

VALDER R. ARRUDA

**DETECÇÃO DE PORTADORAS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR NA HEMOFILIA A EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Unicamp**

Campinas

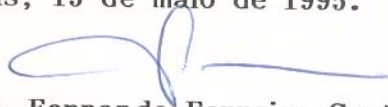
- 1995 -

Ar69d

25997/BC

Este exemplar corresponde a versão final da tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP para a obtenção do título de Doutor em Clínica Médica do Médico VALDER ROBERVAL ARRUDA.

Campinas, 15 de maio de 1995.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'F' followed by a horizontal line.

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Orientador

VALDER R. ARRUDA

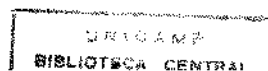
**DETECÇÃO DE PORTADORAS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR NA HEMOFILIA A EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Co-Orientadora: Profa. Dra. Joyce Maria Annicchino Bizzacchi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor
em Clínica Médica

Campinas
1995



95.11.02

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Fernando Ferreira Costa

Co-orientador: Joyce M. Annichino Bizzachi

Membros:

1. Fernando Ferreira Costa [assinatura]
2. Israel Roisemberg [assinatura]
3. Dayse Lourenço [assinatura]
4. Antonio S. Ramalho [assinatura]
5. Sara T. Olalla Saad [assinatura]

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica/Faculdade de
Ciências Médicas da UNiversidade Estadual de Campinas.
Data: 16/05/95

UNIDADE	BC
N.º CAMPUS	JDM/CAMP
N.º	00692
V.º	5
VALOR	2599F
PROZ.	433195
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/05/95
N.º CPD	000.79.286-7

Aos meus pais, Agenor e Maria Elza,

Aos meus tios, Cal e Ana,

Aos meus amigos, Afonso, Aranha e Marilda Gonçalves

Agradecimentos

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, orientador deste trabalho, pelo apoio, confiança e amizade.

À Profa. Dra. Joyce Maria Annicchino Bizzacchi, co-orientadora, pela confiança, estímulo e amizade.

À Profa. Dra. Sara T. O. Saad, pela constante participação e sugestões durante a realização deste trabalho.

À Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, pela ajuda nas várias fases deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Cármino Antonio de Souza e Irene Lorand Metze, pela importante participação em minha formação profissional.

Aos meus amigos, médicos do Hemocentro da Unicamp e residentes da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Ciências Médicas.

À Cármen Lúcia Rodrigues Arruda e à Sandra Souza Andrade, pela importante ajuda, sugestões, elaboração e compreensão durante o desenvolvimento da tese.

A todos os funcionários dos laboratórios de Hemostasia e de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp.

Agradecimentos Especiais

Parte deste trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Trombose e Hemostasia do Hospital Universitário de Leiden, Holanda, a quem agradeço pelas oportunidades oferecidas, especialmente: W. Cynthia Pieneman, Dr. Pieter H. Reitsma, Piëtte P. Deutz-Terlow, Dr. Bert Bakker e Dr. Ernest Briët.

ÍNDICE

I.	Introdução	1
	Hemofilia A	1
	Deteção de portadoras do gene da hemofilia A	3
	O gene do fator VIII	5
	Estrutura e função do fator VIII	6
	Alterações Moleculares no gene do fator VIII	15
II.	Objetivos	23
III.	Casuística e Métodos	24
	a-Casuística	24
	b-Métodos	24
	b1-Avaliação dos parâmetros da coagulação	24
	b2-Extração do DNA genômico	27
	b3-Estudo dos RFLPs para as enzimas BclI e HindIII	28
	b4-Metodologia para a identificação do rearranjo e deficiências gênicas.....	29
	b5-Metodologia para a o estudo do SSCP	32
	b6-Sequenciamento direto dos fragmentos de DNA	37
IV.	Resultados	38
V.	Discussão	73
VI.	Conclusões	81
VII.	Resumo	82
VIII.	Summary	83
IX.	Referências Bibliográficas	84

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária reconhecida desde o século II D.C., em razão do sangramento excessivo dos recém-nascidos após a circuncisão que, em geral, conduzia à morte. A identificação do caráter hereditário e da mulher como transmissora podem já constar nos primeiros relatos da doença (Rosner, 1969). O termo hemofilia foi utilizado inicialmente por Schönlein em 1820 e a descrição clínica da doença e sua relação com a coagulação sanguínea foram realizadas no início do século XIX.

O reconhecimento de dois tipos de hemofilia foi sugerido inicialmente por Pavlovsky (1947) e a distinção entre hemofilia A e B foi feita em 1952 simultaneamente por três grupos independentes (Aggeler *et al*, Biggs *et al*, Schulman & Smith 1952).

A hemofilia A é uma doença caracterizada pela deficiência ou anormalidade da atividade coagulante do fator VIII (FVIII:C) sendo responsável por 80% de todos os casos de hemofilia (Forbes & Madhok, 1991). O gene que controla a produção do fator VIII está localizado no cromossomo X, próximo ao telômero, na região q28, sem homologia no cromossomo Y. Como a hemofilia A é transmitida de forma recessiva ligada ao X e possui baixa frequência populacional, ele afeta quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino. Sua incidência nos diversos grupos étnicos é variável, com valores próximos de um caso para cada 5.000 a 10.000 nascimentos de homens. No Brasil, estudos populacionais revelaram a incidência de 1:10.000 a 1:20.000 para hemofilia A em regiões diferentes (Gonzaga, 1970; Roisenberg, 1971; Melo, 1989). Aproximadamente 30% dos casos de hemofilia não apresentam antecedente familiar da doença, sugerindo que um grande número de mutações *de novo* ocorrem no gene do fator VIII (Haldane, 1935).

A apresentação clínica é heterogênea e está relacionada à atividade coagulante residual do fator VIII. O quadro clínico inclui hematomas, hemorragias musculares e em outros tecidos e cavidades após traumas ou mesmo espontâneas. Os episódios hemorrágicos geralmente têm início com a deambulação. A hemorragia intracraniana no período neonatal é de ocorrência rara (Eyster *et al*, 1978). As hematomas são as complicações hemorrágicas mais comuns do aparelho

locomotor sendo as articulações dos joelhos, cotovelos e tornozelos as mais comumente acometidas. A evolução desses episódios hemorrágicos intra-articulares leva ao desenvolvimento de artropatia crônica e anquilose com perda funcional da articulação (Arnold & Hilgartner, 1977). A hemorragia intracraniana está entre as mais graves complicações que afetam os hemofílicos e foi a principal causa de morte nesta doença até o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida nos anos 80 (MMWR, 1982; Dietrich, 1990; Jones & Ratnoff, 1991; Pinto *et al*, 1992; Ragin *et al*, 1993)

Como anteriormente referido, o quadro clínico é habitualmente relacionado à atividade residual do fator VIII coagulante (FVIII:C), o que faculta a classificação clínica da doença. Os casos graves são representados por atividade residual do FVIII:C inferior a 1%, os moderados por atividades entre 1 e 5% e os casos leves por atividades entre maiores que 5% até 50% (Forbes & Madhok, 1991). Os sangramentos ocorrem espontaneamente nos casos graves e menos comumente nos moderados. Os indivíduos com a forma leve da hemofilia podem apresentar sangramentos somente após intervenções cirúrgicas. Em geral, aproximadamente 50% dos casos de hemofilia são graves. A evolução clínica da hemofilia geralmente é idêntica entre diferentes indivíduos de uma mesma família (Nilsson *et al*, 1961). Na maioria dos casos existe uma correlação direta entre a atividade coagulante e a determinação antigênica do fator VIII. Entretanto, em 5% dos pacientes os níveis antigênicos estão elevados em relação à atividade coagulante, sugerindo uma perda da atividade funcional da molécula sem perda de estabilidade (Hoyer & Breckinridge, 1968). Em 12,9% dos pacientes hemofílicos A brasileiros estudados por Díaz *et al*. foram detectados níveis de fator VIII antigênico (FVIII:C Ag) elevados em relação aos níveis de FVIII:C.

A terapêutica da hemofilia está basicamente fundamentada na administração de concentrados de fatores de coagulação, produzidos a partir do fracionamento do plasma de doadores de sangue. No entanto, esta terapêutica é de alto custo e associada a elevada incidência de doenças infecciosas como hepatites virais e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (Kasper, 1993; Ragni *et al*, 1993; Lusher, 1995).

Aproximadamente 5 a 10% dos pacientes podem desenvolver, com a terapêutica, a formação de alo-anticorpos neutralizantes contra o fator VIII (Shapiro & Siegel, 1991). Dessa forma, o controle dos episódios hemorrágicos é grandemente dificultado, com necessidade do uso de concentrados de complexo protrombínico ativado e programas de imunotolerância prolongados e extremamente dispendiosos (Nilsson *et al*, 1988; Mariani *et al*, 1994; Lusher, 1995). A utilização recente do fator VIII produzido a partir de técnicas de DNA recombinante representa terapêutica segura com relação à transmissão de doenças infecciosas. No entanto, é observada maior incidência de produção de inibidor do fator VIII, o que limitará a sua aplicabilidade terapêutica (Lusher *et al*, 1993; Bray *et al*, 1994).

A detecção de mulheres portadoras do gene para a hemofilia, com objetivo de realizar o aconselhamento genético e o possível diagnóstico pré-natal, representa um aspecto importante na abordagem multidisciplinar da doença (Varekamp *et al*, 1990; Peake *et al*, 1993). Além disso, o reconhecimento das alterações moleculares no gene do fator VIII dos pacientes com hemofilia pode contribuir para um melhor entendimento da estrutura e função da proteína possibilitando o desenvolvimento de concentrados de fator VIII mais efetivos para o tratamento, além de fornecer subsídios para a futura implantação da terapia gênica nessa doença (Toole *et al*, 1984; Vehar *et al*, 1984; Miller, 1990; Hoeben *et al*, 1992; Lusher, 1995).

Deteção de Portadoras do Gene da Hemofilia A

A detecção de mulheres portadoras apresenta dificuldades metodológicas relevantes. Algumas portadoras têm níveis séricos reduzidos do FVIII:C. No entanto, quando o conjunto de portadoras é estudado, existe considerável sobreposição com valores normais, dificultando seu reconhecimento (Graham *et al* 1986; Bunschoten *et al* 1988). A quantificação do antígeno de von Willebrand (vWf:Ag) e o cálculo da relação entre FVIII:C/vWf:Ag eleva muito a sensibilidade dos testes na identificação das portadoras. Também esta relação não é absoluta, pois pode ser alterada por variações fisiológicas no FVIII:C e vWF:Ag decorrentes da idade, grupo sanguíneo ou níveis estrogênicos (Graham *et al*, 1986; Green *et al*, 1986; Fisher *et al*, 1987; Peake *et al*, 1993). Dessa

forma, uma percentagem variável de 10 a 20% das portadoras poderão apresentar resultados dentro da faixa de normalidade, o que acarretará um número apreciável de diagnósticos errôneos.

A clonagem e caracterização do gene do fator VIII por Gitschier *et al* (1984) possibilitaram a análise genética pelo estudo do DNA na detecção de portadoras e diagnóstico pré-natal da hemofilia. Na maioria dos casos de hemofilia a identificação de portadoras foi realizada pelo estudo dos polimorfismos dos tamanhos dos fragmentos do DNA obtidos após a clivagem com endonucleases de restrição (*RFLP-restriction fragment lenght polymorphism*). Estes polimorfismos são provocados por variações naturais na sequência de nucleotídeos no gene ou próximos ao gene do fator VIII, que não afetam a produção da proteína. Estas variações geralmente são de um único nucleotídeo e podem criar ou abolir sítios de reconhecimento de endonucleases de restrição. Os fragmentos originados pela digestão do DNA em estudo com endonucleases de restrição, podem ser analisados por separação em gel de eletroforese de alta resolução. Os diferentes tamanhos dos fragmentos indicam a presença (+) ou ausência (-) de sequências de nucleotídeos reconhecidas pela endonuclease (Weber & May, 1989). Vários polimorfismos intragênicos foram descritos no gene do fator VIII, entre eles podemos destacar o polimorfismo da BclI (intron 18), XbaI (intron 22), Hind III (intron 19), BglII (intron 25) e no intron 7 o polimorfismo G/A.

Além disso, a determinação do número de sequências repetidas de dinucleotídeos (CA) em regiões de íntrons dos genes fornece também a oportunidade do reconhecimento de diferentes alelos. No gene do fator VIII nas regiões dos íntrons 13 e 22 é descrito elevado grau de variabilidade entre os alelos obtidos, com consequente utilidade na detecção de portadoras (Lalloz *et al*, 1994 & Windsor *et al*, 1994a).

Entretanto, alguns fatores limitam a utilização do estudo dos polimorfismos na detecção de portadoras. Entre eles, merece destaque, a grande variabilidade nas frequências dos diferentes polimorfismos entre os vários grupos étnicos estudados. Este fato torna necessária a

caracterização particular dos polimorfismos úteis a serem empregados em cada grupo populacional. Outro fator limitante é a possibilidade de recombinação entre os sítios polimórficos e o local da mutação, o que origina uma chance de erro de 5% nos polimorfismos extragênicos e de 1:1.000 para os intragênicos. Além disso entre os diversos sítios polimórficos pode ocorrer uma ligação genética (*linkage disequilibrium*) limitando, assim, sua utilidade na detecção de portadoras. A necessidade do estudo de várias pessoas das famílias e possíveis erros na paternidade são também fatores que dificultam a utilização segura do estudo dos polimorfismos (Peake *et al*, 1993).

Os casos esporádicos de hemofilia ocorrem entre 30 a 50% da população total de hemofílicos. Nestas famílias, o uso dos polimorfismos podem apenas excluir a transmissão do alelo relacionado à hemofilia e não permite o diagnóstico definitivo da portadora. Adicionalmente, são descritos casos de mosaicismismo na hemofilia A, sugerindo que este mecanismo não seja infrequente, dificultando também o reconhecimento da portadora do gene anormal (Peake *et al*, 1993; Tuddenham, 1994).

Dessa forma, apesar da reconhecida importância dos RFPL a caracterização das alterações moleculares no gene do fator VIII é um passo fundamental para o reconhecimento preciso da portadora do gene para a hemofilia e diagnóstico pré-natal em grande número de casos.

O Gene do Fator VIII

O gene do fator VIII está localizado na região Xq28 e mede 186Kb (fig 1). É constituído por 26 exons que variam de 69 a 3106 pb, separados por 25 íntrons que compreendem 95% do gene (Gitschier *et al*, 1984). Este gene origina um RNA mensageiro (RNAm) de 9 Kb, detectado principalmente nos hepatócitos e também no baço, testículos e linfócitos (Vehar *et al*, 1984) e codifica uma proteína com 2351 aminoácidos que caracteriza o fator VIII (Vehar *et al*, 1984)

Uma sequência característica, denominada *promoter-like "ATA" box*, é encontrada na posição -200 da extremidade 5' e funciona, provavelmente, como elemento promotor do gene.

Entre os exon do gene do fator VIII, existem 2 exons particularmente interessantes pelo grande tamanho. O exons 14 de 3106 pb e o exon 26 com 1958 pb o qual possui 1805 pb que pertencem a extremidade 3' não traduzida. A extremidade 3' contém a principal sequência de poliadenilação AATAAA e a sequência menos conservada CATTG.

A caracterização do gene do fator VIII mostrou que, entre os vários clones utilizados para a determinação da sequências de nucleotídeos, apenas em 2 posições foram identificados diferentes nucleotídeos. Assim, estes dados sugerem fortemente que substituições neutras no gene do fator VIII são incomuns (Gitschier *et al*, 1984) .

Estrutura e Função do Fator VIII

Síntese e Estrutura do Fator VIII

O fator VIII é sintetizado no hepatócito, como um cadeia simples de proteína de 300 kDa com 2351 aminoácidos, constituída de sequências internas homólogas repetidas denominadas domínios A, B e C que adquirem a formação de heterodímeros (Vehar *et al*, 1984). A síntese, o metabolismo intracelular e secreção do fator VIII estão representados na figura 2a.

O fator VIII circula no plasma em associação com o fator de von Willebrand (vWf) por uma ligação não-covalente que tem como consequência a estabilização da molécula e a manutenção da atividade funcional *in vivo* do fator VIII. O fator VIII tem meia-vida de 12 horas e sua concentração plasmática é de 0,01 mg/dl (Wood *et al* , 1984; Toole *et al*, 1984).

Existem 3 subunidades A (A1, A2, A3) compostas de 350 aminoácidos e que apresentam 30% de homologia com os domínios do fator V e da ceruloplasmina. Estas proteínas possuem vários sítios de ligação com o cobre. Esta região é altamente conservada nas diferentes espécies em que o o fator VIII foi estudado e pode estar envolvida na capacidade desta proteína em se ligar ao metal cobre (Vehar *et al*, 1984; Church *et al*, 1984; Kane, 1988) .

As subunidades C1 e C2 contêm 150 aminoácidos e são homólogos a regiões de ligação com lipídeos de aglutininas celulares. Esta homologia sugere que os domínios C podem estar envolvidos na capacidade de ligação do fator VIII com os fosfolipídeos (Poole *et al*, 1981).

O domínio B representa 40% da proteína madura. No entanto, estudos realizados com fator VIII artificialmente deficiente em domínio B, mostraram que a atividade procoagulante é normal (Pittman & Kaufman, 1989). Provavelmente o domínio B seja importante na proteção do fator VIII à ativação pela trombina e na regulação intracelular da síntese e secreção. O domínio B contém 19 dos 25 sítios de asparagina relacionados à glicosilação, ao passo que os domínios A e C contêm 19 dos 23 resíduos de cisteínas (Vehar *et al*, 1984; Wood *et al*, 1984). O arranjo dos domínios da molécula do fator VIII está esquematizado na figura 2b.

Gene do FVIII



Figura 1: Representação esquemática do gene do FVIII identificando os 26 *exons* separados pelas sequências de íntrons. O gene dá origem a um RNA_m de 9 kb que codifica uma proteína com 2351 aminoácidos composta por três domínios (A, B e C).

Os heterodímeros são formados pela clivagem entre os domínios B e A3 gerando a cadeia leve constante (A3, C1, C2) com 80 kDa e a cadeia pesada (A1, A2) de tamanho variável (90 a 210 kDa) dependendo da presença do domínio B. A ligação entre as cadeias leve e pesada é realizada por ligações com metais divalentes (Met^{2+}) entre as subunidades A1 e A3. A análise estrutural por homologia entre os domínios A do fator VIII comparados à proteínas que se ligam ao cobre revelou que são detectados sítios de ligação para o cobre entre as subunidades A1-A3 (Fay & Smudzin, 1992; Fay , 1993; Pan *et al*, 1994).

Ativação do Fator VIII

Os heterodímeros do fator VIII representam a forma inativa da proteína. A ação proteolítica exercida pela trombina e também pelo fator Xa é fundamental para sua ativação (fig. 3). Esta ativação pela trombina envolve a clivagem da cadeia pesada entre a subunidade A2 e o domínio B na posição Arg740 com a origem de uma cadeia de 90 kDa e posterior clivagem entre as subunidades A1 e A2 na posição Arg372 para a formação do fator VIIIa (Eaton *et al* , 1986)

Na cadeia leve a trombina atua na extremidade NH2 terminal na posição Arg 1689, o que representa passo fundamental para a liberação do fator VIII do complexo com o fator de von Willebrand (vWf) permitindo dessa forma a sua participação na ativação da coagulação. Esta ação é potencializada pela presença do vWf (Hill-Eubanks *et al*, 1990). A ligação do fator VIII com o vWf ocorre entre os resíduos 1670-1684 e a ligação com os fosfolípidos nos resíduos 2303-2332 no domínio C2. Estas interações do fator VIII não ocorrem simultaneamente, sugerindo que estes sítios estejam localizados próximos um ao outro na estrutura tridimensional da molécula (Fay, 1993).

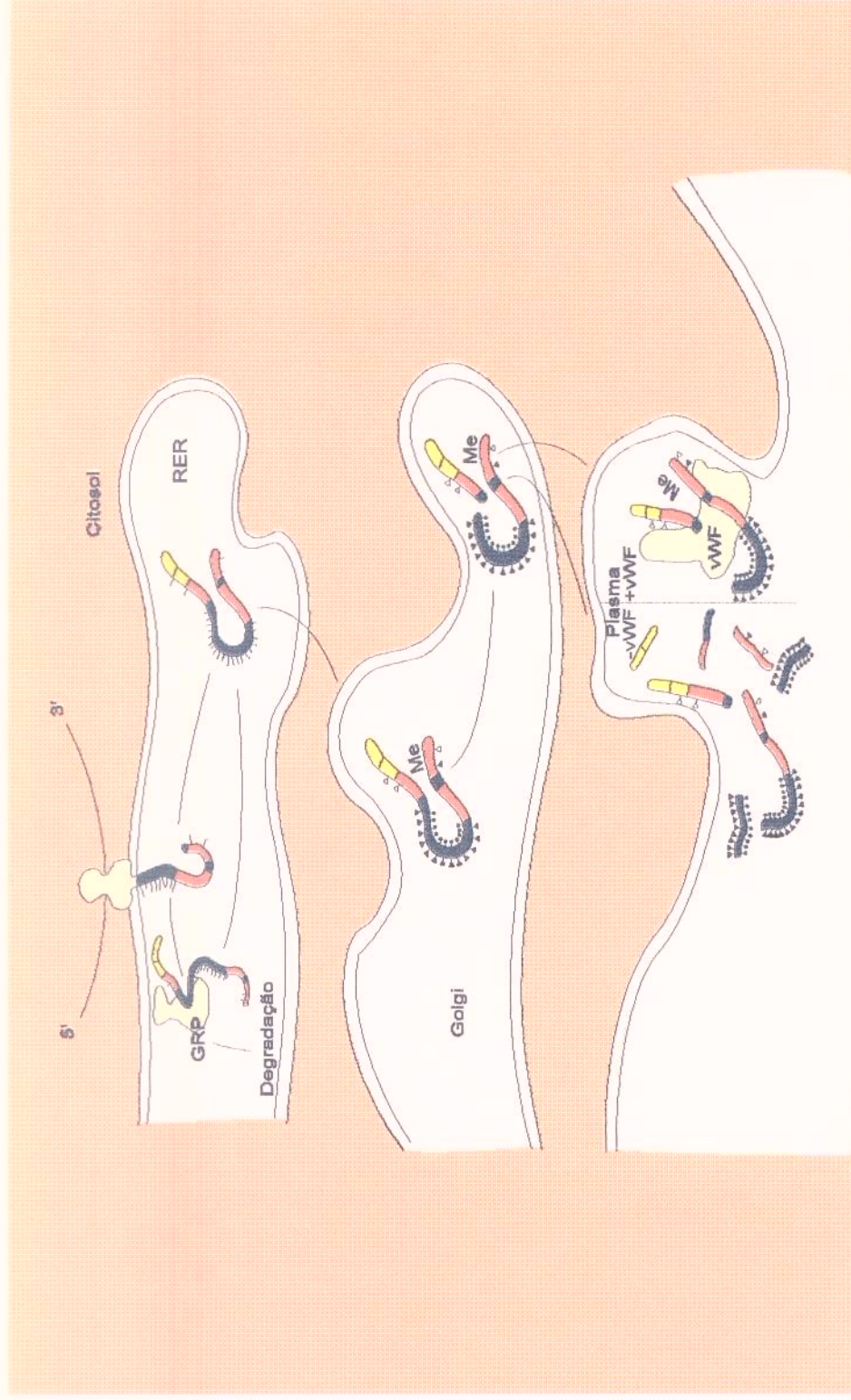


Figura 2a: Síntese, metabolismo e secreção do fator VIII. O produto do fator VIII no retículo endoplasmático rugoso (RER) sofre a glicosilação nos aminoácidos asparagina (▲). Uma fração do fator VIII é ligada à GRP78 (*Glucose-regulated protein*) e posteriormente degradada. A secreção do fator VIII ocorre após a passagem pelo aparelho de Golgi. Nesta fase ocorre a sulfatação nos resíduos de tirosina das cadeias leve e pesada da glicoproteína. Ocorre também a adição de carboidratos aos resíduos de serina e treonina (●). Na presença do fator de von Willebrand (vWF) ocorre a associação entre as cadeias leve e pesada resultando em uma proteína estável e ativa. Na ausência do fator de vWF o fator VIII é secretado em cadeia simples e degradado.

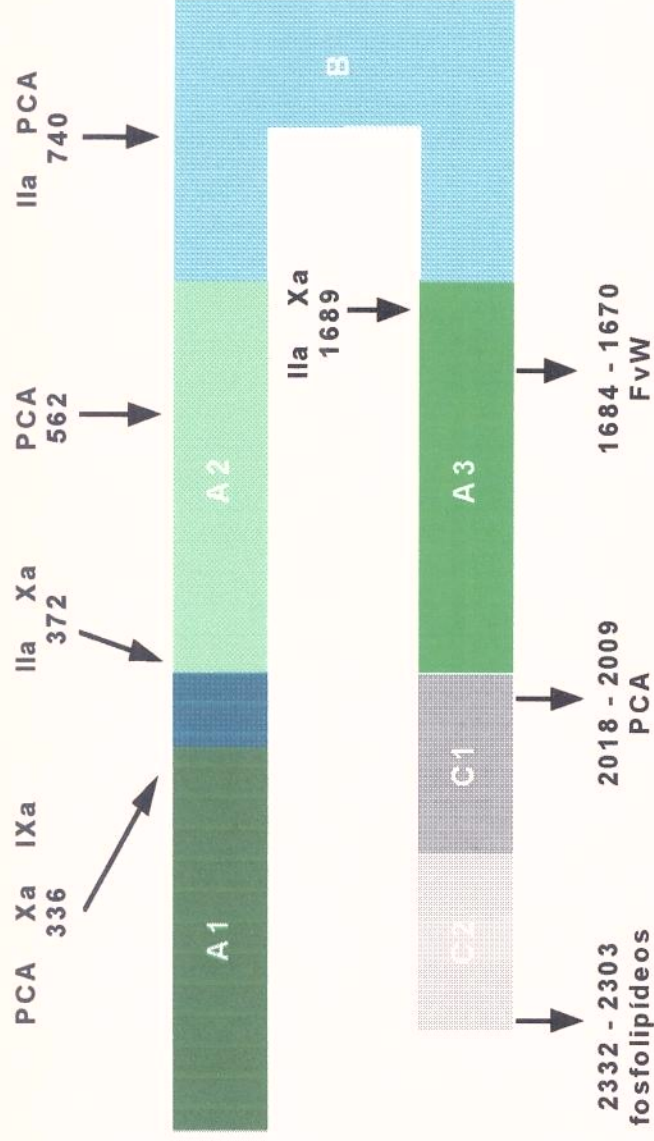


Figura 2b: Representação dos heterodímeros do FVIII. As subunidades A1 e A2 estão separadas por uma região de conexão rica em resíduos ácidos (representado em azul). As setas indicam as posições de clivagem do FVIII pela proteína C ativada (PCA) e pelos fatores Xa, IXa e IIa. A região compreendida entre os resíduos 1670-1684 está envolvida na ligação com a molécula de von Willebrand (FvW). O sítio de ligação com fosfolipídeos está localizado entre os resíduos 2303-2332.

Estudos de mutagênese induzida artificialmente ou mesmo a caracterização de moléculas anormais de fator VIIIa de hemofílicos, permitiram a determinação dos sítios envolvidos na ativação do fator VIII pela trombina (Pittman & Kaufman, 1989, Michnick *et al*, 1994). A substituição de Arg740 e 1648 Ile não interfere com a ativação com a trombina. Por outro lado, a substituição de Arg372, 373 e 1689 resultam em moléculas de fator VIII resistentes à ativação pela trombina apesar de níveis antigênicos normais (CRM+) (Pittman & Kaufman, 1988; Johnson *et al*, 1994). A maioria das mutações descritas nos pacientes hemofílicos CRM+ ocorrem no domínio A2, sugerindo a importância desta região na estrutura terciária da molécula, provavelmente interferindo na ligação do fator VIII com outras proteínas da coagulação. (McGinniss *et al*, 1993).

Inativação do Fator VIII

A forma ativa do fator VIII apresenta grande instabilidade e rapidamente perde sua atividade funcional no plasma. A inativação do fator VIIIa ocorre por um mecanismo independente da trombina. A redução espontânea da atividade do fator VIIIa está relacionada à dissociação da subunidade A2 do dímero A1/A3-C1-C2. Esta dissociação é potencializada por alcalinização no pH e é reversível com a acidificação. Existe em condições normais um equilíbrio entre: $A1/A2/A3-C1-C2 \rightleftharpoons A1/A3-C1-C2 + A2$ (Fay & Smudzin, 1992; Fay, 1993).

Em pH 7,4 a atividade específica do fator VIII correlaciona-se linearmente com a concentração do fator VIII superior a 500nM, que é marcadamente superior à concentração plasmática do fator VIII. Dessa forma, a associação da subunidade A2 com o dímero A1/A3-C1-C2, que forma o fator VIIIa, é dificultada *in vivo* pois predominará a forma dissociada (fig 3). Os sítios de ligação com o cobre existentes entre as subunidades A1-A3 não são detectados entre os domínios A2-A1 do dímero A1/A3-C1-C2 o que pode propiciar a dissociação da subunidade A2 e consequentemente reduzir a estabilidade do fator VIIIa (Fay, 1993; Pan et al, 1994).

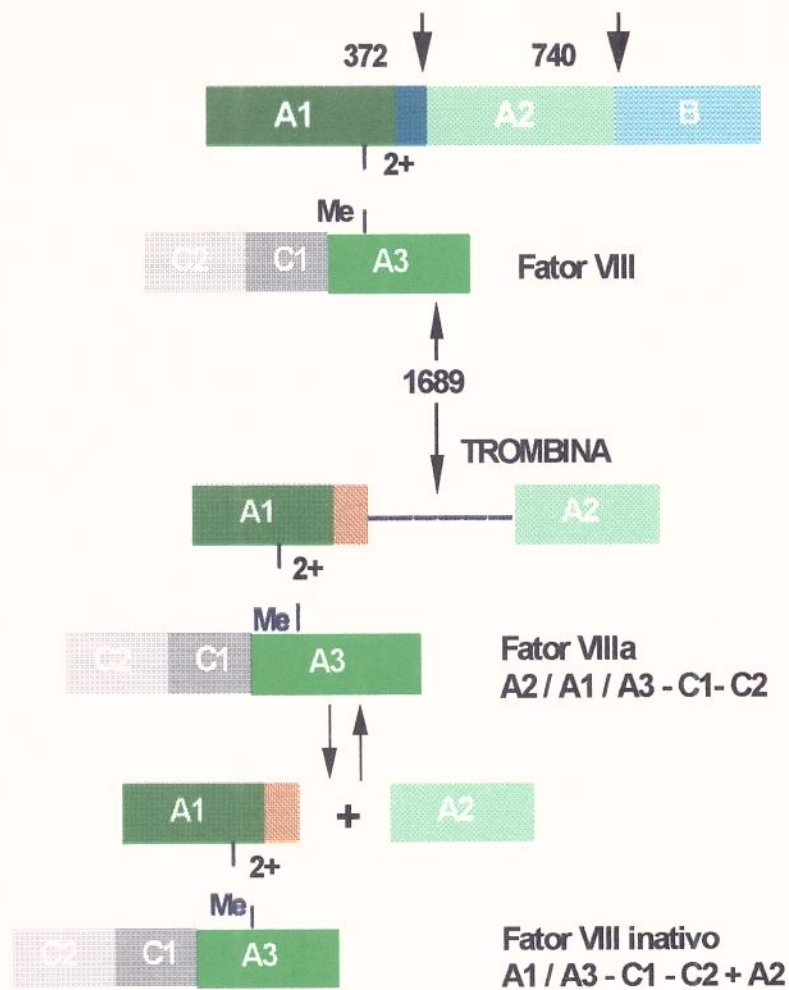


Figura 3: Ativação do fator VIII pela trombina. Os heterodímeros do fator VIII são clivados pela trombina nas posições 372, 740 e 1689. A subunidade A2 está ligada reversivelmente ao dímero formado por A1/A3-C1-C2 formando o fator VIIIa. Quando ocorre a dissociação da subunidade A2, o fator VIII é então inativado.

A proteína C ativada é um potente anticoagulante que integra o complexo mecanismo da coagulação sanguínea. Sua ação anticoagulante é dependente da presença de fosfolípidos, de íons cálcio e resulta na inativação do fator Va e VIIIa. A ação proteolítica ocorre por clivagem na cadeia pesada do fator VIIIa nas posições Arg336 (junção A1-A2) , Arg562 (A2) e Arg740 (junção A2-B) dando origem a fragmentos terminais e intermediários da cadeia pesada. A clivagem que ocorre na Arg562 é mais eficiente quando a subunidade A2 está dissociada da A1, isto é, no fator VIIIa (Walker & Fay, 1992). Provavelmente esta região, à semelhança do que ocorre no fator V, esteja envolvida na afinidade pelo fator IXa e/ou fator X. A importância desta região na atividade funcional é reconhecida pela análise de um paciente com hemofilia A grave (CRM+), com Ile566Thr criando um novo sítio de glicosilação e conjuntamente uma proteína com atividade cofatora deficiente (Aly *et al*, 1992).

As cadeias leves são importantes no mecanismo de inativação do fator VIIIa por permitir a ligação da proteína C ativada na região localizada entre os aminoácidos 2009-2018 na subunidade A3 (região C-terminal). Dessa forma, apenas as cadeias pesadas ligadas às cadeias leves é que são proteolisadas (Walker *et al*, 1990).

Inibidor do Fator VIII

O desenvolvimento de anticorpos contra o fator VIII é observado em 10 a 20% dos pacientes com hemofilia em resposta à terapêutica com concentrados de fatores da coagulação (Shapiro & Siegel, 1991). Os epítomos de inibidor frequentemente estão localizados nas subunidades A2 e C2 do fator VIII. O fator VIII de porco é utilizado como terapêutica nos pacientes com inibidor pois os epítomos de inibidor não são encontrados na proteína de porco (Kasper *et al*, 1993; Mariani *et al*, 1994). Através de estudos de clonagem do fator VIII humano e de porco foi possível a construção de uma proteína híbrida de fator VIII. A subunidade A2 humano foi substituída pela de porco, dessa forma manteve a atividade procoagulante normal na presença de plasma de pacientes hemofílicos com inibidor (Lubin *et al*, 1994).

Alterações Moleculares no Gene do Fator VIII

As alterações moleculares no gene do fator VIII responsáveis pela hemofilia A foram descritas em diferentes regiões do gene e compreendem mutações de ponto, inserções, duplicações, perdas gênicas e rearranjo de sequências do gene do fator VIII (Tuddenham *et al*, 1994).

A identificação das alterações moleculares no gene do fator VIII é dificultada pela grande extensão do gene e pela grande heterogeneidade das mutações descritas em diferentes populações estudadas.

Perdas Gênicas

As primeiras caracterizações moleculares no gene do fator VIII foram realizadas pelo método de *Southern blot* para a detecção de perdas gênicas maiores de 1 Kb. Com esta metodologia foi possível a identificação de perdas gênicas em 5% dos casos de hemofilia A. Em uma recente revisão 78 casos de grandes perdas gênicas mostraram uma elevada heterogeneidade, que variaram de 2 até 210 Kb (Tuddenham *et al*, 1994). A maioria dos casos de grandes perdas gênicas está associada ao fenótipo grave da doença. O desenvolvimento de inibidor do fator VIII é observado em 33% dos casos.

As perdas de pequenas sequências gênicas variam de 1 a 23pb, e é interessante notar o frequente acometimento dos codons 339 e 341. Essas regiões apresentam alta probabilidade de sofrerem mutações pois propiciam o pareamento errôneo de sequências gênicas (Cooper & Krawczak, 1993).

Duplicações

As duplicações gênicas são raramente descritas no gene do fator VIII. Gitschier (1988), relatou um caso de uma mulher com duplicação de 23Kb de uma região do intron 22 do gene do fator VIII, inserida entre os exons 23 e 24. O paciente apresentava grande perda gênica de 39 Kb

compreendendo os exons 23 a 25. Entre os outros familiares estudados foi possível reconhecer que a mãe exibia mosaicismo com o gene normal, o gene com duplicação e o gene com perda de 39 Kb. Provavelmente, o alelo duplicado foi a alteração molecular inicial, dando origem à instabilidade no gene que propiciou a perda gênica relacionada à hemofilia.

Murru *et al* (1990) descreveram uma duplicação do exon 13 em um hemofílico leve resultante de uma recombinação não-homóloga e posterior rearranjo de duas regiões cromossômicas não alinhadas.

Inserções

São reconhecidas inserções de sequências gênicas no gene do fator VIII em 12 casos de hemofilia A grave. Kazazian *et al* (1988) demonstraram que as sequências L1 de 3.8 Kb e 2.3 Kb foram inseridas em distintas regiões do exon 14 no gene do fator VIII em dois pacientes não relacionados e ambos casos esporádicos da doença. A sequência L1 pertence a uma família de elementos repetitivos interpostos ao longo do genoma humano. A estrutura dos elementos L1 sugerem que eles representem regiões homólogas à transcriptase reversa, sendo assim, capazes de retro-transposição. Adicionalmente, inserções no gene do fator VIII são descritas no exon 2 (2 casos), exon 11 (1 caso), exon 14 (6 casos) e 17 (1 caso).

Mutações de Ponto

As mutações de ponto são as alterações moleculares mais frequentes no gene do fator VIII. A distribuição das mutações ocorre em sua maioria no interior dos diversos exons, mas também são encontradas em regiões de excisão dos introns e no interior dos introns. São conhecidas aproximadamente 200 diferentes mutações no gene do fator VIII. A maioria é constituída por mutações de ponto e em sua maior parte são mutações do tipo *missense*. Além disso, são descritas 36 mutações *nonsense* e estão relacionadas aos casos graves de hemofilia. As mutações que

afetam os sítios de excisão dos íntrons foram descritas em 14 casos de hemofilia (Tuddenham *et al*, 1994).

Deteccão de Mutações nos Sítios de CpG

No genoma humano 38% das mutações responsáveis por doenças genéticas foram identificadas em dinucleotídeos CpG. A distribuição dos dinucleotídeos no genoma humano ocorre ao acaso e 1% do genoma é constituído por regiões ricas em CpG que frequentemente estão metiladas. A 5-metil citosina do dinucleotídeo CpG sofre espontaneamente um mecanismo de desaminação que está relacionado à mudança C-T ou G-A (quando a mudança da 5-metil citosina ocorre na hélice de DNA de orientação oposta). Dessa forma, estas regiões são consideradas altamente propensas à ocorrência de mutações de ponto (Cooper & Krawczak, 1993).

No gene do fator VIII existem 71 sítios CpG na região codificadora e 7 desses sítios ocorrem em regiões em que a sequência de nucleotídeos determina locais de corte da endonuclease TaqI localizados nos exons 8, 11, 14, 18, 23, 24 e 26. Assim, foi idealizada uma maneira simples de detectar mutações em regiões CpG, consistindo nas amplificações dessas regiões do gene do fator VIII pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão com a endonuclease TaqI. Esta endonuclease reconhece a sequência TCGA que codifica o aminoácido arginina (Arg). Dependendo da hélice de DNA que é afetada na desaminação da citosina, a mudança CT origina um codon precoce de terminação (*stop codon*). De fato, essas mutações são descritas em pacientes com hemofilia grave. Quando o acometimento é da hélice de DNA de orientação oposta, a mudança GA resulta em uma mutação *missense* originando o aminoácido glutamina (Gln). Esta mutação está associada a casos de hemofilia moderada ou leve. Essas mutações de ponto que afetam sítios da TaqI são responsáveis por 5% dos casos de hemofilia A. Em aproximadamente 90% dos casos de hemofilia A o defeito molecular não é passível de detecção por meio desse procedimento (Casula *et al*, 1990; Pattinson *et al*, 1990; Millar *et al*, 1991; Gitschier *et al*, 1991).

Métodos de Rastreamento de Mutações no Gene do Fator VIII

O desenvolvimento de métodos de rastreamento para a detecção de mutações de ponto permitiram o início intensivo de estudos do gene do fator VIII. Estes métodos em geral incluem amplificações pela PCR das regiões codificadoras, regiões de excisão dos introns, região promotora e sítios de poliadenilização (Grompe, 1993). A eletroforese em gel com gradiente de desnaturação ou DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) foi inicialmente utilizado no estudo do gene do fator VIII por Higuchi *et al.* (1991a, b). Esta técnica é baseada na separação dos fragmentos de dupla hélice do DNA, em um sistema de gel com gradiente linear de agente desnaturante (uréia e formamida). A migração do DNA amplificado depende das sequências de bases que determinam a temperatura de fusão (*melting point*) do fragmento. Assim, se no DNA houver mudança da sequência de bases, haverá alteração nessa temperatura o que, por sua vez, modifica a mobilidade eletroforética, diferenciando-a do padrão normal de migração. O reconhecimento de um padrão anormal de eletroforese é facilitado se for realizada a migração de uma mistura do DNA normal e mutante. Neste caso ocorre a formação de heteroduplex que é a associação complementar entre um fragmento proveniente de um alelo normal e um mutante. No entanto, esta metodologia necessita o desenvolvimento de *primers* contendo fragmentos extras constituídos de 30 a 50 bases CG, o que permite alcançar temperatura de fusão ótima para diferenciar fragmentos normais e mutantes. Cada região do gene é analisada isoladamente e é possível analisar somente um número limitado de amostras em cada eletroforese. Com este tipo de metodologia foi possível a identificação dos defeitos moleculares em 24 de 29 pacientes com hemofilia A moderada-leve e em 50% dos casos graves.

Orita *et al* (1989) desenvolveram uma metodologia baseada na propriedade de que duas hélices simples de DNA obtidas na PCR assumem conformação tridimensional que é dependente da sequência primária de nucleotídeos. Este método denominado como polimorfismo de conformação de hélice simples ou SSCP (single strand conformation polymorphism) permite o reconhecimento de sequências de bases que diferem do normal por apenas um nucleotídeo após eletroforese do produto do PCR em gel de poliacrilamida não-desnaturante contendo glicerol. A

principal vantagem dessa metodologia é a sua simplicidade e sua grande sensibilidade (Grompe, 1993; Sheffield *et al*, 1993). O material a ser analisado é o produto direto do PCR o que possibilita a análise de várias amostras simultaneamente. No entanto, a sensibilidade do SSCP é diretamente relacionada ao tamanho do fragmento a ser analisado. Os fragmentos ideais estão entre 200 a 300 pb sendo que, para fragmentos maiores, é necessário a digestão prévias com endonucleases de restrição. Este procedimento demonstrou-se útil na análise do gene do fator VIII. Lin *et al* (1993) utilizaram o SSCP com amplificações isoladas dos diferentes exons e posterior separação em gel de poliacrilamida não desnaturante. Pieneman *et al* (1995) desenvolveram um metodologia rápida que inclui a realização do SSCP a partir do produto de amplificações simultâneas de 16 exons do fator VIII (*multiplex-PCR*) em apenas 3 reações de amplificação. Estes estudos permitiram a caracterização dos defeitos moleculares em aproximadamente 80% dos pacientes com hemofilia A moderada ou leve e 50% dos casos de hemofilia grave. Na maior parte dos casos, esta técnica utiliza isótopos radioativos. No entanto, em relatos recentes a visualização dos fragmentos do PCR podem ser realizada pela coloração pela prata ou brometo de etídeo, o que elimina a necessidade do uso de material radioativo (Grompe, 1993).

Rearranjo do Gene do Fator VIII

Com aplicação dos métodos descritos nos capítulos anteriores apenas em 50% dos casos de hemofilia A grave foi determinado o defeito molecular. Estes resultados sugeriram que os defeitos moleculares pudessem estar localizados em outros locais, como regiões promotoras ou sequências de íntrons ou mesmo em genes ligados ao fator VIII que pudessem funcionar como fatores de transcrição para a atividade do fator VIII.

Naylor *et al* (1993) usando o DNA complementar (cDNA) do fator VIII obtido a partir da reação mediada pela transcriptase reversa em RNA de linfócitos, demonstrou que em 50% dos pacientes com hemofilia A grave era impossível a amplificação do cDNA entre os exons 22 e 23. No entanto, a amplificação entre os exons 1-22 e também entre os exons 23-26 foram realizadas

obtendo os fragmentos de tamanhos normais esperados. Estes dados sugeriam que provavelmente mutações no íntron 22 eram responsáveis pela hemofilia neste grupo de pacientes.

O gene do fator VIII é constituído em 95% por regiões de íntrons. O íntron 22 é o maior dos íntrons, e compreende uma região de 32Kb (Gitschier *et al*, 1984) . Esta região é particularmente interessante por conter ilhas de dinucleotídeos CpG situados a 10Kb do exon 22. Estas ilhas podem funcionar como regiões promotoras bidirecionais, oferecendo uma oportunidade de caracterização de genes próximos a estas regiões (Lavia *et al*, 1987, Cross *et al*, 1994)). De fato, a partir dessa característica foi possível o esclarecimento de dois genes localizados no íntron 22. Estes gene são denominados gene F8A e F8B (Levinson *et al*, 1990 e 1992) . O gene F8A é transcrito em direção oposta ao gene do fator VIII, não apresenta íntrons e está localizado totalmente no íntron 22. Duas cópias homólogas do gene F8A foram descritas em uma região distante de aproximadamente de 500Kb em direção ao telômero. O gene F8B é transcrito na mesma direção do fator VIII, o primeiro exon do gene B é excisado juntamente com os exons 23-26 do gene do fator VIII. As funções dos genes F8A e F8B ainda não são conhecidas.

Lakich *et al* (1993) utilizando a técnica de *Southern blot* demonstraram que uma recombinação homóloga entre o gene F8A no íntron 22 do gene do fator VIII e uma das cópias do gene próxima ao telômero poderia levar a uma inversão do gene do fator VIII dividindo-o em 2 partes (fig 4). Uma parte contendo a região promotora intacta entre os exons 1-22 e uma segunda parte contendo os exons 23-26. Como o gene B está intacto e é excisado com os exons 23-26 foi possível a obtenção do RNA normal desta região.

Este mecanismo de recombinação homóloga é detectado em 45-50% dos casos de hemofilia A grave. Estes pacientes portanto, representam aquelas mutações não detectadas durante o rastreamento de mutações de ponto (Jenkis *et al*, 1994; Tuddenham *et al*, 1994; Tizzano *et al*, 1994; Windsor *et al*, 1994).

No Brasil são raros os casos de pacientes com hemofilia A em que o defeito molecular foi elucidado (Tuddenham *et al*, 1994).

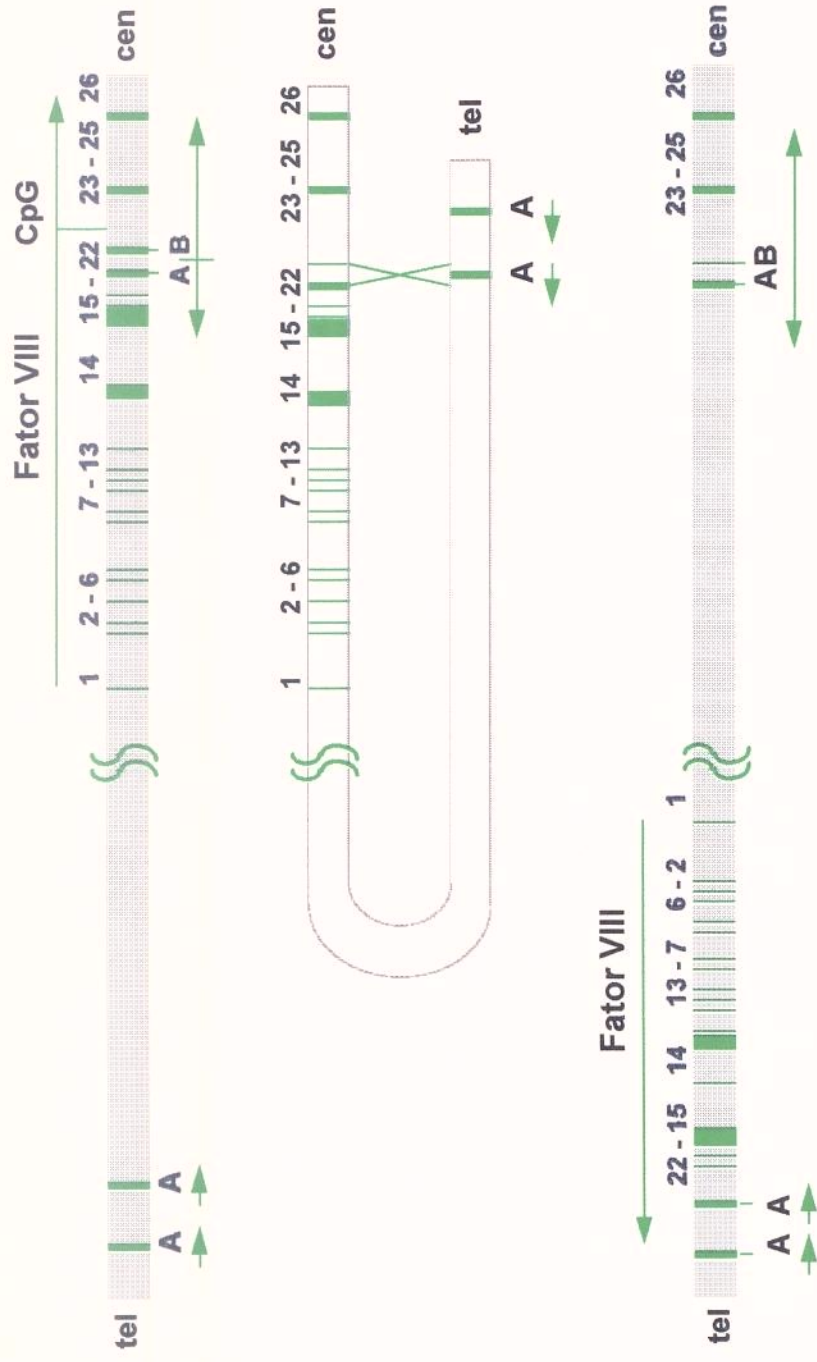


Figura 4: Rearranjo do gene do fator VIII. O diagrama representa a região do cromossomo X que contém o gene do fator VIII. Estão representadas duas cópias do gene A localizadas próximas à região telomérica. A terceira cópia do gene A está localizada próxima ao gene B no íntron 22 do gene do fator VIII. As setas indicam o sentido de transcrição gênica, observa-se que a cópia do gene A no íntron 22 tem o sentido de transcrição oposto às outras cópias e do fator VIII. O modelo sugere um *crossing over* entre as duas regiões idênticas resultando na inversão do gene do fator VIII. A recombinação pode ocorrer em qualquer região homóloga que contenha cópias do gene A.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho consistiram em:

- Detectar as mulheres portadoras do gene da hemofilia em famílias de pacientes com hemofilia A em uma população brasileira, com emprego da análise dos polimorfismos no gene do fator VIII para as endonucleases BclI e HindIII utilizando a técnica da PCR.
- Caracterizar as alterações moleculares no gene do fator VIII em pacientes com hemofilia, A por meio da amplificação dos exons pela PCR em reações da multiplex-PCR, seguida do SSCP não radioativo e posterior sequenciamento.

CASUÍSTICA

Foram estudados quarenta e dois pacientes com hemofilia A acompanhados pela Disciplina de Hematologia-Hemoterapia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, da Escola Paulista de Medicina e do Hospital Brigadeiro de São Paulo. Os dados referentes aos pacientes estudados estão relacionados nas tabelas 1 e 2.

O estudo familiar compreendeu um total de 106 indivíduos originários de 24 famílias de pacientes com hemofilia A, distribuídas entre 16 caucasóides e 8 constituídas de negróides.

O grupo controle consistiu de 30 indivíduos negróides brasileiros clinicamente normais (17 homens e 13 mulheres) para o estudo dos RFPLs das endonucleases BclI e HindIII. E adicionalmente 160 indivíduos normais (100 caucasóides e 60 negróides) foram estudados para o rastreamento da transição A→G na posição 2238 do gene do fator VIII.

MÉTODOS

Avaliação de Parâmetros da Coagulação

O diagnóstico de hemofilia A foi levado a efeito através dos dados clínicos e laboratoriais como descritos a seguir:

O sangue para a análise dos parâmetros da coagulação foi colhido na proporção de 4,5 ml de sangue para 0,5 ml de citrato de sódio a 3,8%.

O tempo de tromboplastina parcial ativado foi realizado em 100µl plasma citratado, procedendo-se a ativação pela adição de 100µl de caulim e 100µl de cefalina preparada a partir de extrato de cérebro humano (Proctor & Rapaport, 1961). Os resultados obtidos foram expressos em relação ao tempo de coagulação de um *pool* de plasmas de 20 a 30 indivíduos normais.

Tabela 1: Classificação Clínica e Laboratorial dos Pacientes com Hemofilia A Grave

PACIENTE	RAÇA	FVIII:C	CLASSIFICAÇÃO	INIBIDOR DO FATOR VIII
			CLÍNICA	(Unidade Bethesda/ ml)
HA1	C	< 1%	GRAVE	-
HA2	C	<1%	GRAVE	-
HA3	C	<1%	GRAVE	18 UB/ml
HA4	N	<1%	GRAVE	-
HA5	C	<1%	GRAVE	-
HA6	C	<1%	GRAVE	-
HA7	N	<1%	GRAVE	-
HA8	C	<1%	GRAVE	-
HA9	N	<1%	GRAVE	-
HA10	N	<1%	GRAVE	-
HA11	C	<1%	GRAVE	10 UB/ml transitório
HA14	C	1%	GRAVE	-
HA17	N	<1%	GRAVE	-
HA20	N	<1%	GRAVE	-
HA27	C	1%	GRAVE	-
HA34	C	<1%	GRAVE	-
HA35	C	<1%	GRAVE	-
HA36	C	<1%	GRAVE	24 UB /ml
HA37	C	<1%	GRAVE	-
HA40	C	<1%	GRAVE	-
HA41	C	<1%	GRAVE	7 UB/ml

C-caucasóide

N-negróide

Tabela 2: Classificação Clínica e Laboratorial dos Pacientes com Hemofilia A Moderada - Leve

PACIENTES	RAÇA	FVIII:C	FvW:Ag	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA	INIBIDOR DO FATOR VIII (Unidade Bethesda/ml)
HA12	C	5,0%	128%	leve	-
HA13	C	3,5%	93%	moderada	-
HA15	C	1,2%	74%	moderada	-
HA16	C	7,8%	NR	leve	-
HA18	N	4,5%	94%	moderada	-
HA19	C	2,6%	125%	moderada	< 5U Bethesda/ml
HA21	C	9,0%	87%	leve	-
HA22	C	2,0%	133%	moderada	-
HA23	C	12%	164%	leve	-
HA25	C	4,5%	71%	moderada	-
HA26	C	2,5%	100%	moderada	-
HA29	N	8,0%	181%	leve	-
HA30	N	1,3%	92,5%	moderada	-
HA31	N	7,5%	178%	leve	-
HA33	C	2,0%	233%	moderada	-
HA39	C	4,0%	NR	moderada	-
HA44	C	14,0%	150%	leve	-
HA45	N	1,0%	173%	moderada	-
HA46	C	1,5%	96,5%	moderada	-
HA49	C	5,0%	79%	moderada	-
HA52	C	11,0%	200%	leve	-

C-caucasóide N-negróide NR = Não Realizado

O tempo de protrombina foi realizado em 100µl plasma citratado, com 100 µl de tromboplastina de cérebro humano, segundo o método de um estágio (Quick *et al*, 1935). Os resultados foram expressos pela relação entre o tempo obtido com o plasma do paciente e entre o de um *pool* de plasmas de um grupo de indivíduos normais e posteriormente corrigido pela tromboplastina de referência internacional e expresso em RNI (relação de normatização internacional).

O tempo de sangramento foi levado a efeito com a utilização do método de Ivy . Os resultados foram expressos em minutos e baseados na observação de duas pequenas incisões na região anterior do antebraço.

A dosagem do fator VIII:C foi feita utilizando um plasma artificialmente deficiente em fator VIII, pelo método de correção do tempo de tromboplastina parcial ativado (Proctor & Rappaport, 1961). Os resultados foram expressos em porcentagem.

A pesquisa e quantificação do inibidor do fator VIII foi conduzida em plasma citratado, pelo método de Kasper *et al* (1975). Um volume igual de plasma do paciente e de um pool de indivíduos normais foram incubados por 2 horas a 37°C em tampão imidazólico 0,05M pH 7,3 contendo 0,585 gramas de NaCl por 100ml. Após a incubação mediu-se a atividade coagulante residual do FVIII:C. Os resultados foram expressos em unidades Bethesda por ml

Nos casos de hemofilia A moderada ou leve o diagnóstico diferencial com a doença de von Willebrand foi realizado através da quantificação imunológica do antígeno de von Willebrand (vWf:Ag) pelo método de imunoeletroforese em placa de agarose a 1% (Laurel , 1966) .

Nas tabelas 1 e 2 estão relacionadas as classificações clínicas e laboratoriais dos pacientes estudados.

Extração do DNA Genômico

O DNA foi isolado de leucócitos a partir de 10-20 ml de sangue venoso coletado em EDTA 10% (sal dissódico do ácido etilenodinitrotetracético) (Maniatis *et al*,1989). O sangue foi

inicialmente centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos. Para a lise de hemácias foi adicionado solução de NH_4Cl 0,144M (cloreto de amônio) na proporção de 5 vezes o volume de células e solução de NH_4HCO_3 0,01M (bicarbonato de amônio) na proporção de 0,5 vezes o volume de células. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e seguida de centrifugação por 15 minutos a 2.5000 rpm a 4°C. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10ml de tampão contendo NaCl 0,3M, EDTA 10mM, Tris/HCl pH 7,5 10mM, Uréia 7M, SDS (duodecil sulfato de sódio 0,5%) e incubado a 37°C por aproximadamente 16 hs.

Após a incubação foram realizadas três extrações com igual volume de mistura contendo fenol (redesilado e saturado em Tris/HCl pH8,0 200Mm contendo 0,1% de hidroxiquinolina) clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 5.000rpm durante 15 minutos. Ao final a camada superior contendo o DNA foi transferida para um novo tubo e realizada nova extração apenas com clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e acetato de sódio 3M (10% do volume).

O DNA precipitado foi lavado em etanol a 70% para eliminar resíduos de fenol e sal e posteriormente diluído em água estéril ou solução de TE (Tris pH 8,0 10mM; EDTA 0,1mM pH 7,4). A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro pela leitura das densidades ópticas nos comprimentos de onda de 260 e 280nm em luz ultravioleta. (Maniatis et al, 1989)

Estudo dos Polimorfismos de Restrição para as Enzimas BclI e HindIII no Gene do Fator VIII.

Amplificação das Amostras

As amostras de DNA estudadas foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki *et al*, 1988).

As reações foram realizadas num volume final de 30 µl contendo 500ng de DNA genômico, 10mM Tris-Hcl pH 8,5, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1,0 mM de cada deoxi-nucleotideo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 400ng de cada *primer* e 2U de Taq DNA Polimerase. As amostras foram desnaturadas inicialmente por 5 minutos a 94°C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação de 1 min a 94°C, *anelling* de 2 min a 55°C e aquecimento a 72°C por 2 min . A reação foi realizada em um ciclador automático de temperatura (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA).

Foram estudados os RFLPs das enzimas BclI e Hind III para o gene do fator VIII. Os *primers* utilizados para o polimorfismo da BclI foram: 5'-TAAAAGCTTTAAAATGGTCTAGGC-3' e 5'-TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTTC-3' e para a detecção do polimorfismo da Hind III os *primers* 5'-TTGGCGAGCATCTCAATGCT-3' e 5'-CTAATGTGTGTCCAGAAGCCAT-3' (Peake *et al*, 1993).

O material amplificado foi digerido com as respectivas enzimas de restrição e o produto separado em gel de poliacrilamida a 12% para a reação da BclI e em gel de agarose a 2% para a Hind III e então visualizado sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

Identificação do Rearranjo e Deficiências Gênicas do Gene do Fator VIII

Digestão do DNA Genômico , Separação em Gel de Agarose e Southern Blot.

A partir de 5 ug do DNA genômico foi realizada a digestão com a endonuclease de restrição BclI de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante (*New England Biolab, Beverly, MA, USA*). Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,5% usando o DNA λ digerido com a enzima HindIII como marcador de peso molecular. O tampão TEA (Tris-Acetato 0,04M; EDTA 0,01M pH 8,3) foi utilizado na preparação da agarose e na eletroforese realizada em cuba horizontal por 36hs, na potência de 25 a 30 V à temperatura ambiente .

Após a corrida eletroforética o DNA contido no gel foi visualizado em luz ultravioleta após coloração com solução de brometo de etídio (0,5mg/ml). O gel foi então submetido ao tratamento com NaOH 0,4N para a desnaturação da hélice dupla de DNA. As lavagens foram realizadas em duas etapas de 15 minutos, sob leve agitação constante à temperatura ambiente. A transferência do DNA para a membrana de nylon (*Hybond N+*, *Amersham, England*) foi realizada usando NaOH 0,4N como solução de transferência durante um período de 4 a 6 horas a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada por 2 minutos em solução de SSC 2X (NaCl 3M; citrato de sódio 0,3M).

Pré-Hibridização e Hibridização das Membranas

A membrana contendo o DNA em hélice simples foi colocada em recipiente plástico contendo de 15 ml de solução de 0,25M NaPi; 0,25M NaCl; 7% SDS; 1mM EDTA e 10% Polietilenoglicol (PEG-6000). Esta incubação foi realizada por 10 a 20 minutos a 65°C sob suave agitação. Posteriormente foi adicionado a sonda específica para o gene em estudo e a hibridização realizada por 16 hs a 65°C.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas a 65°C por etapas de 15 minutos em solução de 2X SSC e 0,1% SDS, 15 minutos em solução de 1X SSC e 0,1% SDS e lavagens adicionais em soluções de 0,3X e 0,1X SSC e 0,1% SDS. O controle da presença de radioatividade inespecífica, foi realizada pelo monitoramento com contador Geiger.

As membranas foram submetidas a lavagem por 5 minutos em solução de SSC 2X, secas e envoltas em filme de plástico e colocadas em cassetes contendo filme *KODAK X-OMAT*. O filme foi revelado após 16hs de exposição a -70°C para a primeira avaliação, e se necessário após prolongada exposição por 7 a 14 dias.

O tamanho dos fragmentos foi determinado pela análise do gráfico contendo a distância das bandas a partir do ponto de aplicação versus a curva padrão do marcador de peso molecular, medidas em centímetros.

Marcação das Sondas

As sondas utilizadas neste estudo foram amplificadas em experimentos de transformação bacteriana (Maniatis *et al*, 1989) utilizando-se células competentes. Após cada transformação foram realizadas preparações de DNA conforme indicações de preparações de plasmídeos (plasmid maxi preparations-QUIAGEN KIT). As sondas usadas foram obtidas a partir do cDNA FVIII e cedida gentilmente pela Dra J Gitschier (*Howard Hughes Medical Institute, San Francisco, USA*) e a sonda probeA oferecida pelo Dr Bert Baker (*Sylvius Laboratory - Department of Anthropogenetic - Leiden- The Netherlands*).

As sondas foram marcadas com α fósforo 32 utilizando-se o sistema *Megaprime DNA Labelling* (Amersham, England). Nessa técnica o DNA é desnaturado e misturado a primers (iniciadores) com molaridade elevada, e a enzima *Klenow*, uma DNA polimerase I, que perde a atividade exonucleásica 5'→3'. Devido a ausência desta atividade, os nucleotídios radiativos incorporados durante a marcação não são liberados como monofosfatos. A reação foi realizada utilizando-se 10ng da sonda em quantidade de água destilada estéril para um volume de 11 μ l. O DNA foi desnaturado a 100°C juntamente com 2 μ l de uma mistura de *primers* e posteriormente deixado a temperatura ambiente até o esfriamento. Após esse período, foi adicionado 4 μ l de uma mistura nucleotídios (dATP, dGTP, dTTP), 1,5 a 2 μ l de 32 P-dCTP, 1 μ l da enzima *Klenow* (5U/ μ l) em um volume final de 20 μ l. A reação foi incubada durante 10 a 15 minutos a 37°C ou 3 horas a temperatura ambiente e finalizada pela adição de 20 μ l de uma solução de EDTA 25mM, 2% Dextran azul e 0,2% de Fenol vermelho.

Após a marcação, a sonda foi purificada em coluna de Sephadex G-50 para a remoção de nucleotídeos não incorporados. O controle da incorporação e da medida da radioatividade foram realizados em detector de emissão beta.

Deteção do Polimorfismo de Conformação em Hélice Simples (SSCP).

Amplificação das Amostras

As amostras de DNA estudadas foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões codificadoras e regiões de excisão dos introns dos 26 exons do gene do fator VIII.

As reações foram realizadas em volume final de 30 µl contendo 500ng de DNA genômico, 54mM Tris-Hcl pH 8,8; 5,4 mM MgCl₂, 5,4µM EDTA, 13,3 mM (NH₄)₂SO₄, 10% DMSO, 8mM β-mercaptoethanol, 0,4 mg/ml BSA, 0,8 mM de cada deoxi-nucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) e 400ng de cada *primer* e 2U de Taq DNA Polimerase.

Diferentes combinações de *primers* foram utilizadas para a amplificação simultânea dos exons (*multiplex-PCR*). As sequências dos vários *primers* utilizados na amplificação do gene do fator VIII estão relatadas na tabela 3. As combinações foram padronizadas de acordo com o tamanho das regiões amplificadas e o padrão obtido pelas hélices simples do DNA amplificado no gel de poliacrilamida não-desnaturante. Para a análise do SSCP é necessário que os fragmentos de sequências de DNA sejam inferiores a 300pb. Dessa forma, foi possível quatro combinações que permitiram a amplificação de 19 exons:

- Combinação A: exons 5-12-22-23-24-25
- Combinação B: exons 2-3-4-6-7
- Combinação C: exons 11-15-16-20-21
- Combinação D: exons 10-19-26

A amplificação dos exons 8 e 9, 17 e 18 foi realizada conjuntamente e com posterior digestão com endonucleases DdeI e TaqI, respectivamente, para obtenção de pequenos fragmentos apropriados para o SSCP.

A amplificação do exon 1 foi realizada isoladamente e um fragmento de 608pb foi obtido e posteriormente digerido com a endonuclease MvaII.

O exon 14 devido à sua grande extensão, 3.000pb, foi amplificado em três diferentes reações com fragmentos de aproximadamente de 1.000pb e posterior digestão com enzimas de restrição.

A amplificação do exon 13 foi realizada isoladamente por necessitar de temperatura de *annealing* de 53°C.

A tabela 4 mostra os dados referentes aos produtos da PCR correspondentes aos diversos exons e dos fragmentos obtidos após a digestão com as diversas endonucleases

TABELA 3: SEQUÊNCIA DOS PRIMERS PARA O ESTUDO DO GENE DO FATOR VIII

EXON	SEQUÊNCIA	SENSE/ANTISENSE	PRODUTO DO PCR (pb)
1	5'-GCTCCTGTTCACTTTGACTT-3' 5'-AGCATCCACAACCATCCTAAC-3'	5' 3'	608
2	5'-TGAAGTGTCCACCAAAATGA-3' 5'-TACCCAATTTCATAAATAGC-3'	5' 3'	207
3	5'-GTACTATCCCCAAGTAACCT-3' 5'-TATTCATAGAATGACAGGAC-3'	5' 3'	208
4	5'-ACAGTGGATATAGAAAGGAC-3' 5'-TGCTTATTTTCATCTCAATCC-3'	5' 3'	295
5	5'-CTCCTAGTGACAATTTCTTA-3' 5'-AGCAGAGGATTTCTTTTCAGG-3'	5' 3'	187
6	5'-CATGAGACACCATGCTTAGC-3' 5'-CTGGTGCTGAATTTGGAAGA-3'	5' 3'	220
7	5'-TCAGATTCTCTACTTCATAG-3' 5'-GAAACTGTGCAAGGTCCATC-3'	5' 3'	225
8	5'-CTCTGGTATAGGACAGCCTA-3' 5'-AGAGAGGTA CAATAGTCAAA-3'	5' 3'	356
9	5'-AGAGTTGGATTGAGCCTAC-3' 5'-CAGACTTTTCTTCTTACCT-3'	5' 3'	284
10	5'-AGCCTCAAATTACTATAATG-3' 5'-ACTTTAGACTGGAGCTTGAG-3'	5' 3'	347
11	5'-CATGATTATCAATATGTGGC-3' 5'-GGATCCGACATACACTGAGA-3'	5' 3'	334
12	5'-CTAGCTCCTACCTGACAACA-3' 5'-GACATCACTTTGATTACATC-3'	5' 3'	283
13	5'-CATATAATAATTCCTAATTG-3' 5'-AGAGCATACGAATGGCTAGT-3'	5' 3'	368
14A	5'-GAGAACCTCTAACAGAACGT-3' 5'-CTGTTGGACCATTTCCATGT-3'	5' nc3444	1252
14B	5'-TATGCTCCAGTACTTCAAGA-3' 5'-AGATGAGAAGAGTTGTCTTG-3'	c 3937 nc 4454	1085
14C	5'-ATTGCAAAAGGTATCATCATT-3' 5'-AGCAGAGCAAAGGAATAACC-3'	c 4375 3'	1029
15	5'-CACCTAGGAAAAATGAGGATG-3' 5'-AGTGGGAATACATTATAGTC-3'	5' 3'	314
16	5'-AGCATCCATCTTCTGTACCA-3' 5'-TTGCACGTAGGATAAATATC-3'	5' 3'	456
17-18	5'-AATCCACTCTGGTTCATAGG-3' 5'-ACTGATTGTGTTCCAGTGC-3'	5' 3'	778
19	5'-GCAAGCACTTTGCATTGAG-3' 5'-GCTGAGTAGGTAGGGAACCT-3'	5' 3'	197
20	5'-TTGTGCACTCTAGTTACTGT-3' 5'-ATAATCAGCCCAGGTTCTTG-3'	5' 3'	155
21	5'-GACTAACCCAGCTGAATTTA-3' 5'-GAGTGAATGTGATACATTTC-3'	5' 3'	181
22	5'-TCAGGAGGTAGCACATACAT-3' 5'-GTCCAATATCTGAAATCTGC-3'	5' 3'	288
23	5'-CTCTGTATTCACTTTCCATG-3' 5'-GATATTGGATGACTTGCCAC-3'	5' 3'	214
24	5'-GCTCAGTATAACTGAGGCTG-3' 5'-CTCTGAGTCAGTTAAACAGT-3'	5' 3'	249
25	5'-GAATTTCTGGGAGTAAATGG-3' 5'-GCTTACCTTTTACTTTGCCAT-3'	5' 3'	322
	5'-GGATTCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGGCA-3'*	5'	
26	5'-ACTGGAAACAACCTAGAAGTG-3' 5'-TTAGCACAAAAGGTAGAAGGC-3'	5' 3'	317

*Sequência do primer mutante para a amplificação de um fragmento do exon 25 com sítio artificial de clivagem para a endonuclease BsrDI.

Tabela 4: Relação dos exons e endonucleases utilizadas para a obtenção dos fragmentos do produto do PCR para a análise do SSCP

EXON	ENDONUCLEASES	PRODUTO DO PCR (bp)
1	MvaI	283,147,101,77
8-9	Dde I	227, 185,177,163,77
14 A	AvaII, HindIII, BstNi	290,248,245,166,138, 87,60
14 B	AvaII, RsaI	343,279,199,169,66,29
14 C	BstNi	321,253,169,160,78,48
17-18	TaqI	320,249,209

Preparação das Amostras

As amostras da PCR foram diluídas em uma solução de formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%, na proporção 1:4, e posteriormente desnaturadas a 80°-100°C por 5 minutos. Desta solução 1µl foi aplicado em gel com auxílio de um instrumento apropriado.

Análise do SSCP Não-radioativo

A análise do SSCP foi realizada no sistema de eletroforese *PhastSystem® Pharmacia* (*Pharmacia, Sollentuna, Sweeden*). As condições de eletroforese foram 25 V por 2 horas à 15° C. Os fragmentos de DNA foram visualizados pela coloração do gel com a prata que consistia em banhos consecutivos em 20% de ácido tricloroacético (5 minutos à 20°C), 5% glutaraldeído (5 minutos à 50°C), água (duas lavagens de dois minutos à 50°C), 0.4% AgNO₃ (8 min à 40°C), água (duas lavagens de 30 segundos cada à 30°C), 2.5% Na₂CO₃ -0.013% formaldeído (4 minutos at 30°C) and 5% ácido acético (2 minutos à 50°C).

Análise do SSCP Radioativo

As ampliações das regiões do gene do fator VIII foram realizadas similarmente ao anteriormente descrito, com adição de 1ul de 32 P-dCTP.

As combinações utilizadas e os exons amplificados foram:

- Combinação A: exons 2-3-4-6-9-10-23-24.
- Combinação B: exons 5-7-12-20.
- Combinação C: exons 11-15-19-21.

Os exons restantes foram amplificados e analisados separadamente, como descrito anteriormente. O exon 14 foi amplificado em 3 diferentes reações. As amostras a serem analisadas eram diluídas 1:40 em uma solução de SDS/EDTA e posteriormente diluída v/v com uma solução de 95% de formamida, 20mM de EDTA, 0,05% de xilenocianol e 0,05% azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 8% não-desnaturante contendo 10% de glicerol em tampão Tris-EDTA-borato (Tris 0,89M, ácido bórico 0,89M e EDTA 20mM) em placas de 33x38 e 33x40 cms com espessura de 0,4mm. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente (20°C) a 20W durante 17 horas. Posteriormente o gel era fixado em uma solução de 10% metanol e 10% ácido acético, seco a 80°C e colocado em um cassete com filme de raio-x. A autorradiografia habitualmente era revelada após uma exposição de 16 horas a -70°C.

Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados

Purificação do DNA

O produto do PCR a ser sequenciado foi purificado por separação em gel de agarose 0,9% de acordo com Maniatis *et al*, 1989 (*Ultra low gelling temperature-Sigma Chemical Co, St. Louis, USA*).

Reação de Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos do PCR obtidos na amplificação simétrica do DNA foi realizado utilizando-se o fragmento *Klenow* da polimerase (Sanger *et al*, 1977).

Ao DNA purificado foi adicionado 3pMol do primer, 1,5µl de tampão 10X e 7,5µl de água estéril. Esta mistura foi incubada a 100°C por 5 minutos e colocada no gelo imediatamente. A seguir, foi adicionado 1,5 a 2µl de ³⁵S dATP e 1µl da enzima Klenow (2U/µl) possibilitando o início da síntese da hélice complementar. Dessa solução final um volume de 3µl foi distribuído em 4 tubos separados contendo cada uma quantidades limitadas dos diferentes 2'3'-dideoxynucleotídeos 5'-trifosfatos (ddATP,ddGTP,ddCTP,ddTTP) e incubado a 37°C por 20 minutos. A adição dos dideoxynucleotídeos trifosfatos provoca a terminação das cadeias sintetizadas. Após esta etapa, foi adicionado aos tubos um volume de 1,5µl de uma mistura de deoxynucleotídeo (0,125mmol/l de cada dATP,dCTP,dGTP,dTTP) e incubado a 37°C por 15 minutos. O excesso de dNTP produz a polimerização das cadeias sintetizadas em que nenhum ddNTP foi incorporado. As reações foram interrompidas pela adição de 4µl de uma solução de formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05% (*Sequence kit,Boehring-Mannheim, , Mannheim Germany*).

O gel de sequenciamento consistia em gel de poliacrilamida 8% em tampão de Tri-EDTA-borato TEB (Tris 0,89M, ácido bórico 0,89M e EDTA 20mM), uréia 8M em placas de 33x38 e 33x40 cms com espessura de 0,4 mm.

Aproximadamente 4µl do produto da reação do sequenciamento foi desnaturado a 100°C por 5 minutos e aplicados no gel. O tampão utilizado na eletroforese foi o TEB IX, com a eletroforese realizada a 60W por 2 a 3 horas à temperatura ambiente. O gel era fixado por 20 minutos em um solução de 10% metanol e 10% de ácido acético, seco a 80°C e colocado em um cassete com filme de raio-x. A autorradiografia foi revelada após 16 horas de exposição à temperatura ambiente.

Resultados

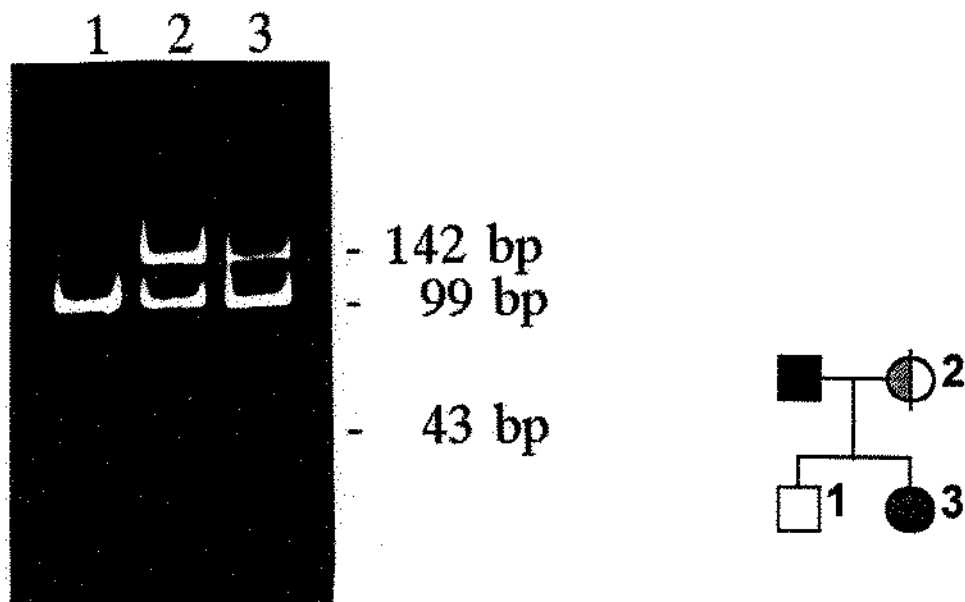
1. Polimorfismos de Restrição (RFLPs) para as Enzimas BclI e HindIII no Gene do Fator VIII em uma População Negróide Brasileira:

Inicialmente foi levado a efeito um estudo dos RFLPs para as enzimas BclI e Hind III no gene do fator VIII em indivíduos controles negróides brasileiros do Estado de São Paulo com o objetivo de avaliar sua frequência alélica nessa população. Foram avaliados 43 cromossomos (15 homens/ 14 mulheres) para o polimorfismo da BclI (íntron 18) e 32 (16 homens/8 mulheres) para a enzima Hind III (íntron19). Os resultados obtidos revelaram a ausência do sítio polimórfico (-) para a BclI em 84% dos cromossomos analisados e a presença (+) do sítio polimórfico em 16%. Para a Hind III, o alelo (+) foi detectado em 81% dos cromossomos e em 19% o alelo (-). A prevalência de heterozigotas para os polimorfismos da BclI e HindIII foi de 0,27 e 0,16, respectivamente. Os números de heterozigotas obtidos neste estudo não foram significativamente diferentes daqueles esperados para a BclI ($\chi^2_{(2)} = 0,068$; $0,70 < p < 0,80$) e HindIII ($\chi^2_{(2)} = 1,30$; $0,20 < p < 0,30$). Também não foram observadas diferenças entre os resultados em homens e mulheres (Arruda *et al*, 1993).

1.2. RFLPs no Reconhecimento das Portadoras do Gene Ligado à Hemofilia

A figura 5 exemplifica a análise do RFLP para a enzima BclI no íntron 18 do gene do fator VIII. O produto do PCR é de 142bp e após a digestão com a enzima observa-se que a presença do sítio de restrição (+) gera dois fragmentos de 99 e 43 pb e a ausência (-), o fragmento de 142 pb. Neste exemplo, o paciente hemofílico (1) tem o alelo (+), a mãe (2) é heterozigota (+/-) dessa forma, nesta família o alelo ligado à hemofilia é o alelo (+). A irmã (3) é homozigota para o alelo polimórfico (+/+). Podemos concluir que a irmã recebeu da mãe o alelo ligado à hemofilia, portanto é portadora do gene anômalo. Esse resultado indica que o estudo do RFLP foi informativo nessa família.

Figura 5



Na figura 6 estão representados os resultados da análise da amplificação de uma região do intron 19 para o estudo do polimorfismo da *Hind III*. O fragmento amplificado é de 730pb. Após a digestão com a enzima de restrição, a presença de um sítio comum em todos os indivíduos gera um fragmento constante de 480pb. A presença do alelo (+) dá origem a dois fragmentos de 160 e 90pb, e ausência do sítio de restrição (-) gera um fragmento de 250pb, além do fragmento constante de 480pb. Nesta família o hemofílico (2) apresenta o alelo (+) e a mãe (3) é heterozigota (+/-) para o polimorfismo. Neste caso, o alelo (+) está ligado ao gene para a hemofilia. A irmã da mãe (4) é homozigota para o alelo (-/-). Concluimos, dessa forma, que esta não é portadora do gene da hemofilia.

O heredograma da figura 7 mostra o estudo do polimorfismo para a *HindIII* em família onde o paciente (1) possui o alelo (-), no entanto, a mãe (2) é homozigota para o alelo (-/-) e a irmã do paciente (3) é homozigota (-/-). Nesse caso, é impossível pelo estudo desse polimorfismo inferir se a irmã recebeu ou não o alelo ligado à hemofilia. Assim, podemos dizer que para essa enzima o polimorfismo não é informativo.

Figura 6

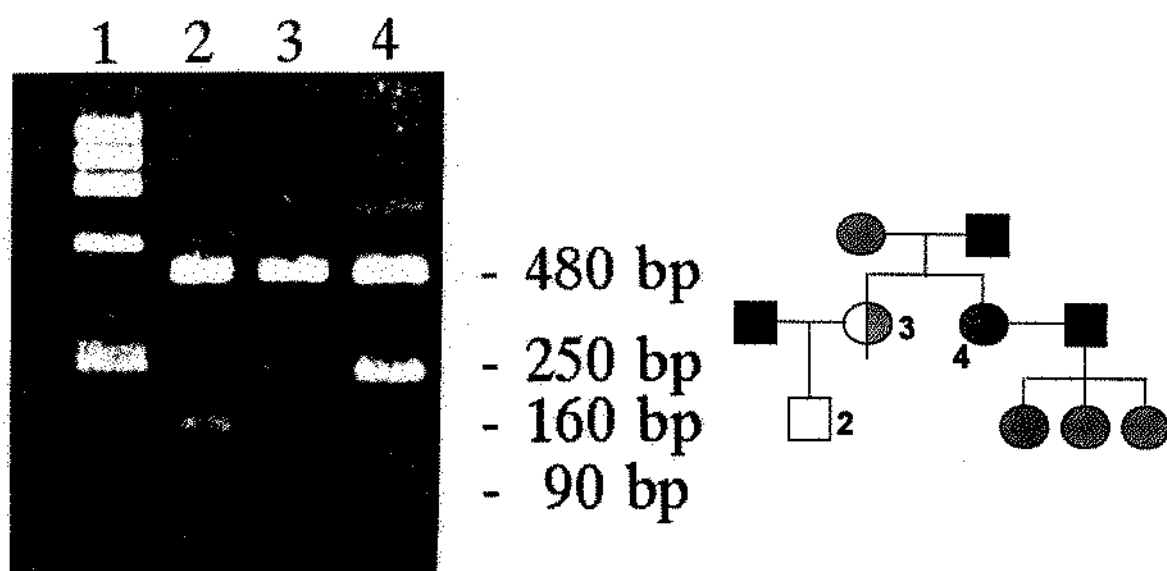
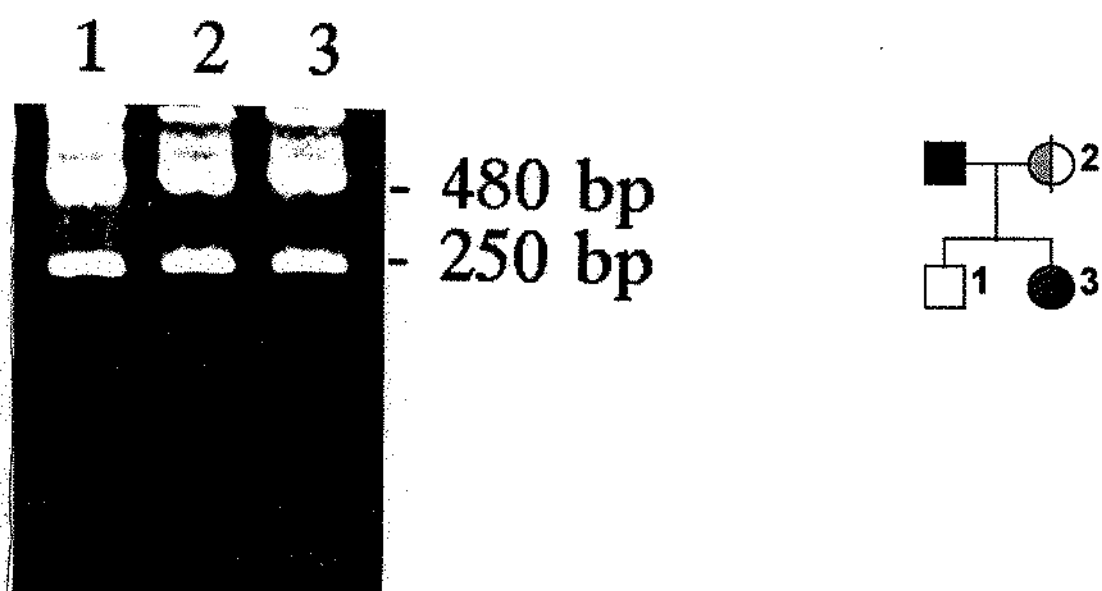


Figura 7



Na tabela 5 estão relacionados os dados referentes ao estudo dos polimorfismos para as enzimas de restrição BclII e HindIII em um grupo de famílias de indivíduos portadores de hemofilia A. Foram estudados 106 indivíduos pertencentes a 24 famílias distribuídas entre 16 caucasóides e 8 negróides. Foi possível identificar ou excluir as portadoras do gene ligado à hemofilia em 17 de 24 (70%) famílias estudadas. Nos demais casos, os polimorfismos não foram informativos.

Tabela 5: Estudos dos polimorfismos no gene do fator VIII em pacientes com hemofilia A e familiares: características clínicas e resultados laboratoriais.

Paciente	Raça	Nº de familiares estudados	BclII (íntron 18)	HindIII (íntron19)
HA1	caucasóide	6	I	I
HA3	caucasóide	4	NI	NI
HA4	negróide	3	I	I
HA6	caucasóide	4	NI	I
HA7	negróide	3	I	I
HA9	negróide	3	NI	NI
HA16	caucasóide	4	I	I
HA17	negróide	4	NI	I
HA20	negróide	5	I	I
HA21	caucasóide	3	NI	NI
HA24	caucasóide	4	NI	NI
HA26	caucasóide	5	NI	NI
HA30	negróide	4	NI	NI
HA36	caucasóide	4	NT	I
HA37	caucasóide	6	NT	I
HA38	caucasóide	4	NT	I
HA39	caucasóide	5	I	I
HA40	caucasóide	4	I	NI
HA42	negróide	6	I	I
HA48	negróide	4	I	I
HA49	caucasóide	6	I	I
HA51	caucasóide	5	I	I
HA52	caucasóide	5	I	I
HA69	caucasóide	5	NI	NI

I-informativo NI-não informativo NT-não testados

2. Estudo das Alterações Moleculares no Gene do Fator VIII

2.1 Análise do Rearranjo do Gene do Fator VIII

O primeiro passo na caracterização molecular dos pacientes com hemofilia A grave foi o estudo do rearranjo do gene do fator VIII com o emprego da técnica de *Southern blot* e hibridização com a sonda F8A.

Na figura 8 estão exemplificados os padrões de hibridizações obtidos com a sonda F8A. Em condições normais são observadas três bandas correspondentes às cópias do gene F8A. A banda correspondente à cópia localizada no intron 22 do gene do fator VIII é de 21.5Kb, enquanto as bandas correspondentes às cópias localizadas distal e proximal ao gene do fator VIII são de 16 e 14Kb, respectivamente (linhas 1 e 4). Quando ocorre a recombinação entre as cópias do gene F8A existe alteração constante no padrão de hibridização da banda de 21.5 Kb que passa a ter aproximadamente 20Kb. Na recombinação com a cópia distal do gene F8A há a mudança de 16Kb para 17.5Kb (linha 2-mulher, linha 3- homem) e na recombinação com a cópia proximal a banda de 14Kb passa a ser de 15Kb (linha 5-homem, linha 6-mulher).

Foram analisados 21 pacientes com hemofilia A grave e em 13 pacientes foi detectado o rearranjo do gene do fator VIII. O rearranjo do gene F8A localizada no intron 22 com a cópia distal foi encontrado em 8 casos e em 4 com a cópia proximal. O paciente 34HA apresentou uma forma variante de recombinação

Na tabela 6 estão representados as distribuições dos tipos de rearranjo do gene do FVIII e a relação com a presença de inibidor do FVIII.

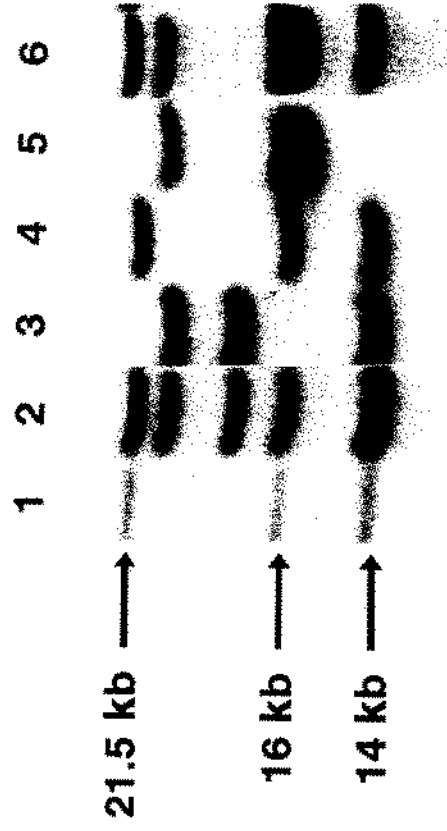


Figura 8: Autorradiografia para a análise do rearranjo do gene do fator VIII pela técnica de *Southern blot*. O DNA genômico digerido com a endonuclease BclI foi hibridizado com a sonda do gene F8A. O padrão normal de hibridização é observado nas linhas 1 e 4. O rearranjo do gene do fator VIII com a cópia distal do gene A na linhas 2 e 3 (linha 2- mulher e linha 3-homen) e o rearranjo com a cópia proximal é observado nas linhas 5 e 6 (linha 5-homem e linha 6- mulher).

Tabela 6: Distribuição dos tipos de rearranjo do gene do FVIII e relação com o inibidor do FVIII.

Paciente	Rearranjo do Gene do Fator VIII	Inibidor do FVIII
HA3	Distal	Presente
HA4	Proximal	-
HA5	Proximal	-
HA6	Proximal	-
HA7	Distal	-
HA8	Distal	-
HA14	Distal	-
HA17	Proximal	-
HA27	Distal	-
HA34	Gene F8a Extra	-
HA36	Distal	Presente
HA37	Distal	-
HA40	Distal	-

O paciente 34HA apresentou as três bandas correspondentes às cópias do gene F8A. Além disso, foi observada uma banda adicional de aproximadamente 20Kb (fig.9). Posteriormente foi realizado a hibridização do DNA genômico do paciente digerido com diversas endonucleases de restrição com a sonda cDNA FVIII. Os resultados obtidos não permitiram reconhecer outras anormalidades no gene do FVIII.

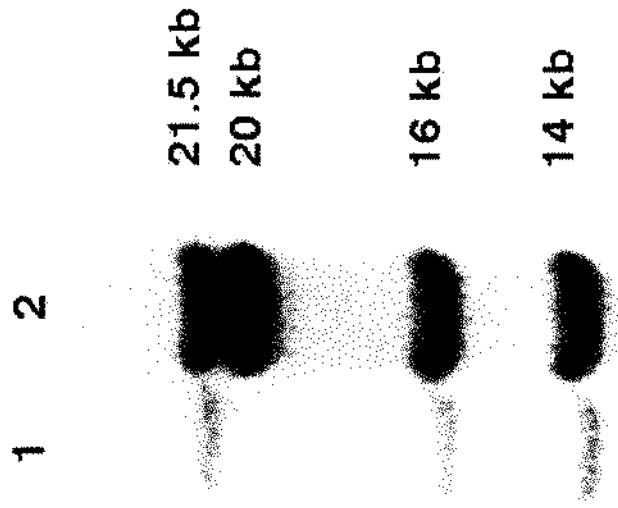


Figura 9: Autorradiografia obtida do DNA genômico digerido com a endonuclease BclI e hibridizado com a sonda F8A pela técnica de *Southern blot*. Na linha 2 (34HA) é observada uma banda extra de aproximadamente 20Kb além das três bandas normalmente detectadas no controle normal (linha 1).

Com o objetivo de avaliar a origem desta banda extra foram estudados os pais do paciente com os mesmos procedimentos. A mesma banda foi observada apenas no DNA materno. Nesta família são conhecidas três outras irmãs com filhos portadores de hemofilia A grave. O pai destas mulheres nunca apresentou sinais de doença hemorrágica e não há casos de hemofilia relacionada aos familiares da mãe.

2.2 Métodos de Rastreamento para a Identificação das Mutações no Gene do Fator VIII

2.2.1 Padronização

Para a realização dos métodos de rastreamento de mutações no gene do fator VIII foi necessário a identificação de *primers* para as amplificação das regiões codificadoras, dos sítios de excisão dos íntrons e da região promotora.

Neste estudo as sequências dos *primers* foram cedidas gentilmente por W.C. Pieneman ou descritas por Higuchi *et al*, 1991a,b. Os *primers* utilizados neste trabalho permitiram o estudo de todas as regiões codificadoras, de 49 dos 50 sítios de excisão dos íntrons e parte da região promotora do gene do fator VIII. A região correspondente a extremidade 3' não traduzida não foi analisada.

A padronização das diferentes combinações de exons a serem amplificados simultaneamente (multiplex-PCR) foi conduzida em razão dos diferentes tamanhos dos produtos da PCR e do padrão obtido na migração eletroforética em gel não-desnaturante para o SSCP. Dessa forma foi possível estabelecer com segurança a identidade de cada banda em relação aos diferentes exons.

O produtos da PCR obtido das diferentes combinações usadas foi desnaturado a 95°C e em seguida separado eletroforéticamente em gel de poliacrilamida não-desnaturante. As hélices simples do DNA assumem uma conformação tridimensional que depende da sequência primária de nucleotídeos. Quando são analisadas as amostras do PCR de diferentes indivíduos no mesmo gel é possível o reconhecimento dos padrões normal e anormal de migração adquirido pelas determinadas sequencias de DNA. Este fato pode ser observado nas figuras 10 à 12 onde estão

respectivamente representados os resultados obtidos com as combinações A, B, C e D em um grupo de pacientes estudados. Assim, o reconhecimento de uma padrão eletroforético anormal das cadeias simples do DNA é facilmente identificado como está exemplificado nas figuras 10 e 11.

Para o análise completa dos sítios de excisão dos íntrons relacionados aos exons 8 e 17 foram realizadas amplificações conjuntas entre os exons 8 e 9; e entre os exons 17 e 18, respectivamente. O produto do PCR foi posteriormente digerido com as enzimas DdeI (exons 8-9) e TaqI (exons 17-18).

Devido à grande extensão do exon 14, sua amplificação foi realizada em três diferentes reações com digestão dos produtos da PCR com endonucleases. Na figura 28 está representado o padrão obtido com este procedimento para os primeiros 1000pb do exon 14.

2.2.2 Resultados Obtidos com *Multiplex-PCR* e SSCP

Na análise da *multiplex-PCR* e SSCP foi possível identificar um padrão eletroforético anormal em 85% dos pacientes estudados do grupo com hemofilia moderada ou leve. Adicionalmente foram analisados os pacientes com hemofilia A grave que não apresentaram o rearranjo do gene do fator VIII. Este grupo consistiu de 8 pacientes e um padrão eletroforético anormal foi evidenciado em 4 pacientes.

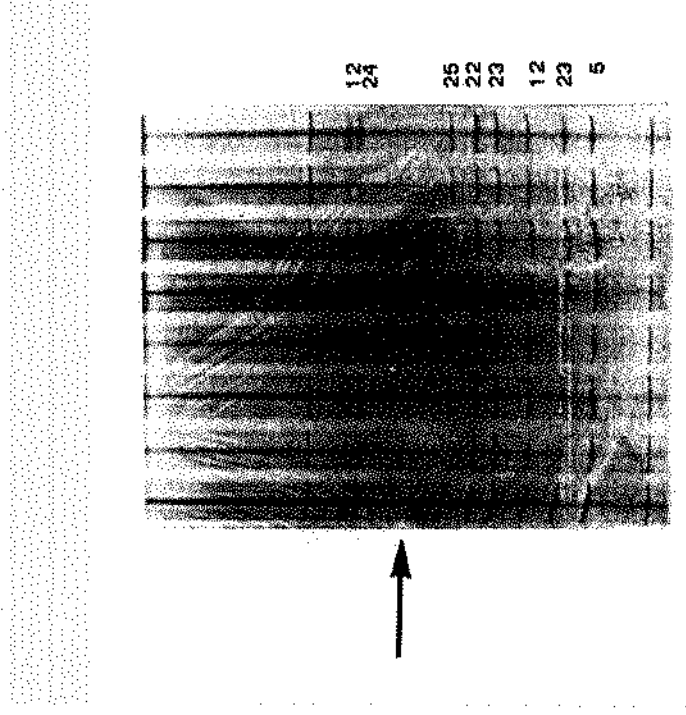


Figura 10: Análise do SSCP do produto após *multiplex PCR* do gene do fator VIII. Os fragmentos correspondentes aos exons 5, 12, 22, 23, 24 e 25 estão identificados à direita da figura. A seta indica um fragmento do produto do PCR correspondente ao exon 25, com um padrão anormal de migração eletroforética identificadas em dois pacientes (18HA e 39HA).

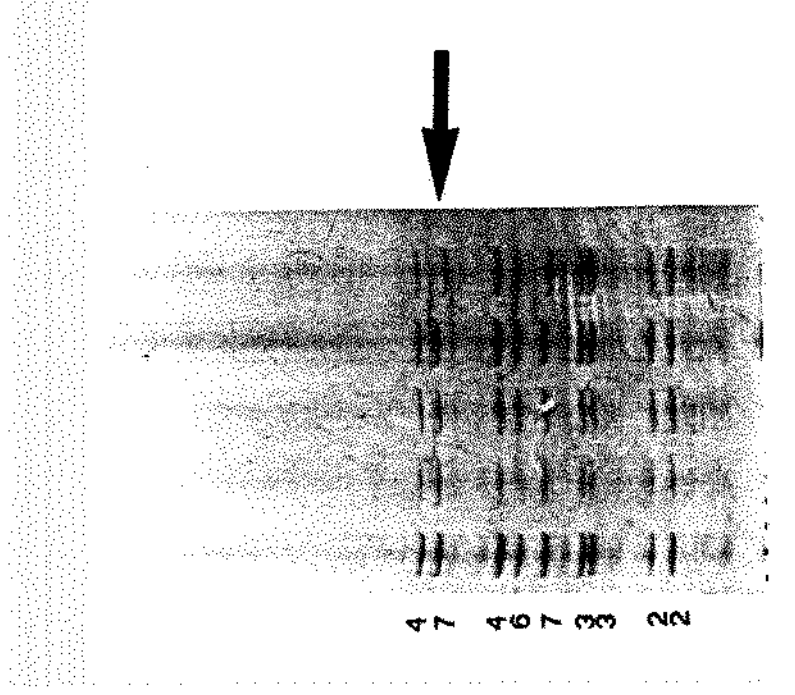


Figura 11: Análise do SSCP após *multiplex PCR* do gene do fator VIII. Os fragmentos correspondentes aos exons 2, 3, 4, 6 e 7 estão identificados à esquerda da figura. A seta indica um padrão anormal de migração eletroforética de um fragmento correspondente ao exon 7 no paciente 46HA.

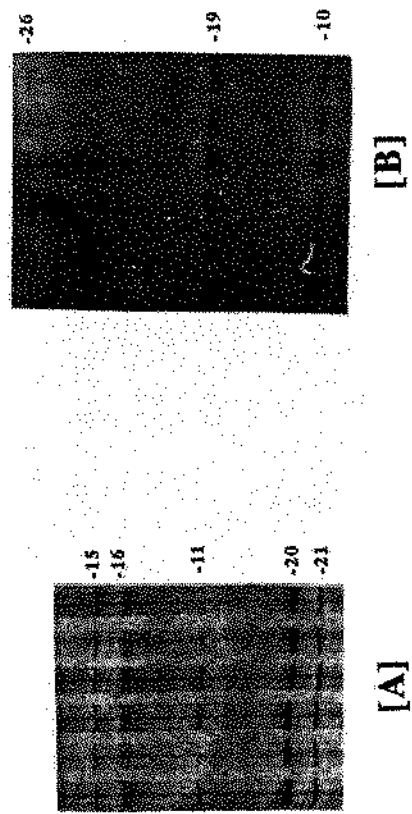


Figura 12: Análise do SSCP corado pela prata do produto do multiplex PCR do gene do fator VIII. [A] Combinação C: os fragmentos correspondentes aos exons 11, 15, 16, 20 e 21 estão identificados à direita. [B] Combinação D: os fragmentos correspondentes aos exons 10, 19 e 26 estão identificados à direita.

2.2.3 Mutações Identificadas

Os resultados obtidos com o SSCP facultam a reconhecimento da região do gene aonde está localizada a mutação, mas não é suficiente para sua identificação. Dessa forma, foi realizado o sequenciamento direto dos fragmentos de DNA identificados como anormais no SSCP. Os resultados obtidos revelaram 16 diferentes mutações das quais 11 não previamente descritas. Foi também identificada uma substituição neutra no codon 1241 (exon 14). Na tabela 8 estão resumidas as alterações moleculares caracterizadas neste estudo.

Quatro pacientes hemofílicos do grupo moderado-leve apresentaram a mesma mutação de ponto no exon 25, caracterizada por uma transição A→G na posição 2238 que prediz a mudança de Val→Met (fig. 25). Para analisarmos se esta transição poderia corresponder a um polimorfismo foi realizado seu rastreamento em 160 indivíduos normais (100 caucasóides e 60 negróides). Essa alteração foi investigada segundo um procedimento técnico desenvolvido nesse trabalho, que permitiu a criação de um sítio artificial para a endonuclease BsrDI. Assim foi desenhado um *primer* com a sequência modificada criando-se artificialmente um sítio para a endonuclease BsrDI. O fragmento do PCR obtido com o *primer* modificado e o *primer* 3' do exon 25 foi de 169pb. A digestão do produto do PCR com BsrDI origina dois fragmentos de 140 e 29pb quando existe o nucleotídeo A na posição 2238. No entanto, quando existe o nucleotídeo G nesta posição a enzima não reconhece o sítio de clivagem permanecendo o produto do PCR com 169pb (fig. 29). A análise desta população mostrou que os 160 indivíduos apresentavam o nucleotídeo A na posição 2238. Estes dados sugerem que a transição deva ser uma mutação de ponto e não um polimorfismo. O estudo dos haplótipos destes quatro pacientes pelo análise do polimorfismo da BclI (intron 18), da HindIII (intron 19) e das sequências (CA) nos introns 13 e 22 mostram haplótipos idênticos em três pacientes e o do paciente 49HA apresentou divergência somente no alelo das sequências (CA) do intron 13. Estes dados em conjunto sugerem que a mutação Met2238→Val é provavelmente responsável pela doença com a mesma origem em pelo menos três dos 4 pacientes.

A análise do paciente 11HA revelou a impossibilidade de amplificação do exon 17, embora com amplificações normais dos exons 16, 18. Assim, para a confirmação de uma provável perda gênica foi levado a efeito a hibridização do *Southern blot* do DNA genômico digerido com a enzima TaqI com a sonda cDNAFVIII. Os resultados obtidos evidenciaram um padrão anormal correspondente à região do exon 17 (fig.27). Em seu conjunto esses dados indicam uma deficiência gênica de aproximadamente 200 pb incluindo o exon 17.

O fragmento originário da amplificação dos exons 17-18 do DNA do paciente 31HA não apresentava o sítio de clivagem para a endonuclease TaqI. Neste fragmento existem normalmente 3 sítios para a TaqI. Quando os exons 17 e 18 foram amplificados isoladamente o produto do PCR correspondente apenas ao exon 18 não apresentava o sítio de clivagem para a TaqI. O sequenciamento direto do fragmento correspondente ao exon 18 evidenciou a mutação de ponto 1941 decorrente da mudança Arg1941 CGA →CAA Gln (fig.22)

Dez das mutações descritas neste estudo modificam sítios de restrição para endonucleases, o que possibilita a identificação rápida dos indivíduos portadores destas mutações nas diferentes famílias. Na tabela 9 estão representadas as mutações e as respectivas endonucleases envolvidas no seu reconhecimento.

TABELA 8: RESUMO DOS DEFEITOS MOLECULARES NA HEMOFILIA A

Paciente	Exon Intron	Codon	Mudança de Nucleotídeo	Mudança de Codon	Classificação Clínica	Figura
13 HA	3	94	CAT → CGT *	His → Arg	MODERADA	13
26 HA	5	183	AGT → AAT *	Ser → Asp	MODERADA	14
46 HA	7	256	CAT → CTT *	His → Leu	MODERADA	15
23 HA	7	266	GTG → GGG	Val → Gly	LEVE	16
44 HA	7	266	GTG → GGG	Val → Gly	LEVE	16
29 HA	7	282	CGC → TGC *	Arg → Cys	LEVE	17
12 HA	13	618	AAT → GAT *	Asn → Asp	LEVE	18
33 HA	13	618	AAT → GAT *	Asn → Asp	MODERADA	18
35 HA	intron 15	nucleotídeo 13	C → T *	-	GRAVE	19
21 HA	16	1789	CTT → TTT	Leu → Phe	LEVE	20
52 HA	16	1789	CTT → TTT	Leu → Phe	LEVE	20
15 HA	17	1848	CAC → CCC *	His → Prol	MODERADA	21
31 HA	18	1941	CGA → CAA	Arg → Gln	LEVE	22
30 HA	23	2150	CGT → CAT	Arg → His	MODERADA	23
25 HA	23	2159	CGC → TGC	Arg → Cys	MODERADA	24
18 HA	25	2238	ATG → GTG *	Met → Val	MODERADA	25, 29
39 HA	25	2238	ATG → GTG *	Met → Val	MODERADA	25, 29
45 HA	25	2238	ATG → GTG *	Met → Val	MODERADA	25, 29
49 HA	25	2238	ATG → GTG *	Met → Val	MODERADA	25, 29
20 HA	25	2262	ATC → ACC *	Ile → Thr	GRAVE	26
11 HA	17	-	Perda do exon 17 *	<i>frameshift</i>	GRAVE	27
09 HA	14	1049	Perda de AG *	<i>frameshift</i>	GRAVE	28

*Mutações não descritas anteriormente

Tabela 9: Relação das mutações de ponto identificadas pelo uso das endonucleases de restrição.

PACIENTE	Exon	Codon	Modificação no sítio de restrição
HA13	3	94	Perda de sítio para a FokI
HA26	5	183	Perda de sítio para a PstI
HA29	7	282	Novo sítio para a GsuI
HA46	7	256	Perda de sítio para a NlaIII
HA12	13	618	Novo sítio para a TaqI
HA15	17	1848	Perda de sítio para a MnlI
HA31	18	1941	Perda de sítio para TaqI
HA20	25	2262	Novo sítio para a HphI
HA25	25	2159	Perda de sítio para a BsmI
HA25	25	2238	Perda de sítio para a BsrDI

2.2.4 Descrições das Mutações Identificadas

Para exemplificar as mutações identificadas neste estudo são mostrados os resultados obtidos com a *multiplex-PCR* e SSCP, seguidos dos sequenciamento direto do DNA e eventualmente são mostradas as detecções das mutações utilizando-se o produto do PCR e posterior digestão com endonucleases.

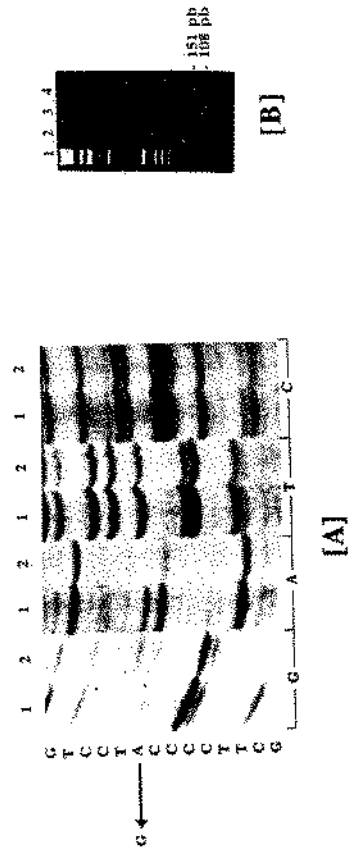


Figura 13: [A] Auto-radiografia do gel de sequenciamento do produto do PCR do exon 3 do paciente 13HA (2) e de um controle normal (1). O sequenciamento revelou a mudança do nucleotídeo A→G que resulta na mutação His94 CAT→CGT Arg. [B] Eletroforese em gel de agarose 2% do produto do PCR do exon 3 digerido com a endonuclease FokI. Em condições normais são detectados após a digestão os fragmentos de 108, 57 e 43pb (linhas 2 e 3). A mudança A→G na posição 94 leva a uma perda de um sítio de restrição para a FokI originando os fragmentos de 151 e 57pb, como é observado na linha 4 (13HA).

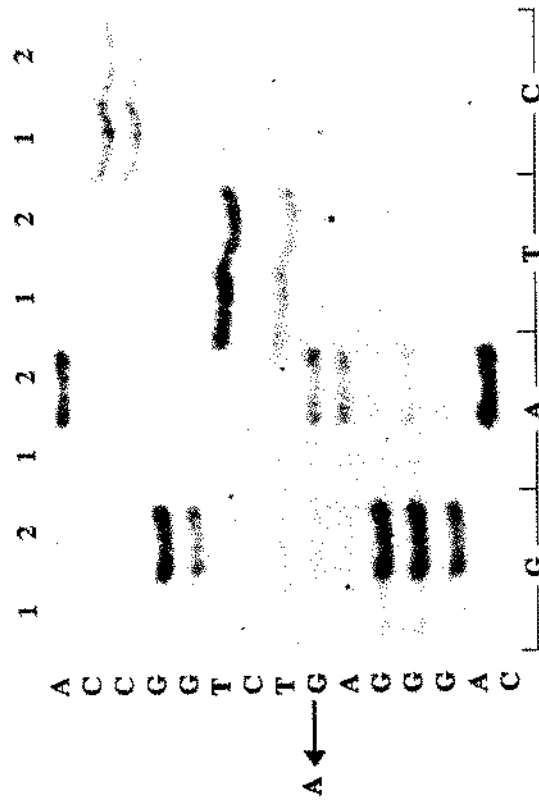


Figura 14: Auto-radiografia do gel do sequenciamento correspondente ao exon 5 do paciente 26HA (2) e do controle normal (1). O produto do PCR foi sequenciado e revelou a mudança G→A que origina a mutação Ser183 AGT→AAT Asp (2).

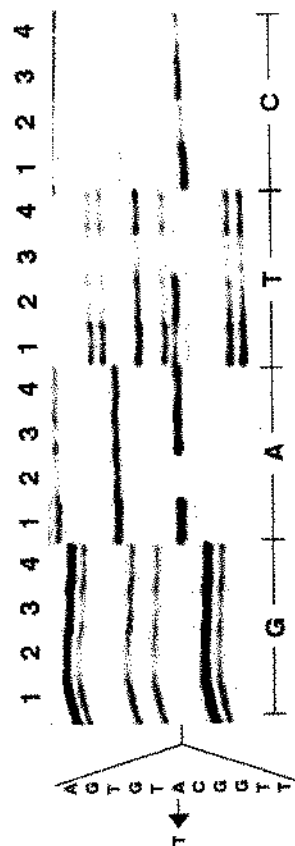


Figura 15: O sequenciamento direto do produto do PCR do exon 7 foi realizado de um controle normal (1) e dos pacientes 46HA (2), 23 HA (3) e 44HA (4). No paciente 46HA foi detectada uma mutação A→T que resulta na troca de His256 CAT→CTT Leu.

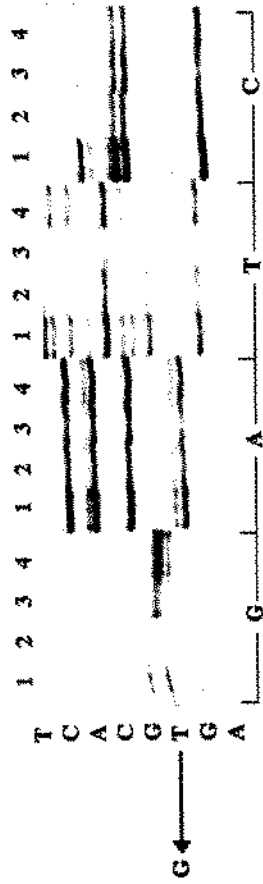


Figura 16: Auto-radiografia do gel do sequenciamento correspondente ao exon 7 de um controle normal (1) e dos pacientes 46HA (2), 23HA (3) e 44HA (4). O produto do PCR sequenciado revelou a troca de T→G originado a mutação Val 266 GTG→GGG Gly identificadas nos pacientes 23 e 44HA.

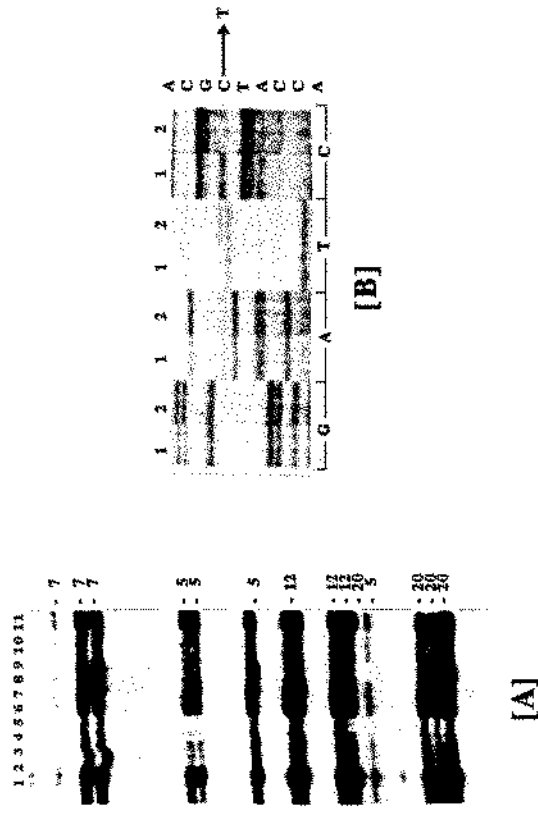


Figura 17: [A] A análise do SSCP da *multiplex-PCR* marcado com $^{32}\alpha\text{P}$ de um grupo de 11 pacientes com hemofilia A. É evidenciado um padrão anormal de migração do fragmento correspondente ao exon 7 do paciente 3 (29HA). [B] Auto-radiografia do gel de sequenciamento correspondente ao exon 7 de um controle normal (1) e do paciente 29HA (2) revelou a mudança C→T que resulta na mutação Arg282 CGC→TGC Cys.

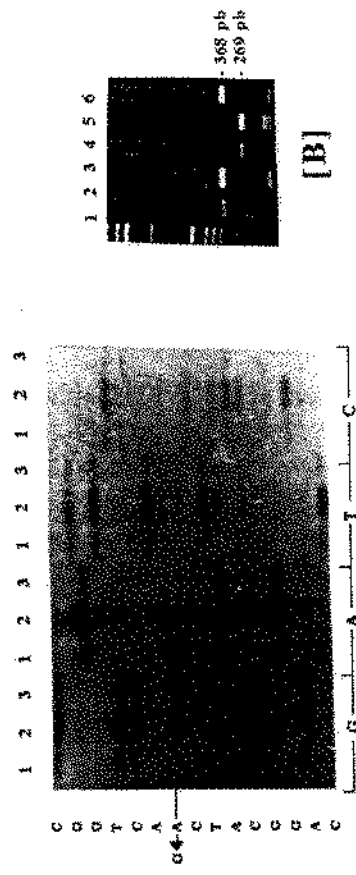


Figura 18: [A] Auto-radiografia do gel de sequenciamento do produto do PCR do exon 13 de um controle normal (1) e dos pacientes 12HA (2) e 33HA (3). A mudança A→G resulta na mutação AAT 618 Asn→GAT Asp.[B] Eletroforese em gel de agarose 2% do produto do PCR do exon 13 após a digestão com a endonuclease TaqI. O fragmento de 269pb decorre da presença da mutação na posição 618 cria um novo sítio de restrição pra a TaqI (linhas 3 e 4) clivando o fragmento de 368pb. Nas linhas 2 e 5 está representado o padrão obtido em dois controles normais após a digestão com a endonuclease.

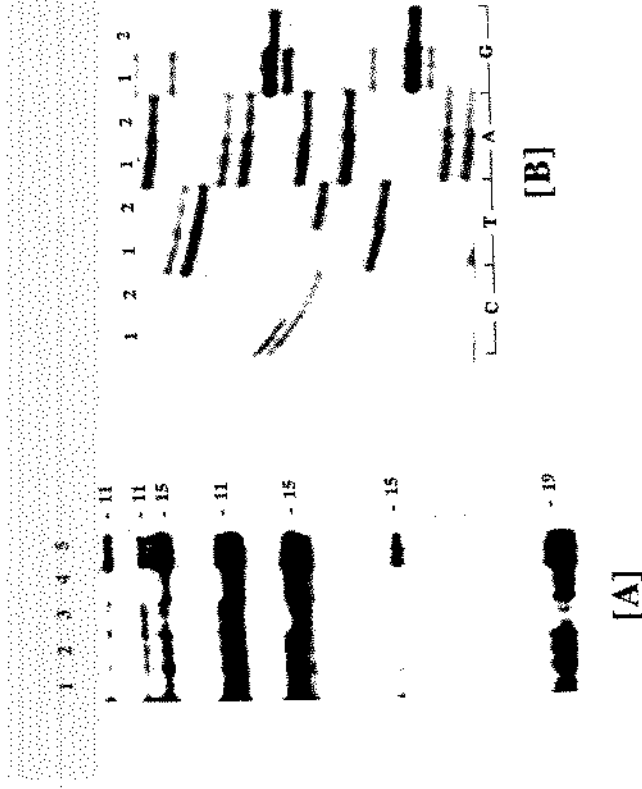


Figura 19: A análise do SSCP do multiplex-PCR marcado com $^{32}\alpha P$ de 5 pacientes com hemofilia A. É evidenciado um padrão anormal de migração do fragmento correspondente ao exon 15 do paciente 3 (35HA). [B]Auto-radiografia do gel de sequenciamento correspondente ao exon 15 de um controle normal (1) e do paciente 35HA (2) revelou a mudança C→T na posição + 13 localizada no intron 15.

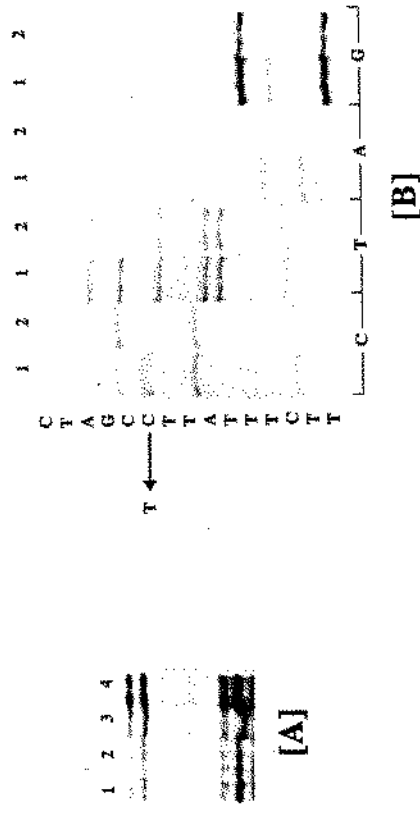


Figura 20:

[A] A análise do SSCP marcado com $^{32}\alpha\text{P}$ do produto do PCR correspondente ao exon 16 de quatro pacientes com hemofilia A. É evidenciado um padrão anormal de migração correspondente ao paciente 3 (21HA). [B] Auto-radiografia do gel de sequenciamento do paciente 21 HA(2) e do controle normal (1) revelou a mudança C→T que resulta na mutação Leu1789CTT→TTT Phe.

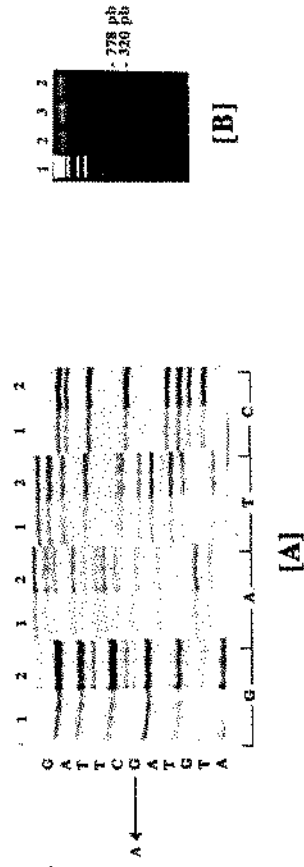


Figura 22:

[A] Auto-radiografia do gel de sequenciamento do produto do PCR do exon 18 de um controle normal (1) e do paciente 31HA (2) revelou a mudança G→A que resulta na mutação Arg1941 CGA→CAA Gln. [B] Eletroforese em gel de agarose 2% do produto do PCR do exon 18 após a digestão com a endonuclease TaqI em condições normais (linha 3) origina fragmentos de 320, 248 e 209pb. A mutação na posição 1941 afeta o sítio de restrição da TaqI no exon 18 originando o fragmento de 778pb (2).



Figura 23: Auto-radiografia de gel do sequenciamento do produto do PCR correspondente ao exon 23 de um controle normal (1) e do paciente 30HA (2). A mudança do nucleotídeo G→A resulta na mutação Arg2150 CGT→CAT His.

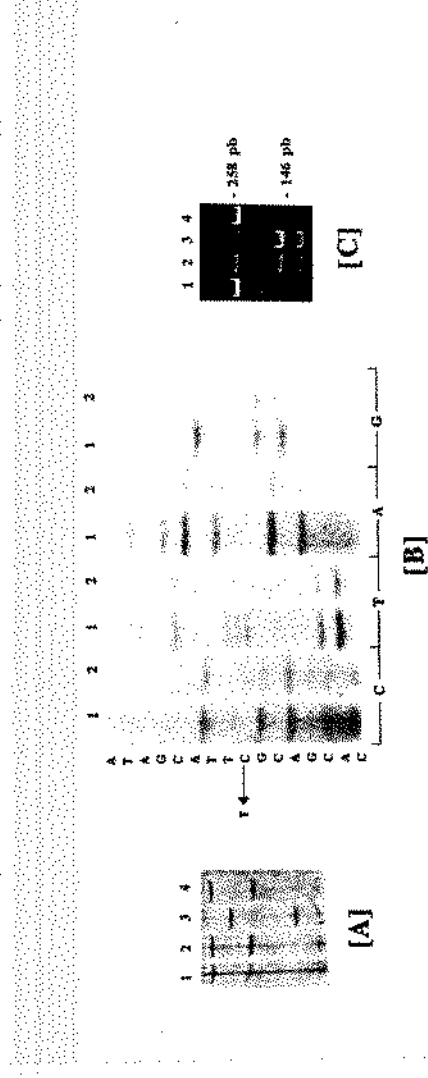


Figura 24:

Na figura A é observado o SSCP corado pela prata, do produto do PCR do exon 23 em 4 pacientes com hemofilia A. Um padrão anormal foi detectado no paciente 3 (25HA). [B] A auto-radiografia do gel de sequenciamento de um controle (2) e do paciente 25HA (1) revelou a mudança C→T que origina a mutação Arg2159 CGC→TGC Cys. [C] Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% do produto do PCR de 258 pb do exon 23 (linha 1). Em condições normais após a digestão com a enzima BsmI são obtidos os fragmentos de 146 e 112pb. Na presença da mutação na posição 2159 é afetado o sítio de restrição da BsmI que não cliva o fragmento mutante. Após a digestão com a BsmI na linha 4 está representado o resultado obtido com a amostra do paciente 25HA. Nas linhas 2 e 3 estão representadas respectivamente os da mãe e irmã. Ambas apresentam os fragmentos normais e também o fragmento mutante, assim são portadoras do gene anômalo.

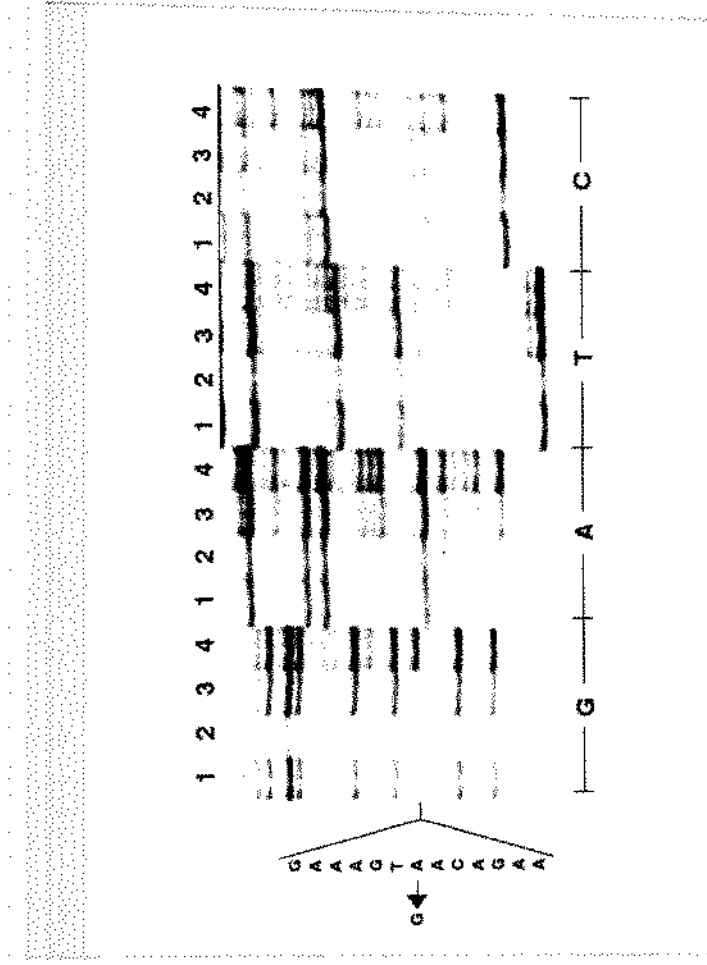


Figura 25: Auto-radiografia do gel de sequenciamento do produto do PCR do exon 25 de dois controles normais (1 e 2) e dos pacientes 20HA (3) e 18HA (4). A mudança A→G resulta na mutação Met 2238 ATG→GTG Val.



Figura 26: [A] Auto-radiografia do gel de sequenciamento do produto do PCR do exon 25 de um controle normal (1) e do paciente 20HA (2) revelou a mudança T→C que resulta na mutação Ile 2262 ATC→ACC Thr. [B] Eletroforese em gel de agarose 2% do produto do PCR do exon 25 após a digestão com a endonuclease HphI origina os fragmentos de 170, 40 e 30pb em condições normais (linhas 3-5). A presença da mutação na posição 2262 cria um novo sítio de restrição clivando o fragmento de 170 em fragmentos de 96 e 78pb (linha 2).

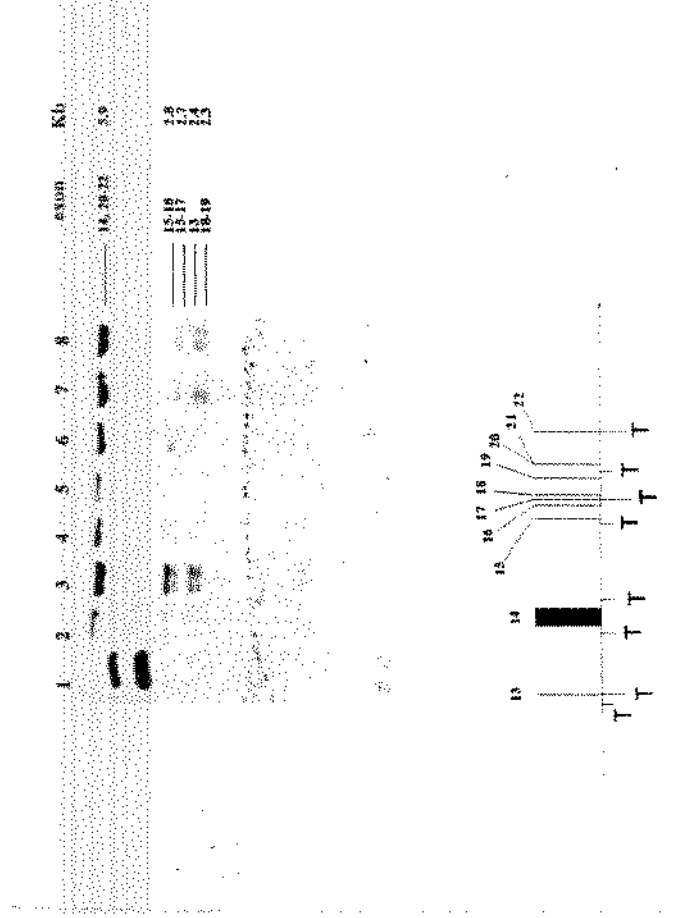


Figura 27:

Auto-radiografia do Southern blot realizado com o DNA genômico de um controle (2) e de um grupo de hemofílicos (3-8). O DNA foi digerido com a enzima TaqI e hibridizado com a sonda cDNA do gene do Fator VIII que corresponde aos exons 13-23. A seta demonstra a ausência do fragmento correspondente aos exons 15-18 nos indivíduos 7 e 8 (1HA e irmão hemofílico, respectivamente). Na parte inferior está representado esquematicamente a região do gene do fator VIII estudada e os sítios de restrição da TaqI (T).

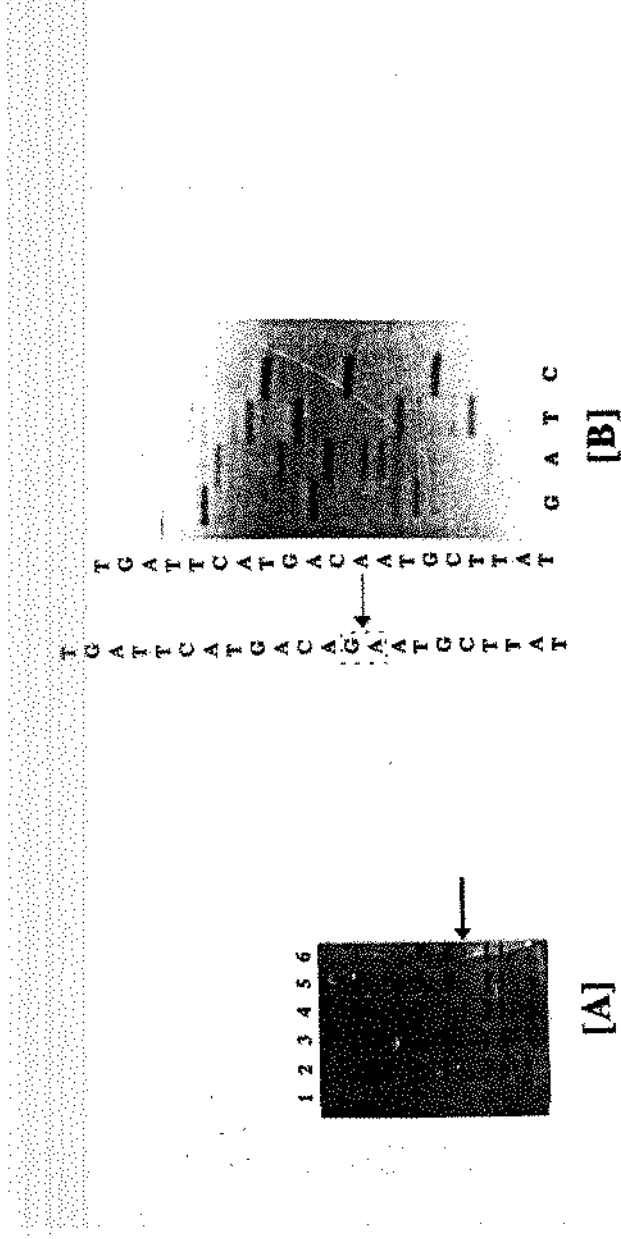


Figura 28: [A] A análise do SSCP corado pela prata do produto do PCR de um fragmento do exon 14 (exon 14A- tabela 3) após a digestão com as endonucleases AvalI-HindIII-BstNI, em um grupo de 6 pacientes com hemofilia A. É evidenciado um padrão anormal de migração eletroforética correspondente ao paciente 4 (9HA). [B] Auto-radiografia do gel de sequenciamento correspondente ao fragmento do exon 14 do paciente 9HA revelou a perda de 2 pb AG, identificados, na posição 1049.

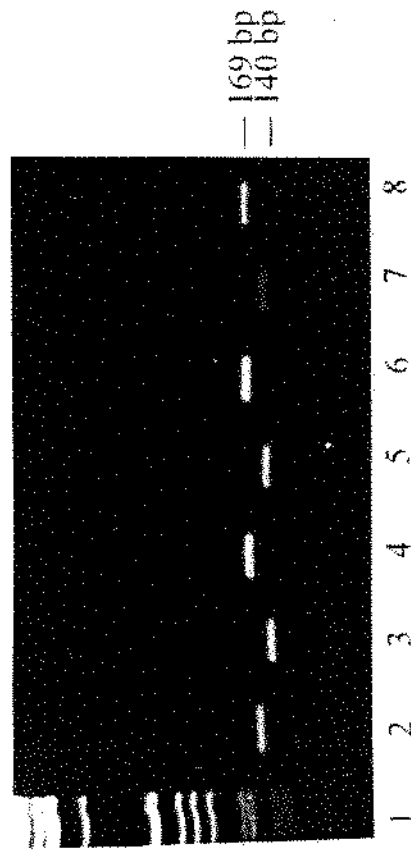


Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 2% do produto do PCR correspondente à amplificação de fragmento de 169 pb do exon 25 utilizando-se um *primer* modificado (5') e o *primer* 3' (tabela 2). O produto do PCR foi digerido com a endonuclease BsrDI originando os fragmentos de 140 e 29pb, como é observado nas linhas 3, 5 e 7. Quando a substituição A→G está presente, a digestão com a BsrDI resulta em um fragmento de 169pb. Esta substituição resulta na mutação Met 2238 ATG→GTG Val que foi detectada nos pacientes 18, 39, 45 e 49HA correspondente às linhas 2, 4, 6 e 8, respectivamente.

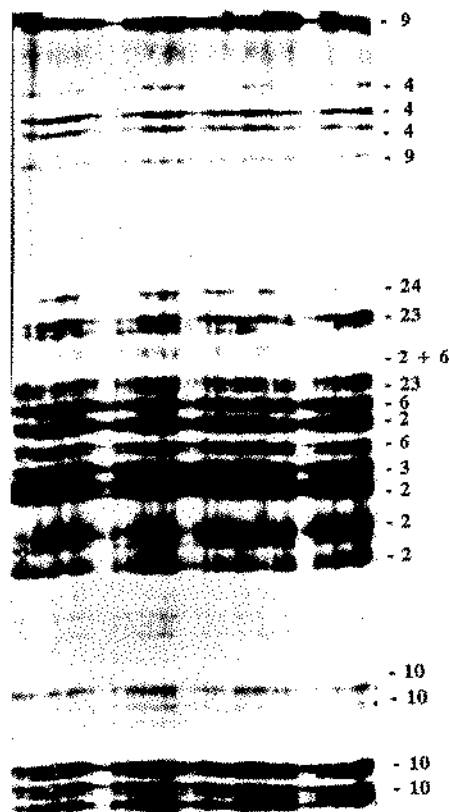


Figura 30 : Análise do SSCP marcado com $^{32}\alpha\text{p}$ do produto do multiplex PCR do gene do fator VIII. Os fragmentos correspondentes aos exons 2,3,4,6,9,10,23 e 24 estão identificados à direita. Não é observado padrão anormal de migração neste grupo de pacientes.

Discussão

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao sexo amplamente distribuída entre os diferentes grupos populacionais estudados (Peake *et al*, 1993). Seu tratamento é baseado na reposição do fator coagulante deficiente obtido a partir do plasma humano, o que acarreta alto risco de transmissão de doenças infecciosas, contribuindo para a elevada morbidade da doença (Jones & Ratnoff, 1991; Lusher, 1995). Além disso, pelo alto custo desta terapêutica, apenas 20% dos pacientes hemofílicos do mundo têm acesso a tratamento adequado (Jones, 1995). Desse modo, o aconselhamento genético na hemofilia reveste-se de particular importância quando comparado a outras doenças genéticas.

Nesse contexto, a aplicação dos métodos de biologia molecular no reconhecimento da portadora do gene da hemofilia apresenta-se como uma importante alternativa aos métodos bioquímicos clássicos. O estudo de diferentes RFPLs no gene do fator VIII faculta o reconhecimento da portadora em 60 a 80% das famílias estudadas em populações europeias e norte-americanas (Peake *et al*, 1993).

Em razão da variabilidade dos polimorfismos gênicos relacionados à hemofilia nas diversas populações estudadas, o presente trabalho inicialmente estimou a prevalência de diferentes polimorfismos intragênicos no gene do fator VIII em indivíduos negróides de uma população brasileira. Os resultados revelaram a prevalência de heterozigotas de 0,27 e 0,16 para os polimorfismos das endonucleases BclII e HindIII, respectivamente. Estes dados indicam valores semelhantes aos relatados em populações negras de diferentes países e em outras regiões brasileiras (Peake *et al*, 1993; Figueiredo *et al*, 1993; Bandinelli *et al*, 1994) corroborando os achados anteriores que sugeriam certa homogeneidade desses polimorfismos na população negra (tabela 10).

Tabela 10: Frequência dos polimorfismos relacionados ao gene do fator VIII em populações brasileiras

Polimorfismo	alelos	negróides (este estudo)	negróides (Bandinelli, 1994)	caucasóides (Bandinelli, 1994)	caucasóides (Figueiredo,1993)
BclI	(-)	0.84	0.91	0.25	0.25
(intron 18)	(+)	0.16	0.09	0.75	0.75
HindIII	(-)	0.09	0.13	0.68	0.70
(intron 19)	(+)	0.91	0.87	0.32	0.30

Em seguida, com o objetivo de utilizar os polimorfismos na identificação de portadoras, foram analisadas 24 famílias, constituída de indivíduos negróides e caucasóides relativas a pacientes com hemofilia A. Foi possível a identificação ou exclusão da portadora do gene ligado a hemofilia em 70% dos casos, o que sugerem que nessa população brasileira a análise de apenas dois polimorfismos no gene do fator VIII permite aconselhamento genético efetivo na hemofilia A. O procedimento técnico pode ser realizado sem o uso de material radioativo e com a utilização de pequenas quantidades de sangue, líquido amniótico ou vilosidades coriônicas. Além disso viabiliza a aplicação desse método para um possível diagnóstico pré-natal.

Neste contexto, o reconhecimento do defeito molecular responsável pela hemofilia oferece a oportunidade de diagnóstico preciso da portadora do gene anômalo além de facultar o reconhecimento de importantes regiões funcionais da molécula do fator VIII.

Em contraste com alguns genes responsáveis por doenças hereditárias frequentes em diferentes populações, a análise molecular do gene do fator VIII é extremamente dificultada pela grande extensão do gene e heterogeneidade na distribuição das mutações.

As primeiras investigações concernentes às anormalidades gênicas nas hemofilias foram conduzidas pelo procedimento de *Southern blot* e sondas cDNA do fator VIII, o que permitiu o reconhecimento de várias deficiências gênicas responsáveis pela doença. No entanto, este tipo de

técnica permite a identificação de apenas 5% das mutações. Assim, tornou-se inevitável o desenvolvimento de novos métodos para a detecção das mutações de ponto ou de pequenas perdas gênicas responsáveis pela maioria dos casos de hemofilia A. O desenvolvimento de técnicas variadas para o rastreamento efetivo dessas mutações foi possível com o advento da PCR (Saiki *et al*, 1988). Como consequência desses avanços, numerosos tipos de mutações de ponto na hemofilia A foram descritos (Tuddenham *et al*, 1994).

O rearranjo do gene do fator VIII foi detectado em 13 dos 21 pacientes com hemofilia A grave. A distribuição entre os dois tipos diferentes de rearranjos entre as cópias do genes F8A revelou 60% com a cópia distal e 40% com a proximal. Estes dados diferem dos relatos em outras populações onde há predominância de 80 a 90% dos rearranjos com a cópia distal do gene F8A (Tuddenham *et al*, 1994).

Merece menção os estudos iniciais dos pacientes que apresentavam rearranjo e que sugeriam que a presença da inversão do gene do fator VIII não estava relacionada ao desenvolvimento de inibidores do fator VIII (Goodeve *et al*, 1994). Neste estudo, três pacientes apresentaram altos títulos de anticorpos contra o FVIII:C e em dois deles foi possível a identificação da inversão do gene. Estes dados, analisados em conjunto com outros estudos recentes não confirmam a hipótese de proteção contra o desenvolvimento de inibidores do fator VIII nestes pacientes (Tuddenham *et al*, 1994).

Durante a análise do *Southern blot* do DNA do paciente 34HA hibridizado com o probe F8A foi visualizada uma banda extra de aproximadamente 20kb além das três bandas normais correspondentes às cópias do gene F8A. Esta banda extra é semelhante à descrita por Jenkins *et al* (1994). Posteriormente, foi levado a efeito o estudo do DNA genômico hibridizado com a sonda cDNA FVIII que apresentou padrão normal. Estes dados não confirmaram as hipóteses de uma possível duplicação do gene ou mesmo perdas gênicas. Lakich *et al* (1993) descreveram que o número de cópias do gene F8A pode ser variável e um paciente analisado por este grupo apresentava uma banda adicional de 16Kb. Assim, a banda identificada no paciente 34HA pode ser uma cópia extra do gene F8A. O estudo familiar revelou que mãe do paciente é portadora do mesmo padrão obtido com a sonda F8A. Três tias deste paciente têm filhos com hemofilia A

grave. O avô materno, falecido, nunca apresentou história de sangramentos espontâneos ou pós-operatórios e nenhum caso de hemofilia é conhecido nos ancestrais da família. Esses dados sugerem fortemente que esta anomalia seja a causa da hemofilia.

O rastreamento de mutações na região codificadora, nos sítos de excisão dos íntrons e na região promotora do gene do fator VIII foi inicialmente descrito por Higuchi *et al* (1991 a e b) com a utilização da DGGE. A caracterização dos defeitos moleculares foi possível em 24 de 29 casos de hemofilia A moderada ou leve e em 50% dos casos de hemofilia A grave. Posteriormente, o método de SSCP foi aplicado por Lin *et al* (1993) com a análise de cada exon isoladamente do fator VIII. Um aperfeiçoamento maior desse procedimento foi descrito por Pieneman *et al* (1995). Esses autores levaram a efeito a amplificação simultânea de vários exons (*multiplex-PCR*) seguido de SSCP o que possibilitou o reconhecimento da maioria das mutações nos casos de hemofilia moderada ou leve e em metade dos casos de hemofilia grave.

No presente estudo foi conduzida a análise de quatro diferentes combinações de *multiplex-PCR*, que permitiram o estudo de 19 exons. Os produtos dos PCR foram separados em gel não-desnaturante em sistema automático de eletroforese e visualizados pela corolação pela prata para o estudo de SSCP. Esta metodologia facilita muito o rastreamento de mutações por associar uma rápida corrida eletroforética (2 horas) a um método não radioativo para a visualização dos fragmentos de DNA.

A sensibilidade do SSCP em localizar mutações de ponto em diferentes sequências gênicas está relacionada, entre outros fatores, ao tamanho do fragmento do DNA a ser analisado. Aparentemente fragmentos superiores a 300pb não são adequados para este tipo de análise. Assim, para fragmentos de DNA superiores a 300pb foram realizadas digestões do produto do PCR com endonucleases de restrição antes da separação eletroforética (Orita *et al*, 1989; Grompe, 1993).

A análise do SSCP permitiu o reconhecimento de um padrão anormal de migração eletroforética em 18 dos 21 (85%) pacientes com hemofilia A moderada ou leve e em quatro entre oito (50%) pacientes com hemofilia A grave. Esses números são equivalentes àqueles descritos por Higuchi *et al* 1991a,b e Pieneman *et al* 1995.

Foram identificadas 16 mutações diferentes no gene do fator VIII e deste grupo 11 mutações não foram descritas anteriormente. O gene do fator VIII apresenta 70 regiões de dinucleídeos CpG que são comumente expostos a mecanismos de hipermutabilidade (Cooper & Krawczak, 1993). Entre as 14 mutações de ponto identificadas, quatro mutações (33%) afetaram as regiões de dinucleídeos CpG, que codificam o aminoácido arginina. As transições C→T ocorreram nas posições Arg282→Cys e Arg2159→Cys (fig.17 e 24). As transições G→A ocorreram nas posições Arg1941→Gln e Arg2150→His (fig.22 e 23). Os fenótipos correspondentes a estas quatro mutações foram relacionados à hemofilia moderada ou leve. Neste grupo a única mutação não reconhecida anteriormente é a Arg282→Cys. No entanto, esta posição já foi envolvida em diferentes mutações de ponto (Tuddenham *et al*, 1994). Estes dados estão em acordo com a incidência de mutações de ponto nas regiões CpG que ocorrem em diversas outras doenças humanas (38%).

Cinco mutações descritas neste estudo já foram reconhecidas em outros pacientes com hemofilia A (tabela 8), e três mutações deste grupo afetaram o dinucleídeo CpG. As duas mutações restantes deste grupo foram descritas em pacientes hemofílicos de diferentes etnias e com fenótipos semelhantes. Por exemplo a mutação Val266→Gly descrita inicialmente por Higuchi *et al* (1991b) foi também observada em dois pacientes não relacionados estudados neste trabalho (fig. 16). A mutação Leu1789→Phe aqui identificada em dois pacientes relacionados (fig. 20) havia sido previamente descrita em pacientes dos EUA e um paciente da China e todos apresentavam hemofilia A leve (Lin *et al*, 1993; Tuddenham *et al*, 1994).

Entre as mutações novas identificadas no grupo com hemofilia moderada ou leve, a mutação ATG Met2238→ GTG Val foi identificada em quatro pacientes não relacionados. Com o objetivo de afastar a possibilidade que esta mudança de base representasse um polimorfismo foi levado a efeito um estudo desta mutação em um grupo de 160 indivíduos normais de grupos étnicos diferentes (100 caucasóides de origem holandesa e 60 negróides brasileiros). Esta mutação não afeta sítios de clivagem para endonucleases de restrição, e em razão desse fato foi desenvolvido um *primer* cuja sequência foi modificada em um nucleotídeo com a criação de um sítio artificial de clivagem para a endonuclease BsrDI (fig. 29). Esta análise permitiu reconhecer que todos os

controles apresentavam a sequência normal nesta posição, o que claramente indica que essa mudança de base não representa um polimorfismo e sim a mutação propriamente dita. O estudo dos haplótipos destes quatro casos sugerem uma mesma origem em pelo menos três pacientes.

No grupo de pacientes com hemofilia A grave uma mutação de ponto ainda não descrita foi identificada no paciente 20HA, a mutação Ile2262→Thr (fig. 26). Nesta transição há a mudança de um aminoácido não-polar para um polar neutro o que pode alterar as cadeias hidrofóbicas e consequentemente a estabilidade da proteína (Cooper & Krawczak, 1993). A mudança C→T no nucleotídeo +13 localizado no íntron 15 foi identificada no paciente 35HA (fig. 19). Esta mutação pode criar um sítio alternativo de excisão do íntron ou ser uma substituição neutra (Padgett *et al*, 1986). Essa última possibilidade não pode ser excluída, pois não foi conduzida uma análise populacional para a avaliação da frequência dessa alteração na população estudada. Um polimorfismo comum em outras populações foi identificado no paciente 10HA na posição 1241C→G e está em *linkage disequilibrium* com outros polimorfismos no gene do fator VIII (Higuchi *et al*, 1991b; Peake *et al*, 1993).

Ainda no grupo com hemofilia grave foram reconhecidas duas novas perdas gênicas, uma de aproximadamente 200pb comprometendo todo o exon 17 (paciente 11HA) e uma perda de 2pb no exon 14 (paciente 9HA) que resultam em leitura fora de fase (*frameshift*) com aparecimento de código de parada prematura da síntese proteica.

Embora sejam necessários estudos para a confirmação do efeito destas mutações na estrutura e função do fator VIII, três importantes considerações sugerem que as nove novas substituições de ponto identificadas representam as causas primárias da hemofilia: as mutações *missense* caracterizam-se por substituições em aminoácidos que são conservados durante a evolução (Kane & Davie, 1988; Elder *et al*, 1993); foi reconhecida apenas uma anormalidade no SSCP em cada paciente e substituições neutras são extremamente raras no gene do fator VIII (Gitschier *et al*, 1984).

Os vários domínios do fator VIII são afetados por mutações. Neste estudo foi observado um frequente envolvimento dos domínios A: na subunidade A1 (5 mutações), subunidade A2 (1 mutação) e subunidade A3 (5 mutações). Os domínios A do fator VIII são de particular

importância na formação de heterodímeros e na manutenção da forma ativa do fator VIII. Estes domínios apresentam homologias com os domínios de proteínas que fixam cobre (Vehar *et al*, 1984; Church *et al*, 1984; Kane & Davie, 1988) . Neste sentido, Pan *et al* (1994) por estudos de homologia entre o fator VIII e proteínas relacionadas ao cobre identificaram importantes ligações deste metal entre os domínios A1 e A3-C1-C2 que é uma ligação estável. No entanto, a forma ativa do fator VIII é decorrente da ligação do domínio A2 com o dímero A1/A3-C1-C2 e nesta ligação são encontrados os sítios de ligação com o cobre; o que sugere provável participação deste metal na estabilidade do fator VIIIa (Fay, 1993; Pittman *et al*, 1994; Pan *et al*, 1994). O domínio B, responsável por 40% da molécula, não possui atividade coagulante (Pittman & Kaufman, 1989). A única alteração molecular neste domínio detectada neste estudo foi a perda de 2pb que resultou em um *frameshift* responsável por um caso de hemofilia grave. Nos domínios C foram identificadas quatro diferentes mutações de ponto. Estes domínios estão relacionados a ligação do fator VIII a fosfolípidos, que é essencial para a função pró-coagulante da molécula (Poole *et al*, 1981). Assim, a análise das possíveis alterações funcionais que afetam o fator VIII podem oferecer dados importantes para o desenvolvimento de melhores produtos de fator VIII por DNA recombinante além de possivelmente contribuir para implantação futura de terapia gênica (Hoeben *et al*, 1992; Webb *et al*, 1993; Kasper *et al*, 1993; Lusher, 1995).

Este estudo demonstrou que a detecção da portadora do gene da hemofilia A pode ser realizada em 70% das famílias com a utilização de limitado número de polimorfismos. Os casos não esclarecidos pelo estudo dos RFLP, na sua maioria, podem ser resolvidos com a identificação do defeito molecular permitindo assim o diagnóstico preciso da portadora.

Como exemplo desse tipo de situação os polimorfismos para as enzimas BclI e HindIII em 7 das 24 famílias inicialmente estudadas não foram informativos, não sendo possível a identificação de portadoras. Deste grupo foram estudados seis hemofílicos relacionados a seis famílias e todos tiveram caracterizado o defeito molecular no gene do fator VIII, permitindo assim o diagnóstico definitivo das portadoras.

A caracterização dos defeitos moleculares na maioria dos pacientes com hemofilia A moderada ou leve, foi possível com a combinação da *multiplex-PCR* e SSCP não-radioativo como

métodos de rastreamento. Essa metodologia é de fácil execução e pode ser aplicada à outros genes de grande extensão como o fator VIII. O grande número de mutações novas descritas neste grupo de pacientes está em acordo com a elevada heterogeneidade das mutações descritas em outras populações e apresenta dados relevantes para um melhor conhecimento das alterações moleculares e funcionais do fator VIII humano.

Conclusões

A utilização dos métodos de biologia molecular no estudo dos polimorfismos de restrição para as endonucleases BclII e Hind III facultam o diagnóstico da portadora do gene da hemofilia A em 70% das famílias brasileiras estudadas.

A combinação das metodologias *Multiplex-PCR* e *Southern blot* utilizadas neste estudo mostrou-se eficaz e sensível para o reconhecimento da maioria das mutações em gene de grande extensão como o fator VIII e permite sua aplicação no estudo de outros genes responsáveis por doenças genéticas.

Foram identificadas 16 mutações diferentes no gene do fator VIII e deste grupo 11 não descritas anteriormente em outras populações.

Resumo

A caracterização molecular na hemofilia A é dificultada pela grande extensão do gene do fator VIII (186Kb e 26 exons) e pela grande heterogeneidade das mutações nos pacientes de diferentes grupos étnicos estudados. Inicialmente a identificação da portadora do gene da hemofilia foi realizada em 24 famílias de pacientes com hemofilia A utilizando-se os polimorfismos de restrição para as endonucleases BclII e HindIII. Foi possível identificar ou excluir portadoras do gene em 70% das famílias estudadas.

Com o objetivo de definir as alterações genéticas de uma população distinta e realizar um aconselhamento genético preciso, foi levado a efeito um estudo das mutações no gene do fator VIII em 42 pacientes brasileiros portadores de hemofilia A.

A análise por *Southern blot* foi realizada nos pacientes com a forma grave da hemofilia para a detecção de inversão do gene do fator VIII com ruptura do gene do fator VIII e foi detectada em 13 de 21 do grupo com hemofilia grave.

A metodologia incluiu a amplificação dos 26 exons do gene do fator VIII em quatro combinações diferentes de exons (*Multiplex-PCR*) e posterior análise do polimorfismo de conformação em hélice simples do DNA (SSCP) não-radioativo no sistema *PhastSystem*® *Pharmacia* com coloração pela prata. A confirmação do defeito molecular foi realizada pelo sequenciamento do exon com padrão eletroforético anormal no SSCP.

O SSCP revelou um padrão anormal de migração em 85% dos casos de hemofilia moderada-leve e em 50% nos casos de hemofilia grave. Foram detectadas 16 mutações de ponto diferentes sendo que 11 não previamente descritas.

Com essa combinação de metodologias foi possível identificar as alterações moleculares em 80% dos pacientes brasileiros com hemofilia A. O grande número de novas mutações está em acordo com a grande heterogeneidade das mutações descritas em outras populações.

Summary

The molecular characterization of the mutations in hemophilia A patients is hampered by the large size of the factor VIII gene and the great heterogeneity of mutations. First of all we carried out a study of RLFPs for the enzymes BclII and HindIII in 24 families of hemophilia A patients and was possible to detect carriers in 70% of the families. Further in a attempt to elucidate the genetic basis of a distinct population and to perform a precise carrier detection we carried out a study of Brazilian patients with hemophilia A. In this study, we have carried out a protocol involving multiplex PCR in which 19 exons were amplified in four different combinations followed by non-radioactive SSCP in order to screen for mutations. Southern blotting was used to detect inversion of the factor VIII gene resulting from recombination between copies of the F8A gene located in intron 22 of the factor VIII gene and two copies close telomeric region of X chromosome. Forty-two hemophilia A patients (21 with severe and 21 with mild-to-moderate disease) were studied. The inversion of factor VIII occurred in 13 out of 21 patients affected by severe hemophilia A. One patient showed a large extra band in addition to the three bands observed following Southern blotting with the F8A probe. An abnormal electrophoretic pattern of SSCP was detected in 85% and 50% of the patients affected by mild-to-moderate and severe disease, respectively. Sixteen different mutations were identified. Eleven mutations were novel and comprised nine point mutations and two small deletions. This study demonstrates that the methodology employed is safe and rapid and has a potential in detecting almost all the genetic defects of the studied hemophiliacs patients.

Referências Bibliográficas

- Aggeler PM, White SC, Glendening MB, Page EW, Leake TB, Bates G. Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency: a new disease resembling hemophilia. **Proc Soc Exp Med** 70:692-694, 1952.
- Aly AM, Higuchi M, Kasper CK, Kazazain Jr HH, Antonarakis SE, Hoyer LW. Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. **Proc Natl Acad Sci** 89:4933-4937, 1992.
- Arnold WD & Hilgartner MW. Hemophilic arthropathy. **J Bone and Joint Surg** 59:287-305, 1977.
- Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Sonati MF, Costa FF. Factor VIII and IX gene polymorphism in a Brazilian black population. **Thromb Haemost** 70:371, 1993.
- Bandinelli E, Simon D, Schrank A, Roisenberg I. Polimorfismos de DNA do genes dos fatores VIII, IX e von Willebrand. **Bol Soc Bras Hematol Hemoter** 16: 84, 1994 (resumo).
- Bray GL, Gomperts ED, Courter S. A multicentric study of recombinant factor VIII (recombinate). Safety, efficacy and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. **Blood** 83:2428-2437, 1994.
- Biggs R, Douglas AS, MacFarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey C, O'Brien JR. Christmas disease; A condition previously mistaken for haemophilia. **Brit Med J** 2:1378-1382, 1952.
- Bunschoten EPM, van Houwelingen JC, Visser EJMS, van Dijken PJ, Kok AJ, Sixma JJ. Bleeding symptoms in carriers of hemophilia A and B. **Thromb Haemost** 59:349-352, 1988.
- Church WR, Jernigan RL, Toole J, Hewick RM, Knopf J, Knutson GJ, Nesheim ME, Mann KG, Fass DN. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 81:6934, 1984.
- Casula L, Murru S, Percorara M, Ristaldi MS, Restagno G, Mancuso G, Morfini M, De Biasi R, Baudo F, Carbonara A, Mori PG, Cao A, Pirastu M. Recurrent mutations and three novel rearrangements in the factor VIII gene of hemophilia A patients of Italian descent. **Blood** 75:662-670, 1990.
- Cooper DN & Krawczak M. Human Gene Mutation. Ios Scientific, Oxford (1993).
- Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. **Nature Genet** 6:236-244, 1994.

- Díaz JEQ, Roisenberg I, Fisher RR. A study of VIIIc and VIIIcAg in normals and hemophilia A patients in a Brazilian population. **Braz J Genet** 11:193-202, 1988.
- Dietrich SL. The epidemiology of HIV infection in haemophiliacs. Recent Advances in Hemophilia Care, pag 79-86. In Progress in Clinical and Biology Care vol 324. Alan R Liss, Inc. New York, 1990.
- Eaton DH, Rodríguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. **Biochemistry** 25:505-512, 1986.
- Elder B, Lakich D, Gitschier J. Sequence of the murine factor VIII cDNA. **Genomics** 16:374, 1993.
- Fay PJ, Smudzin TM. Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIIIa. **J Biol Chem** 267: 13246, 1992.
- Fay PJ. Factor VIII structure and function. **Thromb Haemost** 70:63-67, 1993.
- Eyster ME, Gilli FM, Blatt PM, Hilgartner MW, Ballard JO, Kinney TR. Hemophilia Study Group: Central nervous system bleeding in haemophiliacs. **Blood** 51:1179-1188, 1978.
- Figueiredo MS, Franco RF, Zago MA. Detection of hemophilia A carriers by DNA analysis. Comparison with coagulation tests. **Braz J Genet** 16:187-202, 1993.
- Fischer RR, Lerner C, Roisenberg I. Efeito do sistema sanguíneo ABO sobre os níveis de fator de von Willebrand e de fator VIII em heterozigotas para hemofilia A. **Ciência e Cultura** 41 (suppl.):764, 1987.
- Forbes CD & Madhok R. Genetic disorders of blood coagulation: Clinical presentation and management. In: Disorders of hemostasis. OD Ratnoff & Forbes CD. (2ed.) pp.141-202, WB Saunders Company, Philadelphia (1991).
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of human factor VIII gene. **Nature** 312:326-330, 1984.
- Gitschier J. Maternal duplication associated with gene deletion in sporadic hemophilia. **Am J Hum Genet** 43:274-279, 1988.

- Gitschier J, Kogan S, Diamond C, Levinson B. Genetic basis of hemophilia A. **Thromb Haemost** 66:37-39, 1991.
- Gonzaga AL. Hemofilia: Contribuição ao tratamento da hemofilia A, com especial referência ao emprego de crioprecipitados de fator VIII. Tese de Livre Docência de Hematologia Clínica da Escola de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro, 1970.
- Goodeve AC, Preston FE, Peake IR. Factor VIII gene rearrangements in patients with severe haemophilia A. **Lancet** 343:329-330, 1994
- Graham JB, Rizza CR, Chediak J, Mannucci PM, Briët E, Ljung R, Kasper CK, Essein EM, Green PP. Carrier detection in hemophilia A: A cooperative international study.I.The carrier phenotype. **Blood** 67:1554-1559, 1986.
- Green PP, Mannucci PM, Briët E, Ljung R, Kasper CK, Essein EM, Chediak J, Rizza CR, Graham JB. Carrier detection in hemophilia A:A cooperative international study.II The efficacy of a universal discriminat. **Blood** 67:1560-1567, 1986.
- Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. **Nature Genetics** 5:111-117, 1993.
- Haldane JBS. The rate of spontaneous mutations of a human gene. **J Genet** 31:317-326, 1935.
- Higuchi H, Kazazian HH, Kasch L, Warren TC, McGinniss MJ, Phillips JA, Kasper C, anco R, Antonarakis SE. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:7405-7409, 1991.
- Higuchi M, Antonarakis SE, Kash L, Oldenburg J, Economou-Petersen E, Olek K, Arai M, Inaba H, Kazazian Jr HH. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:8307-8311, 1991.
- Hill-Eubanks DC, Lollar P. von Willebrand is a cofactor for thrombin-catalyzed of the factor VIII ligh chain. **J Biol Chem** 265:17854-17858, 1990.
- Hoeben RC, Einerhand MPW, Briët E, van Ormondt H, Valerio D, van der Eb AJ. Toward gene therapy in haemophilia A: retrovirus-mediated transfer of a factor VIII gene into murine haematopoietic progenitor cells. **Thromb Haemost** 67:341-345, 1992.

- Hoyer LW, Breckinridge RT. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, Factor VIII): Cross-reacting material in a genetic variant of hemophilia A. **Blood** 32:962-971, 1968.
- Jenkins PV, Collins PW, Goldman E, McGraw A, Riddell A, Lee CA, Pasi KJ. Analysis of intron 22 inversions of the factor VIII gene in severe hemophilia A: implications for genetic counseling. **Blood** 84:2197-2201, 1994.
- Johnson DJD, Pemberton S, Acquila M, Mori PG, Tuddenham EGD, O'Brien DP. Factor VIII S373L: Mutation at P1'site confers thrombin cleavage resistance, causing mild haemophilia A. **Thromb Haemost** 71:428-433, 1994.
- Jones P. Haemophilia: a global challenge. **Haemophilia** 1:11-13, 1995.
- Jones PK & Ratnoff OD. The changing prognosis of classic hemophilia (factor VIII "deficiency"). **Ann Intern Med** 114:641-684, 1991.
- Kane W & Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: Structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. **Blood** 71:539-555, 1988.
- Kasper CK, Aledort LM, Counts RB, et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. **Thromb et Diath Haemor** 34:869-872, 1975.
- Kasper CK, Lusher JM and the Transfusion Practice Committee. Recent evaluation of clotting factor concentrates for hemophilia A and B. **Transfusion** 33:422-433, 1993.
- Kazazian Jr HH, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequence represents a novel mechanism for mutation in man. **Nature** 332:164-166, 1988.

- Kazazian Jr HH. The molecular basis of hemophilia A and the present status of carrier and antenatal diagnosis of the disease. **Thromb Haemost** 70:60-62, 1993.
- Lakich D, Kazazian Jr HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. **Nature Genetics** 5:236-241, 1993.
- Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. **Br J Haematol** 86:804-809, 1994.
- Laurell CV. Quantitative estimation proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. **Anal Biochem** 15: 45-52, 1966.
- Lavia P, Macleod D, Bird AP. Coincident start sites for divergent transcripts at a randomly selected CpG-rich island of mouse. **EMBO J** 6:2773-2779, 1987.
- Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G Jr, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. **Genomics** 7:1-11, 1990.
- Levinson B, Kenwrick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. **Genomics** 14:585-589, 1992.
- Lin SW, Lin SR, Shen MC. Characterization of genetics defects of hemophilia A in patients of Chinese origin. **Genomics** 18:496-504, 1993.
- Lubin IM, Healey JF, Scandella D, Runge MS, Lollar P. Elimination of a major inhibitor epitope in factor VIII. **J Biol Chem** 269:8639-8641, 1994.
- Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS and the Kogenate Previously Untreated Patients Study Group. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. **N Engl J Med** 328:453-547, 1993.
- Lusher JM. Considerations for current and future management of haemophilia and its complications. **Haemophilia** 1:2-10, 1995.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning, A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

- Mariani G, Ghirardini A, Bellocco R. Immune tolerance in hemophilia-principal results from the international registry. **Thromb Haemost** 72:155-158, 1994.
- McGinniss MJ, Kazazian HH, Hoyer LW, Bi L, Inaba H, Antonarakis SE. Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. **Genomics** 15:392, 1993.
- Melo L. Hemofilia e outras coagulopatias congênitas no Brasil. **Bol Soc Bras Hematol Hemoter** 11:112-121, 1989.
- Michnick DA, Pittman DD, Wise RJ, Kaufman RJ. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. **J Biol Chem** 269:20.095, 1994.
- Millar DS, Zoll B, Martinowitz U, Kakkar VV, Cooper DN. The molecular genetics of haemophilia A: screening for point mutations in the factor VIII gene using the restriction enzyme TaqI. **Hum Genet** 87:607-612, 1991.
- Miller AD. Progress toward human gene therapy. **Blood** 76:271-278, 1990.
- Morbidity and Mortality Weekly Report 31:365-367, 1982.
- Muru S, Casula L, Percorara, Mori P, Cao A, Pirastu M. Illegitimate recombination produced a duplication within the FVIII gene in a patients with hemophilia A. **Genomics** 7:115-118, 1990
- Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. **Hum Mol Genet** 2:1773, 1993.
- Nilsson IM, Blombäck M, Ramgren O. Haemophilia in Sweeden. **Acta Med Scand** 170:665-681,1961.
- Nilsson IM, Berntorp E, Zettervall O. Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. **N Engl J Med** 318:947-950, 1998.
- Oldenburg J, Schwaab R, Grimm T, Zerres K, Hakenberg P, Brackmann HH, Olek K. Direct and indirect estimation of the sex ratio of mutation frequencies in hemophilia A. **Am J Hum Genet** 53:1229-1238, 1993.

- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci USA** 86:2766, 1989.
- Pattinson JK, Millar DS, McVey JH, Grundy CB, Wieland K, Mibashan RS, Martinowitz U, Tan-Un K, Vidaud M, Goossens M, Sampietro M, Mannucci PM, Krawczak M, Reiss J, Zoll B, Whitmore D, Bowcock S, Wensley R, Ajani A, Mitchell V, Rizza C, Maia R, Winter E, Mayne EE, Schwartz M, Green PJ, Kakkar VV, Tuddenham EGD, Cooper DN. The molecular genetic analysis of hemophilia A: a direct strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene. **Blood** 76:2242-2248, 1990.
- Padgett RA, Grabowsky, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. **Ann Rev Biochem** 55:1119-1150, 1986.
- Pan Y, Defay T, Cohen F, Gitschier J. Structure of the A domains of factor VIII by homology modeling. **Blood** 84: 62a, 1994 (abstract).
- Pavlosky A. Contribution to the pathogenesis of hemophilia. **Blood** 2:185-191, 1947.
- Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, Kraus EM, Ljung R, Mannucci PM, Nicolaides K, Tuddenham EGD. Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. **Blood Coag Fibr** 4:313, 1993.
- Pieneman WC, Deutze-Pretz P, Reitsma PH, Briet E. Screening for mutations in hemophilia A patients by multiplex PCR-SSCP, Southern blotting and RNA analysis: The detection of a genetic abnormality in the factor VIII gene in 30 out of 35 patients. **Br J Haematol** (in press).
- Pinto MT, Fernandez, Perez Bianco PR. Update of 156 episodes of central nervous system bleeding in hemophiliacs. **Haemostasis** 22:259-267, 1992.
- Pittman DD, Kaufman RJ. Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). **Proc Natl Acad Sci USA** 85:2429-2433, 1988.
- Pittman DD, Kaufman RJ. Structure-function relationship of factor VIII elucidated through recombinant DNA technology. **Throm Haemost** 61:161, 1989.
- Pittman DD, Tomkinson KN, Kaufman RJ. Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells. **J Biol Chem** 269:17329, 1994.

- Poole S, Firtel RA, Lamar E, Rowekamp W. Sequence and expression of the Discoidin I gene family in Dictyostelium discoideum. **J Mol Biol** 153:273, 1981.
- Proctor PR, Rappaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin . A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. **Am J Clin Pathol** 36:212-219, 1961.
- Quick AJ, Stanley-Brown M, Brancott FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. **Am J Med Sci** 190: 501-511, 1935.
- Ragni MV, Belle SH, Jaffe RA, Duerdtein SL, Bass DC, McMillam CW, Lovrien EW, Aledort LM, Kisker CT, Stabler SP, Hoots WK, Hilgartner MW, Cox-Gilli J, Buchanan GR, Sanders NL, Brettler DB, Barron LE, Goldsmith JC, Ewenstein B, Smith KJ, Green D, Addiego JE, Kingsley LA. Acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphomas and others malignancies in patients with hemophilia. **Blood** 81:1889-1897, 1993.
- Roisenberg I. Hemofilia e estados hemofilióides no Rio Grande do Sul: frequência, fisiologia e herança. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1971.
- Rosner F. Hemophilia in the Talmud and Rabbinic Writings. **Ann Intern Med** 70:833-837, 1969.
- Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schald DJ, de Moerloose P, Sommer SS, Kazazian HH, Antonarakis SE. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. **Hum Molec Genet** 3:1035, 1994.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT , Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239:487, 1988.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain inhibitors. **Proc Natl Acad Sci** 74:5463-5467, 1977.
- Schulman I e Smith CH. Hemorrhagic disease in an infant due to deficiency of a previously undescribed clotting factor. **Blood** 7:794-807, 1952.
- Shapiro SS & Siegel JE. Genetic disorders of blood coagulation: Clinical presentation and management. In: Disorders of hemostasis. OD Ratnoff & Forbes CD. (2ed.) pp.245-266, WB Saunders Company, Philadelphia (1991).

- Sheffield VC, Bech JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. **Genomics** 16:325-332, 1993.i
- Tizzano EF, Domènech M, Altisent C, Tusell, Baiget M. Inversions in the factor VIII gene in Spanish hemophilia A patients. **Blood** 83:3826, 1994.
- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. **Nature** 312:342-347, 1984.
- Tuddenham EGD, Cooper DN, Gitschier J, Higuchi M, Hoyer LW, Yoshioka A, Peake IR, Olek K, Kazazian HH, Lavergne JM, Giannelli F, Antonarakis SE & Cooper DN.. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VII gene, second edition. **Nucleic Acids Res** 22:3511, 1994.
- Varekamp I, Suurmeijer Th PBM, Bröcker-Vriends AHJT, van Dijck H, Smit C, Rosendaal FR, Briët E. Carrier testing and prenatal diagnosis for hemophilia: experiences and attitudes of 549 potential and obligate carriers. **Am J Med Genet** 37:147-154, 1990.
- Vehar GA, Keyt B, Eaton DH, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Opperman H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ. Structure of human factor VIII. **Nature** 312:337-342, 1984.
- Walker FJ, Scandella D, Fay FJ. Identification of the binding site for activated protein C on the light chain of factors V and VIII. **J Biol Chem** 265:1484-1489, 1990.
- Walker FJ, Fay PJ. Regulation of blood coagulation by the protein C system. **FASEB J** 6:2562-2567, 1992.
- Webb E and Nisbet I. The effect on recombinat protein production of reinstating native introns in the coding sequence of human factor VIII. **Biotechnology Letters** 15:889-894, 1993.
- Weber JL & May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet** 44: 388-396, 1989.
- White GC & Schomaker CB. Factor VIII gene and hemophilia. **Blood** 73:1-12, 1989.

Windsor S, Taylor SAM, Lillicrap D. Multiplex analysis of two intragenic microsatellite repeat polymorphisms in the genetic diagnosis of haemophilia. **Br J Haematol** 86:810-815, 1994.

Windsor S, Taylor SAM, Lillicrap D. Direct detection of a common inversion mutation in the genetic diagnosis of severe hemophilia A. **Blood** 84:2202-2205, 1994.

Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. **Nature** 312:330-336, 1984.