

**FACULDADE BOA VIAGEM  
CENTRO DE CAPACITAÇÃO EDUCACIONAL**

**MELISSA PAPALÉO ROCHA DE LIMA**

**HEMOFILIAS A E B**

**RECIFE  
2013**

**MELISSA PAPALÉO ROCHA DE LIMA**

**HEMOFILIAS A E B**

Monografia apresentada à Faculdade Boa Viagem e ao Centro de Capacitação Educacional, como exigência do curso de Pós-Graduação *Lato sensu* em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial.

Orientador: Prof. MSc. Gustavo Santiago Dimech.

**RECIFE  
2013**

L732h Lima, Melissa Papaléo Rocha de, 1986-  
Hemofilias A e B / Melissa Papaléo Rocha de Lima. – Recife : Ed. do Autor,  
2013.  
45f. : il.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Msc. Gustavo Santiago Dimech.  
Monografia (Curso Pós-Graduação Lato Sensu em Hematologia e Hemoterapia  
Laboratorial) – Faculdade Boa Viagem. Centro de Capacitação Educacional.  
Resumo em português e inglês.  
Inclui referências.  
Inclui anexos.

1. HEMOFILIA – DIGNÓSTICO. 2. HEMOFILIA – PREVENÇÃO. 3. HEMO-  
FILIA – TRATAMENTO – COMPLICAÇÕES E SEQUELAS. 4. SANGUE – DIS-  
TÚRBIOS DA COAGULAÇÃO. 5. HEMORRAGIA. 6. SANGUE – DOENÇAS.  
7. HEMOFILIA – PESQUISA. I. Dimech, Gustavo Santiago. II. Título.

CDU 616.15  
CDD 616.157

PeR – BPE 13-090

**MELISSA PAPALÉO ROCHA DE LIMA**

**HEMOFILIAS A E B**

Monografia apresentada à Faculdade Boa Viagem e ao Centro de Capacitação Educacional, como exigência do curso de Pós Graduação *Lato sensu* em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial.

Recife, 08 de Fevereiro 2013.

**EXAMINADOR**

Nome: \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

**PARECER FINAL:**

---

---

---

---

Aos meus pais, Regina e Waldir, pelo apoio de sempre e por terem me proporcionado essa especialização tão importante para a minha vida profissional.

## RESUMO

As hemofilias são doenças hemorrágicas resultantes da deficiência de fator VIII (hemofilia A) ou de fator IX (hemofilia B) da coagulação, decorrentes de mutações nos genes que codificam os fatores VIII ou IX, respectivamente. A hemofilia A é mais frequente que a hemofilia B e acomete aproximadamente 1:10.000 nascimentos masculinos. A gravidade e frequência dos episódios hemorrágicos estão relacionadas ao nível residual de atividade de fator correspondente presente no plasma e este relaciona-se ao tipo de mutação associada à doença. A clonagem do gene dos fatores VIII e IX tornou possível o conhecimento das bases moleculares da hemofilia, sendo hoje conhecidas mais de 1.000 mutações associadas à doença. Além disso, a disponibilidade de técnicas moleculares acrescentou, ao diagnóstico laboratorial da hemofilia, a possibilidade de caracterizar a doença em nível molecular. O gerenciamento moderno da hemofilia começou verdadeiramente nos anos 1970, quando o aumento da disponibilidade de concentrados de fatores da coagulação liofilizados e a adoção generalizada de terapia de reposição levaram ao controle inicial de hemorragias e à redução de danos musculoesqueléticos típicos de pacientes não tratados ou tratados de forma ineficaz, porém, o desenvolvimento de aloanticorpos inibidores contra o FVIII ou FIX tornou-se a complicação mais desafiadora do tratamento da hemofilia. Esses inibidores, que se desenvolvem em aproximadamente 25-30% dos pacientes com hemofilia A grave, 0,9-7% dos pacientes com hemofilia leve e em apenas 3-5% dos com hemofilia B, tornam as terapias de reposição ineficazes, limitam o acesso dos pacientes a um padrão de cuidados seguro e efetivo e predispõem os mesmos a um risco aumentado de morbidade e mortalidade. Portanto, novas abordagens, como a indução de tolerância imunológica ou a terapia gênica, estão sendo pensadas como formas alternativas e mais eficazes de tratamento da hemofilia, para garantir aos pacientes a qualidade de vida a que todos têm direito.

**Palavras-chaves:** Hemofilia A, Hemofilia B, Fator VIII, Fator IX, Anticorpos inibidores.

## ABSTRACT

Hemophilia is an inherited bleeding disorder caused by a deficiency of functional clotting factors VIII (hemophilia A) or IX (hemophilia B) in the blood plasma, resulting from mutations on FVIII or FIX genes, respectively. Haemophilia A is the most commonly and affects approximately one in 10000 male births. Severity and frequency of bleeding are related to the residual activity of the corresponding factor in plasma and this is associated to the type of mutation. The cloning of factors VIII and IX genes made possible the understanding of hemophilia molecular basis, and more than 1,000 mutations are currently associated with the disease. Furthermore, the availability of molecular techniques made possible characterizing the disease at molecular level. The modern management of hemophilia truly started in the 1970s, when the increased availability of lyophilized plasma concentrates of coagulation factors and the widespread adoption of home replacement therapy led to the early control of hemorrhages and the reduction of the musculoskeletal damage typical of untreated or poorly treated patients, however, the most challenging complication of therapy has become the development of inhibitory alloantibodies against FVIII or FIX. These inhibitors, that develop in approximately 25-30 % of severe hemophilia A patients and in only 3-5 % of those with hemophilia B, render replacement therapies ineffective, limit patient access to a safe and effective standard of care and predispose them to an increased risk of morbidity and mortality. Thus, new approaches as immune tolerance induction or gene therapy are being considered as alternative and more effective treatment of hemophilia, in order to give patients the quality of life to which all are entitled.

**Key-words:** Hemophilia A, Hemophilia B, Factor VIII, Factor IX, Inhibitory antibodies.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Pacientes identificados com coagulopatias hemorrágicas | 10 |
| Figura 2. Hereditariedade da hemofilia                           | 16 |
| Figura 3. Estrutura molecular dos fatores VIII e IX              | 18 |
| Figura 4. Representação esquemática do gene do fator VIII        | 20 |
| Figura 5. Representação esquemática do gene do fator IX          | 22 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |  |
|------------------|--|
| AIDS             | Síndrome da Imunodeficiência Humana          |
| CPPa             | Complexo de protrombina parcialmente ativada |
| EGF              | Fator de crescimento epidérmico              |
| FVIII            | Fator VIII da coagulação                     |
| FVIIIa           | Fator VIII ativado                           |
| FIX              | Fator IX da coagulação                       |
| FIXa             | Fator IX ativado                             |
| FX               | Fator X da coagulação                        |
| FXa              | Fator X ativado                              |
| FT               | Fator tecidual                               |
| F8               | Gene do fator VIII                           |
| F9               | Gene do fator IX                             |
| Gla              | Ácido gama carboxiglutâmico                  |
| HCV              | Vírus da hepatite C                          |
| HIV              | Vírus da imunodeficiência humana             |
| HLA              | Antígeno de histocompatibilidade             |
| INT22            | Íntron 22                                    |
| INV-1            | Inversão do íntron 1                         |
| ITI              | Indução de tolerância imunológica            |
| PCR              | Reação em cadeia da polimerase               |
| rFVIIa           | Fator VIIa recombinante                      |
| RNA <sub>m</sub> | RNA mensageiro                               |
| vCJD             | Doença de Creutzfeldt-Jakob                  |
| VWF              | Fator de Von Willebrand                      |

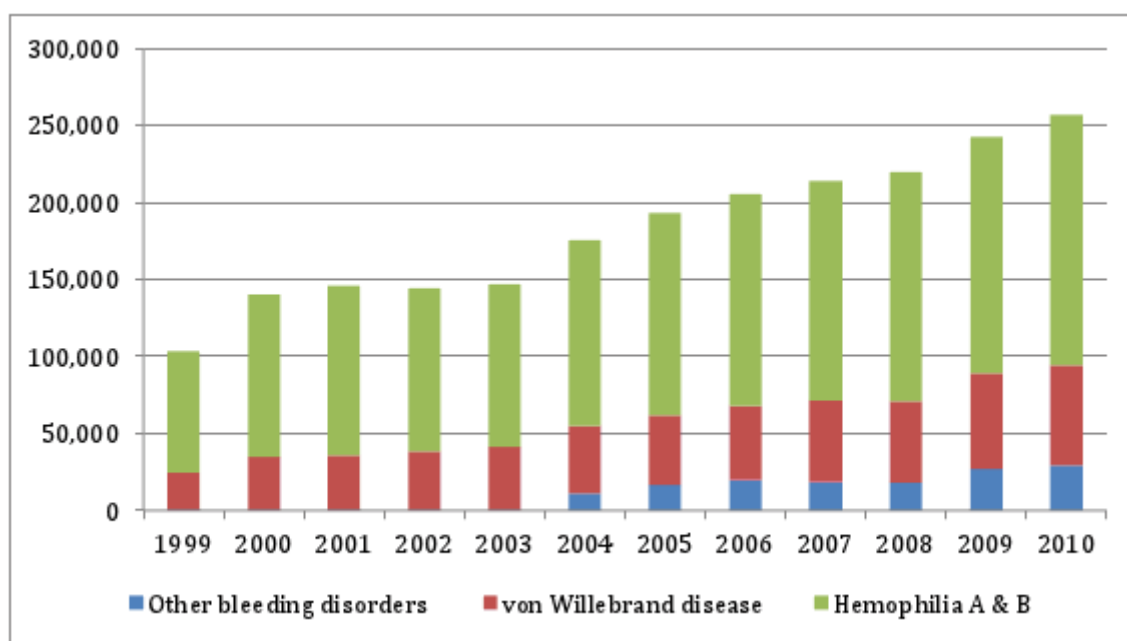
## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>11</b> |
| <b>1 FISIOPATOLOGIA DAS HEMOFILIAS A E B</b>               | <b>13</b> |
| <b>2 EPIDEMIOLOGIA</b>                                     | <b>15</b> |
| <b>3 GENÉTICA MOLECULAR</b>                                | <b>18</b> |
| <b>4 DIAGNÓSTICO</b>                                       | <b>24</b> |
| <b>5 TRATAMENTO</b>  | <b>27</b> |
| <b>6 PRESENÇA DE INIBIDORES E TRATAMENTOS ALTERNATIVOS</b> | <b>30</b> |
| <b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                              | <b>35</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>37</b> |

## INTRODUÇÃO

A coagulação do sangue consiste em uma série de reações bioquímicas sequenciais envolvendo a interação de proteínas, comumente referidas como fatores da coagulação, além de células (em particular, as plaquetas) e íons. O processo, em última análise, leva à formação de um coágulo, cujo principal componente é a fibrina (HIRSH, WEITZ, 1999). Deficiências dos fatores da coagulação podem ocasionar doenças hemorrágicas. As principais manifestações clínicas destas doenças são os sangramentos que podem ocorrer de forma espontânea ou induzida por trauma ou cirurgia. Dentre todas as coagulopatias, as hemofilias e a doença de von Willebrand são as mais frequentes (figura 1). O primeiro relato conhecido sobre hemofilia encontra-se em um decreto do Talmude (livro de condutas do povo judeu) datado do século II d.C. Neste decreto, o relator isenta da circuncisão crianças provenientes de famílias que tenham sofrido duas mortes decorrentes de hemorragias após o procedimento. Desde então, a hemofilia soma mais de 1.800 anos de história, contada por esparsos casos durante a Idade Média, por estudos pioneiros durante o século XIX e por avanços da bioquímica e genética ao longo do século XX (DIMICHELE, NEUFELD, 1998; MANNUCCI, TUDDENBAM, 1999).

**Figura 1** - Pacientes identificados com coagulopatias hemorrágicas.



Fonte: Federação Mundial de Hemofilia (2010)

As hemofilias são doenças resultantes da deficiência quantitativa dos fatores VIII (FVIII) (hemofilia A) ou IX (FIX) (hemofilia B) da coagulação, podendo decorrer devido a fatores adquiridos ou hereditários. As formas adquiridas, mais raras, são resultantes do desenvolvimento de autoanticorpos, associados a doenças autoimunes, câncer ou causas de origem idiopática. A hemofilia hereditária resulta de alterações nos genes que codificam o fator VIII (hemofilia A) ou IX (hemofilia B) da coagulação (BOLTON-MAGGS, PASI, 2003).

## 1 FISIOPATOLOGIA DAS HEMOFILIAS A E B

As hemofilias A e B são clinicamente indistinguíveis. O diagnóstico deve ser confirmado por ensaio específico para o fator. A tendência a sangramento é relacionada à concentração do fator e é classificada como leve, moderada e grave (WHITE et al., 2001). Nos indivíduos com hemofilia A grave (aproximadamente 50% dos casos; atividade do FVIII < 0,01 U/mL), a hemorragia pode ocorrer espontaneamente, enquanto pacientes com hemofilia moderada (cerca de 10% dos indivíduos; atividade do FVIII 0,01-0,05 U/mL) apresentam um fenótipo intermediário. Pacientes portadores da forma leve da doença, observada em 30%-40% dos casos (atividade do FVIII 0,05-0,4 U/mL), sofrem de hemorragias pós-trauma ou pós-cirúrgicas (ANTONARAKIS et al., 1995, Silva Pinto et al., 2012).

O fator VIII é uma glicoproteína plasmática complexa com 2351 aminoácidos e é sintetizada primariamente pelos hepatócitos, embora rins, células endoteliais e tecidos linfáticos possam também sintetizar pequenas quantidades (Hollestelle et al., 2001). É um dos maiores e menos estáveis fatores da coagulação, que circula no plasma em um complexo não covalente com o fator de Von Willebrand (VWF). O fator VIII tem uma vida média de aproximadamente 12 horas em adultos (mais curta em crianças). O VWF protege o fator VIII da degradação proteolítica prematura e concentra-o em sítios de lesão vascular.

O Fator IX é uma serina-protease de 415 aminoácidos sintetizada no fígado e é a maior das proteínas vitamina K-dependentes. A vitamina K é necessária para permitir a gama-carboxilação na região N-terminal dos resíduos de ácido glutâmico para formar domínios Gla, que são cruciais para a função normal e a atividade biológica. A concentração plasmática de fator IX é cerca de 50 vezes maior do que a do fator VIII, e o fator IX tem uma vida média de aproximadamente 24 horas.

O sangramento ocorre na hemofilia devido à falha da hemostasia secundária. A hemostasia primária com a formação do botão plaquetário ocorre normalmente, mas a estabilização do botão pela fibrina é defeituosa por conta da inadequada quantidade de trombina gerada. Embora a hipótese clássica da cascata da coagulação proponha duas vias separadas, atualmente sabe-se que os fatores VIII e IX são centrais no processo da coagulação sanguínea e para a adequada geração de trombina. Após a lesão tecidual, a ativação do complexo formado pelo fator tecidual e pelo fator VII medeia a geração de fator X ativado.

Essa produção deve ser amplificada pelos fatores IX e VIII para permitir o progresso e conclusão da coagulação. Esse esquema mostra que na falta de fator VIII ou IX, o sangramento ocorrerá porque a amplificação e a geração consolidada do fator Xa é insuficiente para sustentar a hemostasia (Bolton-Maggs, Pasi, 2003).

## 2 EPIDEMIOLOGIA

A hemofilia é conhecida há mais de 2000 anos e ganhou atenção pública significativa devido à sua associação com famílias reais europeias (Ingram, 1976; Stevens, 1999). A hemofilia A, o tipo mais comum de hemofilia, é causada pela deficiência do fator VIII da coagulação, enquanto que a hemofilia B ou “Hemofilia da Rainha Vitória” é causada pela deficiência do fator IX (Stevens, 1999 ; Rogaev et al., 2009). Por ser uma doença ligada ao cromossomo X, é tipicamente expressa em homens, enquanto as mulheres são carreadoras da doença (Figura 2) (Biggs, 1967; Mannucci, Tuddenham, 2001). Hemartrose ou hemorragia nas articulações são características da doença. Outras manifestações hemorrágicas incluem sangramentos em músculos e órgãos internos, como o sistema nervoso central (SNC). Dependendo da atividade endógena do FVIII/FIX, a severidade da hemofilia em homens afetados variam entre leve (5-40% de atividade), moderada (1-5% de atividade) e severa ou grave (<1% ou essencialmente nenhuma atividade) (White et al., 2001). Na hemofilia A, a forma grave da doença acontece em 50-70% dos casos, enquanto que 70% dos pacientes com hemofilia B têm a forma leve ou moderada da doença. O fenótipo do sangramento geralmente corresponde à severidade da doença. Pacientes com hemofilia leve usualmente sangram apenas após traumas ou cirurgias, já os com hemofilia grave podem experimentar uma média de 20-30 sangramentos por ano, frequentemente espontâneos ou causados por trauma trivial. Pacientes com hemofilia moderada têm um padrão de sangramento variável, que oscilam do fenótipo leve ao grave.

A hemofilia A está associada a mutações no gene que codifica o F VIII, localizado na porção 2.8 do braço longo do cromossomo X. Até o presente momento, foram relatadas mais de 800 mutações associadas à doença, conforme The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site – HAMSTeRS. É importante ressaltar que, em cerca de 25%–30% dos casos de hemofilia A, o evento genético é novo (mutação de novo), não havendo, neste caso, relato de ocorrência da doença em outros membros da família. A mutação de novo pode ocorrer tanto em mulheres quanto em homens; este evento está relacionado à geração de portadoras e hemofílicos, respectivamente (Brasil, 2006).

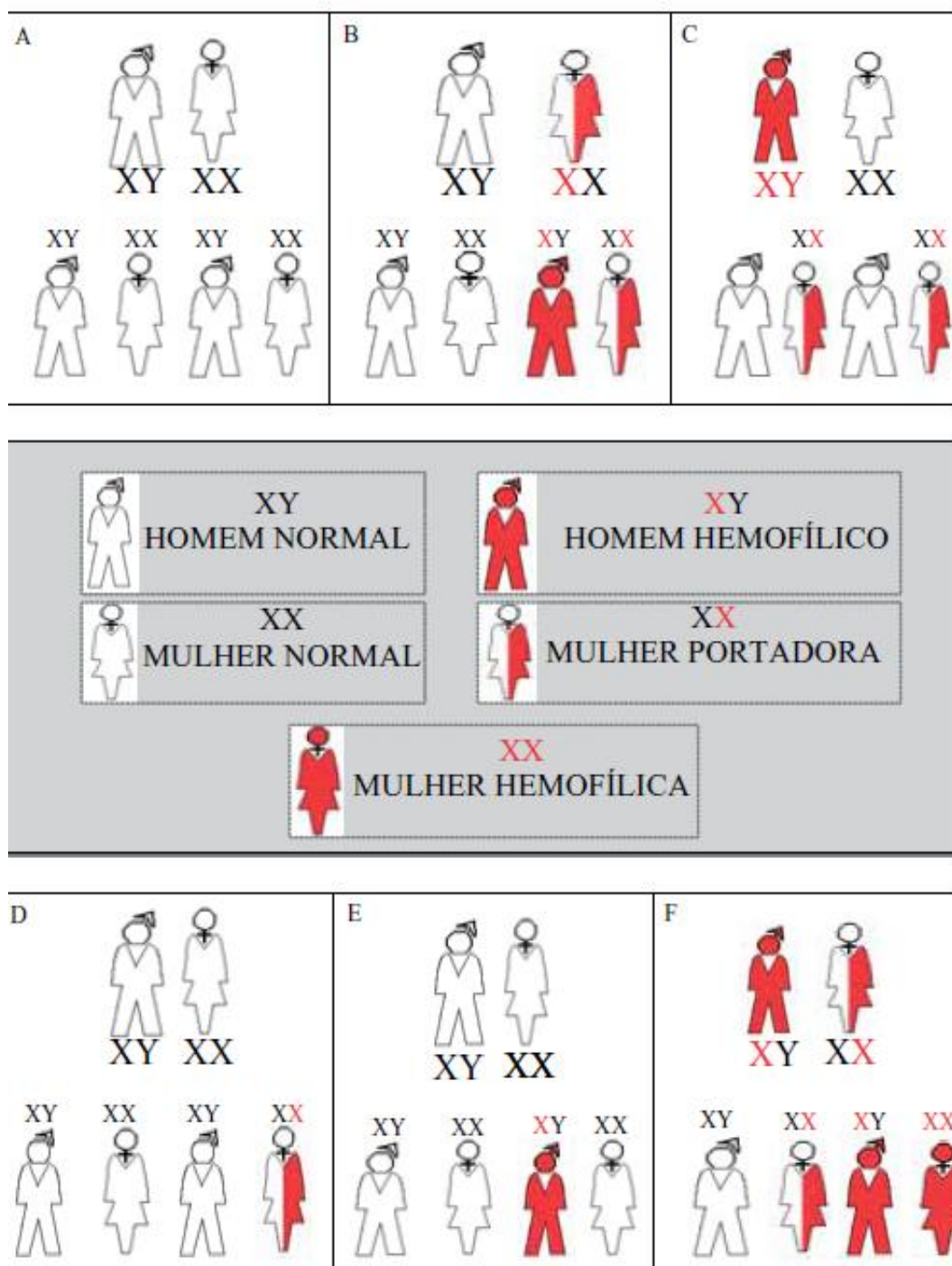
Por ser uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, a hemofilia afeta quase exclusivamente homens. Ocorre em todos os grupos raciais e pode ser

encontrada em todo o mundo (World Federation of Hemophilia). A deficiência de fator VIII (Hemofilia A) é a mais frequente, ficando com 85% dos casos; já a deficiência do fator IX (Hemofilia B) corresponde a 15%. A incidência na população mundial é de 1/10.000 (pelo fator VIII) e de 1/30.000 (pelo fator IX) nascimentos do sexo masculino (CAIO, 2000; BRASIL, 2006). Esta frequência parece não variar consideravelmente entre as populações e tem sido mantida por um equilíbrio entre a perda de mutações, por exemplo, no caso de um paciente com hemofilia que tem somente filhos homens e não transmite aos mesmos a doença, e o aparecimento de mutações espontâneas (Hedner et al., 2000).

De acordo com o Registro de Coagulopatias Hereditárias do Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/saude>) no ano 2012, 10.464 pacientes hemofílicos A e B estavam cadastrados no Brasil. O tratamento dos pacientes com hemofilia é caro. Por ano, são gastos em nosso país, em torno de US\$ 150 milhões com a importação de hemoderivados, incluindo os fatores VIII e IX da coagulação, destinados ao tratamento desses pacientes.



**Figura 2 - Hereditariedade da hemofilia**



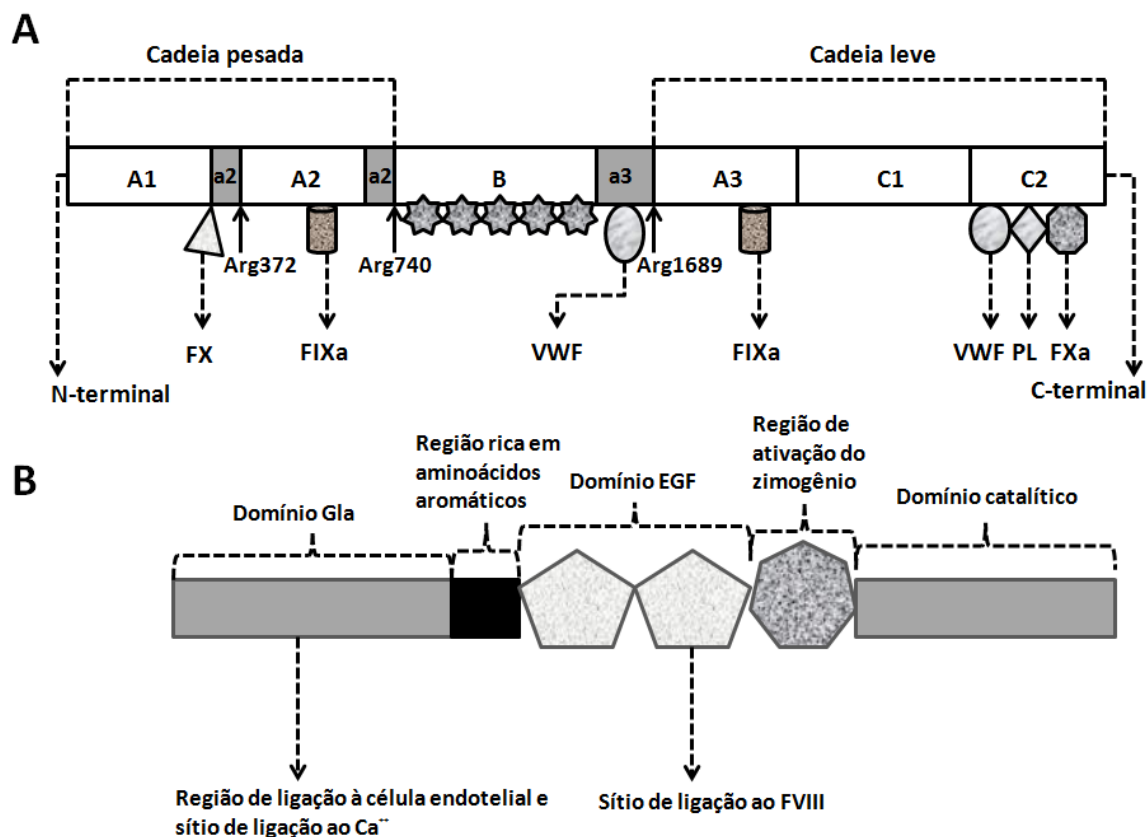
Fonte: BRASIL, 2006.

### 3 GENÉTICA MOLECULAR

Enquanto aspectos clínicos e bioquímicos da hemofilia são conhecidos há décadas, as bases moleculares da doença somente foram compreendidas a partir de 1984 após a clonagem e caracterização dos genes que codificam os fatores VIII e IX (PIO, OLIVEIRA, REZENDE, 2009).

Ambos os fatores VIII e IX são sintetizados no fígado, o FVIII nas células endoteliais sinusoidais ou células de Kupffer e o FIX nos hepatócitos. A molécula madura do FVIII é um heterodímero e consiste de 5 domínios (2A, 2C, 1B) e três regiões ricas em aminoácidos (a1, a2, a3) na junção dos domínios A1/A2, A2/B, e B/A3 (Figura 3A) (Vehar et al, 1984; Kaufman, 1991; Lenting, van Mourik, Mertens, 1998). O domínio B é importante para a expressão e função do FVIII, mas não tem nenhum papel na função de coagulação da molécula. O fator IX maduro é uma glicoproteína de cadeia única e consiste de cinco domínios: um domínio rico em ácido gama carboxiglutâmico (Gla), uma região rica em aminoácidos aromáticos, um domínio de fator de crescimento epidérmico (EGF), um domínio de ativação do zimogênio e um domínio catalítico (Figura 3B). O FIX requer gama carboxilação para exercer a sua função enzimática. O FVIII é covalentemente ligado ao fator de Von Willebrand e age como cofator para a ativação do FIX para formar o complexo Tenase intrínseco. A ligação do FIXa e FVIIIa a superfícies fosfolipídicas constitui o complexo Tenase, que é requerido para a geração de trombina e amplificação da cascata de coagulação. Uma deficiência de um desses fatores causa redução significativa da geração de trombina levando a uma comprometida formação de coágulos e hemostasia deficiente, causando, portanto, tendência a hemorragias ao longo da vida (MANN, 2009).

**Figura 3 - Estrutura molecular dos fatores VIII e IX**



O domínio do fator de crescimento endotelial (EGF) contribui na formação de complexo proteico com o FVIII (A) e com a proteína madura do FIX (B). **A:** O fator VIII requer clivagem pela trombina para a sua ativação e liberação do fator de Von Willebrand. As setas espessas indicam os sítios de clivagem induzida pela trombina (Arg 372, Arg 730 e Arg 1689). Os domínios ácidos sombreados (a1, a2, a3) ligam-se à trombina e aumentam a ativação do FVIII induzida por trombina. As setas tracejadas mostram os sítios de ligação ao fator X (FX), fator IXa (FIXa), VWF, fosfolípidos (PL) e fator X ativado (FXa). O domínio C2 é um sítio de ligação funcionalmente importante para a interação com o VWF, FIXa, trombina e membrana fosfolipídica. O domínio B indica região pesadamente glicosilada, como mostrado por estrelas, requerida para a secreção do FVIII. **B:** O FIX requer gama carboxilação do domínio rico em ácido gama carboxiglutâmico (Gla) para a sua ativação. O domínio EGF contribui na formação de complexo proteico com o FIX. O domínio catalítico é responsável pela função enzimática do FIX. A função da região rica em aminoácidos aromáticos não é conhecida.

**Fonte:** adaptada de Sharathkumar, Carcao, 2011.

A hemofilia pode ser causada por uma variedade de anormalidades genéticas, incluindo rearranjos gênicos, inserções e deleções de sequências genéticas de variados tamanhos e mutações pontuais (missense ou non-sense) dentro dos genes do FVIII ou FIX (WACEY et al., 1996; TUDDENHAM., 1991; TUDDENHAM., 1994; GIANNELLI, GREEN, 1996; GIANNELLI, 1998; TAVASSOLI., 1999; GREEN., 2008).

Bases de dados de mutações como a HAMSTeRS e Haemophilia B Mutation Database são mantidas para entender a heterogeneidade molecular das hemofilias A e B, respectivamente (WACEY et al., 1996; GIANNELLI, 1997; BAXEVANIS, 2000).

A mutação mais comum que causa hemofilia A grave inclui a inversão do íntron 22, ocorrendo em 45% dos pacientes, seguida das mutações pontuais em 30%, mutações “frameshift” em 15% e deleções em 10-20% (WACEY et al., 1996). Em contraste, as formas leve e moderada da doença são geralmente causadas por várias mutações missense. Nenhuma mutação foi identificada em 2-4% dos pacientes com a forma grave da doença, o que implica que mutações dentro das regiões não codificadoras do gene do FVIII ou mutações para além do F8 podem ser responsáveis pelo fenótipo da hemofilia A. Os fenótipos clínicos e a atividade do FVIII são altamente variáveis em pacientes com hemofilia A leve e moderada contendo exatamente a mesma mutação, o que sugere que fatores adicionais além da própria mutação provavelmente influenciam nos níveis de FVIII (Uen et al., 2003). Similarmente, 10% dos pacientes com hemofilia A grave que contêm a mesma inversão do íntron 22 demonstram um variável fenótipo hemorrágico que varia da forma leve à moderada (ALEDORT, HASCHMEYER, PETTERSSON, 1994; VAN DIJK, 2005).

Essa variabilidade genótipo-fenótipo pode ser parcialmente explicada pelas diferenças nas taxas de geração de trombina e fibrinólise entre pacientes (Dargaud et al., 2005; Dargaud, Meunier, Negrier, 2004; Grunewald et al., 2002; Walsh, Rainsford, Biggs, 1973). Por exemplo, o potencial de geração de trombina pode ser aumentado em indivíduos que são co-herdeiros de traço trombofílico, como o fator V de Leiden ou a mutação G20210A no gene da protrombina (Nichols et al., 1996; Lee et al., 2000; Dargaud, Meunier, Negrier, 2004; Dargaud et al., 2005), enquanto que indivíduos com taxas aumentadas de fibrinólise exibirão maior tendência a sangramentos (Grunewald et al., 2002).

Adicionalmente, fatores não biológicos, como diferenças no comportamento de tomada de risco entre os pacientes também contribuem para o risco de sangramento (Heijnen, Buzzard, 2005). Um melhor entendimento da heterogeneidade do genótipo-fenótipo em pacientes hemofílicos ajudará a individualizar seus regimes de tratamento.

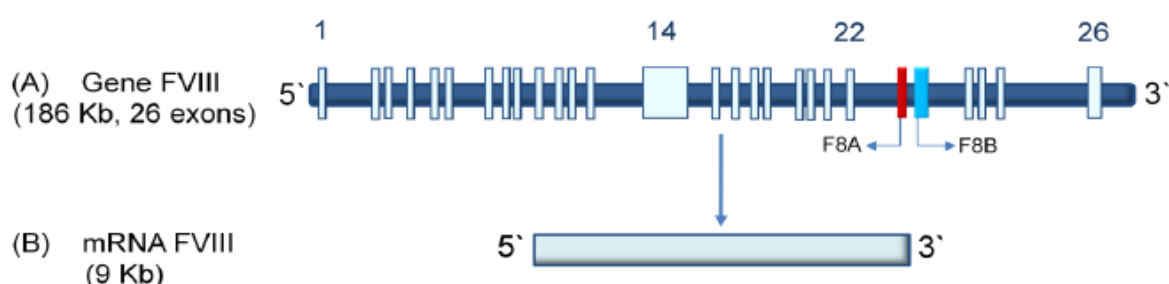
Ao contrário da hemofilia A, as mutações missense são predominantes na hemofilia B, sendo responsáveis por 70% dos casos graves e 97% dos casos leves e moderados (Sommer et al., 1992). Pequenas inserções ou deleções e rearranjos gênicos complexos são responsáveis por 10-15% e 1-5% dos casos severos, respectivamente (Giannelli et al., 1996).

O defeito mais simples conhecido na hemofilia B é a ausência da proteína do FIX devido à completa ausência do gene do FIX (F9), mas isso é responsável por menos de 1% dos casos (Anson et al., 1988). Aproximadamente 700 diferentes mutações foram documentadas na hemofilia B, a maioria das quais prejudicam a síntese, secreção ou estabilidade do FIX (Giannelli et al., 1992).

Um número significativo de ambas as mutações dos genes FVIII e FIX ocorre nos dinucleotídeos CG (Youssofian et al., 1986; Reiner & Thompson, 1992). Essas mutações frequentemente envolvem resíduos de arginina em posições críticas, resultando em alterações nos sítios funcionais da molécula ou em códons de parada inapropriados. Cerca de um terço dos pacientes com hemofilia tem mutações novas (Gitschier et al., 1991)

O gene do fator VIII (*F8*) está localizado no braço longo do cromossomo X (banda Xq28) e compreende uma região de 186 Kb, constituído por 26 éxons, separados por 25 íntrons. Os éxons variam entre 69 a 262 pb, exceto os éxons 14 e 26, que contêm 3.106 e 1.958 pb, respectivamente. O RNA mensageiro (RNAm) possui 9 Kb (Gitschier et al., 1984) (Figura 4).

**Figura 4** - Representação esquemática do gene do fator VIII



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

**Fonte:** SANTOS, 2010.

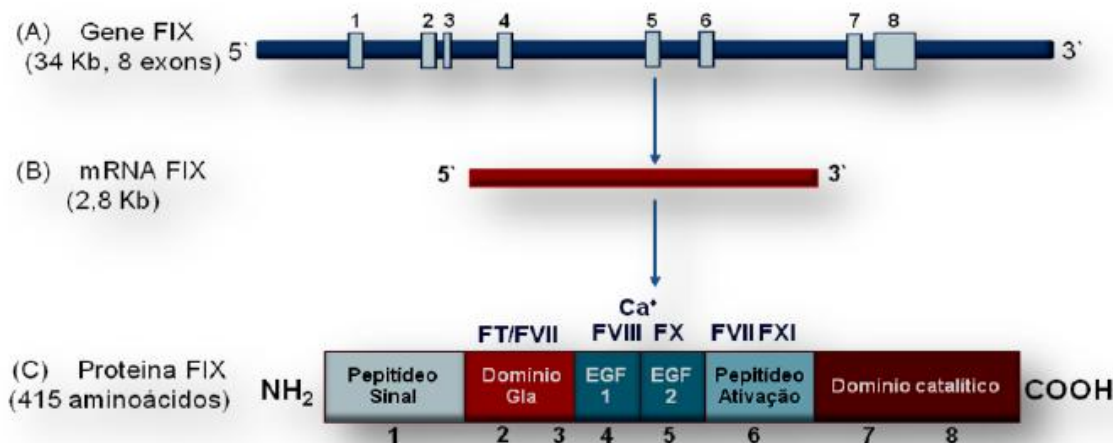
O F8 compreende cerca de 0,1% do cromossomo X e em 80% é constituído por regiões de íntrons. O maior íntron é o 22 (INT22) com 32 Kb. Esta região contém uma ilha de nucleotídeos CpG, situados a 10 Kb do éxon 22, que podem funcionar como regiões promotoras bidirecionais, caracterizando a existência de dois genes: F8A e F8B. O gene F8A, que é transcrito em direção oposta ao gene do fator VIII possui 1,8 Kb, enquanto que o F8B com 2,5 Kb é transcrito no mesmo sentido do fator VIII. Duas cópias homólogas do gene F8A foram descritas em uma região distante de aproximadamente 500 Kb em direção ao telômero. A função do F8A e F8B ainda é desconhecida. Cerca de 40% dos casos de hemofilia A classificados como grave, ou seja, com < 1% de atividade do FVIII, são decorrentes de um rearranjo molecular que leva à inversão do íntron 22 do gene do fator VIII (INV-22) (Naylor et al., 1992). Essa mutação é decorrente de uma recombinação entre uma região de 9,5 Kb do íntron 22 (Int22h1) e uma das duas regiões extragênicas homólogas Int22h2 e Int22h3, que resultarão respectivamente na inversão íntron 22 do tipo I ou tipo II (Antonarakis et al., 1995). Recentemente, Bagnall et al., (2002) identificou uma segunda inversão de seqüências do íntron 1 do gene do fator VIII (INV-1) que está presente em cerca de 5% dos pacientes com hemofilia A grave. Entre os outros defeitos do gene do FVIII causadores de hemofilia, a maioria deles é decorrente de substituições de um único nucleotídeo e somente em 5% dos casos há inserções ou deleções.

Algumas características do F8 devem ser enfatizadas: (I) a presença de cerca de 70 ilhas CpG, das quais 2% estão em sequências codificadoras; (II) o grande tamanho do éxon 14 (3.106 pb), que representa cerca de 40% da região codificadora, mas que codifica a parte funcionalmente menos importante da proteína e (III) o grande tamanho do íntron 22, que apresenta uma ilha de CpG que funciona como promotor bidirecional para dois transcritos adicionais denominados F8A e F8B (OLDENBURG, et al, 2000).

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

O gene do fator IX (F9) com 34Kb, também está localizado na extremidade do braço longo do cromossomo X (banda Xq-27), mas em região distante do local envolvido com a síntese do FVIII. O F9 possui oito éxons que codificam um RNAm com 2,8 Kb. O gene foi inicialmente clonado em 1982 (Choo et al., 1982), e seqüenciado em 1985 (Yoshitake et al., 1985). O fator IX (FIX) é uma glicoproteína com 415 aminoácidos e tem quatro domínios, como os outros fatores da coagulação dependentes da vitamina K. O primeiro domínio (Gla) contém os resíduos de ácido Y-carboxiglutâmico necessários para ligação, dependente de íons cálcio, do fator IX aos fosfolípides e às células endoteliais. As funções dos dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, domínio EGF-1 e EGF-2, não são inteiramente claras, parecendo estar relacionadas com ligação do FIX aos fatores VIII e X e à incorporação do FIX ativado ao “complexo tenase”. No último domínio, o domínio catalítico, localiza-se o sítio ativo serina-protease do FIX (Figura 5). De maneira oposta à hemofilia A, a taxa de mutação espontânea no gene do FIX é relativamente baixa (Rodgers et al., 1999).

**Figura 5** - Representação esquemática do gene do fator IX



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

**Fonte:** SANTOS, 2010.

## 4 DIAGNÓSTICO

A história familiar e a ocorrência de episódios hemorrágicos são os principais dados para o diagnóstico da hemofilia. Entretanto, cerca de 20%-30% dos pacientes com hemofilia não apresentam história familiar da doença.

A deficiência de FVIII é diagnosticada laboratorialmente e inclui todas as situações clínicas em que a atividade do FVIII da coagulação é mais baixa do que os valores normais, podendo levar a complicações clínicas hemorrágicas. Um ensaio de FVIII tem que ser realizado quando há suspeitas de que um paciente tenha hemofilia ou seja um carreador da doença, ou quando um teste de triagem de coagulação está prolongado (Barrowcliffe, 2003; Barrowcliffe, 2004). O diagnóstico correto da deficiência de FVIII é pré-requisito para uma estratégia de tratamento sob medida para o paciente. É extremamente importante discriminar a hemofilia entre as formas grave (FVIII<0,01 U/mL), moderada (FVIII entre 0,01 e 0,05 U/mL) e leve (FVIII entre 0,05 e 0,4 U/mL). Além disso, a identificação correta de pacientes com sub-hemofilia e carreadores da doença também é importante, já que esses pacientes necessitam de proteção contra complicações hemorrágicas durante intervenções cirúrgicas (Plug et al., 2006).

A disponibilidade de técnicas moleculares acrescentou, ao diagnóstico laboratorial da hemofilia, a possibilidade de caracterizar a doença em nível molecular. A análise molecular pode utilizar tanto DNA ou RNA, embora o primeiro seja mais utilizado em função de sua maior estabilidade e facilidade de manuseio. As abordagens utilizadas para a análise do DNA podem ser diretas ou indiretas. As abordagens indiretas são baseadas em análise de ligação e empregam marcadores polimórficos específicos. As abordagens diretas são baseadas em diversas técnicas moleculares que permitem a identificação precisa da mutação. Entretanto, apresentam como dificuldade o extenso tamanho de F8, a complexidade genômica do mesmo e a grande diversidade de mutações. Mutações envolvendo grandes sequências de DNA, isto é, grandes deleções, inserções ou rearranjos podem ser identificadas por meio de análise de *Southern blotting* (Saweck et al., 2005). Para a detecção da inversão do intron 22, vêm sendo utilizadas as técnicas de PCR longa propostas por Liu e colaboradores (1998), e, mais recentemente, uma técnica de PCR multiplex proposta por Rossetti e colaboradores (2005). Mutações envolvendo pequenas alterações na sequência de



DNA (em geral, mutações em ponto) requerem procedimentos técnicos especiais. Para tal, utiliza-se a amplificação por PCR, seguida de um ensaio de mobilidade eletroforética (DGGE - *Denaturing, Gradient Gel eletrophoresis*, SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*, CSGE - *Conformation Sensitive Gel Eletrophoresis*, DHPLC - *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*, e CCMA - *Chemical Cleavage Mismatch Analysis*) e/ou de sequenciamento (Goodeve, 1998; Vidal et al., 2001). De modo geral, as taxas de detecção de mutações obtidas com estes ensaios são bastante elevadas e têm sido aperfeiçoadas mediante adequação de protocolos.

Existem duas diferentes maneiras de avaliar geneticamente a hemofilia: 1. Análise de polimorfismo de nucleotídeo único ou microssatélites de sequência repetida em número variável nos genes dos fatores VIII e IX para localizar o cromossomo X defeituoso na família (estudo de linkage); 2. Identificação da mutação no gene do fator VIII ou IX (detecção de mutação direta) (Peake et al., 1993; Peyvandi, 2005).

O estudo de linkage pode ser seguro em mais de 99% dos casos (aproximadamente 1% de chance de recombinação) quando aplicada em famílias com mais de um membro afetado (hemofilia familiar), mas somente pode excluir o estado de portador de uma mulher quando aplicado a famílias sem nenhuma história prévia de hemofilia (hemofilia esporádica). O principal requisito no estudo de linkage é a heterozigose do marcador polimórfico na mãe do caso diagnosticado. Isso requer uma estratégia para a análise sequencial de diferentes polimorfismos nos genes F8 e F9 dependendo das taxas de heterozigose na população. Tendo em vista a variação étnica e geográfica considerável nas frequências de alelos desses polimorfismos (Peake et al., 1993), é necessário estabelecer a informatividade desses polimorfismos em diferentes populações (Lalloz et al., 1994; Jayandharan et al., 2004; Soares, Chamone, Bydlowski, 2001).

A detecção direta de mutações causadoras da doença tem sido cada vez mais utilizada para o diagnóstico da hemofilia. Essa método possui aproximadamente 100% de precisão e é informativa em mais de 95% das famílias com hemofilia A e quase 100% das famílias com hemofilia B. É igualmente eficiente e sensível na detecção de mutações em ambas hemofilias familiar e esporádica. A estratégia empregada inclui amplificação dos genes F8 e F9 por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida da detecção de mutações por vários

métodos de rastreio e/ou sequenciamento de DNA. Por razões de custo e de ampla aplicabilidade, um método simples de detecção de mutação realizada anteriormente ao sequenciamento fornece uma ferramenta poderosa e precisa para o diagnóstico genético. Várias técnicas de identificação de mutações podem ser usadas para detectar produtos da PCR dos genes F8 e F9. Perfis anormais de produtos de PCR são sequenciados para identificar a alteração nucleotídica. Além disso, não são de alta tecnologia como PCR em tempo real ou eletroforese capilar com detecção de fluorescência (Tizzano et al., 2005).

## 5 TRATAMENTO

Nos anos 1950 e início de 1960, hemofílicos apenas poderiam ser tratados com transfusão de sangue total ou plasma fresco. Infelizmente, não há proteínas FVIII e FIX suficiente nesses produtos para conter um sangramento grave. Dessa forma, a maioria das pessoas com hemofilia grave morria ainda na infância ou no início da idade adulta, tendo como principais causas de morte as hemorragias pós cirúrgicas ou traumáticas ou hemorragias em órgãos vitais (especialmente no cérebro) (Mannucci, 2008). Em 1964, a descoberta por Judith Pool que a fração crioprecipitado do plasma continha grandes quantidades de FVIII representou um enorme avanço para o tratamento da hemofilia. Pela primeira vez, quantidade suficiente de FVIII poderia ser infundida em volumes relativamente pequenos para controlar sangramentos graves, tornando viáveis cirurgias de grande porte (Mannucci, 2002).

No entanto, o gerenciamento moderno da hemofilia começou verdadeiramente nos anos 1970, quando o aumento da disponibilidade de concentrados de fatores da coagulação liofilizados e a adoção generalizada de terapia de reposição levaram ao controle inicial de hemorragias e à redução de danos musculoesqueléticos típicos de pacientes não tratados ou tratados de forma ineficaz. A profilaxia primária foi pioneira e bem-sucedida na Suécia e depois adotada em outros países, atingindo o objetivo de impedir a maioria dos episódios hemorrágicos e reduzindo ainda mais o impacto da artropatia (Nilsson, 1993). Centros especializados em hemofilia tornaram-se menos sobrecarregados pelo fardo de fornecer tratamento de emergência, podendo, assim, desenvolver programas de atenção integral, com o envolvimento de vários especialistas como ortopedistas, fisioterapeutas, dentistas e assistentes sociais. Cirurgias eletivas, particularmente operações ortopédicas, ajudaram a corrigir ou minimizar as anormalidades musculoesqueléticas desenvolvidas como consequência da falta de tratamento ou de tratamento ineficaz de episódios hemorrágicos em músculos e articulações. Em 1977, a descoberta da desmopressina, uma droga sintética que aumenta os níveis plasmáticos de FVIII e VWF, forneceu um tratamento novo, seguro e de baixo custo para pacientes com hemofilia A leve, o que poderia evitar ou reduzir substancialmente o uso de produtos derivados do plasma, os custos

correspondentes e ainda os riscos de infecção transmitidas pelo sangue (Mannucci, 2001; Mannucci, 2000).

Essa percepção otimista da hemofilia mudou dramaticamente no início dos anos 1980, num momento em que 60-70% das pessoas com a forma grave da doença foram infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) que havia contaminado os concentrados de fatores da coagulação. Praticamente todos os hemofílicos tratados também foram infectados com o vírus da hepatite C (HCV) (no momento chamado de vírus da hepatite não-A e não-B), transmitido por concentrados de fatores fabricados a partir de pool de plasma de milhares de doadores (Mannucci, 2005). Como consequência das sequelas da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) e das epidemias de hepatite, a necessidade de um tratamento seguro tornou-se crucial para a comunidade hemofílica. O desenvolvimento e a implementação de técnicas de inativação viral para a produção de concentrados de fatores derivados do plasma, assim como a adoção de novos métodos de detecção de vírus em doações de sangue (por exemplo, o teste NAT), melhoraram muito a segurança de produtos derivados do plasma, como demonstrado pelo fato de que transmissões de vírus da hepatite ou HIV pelo sangue não têm mais ocorrido nos últimos 25 anos (Mannucci, 2008). Entretanto, o avanço mais importante neste campo foi representado pelo rápido progresso na tecnologia de DNA (seguindo a clonagem, em 1982 e 1984, dos genes do FVIII e FIX), que permitiu a produção industrial de FVIII recombinante (e subsequentemente, de FIX), culminando com a publicação, em 1989, do primeiro relato de eficácia clínica desse produto em dois pacientes com hemofilia A (White et al., 1989).

Apesar da segurança dos fatores derivados do plasma terem melhorado nos últimos 25 anos, o medo relacionado à possível transmissão de patógenos novos ou desconhecidos pelo sangue ou seus derivados levou os cuidadores da hemofilia dos países ocidentais a tratarem bebês hemofílicos anteriormente não tratados com produtos recombinantes (Llewelyn et al., 2004). Paralelamente, tendo a segurança como prioridade, os processos de fabricação de fatores recombinantes também evoluíram ao longo dos últimos anos para minimizar ainda mais o risco de transmissão de patógenos, por meio do aperfeiçoamento de técnicas de purificação de proteínas, da adição de etapas de inativação viral e da evitação do uso de

proteínas humanas ou animais durante qualquer etapa de seus processos fabris (Pipe, 2008; Franchini, Lippi, 2010).

A disponibilidade da terapia de substituição de concentrados de fator de alta qualidade foi importante não apenas por reduzir a probabilidade de morte por hemorragia, mas também pela ampla implementação de regimes de tratamento profilático a fim de prevenir sangramentos e consequentes danos nas articulações, permitindo, assim, que os pacientes mantivessem um estilo de vida praticamente normal (Franchini, Tagliaferri, Mannucci, 2007). Isso, juntamente com o progresso do gerenciamento de infecções virais transmitidas pelo sangue por meio da vigilância de pacientes com hepatite crônica (especialmente em relação ao carcinoma hepatocelular e à falência hepática), a viabilidade de novas opções de tratamento como terapias antivirais contra o HIV e o HCV, contribuíram bastante para a melhora na qualidade de vida e redução da morbidade na população hemofílica (Franchini, Mannucci, 2010). Portanto, os últimos 15 anos representam a “nova era de ouro” no tratamento da hemofilia (após a primeira “era de ouro” durante os anos 1970), com uma expectativa de vida desses pacientes que, progressivamente, se aproximou da dos homens da população geral, ao menos nos países desenvolvidos (Tagliaferri et al., 2010).

## 6 PRESENÇA DE INIBIDORES E TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

O desenvolvimento de aloanticorpos inibidores contra o FVIII ou FIX tornou-se a complicação mais desafiadora do tratamento da hemofilia. Esses inibidores, que se desenvolvem em aproximadamente 25-30% dos pacientes com hemofilia A grave (White et al., 2001; Brackmann, Wall, 2002; Kessler, 2005), 0,9-7% dos pacientes com hemofilia leve a moderada (Darby et al., 2004) e em apenas 3-5% dos com hemofilia B (Kessler, 2005), tornam as terapias de reposição ineficazes, limitam o acesso dos pacientes a um padrão de cuidados seguro e efetivo e predis põem os mesmos a um risco aumentado de morbidade e mortalidade (Franchini, Mannucci, 2011). Em um estudo de meta-análise foi demonstrado que a prevalência de inibidores entre todos os hemofílicos A foi de 5% a 7%, e entre os hemofílicos A grave foi de 12% a 13% (Wight & Paisley, 2003).

Os inibidores são aloanticorpos (populações de IgG policlonal, mais frequentemente representadas por IgG4) neutralizadores da atividade coagulante do FVIII ou FIX desenvolvidos por pacientes hemofílicos, como complicação decorrente do tratamento da hemofilia, ou seja, da administração de concentrados destes fatores da coagulação. Clinicamente a presença desses anticorpos dificulta a indução da hemostasia terapêutica a partir da reposição dos concentrados de fator. Essa é considerada uma complicação grave, pois as alternativas de tratamento nessa situação, além de não serem capazes de garantir com eficácia a hemostasia, são de altíssimo custo. Em alguns casos, o uso de altas doses do concentrado de fator pode ser suficiente, mas na maioria das vezes é necessário o uso de produtos que possuem a capacidade de gerar trombina independente da via do FVIII ou FIX (produtos *bypass*), como o concentrado de complexo protrombínico parcialmente ativado (CPPa) e o fator VII ativado recombinante (rFVIIa) (Scandella et al., 1988; Scandella et al., 1989; Scandella et al., 1995; Hedner *et al.* 2001).

Um dos fatores que predis põe ao desenvolvimento de inibidores é o tipo de mutação nos genes do FVIII ou FIX. De fato, pacientes com mutações consideradas de alto risco para o desenvolvimento de inibidores como as inversões do íntron 22 e íntron 1, grandes deleções, mutações *nonsense*, pequenas inserções ou deleções fora de regiões com repetição de nucleotídeos A e mutações *missense* nos domínios A2, C1 e C2, apresentam 7 a 10 vezes maior risco de desenvolverem inibidor, quando comparados aos pacientes com mutações

consideradas de baixo risco para o desenvolvimento de inibidores como mutações do tipo *splice alternativo*; pequenas inserções ou deleções em regiões de repetições A; e mutações *missense* nos demais domínios do FVIII. (Oldenburg *et al.*, 2002).

Recentemente foi sugerido que não só o tipo de mutação envolvida está associado ao risco de desenvolvimento de inibidor, mas sim a associação da mutação específica e o subtipo de antígeno de histocompatibilidade (HLA) classe II (White *et al.*, 2005). Além disto, outros fatores de risco ao desenvolvimento de inibidores são reconhecidos, como a presença de inibidor no histórico familiar, idade com a qual se iniciou o tratamento (Lorenzo *et al.* 2001), alterações específicas do sistema imunológico (Astermark *et al.*, 2006) e o tipo de produto utilizado na reposição de fator (Goudemand *et al.*, 2006). Alterações associadas no momento de desenvolvimento de inibidores (infecções associadas) também podem influenciar no seu aparecimento (Bray *et al.*, 1994).

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

A presença de inibidor não aumenta a mortalidade, mas complica o tratamento e aumenta a morbidade relacionada à doença, porque os episódios hemorrágicos não respondem ao tratamento padrão (Hay *et al.*, 2000). Enquanto que altas doses do fator podem superar baixos títulos de inibidores ( $\leq 5$  Unidades de Bethesda-BU) (White *et al.*, 2001), altos títulos de inibidores geralmente tornam a reposição de fator ineficaz, necessitando de terapia com produtos *bypass* (Leissinger, 2004). Dois desses produtos são atualmente disponibilizados: o

complexo de protrombina parcialmente ativado (CPPa), FEIBA, e o fator VIIa recombinante.

O FEIBA é um concentrado de complexo protrombínico parcialmente ativado (CPPa) que consiste de proteínas vitamina K dependentes: FII, FVII, FIX e FX nas formas original e ativada com uma pequena atividade anticoagulante (Turecek et al., 2004). O tempo de meia-vida do FEIBA é de 4 a 7 horas, medida pelo teste de geração de trombina (Váradi et al., 2003). Os principais contribuintes para a atividade hemostática são a formação do complexo ativado de FX (FXa) e a geração de trombina pelo FII no complexo protrombinase (Turecek et al., 2004). O FVIIa no FEIBA aumenta o efeito hemostático, mas, por outro lado, não desempenha nenhum papel importante no mecanismo de ação.

O fator VIIa recombinante (rFVIIa) aumenta a formação de trombina na superfície plaquetária pela ativação do FX a FXa (Hedner, 2006). É importante ressaltar que altas concentrações de rFVIIa têm a habilidade de ativar o FX independentemente do fator tecidual (FT). Porém, a presença desse cofator melhora substancialmente o potencial hemostático. O tempo de meia-vida do rFVIIa é mais curto do que o do CPPa, estando entre 2 e 3 horas em adultos e 1 hora e meia em crianças (Villar et al., 2004).

Ambos os produtos demonstraram controlar pelo menos 80% dos episódios hemorrágicos associados com altos títulos de inibidores, incluindo sangramento perioperatório (Hilgartner et al., 1990; Negrier et al., 1997; Key et al., 1998; Shapiro et al., 1998; Arkin et al., 2000; Tjonnfjord, 2004; Astermark et al., 2007). No entanto, sua eficácia hemostática é difícil de ser prevista (Leissinger, 2004; Ho, Height, Smith, 2000) e não alcança as taxas de sucesso globais obtidas com reposição de fator específico em pacientes sem inibidores (Leissinger, 2004; DiMichele et al., 2004). Além disso, não há ensaios laboratoriais disponíveis que se correlacionem com a dosagem ou eficácia, ou que prevejam complicações (Leissinger, 2004). Conseqüentemente, pacientes com inibidores, particularmente os com altos títulos, estão em maior risco de hemorragia incontrolável, doença articular e incapacidade subsequente (Leissinger, 1999). Para reduzir esses riscos e melhorar a qualidade de vida, a indução de tolerância imunológica (ITI) é geralmente tentada para eliminar a alta responsividade dos inibidores de FVIII de início recente e restaurar a farmacocinética normal do fator (Ho, Height, Smith, 2000)



ITI pode também ser realizada, embora menos frequentemente, em pacientes com inibidores de FIX de alta titulação. O protocolo de Bonn, primeiramente descrito em 1977 (Brackmann, Gormsen, 1977), é o protótipo a partir do qual os regimes de ITI subsequentes evoluíram. Todos os regimes utilizam exposição ao FVIII ou IX contínua, frequente e ininterrupta, por um período de poucos meses a dois ou mais anos (Hay, 2005) com o objetivo de induzir tolerância antígeno-específica (Ho, Height, Smith, 2000; DiMichele, 2006).

Outra alternativa interessante ao tratamento da hemofilia é a terapia gênica, que, por meio da introdução de cópias funcionais dos genes do FVIII ou FIX em células-alvo, poderia finalmente proporcionar a cura e evitar a necessidade de infusões de fatores da coagulação. Curiosamente, a hemofilia tem sido reconhecida como uma doença-alvo ideal para a terapia gênica, já que é causada por um único defeito genético bem conhecido e possui uma ampla janela terapêutica (Nathwani, Davidoff, Tuddenham, 2004; VandenDriessche, Collen, Chuah, 2003).

A possibilidade de cura para as hemofilias A e B continua sendo o objetivo final dos pacientes acometidos pela doença. A clonagem dos genes dos fatores VIII e IX nos anos 80 e a subsequente produção e introdução dos fatores recombinantes VIII e IX durante a última década continuaram a prometer uma perspectiva de um tratamento de terapia gênica para a hemofilia. Nos últimos anos, muitos trabalhos têm focado no desenvolvimento de estratégias para esse tipo de tratamento.

A terapia gênica, no sentido mais amplo, é a introdução de material genético externo em uma célula com intenção terapêutica. A terapia gênica final para a hemofilia A e B seria a substituição do gene defeituoso e/ou a correção direta do defeito molecular no gene F8 ou F9 mutante. A modificação genômica direta, usando oligonucleotídeos de RNA/DNA quiméricos (Kren et al, 1998; Kren et al., 1999), tem sido demonstrada, mas ainda permanece um longo caminho no futuro para a sua aplicação clínica. A terapia gênica para a hemofilia hoje, por conseguinte, baseia-se na adição de sequências de DNA de fatores da coagulação funcionalmente normais com promotor adequado e com elementos potencializadores às células de um paciente com um gene de fator da coagulação defeituoso, de modo que as células modificadas possam produzir proteínas funcionais, como indicado pelo DNA inserido.

Embora as hemofilias sejam vistas como um bom modelo clínico para o desenvolvimento de terapia gênica para distúrbios de um único gene, é agora um alvo importante para a terapia gênica em geral, uma vez que possui várias vantagens fundamentais em relação a outros distúrbios de único gene: tem uma relação simples de causa e efeito entre a deficiência do fator da coagulação e o fenótipo da doença/sintomas clínicos; a expressão tecido-específica do transgene e a sua regulação precisa são provavelmente sem importância; modelos animais adequados grandes e pequenos estão disponíveis para estudos pré-clínicos e em ensaios clínicos, a eficácia pode ser facilmente estabelecida e avaliada clínica e laboratorialmente.

Do ponto de vista clínico, a terapia gênica na hemofilia seria um grande passo. A terapia de reposição com os fatores FVIII e FIX é agora mais segura do que nunca, mas continua a ser inferior ao ideal. Embora haja aumento do uso de fatores recombinantes, com produtos de plasma vírus inativado, haverá sempre a preocupação com infecções transmitidas pelo sangue e contaminação com príons infecciosos causadores da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Will et al, 1996; Evatt, 1998).

Mesmo em regimes profiláticos, o tratamento de reposição deve ser feito por via intravenosa em intervalos frequentes, o que é muitas vezes problemático em crianças pequenas. Tem havido avanços importantes nesse campo nos últimos anos, mas, com a tecnologia atual, é pouco provável que a terapia gênica seja capaz de proporcionar uma “cura” total para a hemofilia. A tecnologia atualmente disponível ainda não é suficientemente avançada para efetuar uma transferência gênica ao longo da vida que garanta produção contínua do fator da coagulação a níveis normais. Apesar disso, talvez o aspecto mais importante da hemofilia que a torna um excelente alvo para a terapia gênica é o fato de que até mesmo um ligeiro aumento ( $1 \pm 2\%$  dos níveis fisiológicos), em circulação do fator VIII ou IX teria um efeito terapêutico significativamente benéfico, protegendo contra hemorragias espontâneas e transformando potencialmente a vida de pacientes com hemofilia A grave. Em essência, a produção de fator endógeno para proporcionar esses pequenos aumentos nos níveis de fator atingiria os objetivos de profilaxia sem a necessidade de infusões regulares de concentrado.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hemofilia é uma coagulopatia hereditária recessiva ligada ao sexo que ocorre devido à falta ou produção defeituosa de moléculas dos fatores VIII ou IX da coagulação. A deficiência de fator VIII (Hemofilia A) é a mais frequente, ficando com 85% dos casos; já a deficiência do fator IX (Hemofilia B) corresponde a 15%.<sup>1,2</sup> A incidência na população mundial é de 1/10.000 (pelo fator VIII) e de 1/30.000 (pelo fator IX) nascimentos do sexo masculino. É caracterizada pela ocorrência de hemorragias que aparecem espontaneamente ou em consequência de traumatismos leves e são comuns nas articulações. As hemorragias geralmente ocorrem nas grandes articulações, podendo causar muita dor, danos permanentes e incapacitantes se não forem tratados adequadamente.

Nas três últimas décadas, a hemofilia passou do estado de doença negligenciada e frequentemente doença hereditária hemorrágica fatal para um grupo bem definido e bem caracterizado de entidades moleculares. Atualmente, existe uma pequena dúvida de que, entre as doenças monogênicas mais prevalentes (fibrose cística, talassemia, distrofia molecular), a hemofilia desfruta do tratamento mais seguro e eficaz. De fato, após os eventos dramáticos generalizados de transmissão de vírus pelo sangue nos anos de 1970 a 1980, tem havido uma forte tendência no sentido da melhoria contínua da eficácia e segurança da terapia de reposição e para a cura da doença, através de terapia gênica. Para manter esse alto nível de assistência médica e pesquisa, dois elementos são essenciais: primeiro, há uma necessidade de colaboração internacional em pesquisa clínica sobre hemofilia. Na verdade, poucas das questões não resolvidas mencionadas acima podem ser abordadas por estudos feitos em um único centro de hemofilia. A adequação do tamanho da amostra é essencial também para uma doença rara como a hemofilia, e este objetivo só pode ser alcançado através de estudos colaborativos multicêntricos. Segundo, é necessário manter um elevado nível de interesse e experiência no campo da hemofilia, especialmente entre os médicos da nova geração, que parecem ser mais atraídos pelo lado trombótico da hemostasia.

Nos últimos 20 anos, os avanços na eficácia e segurança dos tratamentos de hemofílicos têm sido implementados quase que exclusivamente nos países ocidentais. Dessa forma, o primeiro objetivo para um futuro próximo é a obtenção

de uma disponibilidade mais ampla de tratamento. Há uma série de países emergentes e populosos, como Índia e China, onde o nível de tratamento da hemofilia está longe de ser satisfatório. Para esses países, que estão em rápido desenvolvimento de um elevado nível de competência tecnológica, é provavelmente mais apropriado fomentar a tecnologia de DNA com o objetivo de produzir fatores recombinantes e desenvolver a transferência de genes, em vez de programas baseados em fracionamento de plasma. Por outro lado, a produção industrial de fatores da coagulação derivados do plasma deve continuar e se expandir para atender as crescentes necessidades e demandas dos países (especialmente América do Sul e Europa oriental) que estão melhorando rapidamente seus programas assistenciais de saúde a pessoas com hemofilia e que não podem arcar com o custo mais elevado de fatores recombinantes. Embora a extensão dos programas de assistência à hemofilia aos países em desenvolvimento seja o objetivo principal para um futuro imediato, há também uma série de objetivos para os países desenvolvidos, como manter o atual nível de excelência de tratamento que corre o risco de ser comprometido pela crise econômica global. Deve ser enfatizado, ainda, que os custos da hemofilia são, na verdade, uma parcela mínima de todo o orçamento para a saúde em qualquer país e que a boa relação custo-efetividade do tratamento da hemofilia já foi bem comprovada. Além disso, os países mais ricos devem apoiar as necessidades de terapia de reposição de fator de países de baixa renda, onde uma produção adequada de concentrados de fator derivado de plasma ou recombinante pode não estar prevista para um futuro próximo.

## REFERÊNCIAS

ALEDORT L.M.; HASCHMEYER R.H.; PETTERSSON H; THE ORTHOPAEDIC OUTCOME STUDY GROUP. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. **J Intern Med**, v.236, p.391–399, 1994.

SHARATHKUMAR A.A.; CARCAO, M. Clinical Advances in Hemophilia Management. **Pediatr Blood Cancer**, v57, p.910–920, 2011.

ANTONARAKIS S.E. et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. **Blood**, v.86, n.6, p.2206-12, 1995.

ANTONARAKIS S.E. et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A results of an international consortium study. **Blood**, v.86, p.2206-2212, 1995.

ARKIN S. et al. Human coagulation factor FVIIa (recombinant) in the management of limb-threatening bleeds unresponsive to alternative therapies: results from the NovoSeven emergency – use programme in patients with severe haemophilia or with acquired inhibitors. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.11, p.255–9, 2000.

ASTERMARK J. et al. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor. **Blood**, v.109, p.546–51, 2007.

ASTERMARK J. et al. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. **Blood**, v.107, n8, p.3167-72, 2006.

BAGNALL, R.D. et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. **Blood**, v.99, p.168-74, 2002.

BARROWCLIFFE T.W. Monitoring haemophilia severity and treatment: new or old laboratory tests? **Haemophilia**, v.10, s.4, p.109–14, 2004.

BARROWCLIFFE T.W. Standardization of FVIII & FIX assays. **Haemophilia**, v.9, p.397–402, 2003.

BAXEVANIS, A.D. The molecular Biology Database Collection: an online compilation of relevant database resources. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.1, p.1-7.

BIGGS R. Thirty years of haemophilia treatment in Oxford. **Br J Haematol**, v.13, p.452–463, 1967.

BOLTON-MAGGS P.H. Haemophilias A and B. **Lancet**, v.361, p.1801-1809, 2003.

BRACKMANN H.H, GORMSEN J. Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder. **Lancet**, v.2, p.933, 1977.

BRACKMANN H.H, WALLNY T. Immune tolerance: high-dose regimen. In: Rodriguez-Merchan E.C., ed. *Inhibitors in Patients with haemophilia*. Oxford, England: Blackwell Science, Ltd, 2002: pp. 45–48.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias*, 2006.

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

CAIO, 2000. **Genética comunitária e hemofilia em uma população brasileira**. 2000. 180f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

CHOO K.H. et al. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. **Nature**, v.299, p.178-80, 1982.

DARBY S.C. et al. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977–99. **J Thromb Haemost**, v.2, p.1047–54, 2004.

DARGAUD Y.; MEUNIER S.; NEGRIER C. Haemophilia and thrombophilia: An unexpected association. **Haemophilia**, v.10, p.319–326, 2004.

DIMICHELE D. Immune tolerance: critical issues of factor dose, purity and treatment complications. **Haemophilia**, v.12, p.81–6, 2006.

DIMICHELE D. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. **Haemophilia**, v.8, p.280-7, 2002.

DIMICHELE D. et al. Inhibitors in haemophilia: clinical aspects. **Haemophilia**, v.10, s. 4, p.140–5, 2004.

DIMICHELE D.; NEUFELD E.J. Hemophilia. A new approach to an old disease. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.12, n.6, p.1315-1344, 1998.

DARGAUD Y. et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. **Thromb Haemost**, v.93, p.475–480, 2005.

EVATT B.L. Prions and haemophilia: assessment of risk. **Haemophilia**, v.4, p.628-633, 1998.

FRANCHINI M.; LIPPI G. Recombinant factor VIII concentrates. **Semin Thromb Hemost**, v.36, p.493–497, 2010.

FRANCHINI M.; MANNUCCI P.M. Co-morbidities and quality of life in elderly persons with haemophilia. **Br J Haematol**, v.148, p.522–533, 2010.

FRANCHINI M.; MANNUCCI P.M. Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. **Br J Clin Pharmacol**, v.72, p.553–562, 2011.

FRANCHINI M.; TAGLIAFERRI A.; MANNUCCI P.M. The management of hemophilia in elderly patients. **Clin Interv Aging**, v.2, p.361–368, 2007.

GIANNELLI F. et al. Haemophilia B: Database of Point Mutations and Short Additions and Deletions. 3rd edn. **Nucleic Acid Research**, v.20, p.2027-2063, 1992.

GIANNELLI F. et al. Haemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions, eighth edition. **Nucleic Acids Res**, v.26, p.265–268, 1998.

GIANNELLI F. et al. Haemophilia B (sixth edition): A database of point mutations and short additions and deletions. **Nucleic Acids Res**, v.24, p.103–118, 1996.

GIANNELLI F.; GREEN P.M. The molecular basis of haemophilia A and B. **Baillieres Clin Haematol**, v.9, p.211–228, 1996.

GITSCHIER J. Genetic basis of haemophilia A. **Thrombosis and Haemostasis**, v.66, p.37-39, 1991.

GITSCHIER, J. et al. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v.312, p.326-30, 1984.

GOODEVE A.C. Laboratory methods for the genetic diagnostic of bleeding disorders. **Clin Lab Haematol**, v.20, p.3-19, 1998.

GOODEVE A.C.; PEAKE I.R. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. **Semin Thromb Hemost**, v.29, n.1, p.23-30, 2003.

GOUDEMANT J. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. **Blood**, v.107, p.46-51, 2006.

GREEN P.M. et al. Haemophilia A mutations in the UK: Results of screening one-third of the population. **Br J Haematol**, v.143, p.115–128, 2008.

GIANNELLI F. et al. Haemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions, eighth edition. **Nucleic Acids Res**, v.25, p.133–135, 1997.

GRUNEWALD M. et al. Paradoxical hyperfibrinolysis is associated with a more intensely haemorrhagic phenotype in severe congenital haemophilia. **Haemophilia**, v.8, p.768–775, 2002.

HAY C.R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors\_ Organization (UKHCDO). **Br J Haematol**, v.111, p.78–90, 2000.

HAY C.R.M. Inhibitors to factor VIII/IX: treatment of inhibitors – immune tolerance induction. In: Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK, eds. Textbook of Hemophilia. Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd:2005; 74–9.

HEDNER U. Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the pathophysiology and treatment of hemophilia. **Hematol Am Soc Hematol Educ Program**, p.241-65, 2000.

HEDNER U. Mechanism of action, development and clinical experience of recombinant FVIIa. **J Biotechnol**, v.124, p.747–57, 2006.

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

HEIJNEN L, BUZZARD BB. The role of physical therapy and rehabilitation in the management of hemophilia in developing countries. **Semin Thromb Hemost**, v.31, p.513–517, 2005.

HILGARTNER M. Efficacy and safety of vapor-heated anti-inhibitor coagulant complex in hemophilia patients. FEIBA Study Group. **Transfusion**, v.30, p.626–30, 1990.

HIRSH J.; WEITZ J.I. Thrombosis and anticoagulation. **Semin Hematol**, v.4, s.7, p.118-32, 1999.

HO A.Y.; HEIGHT S.E.; SMITH M.P. Immune tolerance therapy for haemophilia. **Drugs**, v60, p.547–54, 2000.

HOLLESTELLE M.J. et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo: a closer look. **Thromb Haemost**, v.86, p.855–61, 2001.

INGRAM G.I. The history of haemophilia. **J Clin Pathol**, v.29, p.469–479, 1976.

JAYANDHARAN G. et al. Informativeness of linkage analysis for genetic diagnosis of haemophilia A in India. **Haemophilia**, v.10, p.553–9, 2004.

KAUFMAN RJ. Insight into the structure, function, and biosynthesis of factor VIII through recombinant DNA technology. **Ann Hematol**, v.63, p.155–165, 1991.

KESSLER CM. New perspectives in hemophilia treatment. **Hematol Am Soc Hematol Educ Program**, p.429–35, 2005.

KEY N.S. et al. Home treatment of mild to moderate bleeding episodes using recombinant factor VIIa (Novoseven) in haemophiliacs with inhibitors. **Thromb Haemost**, v.80, p.912–8, 1998.

KREN B.T.; BANDYOPADHYAY P.; STEER C.J. In vivo sitedirected mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. **Nature Medicine**, v.4, p.285±290, 1998.



KREN B.T. Correction of the UDPglucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler±Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, p.10349-10354, 1999.

LALLOZ M.R.A. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. **Br J Haematol**, v.86, p.804–9, 1994.

LEE D.H. et al. Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A. **Thromb Haemost**, v.83, p.387–91, 2000.

LEISSINGER C.A. Prevention of bleeds in hemophilia patients with inhibitors: emerging data and clinical direction. **Am J Hematol**, v.77, p.187–93, 2004.

LEISSINGER C.A. Use of prothrombin complex concentrates and activated prothrombin complex concentrates as prophylactic therapy in haemophilia patients with inhibitors. **Haemophilia**, v.5, s.3, p.25–32, 1999.

LENTING P.J.; VAN MOURIK J.A.; MERTENS K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v.92, p.3983–96, 1998.

LLEWELYN C.A. et al: Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. **Lancet**, v.363, n.9407, p.417–421, 2004.

LIU Q.; NOZARI G.; SOMMER S.S. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. **Blood**, v.92, p.1458-9, 1998.

LORENZO J.I. Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. **Br J Haematol**, v.113, p.600-3, 2001.

MANN K.G. et al. Blood coagulation dynamics in haemostasis. **Hamostaseologie**, v.29, p.7–16, 2009.

MANNUCCI P.M. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. **Haemophilia**, v.14, s.3, p.10–18, 2008.

MANNUCCI P.M. Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first twenty years. **Haemophilia**, v.6, s.1, p.60–67, 2000.

MANNUCCI P.M. Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.1–9, 2002.

MANNUCCI P.M. Hemophilia: treatment options on the twenty-first century. **J Thromb Haemost**, v.1, p.1349–1355, 2005.

MANNUCCI P.M.; TUDDENHAM E.G.D. The hemophiliac – from royal genes to gene therapy. **N Engl J Med**, v.344, p.1773–1779, 2001.

MANNUCCI P.M.; TUDDENHAM E.G.D. The hemophilias: progress and problems. **Semin Hematol**, v.36, 4 s.7, p.104-17, 1999.

NATHWANI A.C.; DAVIDOFF A.M.; TUDDENHAM E.G. Prospects for gene therapy of haemophilia. **Haemophilia**, v.10, p.309–318, 2004.

NAYLOR J.A. et al. The factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. **Lancet**, v.340, p.1066–7, 1992.

NEGRIER C. et al. Multicenter retrospective study on the utilization of FEIBA in France in patients with factor VIII and factor IX inhibitors. French FEIBA Study Group. Factor Eight Bypassing Activity. **Thromb Haemost**, v.77, p.1113–9, 1997.

NICHOLS W.C. et al. Moderation of hemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. **Blood**, v.88, p.1183–7, 1996.

NILSSON I.M. Experience with prophylaxis in Sweden. **Semin Hematol**, v.30, 3 s.2, p.16–19, 1993.

O'MAHONEY B. Global haemophilia care challenge and opportunities: World Federation of Hemophilia, 2002. Disponível em: <[www.wfh.org](http://www.wfh.org)>. Acesso em: dezembro de 2012.

OLDENBURG J. et al. Molecular genetics in hemophilia A. **Vox Sang**, v.78, s.2, p.33–8, 2000.

OLDENBURG J.; EL-MAARRI O.; SCHWAAB R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. **Haemophilia**, v.8, p.23–9, 2002.

PEAKE I.R. et al. Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. **WHO Bull**, v.71, p.429–58, 1993.

PEYVANDI F. Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia in developing countries. **Semin Thromb Hemost**, v.31, p.544–54, 2005.

PIO S.F.; OLIVEIRA G.C; REZENDE S.M. As Bases Moleculares da Hemofilia A. **Rev Assoc Med Bras**, v.55, n.2, p.213–9, 2009.

PIPE SW: Recombinant clotting factors. **Thromb Haemost**, v.99, p.840–850, 2008.

PLUG I. et al. Bleeding in carriers of hemophilia. **Blood**, v.108, p.52–6, 2006.

REINER A.P.; THOMPSON A.R. Screening for nonsense mutations in patients with severe hemophilia A can provide rapid, direct carrier detection. **Human Genetics** v.89, p.88–94, 1992.

REZENDE S.M. et al. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. **Haemophilia**, v.15, n.1, p.142–9, 2009.

RODGERS G.M.; GREENBERG C.S.; Inherited coagulation disorders. In: Lee, G.R.; Foerster, J.; Lukens, J.; Paraskevas, F.; Greer, J.P.; Rodgers, G.M.; editors.

**Wintrobe`s Clinical Hematology**, 10rd, Baltimore: Williams & Wilkins p1682-732,1999.

ROGAEV E.I. et al. Genotype analysis identifies the cause of the “royal disease”. **Science**, v.326, p.6, 2009.

ROSSETTI L.C. et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. **Clin Chem**, v.51, p.1154-8, 2005.

SANTOS, A. **Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em Hemofilia A e B**. 2010. 156f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

SAWECK J. et al. Prevalence of the intron 22 inversion of the fator VIII gene and inhibitor development in polish patients with severe hemophilia A. **Arch Immunol Ther Exp**, v.53, p.352-6, 2005.

SCANDELLA D. et al. Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of factor VIII fragments expressed in Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci**, v.85, p.6152–6, 1988.

SCANDELLA D. et al. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. **Blood**, v.74, p.1618–26, 1989.

SCANDELLA D. et al. Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248–2312 which overlap a phospholipid binding site. **Blood**, v.86, p.1811–9, 1995.

SHAPIRO AD. et al. Prospective, randomised trial of two doses of rFVIIa (NovoSeven) in haemophilia patients with inhibitors undergoing surgery. **Thromb Haemost**, v.80, p.773–8, 1998.

PINTO S. et al. Molecular diagnosis of haemophilia A at Centro Hospitalar de Coimbra in Portugal: study of 103 families – 15 new mutations. **Haemophilia**, v.18, p.129–138, 2012.

SOARES R.P.; CHAMONE D.A.; BYDLOWSKI S.P. Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. **Haemophilia**, v.7, p.299–305, 2001.

SOMMER S.S. et al. Missense mutations and the magnitude of functional deficit: The example of factor IX. **Hum Genet**, v.89, p.295–297, 1992.

STEVENS R.F. The history of haemophilia in the royal families of Europe. **Br J Haematol**, v.105, p.25–32, 1999.

TAGLIAFERRI A. et al. Italian Association of Hemophilia Centers: Mortality and causes of death in Italian persons with haemophilia, 1990–2007. **Haemophilia**, v.16, p.437–446, 2010.

TAVASSOLI K.; EIGEL A.; HORST J. A. deletion/insertion leading to the generation of a direct repeat as a result of slipped mispairing and intragenic recombination in the factor VIII gene. **Human Genetics**, v.104, p.435-437, 1999.

TIZZANO E.F. et al. Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the factor VIII gene by quantitative real-time PCR analysis. **Thromb Haemost**, v.94, p.661-4, 2005.

TJONNFJORD G.E. Activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) treatment during surgery in patients with inhibitors to FVIII/IX: the updated Norwegian experience. **Haemophilia**, v.10, s.2, p.41-5, 2004.

TUDDENHAM E.G.D. et al. Haemophilia A: Database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.4821-4833, 1991.

TUDDENHAM E.G.D. et al. Haemophilia A database of nucleotide substitutions. Deletions, Insertions and Rearrangements of the Factor VIII Gene 2<sup>nd</sup> edn. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4851-4868, 1994.

Turecek P.L. et al. FEIBA: mode of action. **Haemophilia**, v.10, s.2, p.3-9, 2004.

UEN C. et al. 2% Haemophilia A patients without mutation in the FVIII gene. **Hamostaseologie**, v.23, p.1-5, 2003.

VAN DIJK K. et al. Variability in clinical phenotype of severe haemophilia: The role of the first joint bleed. **Haemophilia**, v.11, p.438-443, 2005.

VANDENDRIESSCHE T.; COLLEN D.; CHUAH M.K. Gene therapy for the hemophilias. **J Thromb Haemost**, v.1, p.1550-1558, 2003.

VÁRADI K. et al. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. **J Thromb Haemost**, v.1, p.2374-80, 2003.

VEHAR G.A. et al. Structure of human factor VIII. **Nature**, v.312, p.337-42, 1984.

VIDAL F. et al. Rapid hemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: identification of 14 novel mutaton. **Thromb Haemost**, v.85, p.580-3, 2001.

VILLAR A. et al. Pharmacokinetics of activated recombinant coagulation factor VII (NovoSeven) in children vs. adults with haemophilia A. **Haemophilia**, v.10, p.352-9, 2004.

WACEY A.I. et al. The haemophilia A mutation search test and resource site, home page of the factor VIII mutation database: HAMSTeRS. **Nucleic Acids Research**, v.24, n.1, p.100-102, 1996.

WALSH P.N.; RAINSFORD S.G.; BIGGS R. Platelet coagulant activities and clinical severity in haemophilia. **Thromb Diath Haemorrh**, v.29, p.722-729, 1973.

WHITE G.C. et al. Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. **N Engl J Med**, v.320, p.166–170, 1989.

WHITE G.C. et al. Definitions in hemophilia: recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb Haemost**, v.85, p.560, 2001.

WHITE G.C. et al. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? **J Thromb Haemost**, v.3, p.1676-81, 2005.

WIGHT J.; PAISLEY S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. **Haemophilia**, v.9, p.418–35, 2003.

WILL R.G. et al. A new variant of Creutzfeldt±Jakob disease in the UK. **Lancet**, v.347, p.921-925, 1996.

YOSHITAKE S. et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). **Biochemistry**, v.24, p.3736-50, 1985.

YOUSSEOUFIAN H. et al. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence of CpG mutation hot-spots. **Nature**, v.324, p.380-382, 1986.

**ANEXO**  
**DECLARAÇÃO**

Eu, **Melissa Papaléo Rocha de Lima**, portador do documento de identidade RG 7336235 SDS-PE, CPF nº 062.988.364-54, aluna regularmente matriculada no curso de Pós- Graduação Especialização em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial, do programa de *Lato Sensu* da Faculdade Boa Viagem / Centro de Capacitação Educacional, sob o nº HC112311, declaro a quem possa interessar e para todos os fins de direito, que:

1. Sou a legítimo autor da monografia cujo título é: "**Hemofilias A e B**" da qual esta declaração faz parte, em seus ANEXOS;
2. Respeitei a legislação vigente sobre direitos autorais, em especial, citado sempre as fontes as quais recorri para transcrever ou adaptar textos produzidos por terceiros, conforme as normas técnicas em vigor.

Declaro-me, ainda, ciente de que se for apurado a qualquer tempo qualquer falsidade quanto às declarações 1 e 2, acima, este meu trabalho monográfico poderá ser considerado NULO e, conseqüentemente, o certificado de conclusão de curso/diploma correspondente ao curso para o qual entreguei esta monografia será cancelado, podendo toda e qualquer informação a respeito desse fato vir a tomar-se de conhecimento público.

Por ser expressão da verdade, dato e assino a presente DECLARAÇÃO,

Em Recife, 08 / Febrero de 2013.

Melissa Papaléo R. de Lima

Assinatura do (a) aluno (a)

Autenticação dessa assinatura, pelo  
funcionário da Secretaria da Pós-  
Graduação *Lato Sensu*