

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORAS DE MUTAÇÕES DO GENE DA
HEMOFILIA A NA POPULAÇÃO PARAENSE

Iêda Solange de Souza Pinto

BELÉM – PA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORAS DE MUTAÇÕES DO GENE DA
HEMOFILIA A NA POPULAÇÃO PARAENSE

Autora: Iêda Solange de Souza Pinto

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas

Belém – PA

2016

DEDICATÓRIA

*Aos meus filhos Igor e Artur, que são a alegria da minha
vida.*

*Aos meus pais Tibiriçá (in memoriam) e Delaíde, pela
educação que moldou meu caráter.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me guiou e premiou com o dom da curiosidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista Santos, pelos ensinamentos, paciência, sugestões e confiança.

Ao Igor Mendes, meu filho, amigo, companheiro, pela imensa contribuição na formatação, resolução dos problemas de informática e pela dedicação, apoio e incentivo incondicional.

Ao Artur Mendes, meu Nino, seguidor, pela gentileza, alegria, incentivo e momentos de descontração.

A minha mãe Delaíde Pinto, por estar sempre do meu lado, me apoiando em todas as horas.

A toda minha família, pelo incentivo e torcida constantes.

A Marilda, enfermeira, amiga, pela ajuda no recrutamento de pacientes.

Ao Marcos Amador (Marquinho), pela cooperação na execução dos exames laboratoriais e pela imensa paciência em me guiar pelos caminhos antes insondáveis dos testes de PCR.

Aos amigos da turma de mestrado, pelo convívio, troca de experiências e novas amizades.

EPIGRAFE

**1 - O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.**

Cora Coralina

**2 - O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.
Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado.
Um esforço total é uma vitória completa.**

Mahatma Gandhi

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORAS DE MUTAÇÕES DO GENE DA HEMOFILIA A NA POPULAÇÃO PARAENSE

A hemofilia A é um distúrbio hereditário da coagulação, ligado ao cromossomo X, causado pela deficiência do Fator VIII (FVIII) da coagulação que se caracteriza por episódios de sangramentos espontâneos ou pós-traumáticos, que pode levar à incapacitação física por artropatia, até risco de morte. A deficiência do FVIII é causada por mutações no gene *F8*. O diagnóstico do estado de portadora do gene da hemofilia A é importante para a realização do aconselhamento genético, assim como para oferecer tratamento para portadoras sintomáticas. Na maioria dos casos, a mulher portadora desconhece este fato. Neste trabalho, pretendemos criar a metodologia necessária para identificação molecular de portadoras de hemofilia A, a partir da análise de 26 pacientes diagnosticados, cadastrados no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, e de seus parentes consanguíneos, prováveis portadores do alelo. O grupo controle foi constituído de 110 indivíduos do sexo masculino da população de Belém. A investigação foi baseada nas análises de seis STR (*Short Tandem Repeats*) localizados na região 3' do final do gene *F8*: CTT3, TAAA3, TTTA3, DXS10011, DXS7423, GATA31E08. A utilização dos seis marcadores se mostrou útil tanto na identificação como na exclusão das portadoras, sendo que todas as portadoras obrigatórias foram identificadas. Este protocolo de identificação poderá ser utilizado rotineiramente para identificação das portadoras da hemofilia A, possibilitando o aconselhamento genético nessas mulheres.

Palavras-chave: Aconselhamento Genético, Gene *F8*, Hemofilia A, Portadoras.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF CARRIERS OF HEMOPHILIA A GENE MUTATIONS IN THE POPULATION OF PARÁ, BRAZIL

Hemophilia A is an inherited X-linked bleeding disorder caused by a deficiency of coagulation FVIII, characterized by spontaneous or post-traumatic bleeding episodes, which can lead to physical incapacitation due to arthropathy and even death. The deficiency is the result of mutations on *F8* gene. Diagnosis of Hemophilia A carrier status is important for genetic counseling as well as to provide treatment for symptomatic carriers, which, in most cases, are unaware of the fact. In this work, we intend to create the necessary methodology for the molecular identification of hemophilia A carriers, based on the analysis of 26 diagnosed patients, enrolled in the Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, and their consanguineous relatives, likely carriers of the allele. The control group consisted of 110 males of the population of Belém. The research was based on analyzes of six STRs (Short Tandem Repeats) located in the 3' end region of the gene *F8*: CTT3, TAAA3, TTTA3, DXS10011, DXS7423, GATA31E08. The use of the six markers proved to be useful in the identification and in the exclusion of the carriers, and all the obligatory carriers were identified. This identification protocol can be routinely used to identify hemophilia A carriers and to provide genetic counseling in these women.

Keywords: Carriers, Gene *F8*, Genetic Counseling, Hemophilia A

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FVIII	FATOR VIII DA COAGULAÇÃO
FIX	FATOR IX DA COAGULAÇÃO
HCV	VÍRUS DA HEPATITE C
SIDA	SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA
HIV	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
HBV	VÍRUS DA HEPATITE B
IgG	IMUNOGLOBULINA G
TTPA	TEMPO DA TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO
TP	TEMPO DE PROTROMBINA
ISTH	INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HEMOSTASIS (SOCIEDADE INTERNACIONAL DE HEMOSTASIA E TROMBOSE)
RNA	RIBONUCLEIC ACID (ÁCIDO RIBONUCLEICO)
DNA	DESOXIRIBONUCLEIC ACID (ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO)
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
RN	RÉCEM NASCIDO
CTHs	CENTROS TRATADORES DE HEMOFILIA
IBGE	INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA
UB	UNIDADE BETHESDA
HEMOCENTROS	CENTROS DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA
DDU	DOSE DOMICILIAR DE URGÊNCIA
RDC	RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA
CCPa	CONCENTRADO DE COMPLEXO PROTROMBÍNICO ATIVADO
rFVIIa	CONCENTRADO DE FATOR VII ATIVADO RECOMBINANTE
UI	UNIDADE INTERNACIONAL
WFH	WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA (FEDERAÇÃO MUNDIAL DE HEMOFILIA)
SC	SUBCUTÂNEA

EV	ENDOVENOSA
EACA	EPSILON AMINO CAPROIC ACID (ÁCIDO EPSILON AMINOCAPRÓICO)
ITI	INDUÇÃO DE IMUNOTOLERÂNCIA
PDM	PODER DE DISCRIMINAÇÃO ENTRE MULHERES
PDH	PODER DE DISCRIMINAÇÃO ENTRE HOMENS
PDT	PODER DE EXCLUSÃO DO TRIO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da genética da hemofilia	20
Figura 2	Gene F8 com mRNA e proteína codificada	21
Figura 3	Gene F8 destacando o íntron 22	22
Figura 4	Inversão do íntron 22	24
Figura 5	Frequência das mutações no desenvolvimento de inibidores	25
Figura 6	Tratamento de pacientes com Hemofilia A e Inibidores	41
Figura 7	Representação esquemática da localização dos seis STRs no cromossomo X	48
Figura 8	Eletroferograma dos seis marcadores em uma amostra estudada	53
Figura 9	Haplótipo e Heredograma da Família 7	66
Figura 10	Haplótipo e Heredograma da Família 9	67
Figura 11	Haplótipo e Heredograma da Família 15	68
Figura 12	Haplótipo e Heredograma da Família 17	69
Figura 13	Haplótipo e Heredograma da Família 18	70
Figura 14	Haplótipo e Heredograma da Família 22	71
Figura 15	Haplótipo e Heredograma da Família 23	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da hemofilia A	18
Tabela 2	Prevalência da hemofilia A por região do Brasil	28
Tabela 3	Prevalência da hemofilia A no Brasil por unidade federada da região Norte	28
Tabela 4	Proporção de pacientes com hemofilia A por gravidade no Brasil e no Pará	29
Tabela 5	Proporção de pacientes com hemofilia A e inibidor no Brasil e no Pará	29
Tabela 6	Mix de Primer	52
Tabela 7	Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador HMF-01	55
Tabela 8	Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador HMF-03	56
Tabela 9	Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador HMF-02	56
Tabela 10	Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador DXS 10011	57
Tabela 11	Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador DXS 7423	58
Tabela 12	Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador GATA 31E08	59
Tabela 13	Parâmetros de Diferenciação entre indivíduos para cada marcador	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Prevalência da Hemofilia em cinco países	27
Quadro 2	Definição dos diversos tratamentos da hemofilia	33
Quadro 3	Esquema de profilaxia primária com dose escalonada	35
Quadro 4	Polimorfismos estudados com Primers utilizados e posição no cromossomo X	50
Quadro 5	Grau de parentesco das mulheres estudadas em sete famílias	61
Quadro 6	Dados dos pacientes quanto à idade, classificação da hemofilia, pesquisa de inibidor e haplótipo	62
Quadro 7	Haplótipo de cada indivíduo estudado nos seis marcadores e portadora identificada	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA HEMOFILIA.....	17
1.2 ESTRUTURA MOLECULAR DO FVIII.....	20
1.3 GENE F8.....	21
1.4 PRINCIPAIS MUTAÇÕES.....	23
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	26
1.6 EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO NO BRASIL.....	30
1.7 TRATAMENTO.....	32
1.8 COMPLICAÇÕES.....	36
1.9 O ESTADO DE PORTADORA DO GENE.....	42
2 APLICABILIDADE	46
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL.....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4 METODOLOGIA	48
4.1 MATERIAIS.....	48
4.1.1 Escolha dos Marcadores.....	48
4.1.2 Seleção dos Primers.....	49
4.2 MÉTODOS.....	51
4.2.1 Casuística.....	51
4.2.2 Extração do DNA.....	51
4.2.3 Otimização da PCR Multiplex.....	51
4.2.4 Detecção e Análise dos produtos da PCR Multiplex.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS INVESTIGADOS.....	54
5.1.1 HMF-01.....	54
5.1.2 HMF-03.....	55
5.1.3 HMF-02.....	56
5.1.4 DXS10011.....	57
5.1.5 DXS7423.....	58
5.1.6 GATA31E08.....	59
5.2 ANÁLISE DAS FAMÍLIAS ESTUDADAS.....	61
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES.....	62
5.4 HAPLÓTIPO DAS FAMÍLIAS.....	63
5.5 ANÁLISE DAS FAMÍLIAS COM POSSÍVEIS PORTADORAS.....	66
6 CONCLUSÕES.....	72
7 REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE A – PROPOSTA DE PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DAS PORTADORAS DA HEMOFILIA A.....	83

1. INTRODUÇÃO

A hemofilia é uma doença conhecida há milênios. Os relatos mais antigos do que poderia ter sido a Hemofilia datam do século II dC e foram descritos no TALMUD (escritos judaicos). No texto é relatada a decisão do Patriarca Rabbi-Judah de isentar o terceiro filho, da mesma mãe, de ser circuncisado, em função do fato que seus dois primeiros filhos morrerem de hemorragia após circuncisão. Outro relato descreve a decisão do Rabino Simon Bem Gamaliel de proibir a circuncisão em um menino porque os filhos de três irmãs mais velhas de sua mãe morreram após esta operação cirúrgica (www.aphemofilia.pt).

Vários relatos ocorreram ao longo dos séculos, mas somente em 1803, na Filadélfia, Estados Unidos, John Conrad Otto caracterizou a doença em detalhes. Ele anotou que, embora somente os homens mostrassem sintomas hemorrágicos, a irregularidade era transmitida por mulheres não afetadas a uma proporção variável de seus filhos. Os atingidos por esta doença eram chamados de “sangradores” (www.chesp.org.br).

O termo hemofilia foi dado por Hopff, na Alemanha, em 1828, para descrever um distúrbio hemorrágico congênito que afetava somente homens. Em 1840, ocorreu a primeira transfusão de sangue em uma criança hemofílica, realizada em Londres pelo Dr. Samuel Lane, devido a uma hemorragia pós-operatória (www.chesp.org.br).

A hemofilia só viria a ser popularmente conhecida no reinado da Rainha Vitória, que governou o Reino Unido de 1837 a 1901. Como portadora, ela transmitiu a doença a seus descendentes de várias casas reais da Europa, ficando a hemofilia conhecida como “doença real” ou “doença de sangue azul”. O caso mais famoso foi o do Príncipe Alexis, filho de Alexandra (neta da rainha Vitória) e do Czar Nicolas II da Rússia, portador de hemofilia nascido em 1904. Especula-se que o tratamento do pequeno Czar pelo curandeiro Rasputin, que exercia grande poder junto à família real, inclusive nas decisões políticas de governo, tenha levado à queda da dinastia russa (www.aphemofilia.pt; LEE, BERNTORP; HOOTS, 2010).

Quatro décadas depois, foi demonstrada a existência de duas formas distintas de hemofilia. Em 1944, o plasma de duas pessoas, aparentemente com o mesmo diagnóstico de hemofilia, foi misturado, com normalização do tempo de coagulação. No ano de 1937,

Patek e Taylor isolaram uma fração do plasma, ausente ou deficiente nos hemofílicos e a denominaram de fator anti-hemofílico ou Fator VIII. Em 1952 Steven Christmas, um garoto canadense, foi o primeiro paciente a ser diagnosticado com o que viria a ser chamada de hemofilia B por Marcfarlane, que denominou esta outra proteína de fator de Christmas ou Fator IX (DE SOUZA et al, 2011).

Um comitê internacional atribuiu o termo hemofilia A para a deficiência de Fator VIII (FVIII) e hemofilia B para a deficiência de Fator IX (FIX), designação que perdura até hoje. A partir de então, a transfusão de sangue deixou de ser um tratamento empírico, passando os pacientes a receber transfusão de plasma (DE SOUZA et al, 2011).

Com a obtenção do crioprecipitado na década de 60 pela Dr^a Judith Pool, houve uma verdadeira revolução no tratamento da hemofilia, pois o problema do volume de plasma infundido e a consequente sobrecarga circulatória da transfusão de plasma foram minimizados. Esta forma de tratamento permitiu a realização de cirurgias com maior segurança, facilitando que o tratamento fosse realizado até em domicílio, diminuindo a mortalidade (EVATT, 2006).

Na década de 70, com a liofilização industrial do FVIII e FIX, o tratamento ganhou novo impulso, propiciando, nos países desenvolvidos, o tratamento domiciliar rotineiro e precoce, aumentando a expectativa de vida dos hemofílicos até níveis próximos da população em geral (CASTRO et al, 2014; LEE; BERNTORP; HOOTS, 2010).

No entanto, a obtenção de fatores de coagulação a partir de pool de plasma de 10.000 a 20.000 doadores, resultou em uma epidemia de doenças virais, especialmente por vírus da hepatite C (HCV) e da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (EVATT, 2006).

Nos Estados Unidos, mais de 50% dos hemofílicos foi contaminada com HIV e 60% com HCV. Na Europa, 60-70% dos hemofílicos foram contaminados com HIV, HCV e HBV. No Brasil, estima-se que 23% dos hemofílicos A foram contaminados pelo HIV, devido a menor disponibilidade dos fatores de coagulação industriais (EVATT, 2006; TAGARIELLO et al, 2000).

Após o advento dos testes de triagem de doadores de sangue para HBV, HCV e HIV e o desenvolvimento de métodos de inativação viral dos hemoderivados, a

contaminação hoje é praticamente nula. Mais recentemente, foram desenvolvidos fatores de coagulação por metodologia recombinante, sem participação de proteína animal, o que afastou definitivamente a possibilidade de contaminação por micro-organismos (CASTRO et al, 2014; SANTAGOSTINO, 2014).

A disponibilidade de concentrado industrial recombinante para o tratamento da hemofilia não afasta uma das maiores complicações do tratamento, o desenvolvimento de inibidores pelo paciente. Estes inibidores são alo-anticorpos da classe IgG (IgG4), desenvolvidos contra o FVIII infundido, levando à diminuição de resposta do paciente à terapia de reposição (OLDENBURG; EL-MAARRI; SCHWAAB, 2002).

O desenvolvimento de inibidores ocorre em cerca de 30% de pacientes com hemofilia A grave, geralmente dentro dos primeiros 10 a 50 dias de exposição, em pacientes ainda não tratados. O desenvolvimento de inibidores leva ao aumento na mortalidade, na morbidade e no custo do tratamento, já que o paciente necessitará de doses muito maiores de FVIII para controlar o sangramento ou utilizar agentes *bypassing*, que têm custo muito mais elevado. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de inibidor, destacam-se a gravidade da hemofilia e o tipo de mutação presente no paciente. A profilaxia regular está associada ao risco 60% menor de desenvolvimento de inibidores do que o tratamento de demanda (CASTRO et al, 2014; MAKRIS et al, 2012; OLDENBURG; EL-MAARRI; SCHWAAB, 2002).

1.1 Aspectos clínicos da hemofilia

A hemofilia hereditária é uma doença genética, ligada ao cromossoma X, que causa um distúrbio hemorrágico por ausência ou acentuada deficiência de um dos fatores da coagulação: Fator VIII na hemofilia A ou Clássica e o Fator IX na hemofilia B ou doença de Christmas. Ela é causada por mutação no gene do fator VIII (*F8*) ou IX (*F9*), sendo caracterizada por episódios de sangramentos “espontâneos” (sem causa aparente), principalmente nas articulações, músculos e tecidos moles, sendo o nível de sangramento proporcional à deficiência do FVIII ou FIX (BRASIL, 2005; WFH, 2015).

A hemofilia A é a mais comum, representando cerca de 80% dos casos de hemofilia, com frequência estimada em 1/5.000 a 1/10.000 nascimentos masculinos, enquanto a hemofilia B tem frequência de 1/30.000 nascimentos masculinos.

Clinicamente, não há diferenciação entre os dois tipos de hemofilia, sendo necessária a dosagem dos Fatores VIII e IX da coagulação para que seja feito o diagnóstico (CASTRO et al, 2014; KEENEY; MITCHEL; GOODEVE, 2005).

Até a década de 1950 o diagnóstico da hemofilia era baseado na história clínica do paciente. O diagnóstico laboratorial foi possível a partir das pesquisas do teste de geração de tromboplastina por Biggs, em 1953, que levou ao desenvolvimento do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa). Este teste, que avalia os fatores da chamada via intrínseca da coagulação, isto é, a deficiência dos Fatores VIII, IX, XI e XII, está aumentado na hemofilia. Por outro lado, o Tempo de Protrombina, que avalia os fatores da via extrínseca da coagulação, ou seja, os Fatores II, V, VII e X, encontra-se normal (KONKLE; JOSEPHSON; FLETCHER, 2015).

O Tempo da Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) consiste na recalcificação do plasma na presença de grande quantidade de fosfolípido e de um ativador do sistema de contato. Ele está aumentado na hemofilia grave e moderada e pode estar normal na hemofilia leve, mas é um teste de triagem de grande utilidade. Portanto, mesmo que o TTPa esteja normal, se um paciente apresenta história clínica sugestiva de hemofilia, a dosagem dos fatores de coagulação deve ser realizada (BRASIL, 2012; KONKLE; JOSEPHSON; FLETCHER, 2015;).

A partir deste TTPa alterado, é realizada a dosagem do FVIII no plasma através da quantificação da atividade coagulante do FVIII, por meio de testes funcionais da coagulação. Pode ser realizado pelo método de um estágio, conhecido como coagulométrico, ou pelo método cromogênico ou em dois estágios (BRASIL, 2012).

A Tabela 1 mostra o consenso da *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) quanto à classificação da hemofilia.

Tabela 1- Classificação da Hemofilia A

Nível de FVIII	Classificação
< 0.01 UI/ml (<1% do normal)	Grave
0.01 - 0.05 UI/ml (1%-5% do normal)	Moderada
> 0.05 - <0.40 UI/ml (>5%-<40 % do normal)	Leve

Fonte: ISTH, 2001

A tendência ao sangramento está diretamente relacionada à concentração plasmática do Fator VIII, classificando a hemofilia em Grave, Moderada e Leve, de acordo com o nível de atividade coagulante do Fator VIII (FVIII:C), sendo o nível normal definido como 1 UI/ml de FVIII:C (100%), segundo recomendação da *World Health Organization International Standard for Plasma Factor VIII:C* (WHITE et al, 2001).

Por ser uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, a hemofilia A afeta principalmente homens, já que estes possuem um único cromossomo X. De forma diferente, as mulheres possuem dois cromossomos X e somente manifestam a doença quando possuem dois alelos deficientes do Fator VIII (homozigotas). As portadoras têm um alelo normal e outro deficiente (heterozigotas). A maioria apresenta níveis de Fator VIII em torno de 50% do normal, o que é suficiente para a hemostasia (PEAKE et al, 1993).

De forma resumida, homens com um alelo mutante (X^HY , hemizigose) terão a doença, enquanto mulheres com um único alelo com a mutação (X^HX , heterozigose) serão portadoras e, portanto, com 50% de probabilidade de transmitir o alelo anormal à sua prole, em cada gestação (FERREIRA PIO; DE OLIVEIRA; REZENDE, 2009; KEENEY; MITCHEL; GOODEVE, 2005).

Como escrito anteriormente, uma situação muito rara é a presença de mulheres com mutações em ambos os alelos (X^HX^H , homozigose), que neste caso manifestarão a doença. Esta situação é mais frequente em casamentos consanguíneos em decorrência da união entre mulheres portadoras e homens hemofílicos (BOWEN, 2002).

Cerca de 30% dos pacientes diagnosticados com hemofilia A não possuem história familiar prévia da doença. Estes casos são explicados pela ocorrência de mutações espontâneas (*de novo*) (BOWEN, 2002).

Mulheres portadoras podem apresentar baixos níveis de Fator VIII ou Fator IX, devido à lionização extrema, evento relacionado à inativação do cromossomo X “normal”, isto é, aquele que não carrega a mutação associada à hemofilia (PEAKE et al, 1993; SRIVASTAVA et al, 2012).

A figura 1 apresenta um esquema da genética da hemofilia e a localização dos genes da hemofilia A e hemofilia B, no braço longo do cromossomo X:

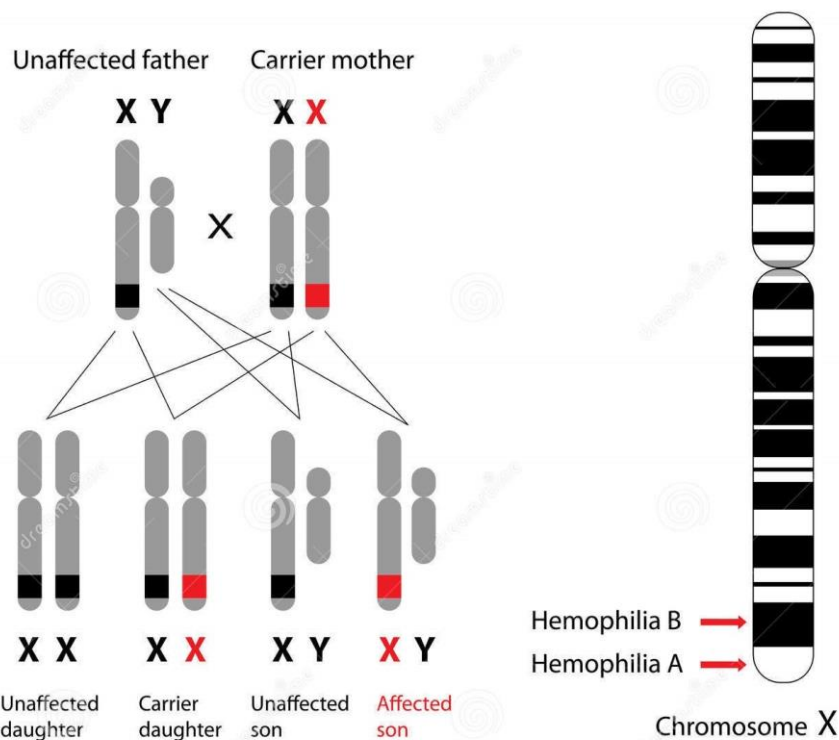


Figura 1. Representação da Genética da Hemofilia

Fonte: Dreamstime (www.shutterstock.com)

1.2 Estrutura molecular do fator VIII

A molécula do FVIII é uma glicoproteína plasmática sintetizada primariamente nos hepatócitos, embora pequenas quantidades possam ser sintetizadas nos rins, tecido linfático e células endoteliais sinusóides e serve como cofator para a ativação proteolítica do Fator X (FANG; WANG, L; WANG, H, 2007).

A proteína precursora do FVIII consiste de 2.351 aminoácidos, onde os 19 primeiros correspondem a uma sequência de peptídeo sinal. Quando a proteína passa pelo retículo endoplasmático, o peptídeo sinal é clivado resultando em uma proteína de estrutura primária de 2.332 aminoácidos organizados em domínios. A análise dessa estrutura primária revelou três diferentes tipos de domínios estruturais: i) três domínios A, com 330 aminoácidos; ii) um domínio B com 980 aminoácidos; e iii) uma região carboxiterminal com 150 aminoácidos, divididos em dois domínios C. A cadeia pesada compreende os domínios A1 – a1 – A2 – a2 – B e a cadeia leve os domínios a3 – A3 – C1 – C2. É um dos fatores de coagulação menos estáveis, com meia-vida de cerca de

doze horas, circulando no plasma em um complexo não-covalente com o Fator de von Willebrand (DE SOUZA et al, 2011; FANG, WANG,L; WANG, H, 2007).

1.3 Gene *F8*

O gene *F8* está localizado no topo do braço longo do cromossomo X, na porção Xq28; compreende 186 Kilobases (Kb), sendo composto por 26 éxons e 25 íntrons, com tamanho variando de 69 pares de bases (pb) (exon 5) a 3.1 Kb (exon 14) e de 0,2 a 32,4 Kb respectivamente. O mRNA (RNA mensageiro) do gene *F8* tem cerca de 9 Kb e codifica uma proteína de 2.332 aminoácidos composta por três domínios (A, B e C) (Figura 2). (KEENEY; MITCHEL; GOODEVE, 2005).

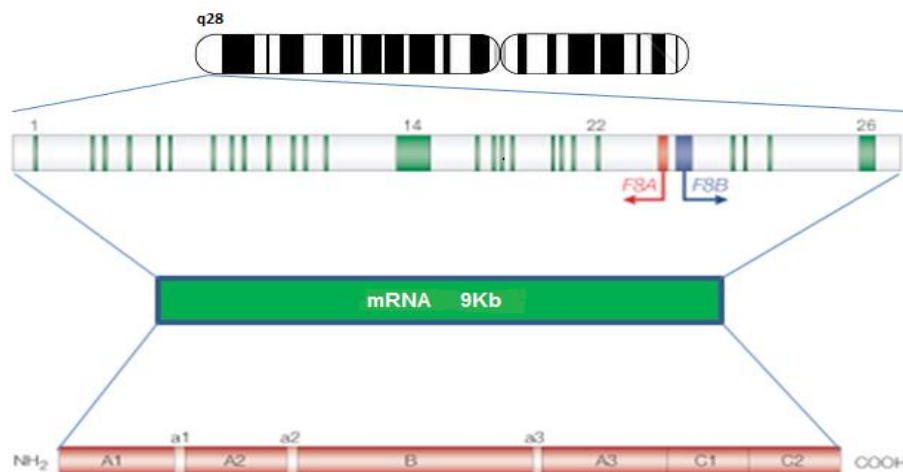


Figura 2. Gene *F8*, mRNA e a proteína codificada

Fonte: Adaptado de Nature Reviews Genetics (www.nature.com)

O gene *F8* possui 3 características dignas de destaque:

a) A presença de cerca de 70 ilhas CpG (sequência em que C e G se repetem, considerada um ponto preferencial para ocorrência de mutação), das quais 2% estão em sequências codificadoras;

b) O tamanho destacado do éxon 14, com 3.106 pb, mas que codifica a parte funcionalmente menos importante da proteína;

c) O tamanho e estrutura do íntron 22, que apresenta uma ilha CpG que funciona como promotor bidirecional para dois transcritos adicionais: *F8A* e *F8B*. *F8A* possui 1,8

Kb, não apresenta íntrons e é transcrito em direção oposta a *F8*. Já *F8B* possui 2,5 Kb e é transcrito na mesma direção de *F8*, sendo parcialmente sobreposto ao mesmo (éxons 23 - 26). As sequências de *F8A* e da ilha de CpG formam uma região de aproximadamente 9,5 Kb denominadas *int22h1*. Esta sequência possui similaridade com duas cópias extragênicas (*int22h2* e *int22h3*) localizadas aproximadamente entre 400-500 Kb anteriores à porção telomérica de *F8* (BOWEN, 2002) (Figura 3).

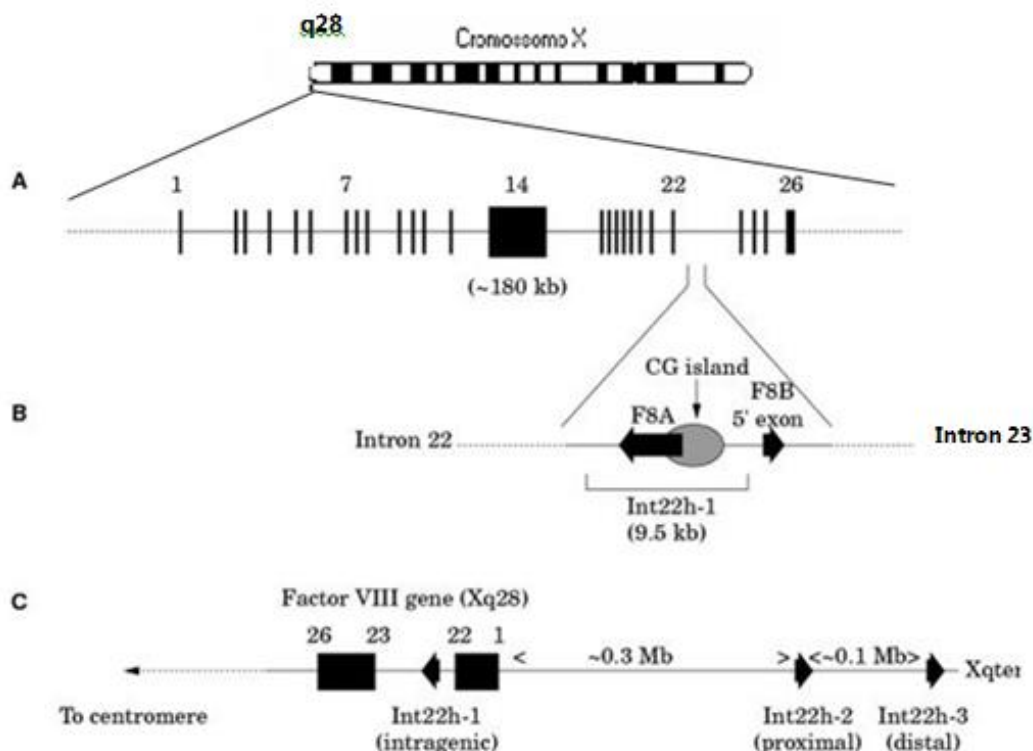


Figura 3. Gene *F8* destacando o íntron 22

Fonte: Adaptado de BOWEN, 2002

A ocorrência de uma segunda região com alto grau de similaridade envolvendo sequência intra e extragênica pode ser observada neste gene. Esta corresponde a uma região de aproximadamente 1 Kb, mais exatamente 1.041 pb, presente no íntron 1, denominada *int1h1*. A região de alta similaridade correspondente está localizada a aproximadamente 140 Kb anteriores à porção telomérica de *F8*. Essa cópia extragênica é denominada *int1h2*. Estas regiões de alta similaridade funcionam como sítios de recombinação homóloga e determinam rearranjos intragênicos, causando mutações responsáveis pela hemofilia (FERREIRA PIO; DE OLIVEIRA; REZENDE, 2009; KEENEY; MITCHEL; GOODEVE, 2005).

A hemofilia resulta de mutações heterogêneas no gene *F8*. As mutações mais frequentes são as inversões no íntron 22 e no íntron 1, responsáveis por 40-50% dos casos de hemofilia A grave (TAGARIELLO et al, 2000). Os demais casos de hemofilia grave, os casos moderados e os casos leves são causados por mutações pontuais, pequenas deleções e inserções, sendo raras as grandes deleções e inserções. 30% dos casos de hemofilia A são mutações *de novo*, sem história de outros casos na família. Quase todos os casos de hemofilia A leve e moderada são causados por mutações pontuais na sequência codificante de *F8*, resultando na substituição de um único aminoácido. A mutação resultante da substituição da Citosina pela Timidina nos nucleotídeos CpG são muito comuns, representando cerca de um quarto das substituições de uma única base (FEREIRA PIO; DE OLIVEIRA; REZENDE, 2009; HEDNER et al, 2000; KEENEY; MITCHEL; GOODEVE, 2005).

1.4 Principais mutações

Mutações pontuais, deleções, inserções, inversões e rearranjos são encontrados na hemofilia A. Mutações pontuais (substituição de um único nucleotídeo) são as mais comuns, presente em cerca de 90% dos pacientes. Deleções no gene *F8* estão presentes em cerca de 5-10% dos pacientes. Inserções e inversões são mais raras na hemofilia, com exceção da inversão do íntron 22, que é a mais prevalente nos pacientes com a forma grave da hemofilia A. Um pequeno percentual (1%) apresenta inversão no íntron 1. Rearranjos também são raros (BOWEN, 2002; GOUW et al, 2012; JAYANDHARAN et al, 2005).

Mutações pontuais: compreendem as mutações *missense*, mutações *nonsense* e mutações mRNA *splice site*. As mutações *missense* podem causar desde doença leve até as formas moderada e grave. Mutações *nonsense* tem como produto uma proteína truncada, causando doença grave. Já as mutações mRNA *Splice site* podem causar tanto doença grave, como moderada e leve, dependendo do local específico acometido. As mutações pontuais também podem ser recorrentes, sendo encontradas principalmente nas ilhas CpG (BOWEN, 2002; GOUW et al, 2012; SALVIATO, 2007).

Deleções: inclui a deleção total do gene, deleção parcial do gene e microdeleções de um dos inúmeros pares de base. As deleções têm grande possibilidade

de destruir a função gênica, resultando em doença grave (BOWEN, 2002; GOUW et al, 2012).

Inserções: podem ser grandes ou pequenas, afetando o produto ou a função gênica. Podem estar associadas à doença grave (BOWEN, 2002; GOUW et al, 2012).

Inversões: ocorrem raramente, à exceção da inversão do íntron 22, que é a mutação mais frequente nos pacientes com a forma grave da doença (KEENEY; MITCHEL; GOODEVE, 2005).

Inversão íntron 22- esta mutação ocorre como resultado de uma recombinação homóloga entre cópias de sequência de DNA repetidas, na região homóloga do íntron 22 (int22h): uma cópia intragênica (inth22-1) e outras duas cópias: int22h-2 (proximal) ou int22h-3 (distal) do gene *F8*, durante a meiose. O gene *F8* é completamente rompido: íntrons 1 ao 22 são deslocados da sua posição normal e sua orientação é invertida (Figura 4). Em famílias com hemofilia A grave, os homens afetados devem ser analisados primeiramente para esta mutação, já que a mesma é responsável por 40% a 45% dos casos de hemofilia grave e 20% de todos os casos de hemofilia A (BOWEN, 2002; FERREIRA et al, 2014; GOUW et al, 2012).

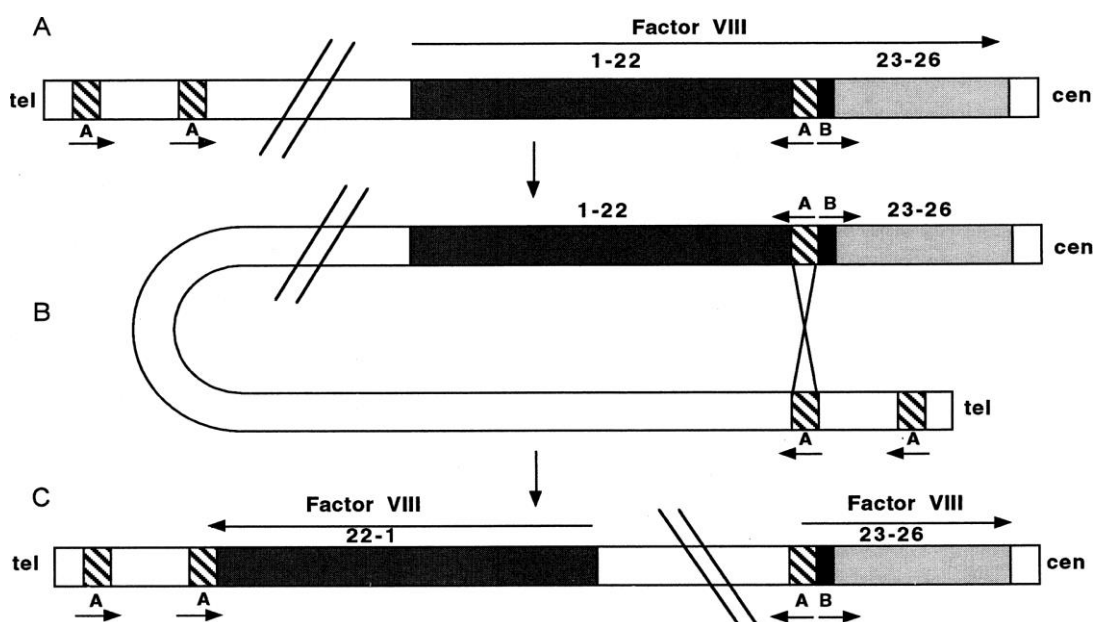


Figura 4. Inversão do íntron 22.

A) Organização genômica de *F8* mostrando a posição e orientação das três cópias dos genes *F8A* (duas acima de *F8* e uma dentro do íntron 22) e uma cópia do gene

F8B dentro do íntron 22. As setas indicam a direção da transcrição dos genes A e B do *F8*. B) Sequência homóloga do *F8A* dentro e fora do gene *F8* media uma recombinação intracromossomal com o gene A proximal (que está aqui representada) ou com o gene A distal. C) O produto da recombinação resulta na inversão e quebra do gene *F8* (PURANDARE e PATEL, 1997).

Desde a clonagem do gene *F8* no ano de 1984, as bases moleculares da hemofilia A vem sendo extensivamente estudadas. Estes estudos geraram grande volume de informações, que hoje são compiladas em bancos de dados. Um dos mais representativos bancos de informação sobre hemofilia A é o HAMSTeRS (*Haemophilia A Mutation Search Test and Resource Site*) (FISCHER et al, 2013). Este banco, que lista centenas de mutações capazes de produzir o fenótipo da hemofilia, assim como de polimorfismos, é mantido pelo Reino Unido (TANTAWY, 2010).

Uma revisão sistemática da literatura realizada por Samantha Gouw *et al* (2012), avaliou 30 estudos de desenvolvimento de inibidores nos vários tipos de mutação do *F8*, envolvendo 5.383 pacientes portadores de hemofilia A, sendo 1.029 com inibidor. Foi verificado que a maioria das mutações era de inversão do íntron 22 (46%), pequenas inserções/deleções (17%) e mutações *nonsense* (15%). A Figura 5 mostra o percentual das mutações encontradas no estudo.

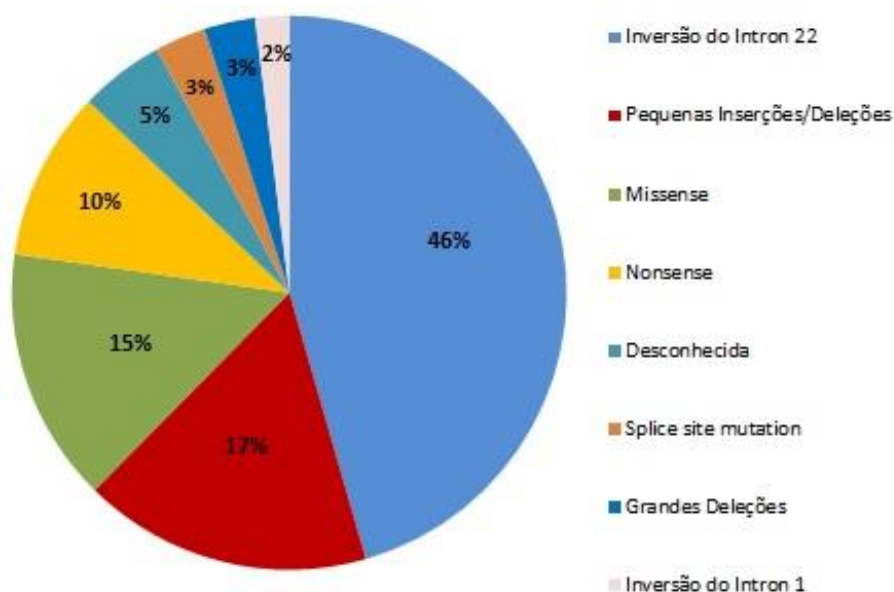


Figura 5. Frequência das mutações no desenvolvimento de inibidores

Fonte: GOUW, 2012.

1.5 Manifestações clínicas

Por ser uma coagulopatia, os sintomas da hemofilia são sangramentos excessivos, secundários a trauma, cirurgia ou mesmo espontâneos, diretamente relacionados à concentração plasmática do Fator VIII (BOLTON-MAGGS; PASI, 2003).

Hemofilia Grave – apresentam sangramentos espontâneos intra-articulares (Hemartroses) e musculares (Hematomas), hemorragias após traumas, cirurgias ou acidentes;

Hemofilia Moderada – Hemartroses e Hematomas secundários a pequenos traumas, sangramento excessivo após cirurgias e avulsão dentária.

Hemofilia Leve – sangramento aumentado após cirurgias, avulsão dentária e traumas. Não apresentam sangramentos espontâneos.

Os sangramentos no sistema musculoesquelético são os mais frequentes, sendo as hemartroses as morbidades mais prevalentes, representando cerca de 80% dos sangramentos. As articulações mais afetadas são joelho, tornozelos e cotovelos, sendo ombro e coxofemoral menos afetadas (GOUW et al, 2012). Em segundo lugar estão os hematomas musculares, responsáveis por cerca de 10% dos sangramentos, que ocorrem principalmente na panturrilha e antebraço, podendo levar à síndrome compartimental, onde há comprometimento de nervos periféricos, que pode evoluir para outras complicações como lesão muscular irreversível, miosite, lesão de tendão (contratura isquêmica de Volkmann). Outro hematoma grave é do músculo *íleo psoas*, muitas vezes confundido com apendicite, que requer pronto diagnóstico, para que o tratamento adequado possa ser instituído precocemente (KARIM; JAMAL, 2013; SILVA; LUCK; LEISSINGER, 2012).

Hemorragias intracavitárias, do trato geniturinário (hematúria) e no Sistema Nervoso Central (SNC) também são vistos com frequência. Nos adultos que recebem tratamento sob demanda, até 20% dos óbitos são causados por hemorragia do SNC (KARIM; JAMAL, 2013).

Nos recém-nascidos (RN), o sangramento mais frequente é após a circuncisão, presente em 45% dos casos. A hemorragia do SNC é relatada entre 4% até 17% dos RN. Os sangramentos de partes moles são comuns no primeiro ano de vida, geralmente

secundários a traumas de quando a criança começa a andar, sendo comum o sangramento na cavidade oral (KARIM e JAMAL, 2013).

De acordo com a Federação Mundial de Hemofilia, o Brasil tem a terceira maior população mundial de hemofílicos, atrás apenas da Índia e Estados Unidos (WFH, 2015).

Quadro 1. Prevalência da Hemofilia em cinco países

País	População	Nº de Hemofílicos
Índia	1.236.344.631	17.470
EUA	318.892.103	17.131
Brasil	202.656.788	11.497
China	1.355.692.576	11.108
Reino Unido	63.742.977	6.811

Fonte: WFH *Annual Global Survey* 2014

Com o objetivo de ter registros atualizados dos portadores de hemofilia, assim como sua evolução e tratamento, o Ministério da Saúde implantou em janeiro de 2009 o Sistema Hemovida Web Coagulopatias, um banco de dados nacional de todos os portadores de coagulopatias. Os centros tratadores de hemofilia (CTHs) são responsáveis por cadastrar os pacientes, assim como manter seus dados atualizados, no que se refere à utilização de concentrados de fatores da coagulação, complicações clínicas, resultados de exames sorológicos e desenvolvimento de inibidor. Em 2012 havia 9.122 hemofílicos tipo A cadastrados no Sistema. Desse total de hemofílicos, 36,09% são classificados como graves, 24,25% como moderados e 25,28% como leves. Em 14,4% dos casos não há registro do grau de severidade da hemofilia (BRASIL, 2014).

Segundo estimativa do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 2010 o Brasil tinha uma população masculina de 95.478.430 pessoas, resultando numa prevalência de 1 paciente/ 10.000 homens (Tabela 2).

As regiões Norte e Nordeste tem a prevalência de hemofilia A um pouco inferior às demais regiões (BRASIL, 2014).

Tabela 2. Prevalência da Hemofilia A por Região do Brasil

REGIÃO	População Masculina	Hemofílicos A	Prevalência/10.000 homens
Norte	8.335.564	749	0,9
Nordeste	26.429.312	2.431	0,9
Sul	13.646.949	1.390	1
Sudeste	39.829,102	3.829	1
Centro Oeste	7.237.503	723	1
Total	95.478.430	9.122	1

Fonte: Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados, 2014

Na região Norte, a maior prevalência é no estado do Amazonas, com 1,3/10.000 homens, estando o Pará em segundo lugar, com 0,9/10.000, observando-se estados com baixíssima prevalência, como Roraima (0,4/10.000), Rondônia e Amapá (0,6/10.000) (Tabela 3). Estima-se que os dados na região norte estejam subestimados por falta de registro ou falta de diagnóstico, uma vez que a prevalência no Brasil é de 1/10.000 homens. No Pará, o número esperado de casos seria de 397 em função da população de 3.976.315 homens (BRASIL, 2014).

Tabela 3. Prevalência da Hemofilia A no Brasil, por unidade federada da Região Norte

UF	População Masculina	Pacientes com Hemofilia A	Hemofilia A/ 10.000 homens
Brasil	95.478.430	9.122	1
Pará	3.976.315	346	0,9
Amazonas	1.829.513	242	1,3
Rondônia	813.000	51	0,6
Tocantins	725.922	48	0,7
Acre	388.512	32	0,8
Amapá	358.150	21	0,6
Roraima	243.772	9	0,4
Total Norte	8.335.564	749	0,9

Fonte: Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados, 2014

Quando se observa a proporção de pacientes por gravidade, chama atenção a grande diferença entre hemofilia leve e hemofilia grave no Pará, 48,55% e 21,97% respectivamente, enquanto no Brasil ocorre o contrário, 25,28% com a forma leve e 36,09% com a forma grave (Tabela 4) (BRASIL, 2014). Pode-se inferir que as mutações que ocorrem nos hemofílicos no estado do Pará sejam mais leves, ocasionando doença mais branda. Esta hipótese poderia ser confirmada através de estudo genético para identificar as mutações dos pacientes no nosso estado, estudo esse ainda não realizado.

Tabela 4. Proporção de pacientes com hemofilia A por gravidade, no Brasil e no Pará

Tipo de Hemofilia	Leve		Moderada		Grave		Não testado/não informado	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Brasil	2.306	25,28	2.212	24,25	3.292	36,09	1.312	14,38
Pará	168	48,55	61	17,63	76	21,97	41	11,85

Fonte: Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados, 2014

Se observarmos a ocorrência de inibidores, a frequência também é muito baixa no Pará, apenas 3,76% contra 7,48% no Brasil (Tabela 5). Porém, a frequência no Brasil deve ser muito maior, uma vez que 67,45% dos pacientes não foram testados, enquanto no Pará apenas 16,76% não o foram (BRASIL 2014). Esta discrepância também poderia ser explicada por mutações mais leves acometendo os pacientes do Pará (observação pessoal). Dos 13 pacientes com inibidor registrados no Pará, quatro apresentavam titulação superior a 5UB/mL, sendo classificados, portanto, como de alto título enquanto nove pacientes não haviam sido testados. É importante ressaltar que até 2011, no estado do Pará era realizada apenas a pesquisa de inibidor, sem a titulação. A partir de 2011, foi implantado o teste, pelo método Bethesda modificado por Nijmegen. Todos os pacientes sem titulação tiveram diagnóstico de inibidor antes de 2011.

Tabela 5. Proporção de pacientes com Hemofilia A e Inibidor, no Brasil e no Pará

	Com Inibidor		Sem Inibidor		Não testado	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Brasil	682	7,48%	6.153	67,45%	2.287	25,07
Pará	13	3,76%	275	79,48	58	16,76

Fonte: Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados, 2014

1.6 Evolução do tratamento no Brasil

O atendimento aos hemofílicos no Brasil sofreu grande modificação nos últimos 35 anos. Como consequência da industrialização a partir de 1960, houve grande incremento da demanda dos serviços de saúde e conseqüentemente por produtos derivados do sangue (BRASIL, 1980).

Esse mercado passou a ser dominado por bancos de sangue privados e indústrias setoriais, com comercialização de hemoderivados contaminados, abastecidos por doadores de sangue remunerados (BRASIL, 1980).

Diante dessa grave situação, o poder público decidiu disciplinar as atividades relacionadas com a coleta e utilização do sangue, a produção e a comercialização de seus derivados, implantando o Programa Nacional do Sangue e Hemoderivados – Pró-Sangue (BRASIL, 1980).

Dentro das ações básicas do Pró-Sangue, foi instituído o Subsistema Nacional de Hematologia e Hemoterapia, que envolvia os Centros de Hematologia e Hemoterapia-HEMOCENTROS, com a competência de: i) centralizar a coleta do sangue, estimulando a doação voluntária, não remunerada; ii) produzir e controlar a distribuição dos hemoderivados básicos, tais como albumina, gamaglobulina, fator anti-hemofílico e concentrados de elementos figurados; iii) desenvolver o ensino e a pesquisa nos campos da hematologia e hemoterapia (BRASIL, 1980).

Os pacientes hemofílicos passaram então a ser tratados nesses centros, instalados inicialmente nas capitais dos estados, mas que formaram uma malha para as cidades do interior, tornando-se verdadeiros centros de excelência em Hematologia e Hemoterapia.

A partir dos anos 90, o Ministério da Saúde concentrou a importação de hemoderivados, em especial os concentrados de fatores da coagulação VIII e IX, estabelecendo um programa nacional para o tratamento da hemofilia, transferindo aos hemocentros coordenadores de cada estado a responsabilidade para estocar e distribuir os hemoderivados aos Centros Tratadores de Hemofilia, onde os pacientes recebem, sem custo algum, os concentrados de fator e demais produtos para o seu tratamento. Em 1999 foi iniciado o programa de dose Domiciliar de Urgência – DDU, onde pacientes e cuidadores são treinados para realizar a infusão de doses predeterminadas de concentrado de FVIII, permitindo o tratamento imediato do sangramento (FERREIRA et al, 2014).

Em 21 de março de 2001, foi sancionada a Lei 10.205, regulamentando as ações relativas à coleta, processamento, estocagem e distribuição do sangue, componentes e derivados (BRASIL, 2001). A Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 23, de 24 de janeiro de 2002, vedou a utilização de crioprecipitado para o tratamento da hemofilia, visto que havia grande risco de contaminação por doenças transmissíveis (FERREIRA et al, 2014).

Em 2011, foi instituído o Protocolo de Profilaxia Primária no Brasil para crianças até 36 meses de idade com hemofilia grave, transformando o tratamento e a qualidade de vida dos pacientes. Baseado no protocolo de doses escalonadas do Canadá possibilita o tratamento considerado padrão pela Federação Mundial de Hemofilia. O tratamento profilático foi a seguir expandido para adultos com hemofilia grave, que reduz o número de eventos hemorrágicos, previne sequelas em outras articulações e melhora a qualidade de vida. Em 2012, foi instituído o protocolo de Indução de Imunotolerância para Hemofílicos A portadores de Inibidor contra o FVIII, normatizando este tratamento no Brasil. Em 2012, a disponibilidade de concentrado de FVIII *per capita* no Brasil atingiu 3,7UI, estando de acordo com o tratamento preconizado pela Federação Mundial de Hemofilia, que reconhece que níveis iguais ou maiores que 3.0 UI *per capita* são necessários para se atingir um tratamento de qualidade em hemofilia (BRASIL, 2014).

No estado do Pará, o Centro de Hemoterapia e Hematologia foi criado em 1978, em Belém, seguindo todos os preceitos do Pró-Sangue e assumindo a responsabilidade pelo tratamento dos hemofílicos do estado. Nos anos seguintes, foram instalados Hemocentros Regionais em outros três municípios: Castanhal, Marabá e Santarém, que também são CTHs, além de hemonúcleos nos municípios de Abaetetuba, Altamira, Capanema, Redenção e Tucuruí. Estes hemonúcleos não são CTHs, mas realizam a infusão e dispensação dos concentrados de FVIII.

Atualmente, existem 18 pacientes em profilaxia primária, 112 em profilaxia secundária e cinco pacientes em Indução de Imunotolerância. Todo o tratamento odontológico e fisioterápico é realizado no hemocentro, assim como os exames de diagnóstico da hemofilia, pesquisa e titulação de inibidores e testes de triagem para as patologias passíveis de transmissão pela transfusão de sangue e produtos derivados de plasma, como as hepatites B e C, HIV, HTLV I/II e Sífilis. Pacientes com idade entre 0-30 anos recebem concentrado de Fator VIII recombinante e os maiores de 30 anos, produtos derivados de plasma.

Para os pacientes com inibidor de alto título, são utilizados agentes *bypassing* (Complexo Protrombínico ativado e FVII ativado recombinante), além do fornecimento, sem custo, de analgésicos e anti-inflamatórios, quando necessários. Os pacientes podem realizar a infusão no próprio hemocentro ou em residência, sendo realizado treinamento para infusão de fator para os familiares e pacientes, proporcionando o tratamento domiciliar precoce. O grande desafio do estado do Pará é vencer a barreira das grandes distâncias.

1.7 Tratamento

Quando se fala em tratamento para pessoas com hemofilia, muitas considerações precisam ser feitas.

De acordo com as diretrizes da Federação Mundial de Hemofilia, o objetivo principal deve ser a prevenção e o tratamento dos episódios hemorrágicos (WFH, 2015). O tratamento dos sangramentos deve ser feito de maneira agressiva e precoce, com a retaguarda de centros de tratamento especializados, contando com equipe multidisciplinar, com apoio psicossocial e de reabilitação (DUNN; ABSHIRE, 2004; KARIM; JAMAL; 2013).

Segundo Manucci (1999), o tratamento da hemofilia evoluiu “das sombras em direção à luz”. Iniciando com a transfusão de sangue total e plasma, hoje o tratamento é baseado na reposição do fator VIII da coagulação, podendo ser realizado com produtos derivados de plasma ou com produtos Recombinantes.

Nos dias atuais, as modalidades de tratamento da hemofilia são definidas pela periodicidade com que é realizada a reposição dos fatores de coagulação, podendo ser sob demanda (episódico) ou profilático (BRASIL, 2015).

O tratamento sob demanda é o mais utilizado rotineiramente, principalmente nos países que não dispõem de oferta suficiente de hemoderivados, sendo também o mais indicado para pacientes com hemofilia moderada e leve. Consiste na administração de concentrado de FVIII na vigência de sangramento, em dose e frequência dependente da gravidade da hemorragia. A administração do fator pode ser feita em domicílio, nos centros tratadores ou em hospitais (BRASIL, 2015; FRANCHINI, 2013; SANTAGOSTINO, 2014).

O cálculo da dose de reposição é baseado na seguinte fórmula:

$$\text{Unidades Internacionais (UI) de ator VIII} = \text{peso (kg)} \times \frac{\Delta}{\%}$$

Onde: Δ = % de fator a ser elevado – % de fator residual endógeno

O tratamento de Profilaxia é de caráter preventivo, superior a 45 semanas ao ano, consistindo na administração regular de concentrado de FVIII, a fim de manter os níveis de fator suficientemente elevados, mesmo na ausência de hemorragias, para prevenir os episódios de sangramento espontâneo, principalmente nas articulações. Atualmente, é considerado o padrão ouro para prevenir o dano articular, sendo indicado para pacientes com hemofilia grave (KARIM e JAMAL, 2013; MANCO-JOHNSON, 2007).

O tratamento profilático vem aumentando gradativamente em todo o mundo. No Canadá, já representa 77% das causas de infusão de FVIII (TRAORE et al, 2014).

As diversas formas de tratamento estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Definição dos diversos tratamentos da hemofilia

Tratamento	Definição
Tratamento de Demanda ou Episódico	Tratamento dado quando há evidência clínica de sangramento
Profilaxia Primária	Tratamento contínuo iniciado na ausência de doença articular osteocondral, antes da segunda hemartrose clinicamente evidente e dos 3 anos de idade
Profilaxia Secundária	Tratamento contínuo e regular iniciado após 2 ou mais hemartroses e antes de dano articular documentado
Profilaxia Terciária	Tratamento regular e contínuo iniciado após doença articular documentada
Profilaxia Intermitente ou Periódica	Tratamento dado para prevenir sangramentos em período não superior a 45 semanas ao ano

Fonte: WFH, 2012

A dose de concentrado de FVIII administrada é baseada no cálculo de que 1 Unidade Internacional (UI) de FVIII por quilo de peso corporal aumenta o nível plasmático em 0,02 UI/mL. Um nível de 0,5 UI/mL é necessário para tratar os sangramentos mais frequentes, como hematomas e hemartroses, mas no caso de cirurgias

ou sangramentos graves, como no SNC, o nível necessário é de 1UI (isto é, 100% do nível normal). O objetivo do tratamento Profilático é converter a forma grave da doença na forma moderada/leve, isto é, com níveis de FVIII >1% (MANUCCI, 1993; WFH, 2012).

A Profilaxia Primária é utilizada em praticamente todos os países desenvolvidos, tendo recomendação tanto da Federação Mundial de Hemofilia quanto da Organização Mundial de Saúde. Este esquema mudou drasticamente a evolução clínica da hemofilia, proporcionando melhor qualidade de vida para os pacientes, principalmente por preservar a saúde articular (WFH, 2012).

Existem dois grandes protocolos de Profilaxia Primária, com doses de FVIII diferenciadas (WFH, 2012);

1-Protocolo Malmö: infusão de 25-40 UI/kg por dose, administrada 3 vezes/semana ou em dias alternados.

2- Protocolo Utrecht: infusão de 15-30UI/kg por dose, administrada 3 vezes/semana.

Fisher e colaboradores (2013) compararam os dois protocolos, observando que a qualidade de vida e participação social foram similares entre os dois grupos, sendo que o custo do protocolo Malmö foi 66% maior que o protocolo Utrecht, concluindo que a profilaxia deve ser individualizada.

O regime com o melhor custo/benefício ainda não está bem estabelecido, mas sabe-se que o tratamento profilático é muito oneroso, chegando nos Estados Unidos a US\$140.000/ano/paciente. Sendo assim, foi proposto um novo protocolo, com doses escalonadas de FVIII, a partir do estudo canadense de profilaxia primária. Neste estudo, a profilaxia primária foi iniciada com uma dose semanal de 50UI de FVIII, aumentando a frequência e diminuindo a dose de acordo com a ocorrência de sangramento (FELDMAN et al, 2006).

Este regime de profilaxia se mostrou efetivo para prevenir sangramentos e consequente dano articular, com um custo bem menor que os demais regimes de profilaxia primária, tendo sido adotado no Brasil a partir de 2011.

Quadro 3. Esquema de profilaxia primária com dose escalonada

Estágio	Dose e frequência das infusões do FVIII
Estágio A	50 UI/kg uma vez por semana
Estágio B	30 UI/Kg duas vezes por semana
Estágio C	25 UI/Kg três vezes por semana

Fonte: Feldman et al, 2006

Os critérios para escalonamento, isto é, para mudança para o próximo estágio, estão definidos a seguir (FELDMAN et al, 2006):

1- Desenvolvimento de articulação-alvo, definida como ≥ 3 sangramentos clinicamente detectados, na mesma articulação, em um período consecutivo de três meses.

2- Desenvolvimento de quatro sangramentos diagnosticados clinicamente, ou sangramento significativo em tecidos moles, com perda de função, por exemplo, em qualquer articulação, num período consecutivo de três meses.

3- Desenvolvimento de ≥ 5 sangramentos diagnosticados clinicamente em qualquer articulação, enquanto estiver no mesmo estágio, ou necessidade de terapia de reposição de fator FVIII em qualquer período de tempo.

Além da reposição do FVIII, alguns medicamentos podem atuar como adjuvantes no tratamento da hemofilia:

A Desmopressina (1-deamino-8-D-arginina vasopressina ou DDAVP), um análogo sintético da vasopressina, é capaz de aumentar os níveis de FVIII no sangue, provavelmente por liberar estoques do Fator VIII do endotélio. Pode ser o tratamento de escolha na hemofilia A leve ou moderada, com a vantagem de menor custo. Pode ser administrada tanto pela via subcutânea (SC), como por infusão endovenosa (EV) ou por spray nasal. A dose deve ser individualizada dependendo da resposta do paciente. Geralmente, uma única dose de 0,33 μg /kg de peso, tanto via SC como EV, pode elevar de 3-6 vezes o nível de FVIII. O spray nasal contém 1,5mg/ml e uma única instilação em cada narina é suficiente para um adulto (BRASIL, 2015; WFH, 2012).

O ácido Tranexâmico e o ácido Epsilon Aminocapróico (EACA) são agentes antifibrinolíticos que inibem a ativação do plasminogênio em plasmina, que é a principal

proteína responsável pela dissolução do coágulo sanguíneo, promovendo assim a estabilização do coágulo. Os antifibrinolíticos podem ser utilizados para o tratamento isolado de algumas hemorragias, principalmente nos sangramentos de pele e mucosas, nas cirurgias odontológicas, ou como adjuvante no caso de hemorragias mais volumosas, reduzindo o consumo de concentrados de fator. São contraindicados nos casos de hematúria, cirurgia torácica e abdominal e em conjunto com complexo protrombínico parcialmente ativado (CCPA). Não tem indicação no tratamento de hemartroses e hematomas musculares (BRASIL, 2015; CAHILL e COLVIN, 1997; WFH, 2012).

1.8 Complicações

Como qualquer outra patologia, a hemofilia apresenta várias complicações, algumas secundárias aos sangramentos e outras secundárias ao tratamento.

As hemorragias do Sistema Nervoso Central (SNC) são consideradas emergências médicas e devem ser prontamente tratadas, antes mesmo de exames laboratoriais ou de imagem. Todo trauma no crânio ou cefaleia importante deve ser inicialmente tratada como hemorragia intracraniana. A dose inicial de FVIII deve elevar o seu nível para 100% do normal, sendo que as doses subsequentes dependerão da avaliação laboratorial e radiológica. Se o sangramento for confirmado, a reposição de FVIII deve se manter por 10 a 14 dias, com paciente hospitalizado e com avaliação neurológica. A hemorragia do SNC é indicação formal para profilaxia secundária, devendo permanecer por 3-6 meses (BRASIL, 2015; WFH, 2012).

A artropatia hemofílica é a principal complicação secundária aos sangramentos, decorrente do acúmulo de sangue na cavidade articular e ferro na membrana sinovial, aumentando a resposta inflamatória, que leva a sinovite crônica, hemartrose recorrente, formando um círculo vicioso que ocasiona dano irreversível da cartilagem e destruição articular (DUNN e ABSHIRE, 2004).

Com o avanço da perda cartilaginosa, advém a artrite progressiva, contratatura secundária dos tecidos moles, artropatia muscular e deformidade angular. A perda de movimentos é comum, com contratatura em flexão do membro afetado, causando perda funcional significativa, além de dor extrema (PACHECO e WOLFF, 2013). Ela se desenvolve geralmente na segunda década de vida ou até antes, dependendo da gravidade do sangramento e do tratamento recebido, principalmente nas articulações do joelho,

tornozelos, cotovelo e coxofemoral (WFH, 2012). Podem aparecer cistos subcondrais, ligados ao espaço articular, que costumam expandir para a articulação, destruindo a cartilagem, ou em direção à metáfise, causando lesões osteolíticas e fraturas patológicas (PACHECO e WOLFF, 2013).

O objetivo do tratamento da artropatia hemofílica consiste em melhorar a função articular, aliviar a dor e auxiliar o paciente para que possa desempenhar suas atividades cotidianas. As opções terapêuticas dependem do estágio da evolução da artropatia, da sintomatologia, do impacto no estilo de vida e das habilidades funcionais do paciente, bem como da disponibilidade de recursos. Este tratamento vai desde a utilização de anti-inflamatórios, exercício físico, fisioterapia, até procedimentos cirúrgicos como a sinovectomia radioativa ou artroscópica, chegando muitas vezes à artroplastia total da articulação e artrodese. Em todos os casos, é fundamental o acompanhamento com uma equipe multiprofissional experiente em hemofilia, para decidir em conjunto com o paciente a melhor abordagem terapêutica (PACHECO e WOLFF, 2013).

Como consequência da evolução do tratamento e disponibilidade de concentrados industriais de fatores da coagulação, obtidos de *pool* de 10.000 a 20.000 doadores de sangue, ocorreu a epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e da Hepatite por Vírus C (HCV) na década de 80. A maioria dos pacientes que recebeu produtos derivados de plasma antes de 1986 foi infectada por esses vírus (EVATT, 2006).

Em 1982, dois pacientes hemofílicos foram diagnosticados com SIDA e o aumento na expectativa de vida alcançada com os novos tratamentos voltou a cair drasticamente. No Reino Unido, de 1985 a 1992, 85% das mortes em hemofílicos soropositivos foi ocasionada pelo HIV (MANUCCI e TUDDENHAM, 2001).

O HIV também pode ocasionar o desenvolvimento de tumores, como sarcoma de Kaposi, 200 vezes mais frequente nos hemofílicos e linfoma não-Hodgkin, 29 vezes maior nos hemofílicos que na população em geral. Com o advento da terapia antiretroviral com múltiplas drogas, a AIDS hoje pode ser considerada uma doença crônica, com qualidade de vida aceitável. Porém, a terapia com antiretrovirais parece aumentar a susceptibilidade a sangramentos espontâneos nos hemofílicos (CAHILL e COLVIN, 1997).

No caso do HCV, a maioria dos infectados desenvolve alguma evidência da doença, desde hepatite crônica moderada até cirrose hepática, falência hepática e carcinoma hepatocelular. Aliás, o carcinoma hepatocelular é 30 vezes mais frequente em hemofílicos do que na população em geral. Nos últimos anos, tem havido preocupação com outras viroses, como o vírus do Oeste do Nilo e Parvovírus B19, apesar de não haver evidência da transmissão destes pelos hemoderivados e da inativação viral efetiva destes produtos. Outra preocupação são as doenças transmitidas por Príons, como a variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (CAHILL e COLVIN, 1997; DUNN e ABSHIRE, 2004; MANUCCI, 2008).

Atualmente, o desenvolvimento de inibidores é a complicação do tratamento mais grave presente nos pacientes portadores de hemofilia. Apesar da significativa melhora no tratamento de pacientes com inibidor, com consequente diminuição da mortalidade, eles ainda são responsáveis por morbidade significativa, maior percentual de complicações hemorrágicas, aumento na incapacidade e diminuição na qualidade de vida (WITMER e YOUNG, 2013). O inibidor é uma Imunoglobulina (IgG4), com alta afinidade policlonal, dirigida contra a proteína do FVIII, dirigidos primariamente contra os domínios A2, A3 e C2 (WHITE et al, 2001).

O poder de um inibidor é medido pela sua capacidade em neutralizar a atividade do FVIII *in vitro*, por método coagulométrico e expresso em Unidades Bethesda/mL de plasma. Por definição, uma Unidade Bethesda (UB) corresponde a quantidade de anticorpos circulantes capazes de inativar 50% do FVIII ou FIX existente em 1 mL de plasma normal. Deve-se considerar de baixa resposta os inibidores que mantêm níveis persistentemente ≤ 5 UB/mL, apesar de constante estímulo com o fator deficiente. O termo inibidor de alta resposta deve ser utilizado para aqueles casos em que a atividade inibitória seja > 5 UB/mL, em qualquer momento da existência do inibidor. Esta classificação é importante, pois determina a adoção de condutas diferentes no tratamento de hemorragias nos pacientes com inibidores (BRASIL, 2012). Atualmente, o método mais indicado para diagnosticar e quantificar o inibidor é o Bethesda modificado por Nijmegen. Clinicamente, suspeita-se da presença de inibidor quando um paciente, na vigência de sangramento, não responde à terapia de reposição de FVIII. Por isso, muitos serviços fazem rotineiramente, a intervalos regulares, a pesquisa de inibidor, que deve ser realizada também antes de procedimentos cirúrgicos ou invasivos (ASTERMARK, 2015).

Vários fatores podem contribuir para o aparecimento dos inibidores: gravidade da hemofilia, história familiar de inibidor, tipo de mutação, entre outros. Em geral, pacientes com defeitos moleculares graves, que não produzem a proteína do FVIII, como nas grandes deleções, mutações *nonsense* e inversão do íntron 22 tem prevalência 7-10 vezes maior de inibidores do que pacientes com mutações *missense*, *splice site* ou pequenas deleções, em que, apesar de haver perda na função, não há ausência total da proteína do FVIII. No primeiro caso, a prevalência de inibidores é maior que 30%, enquanto que no segundo caso, essa prevalência é inferior a 10% (OLDENBURG; EL-MAARI; SCHWAAB, 2002).

Dados do HAMSTeRS data base (Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site) revelaram que pacientes com grandes deleções, afetando mais que um domínio da proteína do FVIII, são os de maior risco para desenvolver inibidor (cerca de 75%). Por outro lado, polimorfismos no sistema imune afetando *IL-10*, *TNF α* e *CTLA-4* também contribuem para o desenvolvimento de inibidor, principalmente na presença de processo inflamatório (KARIM e JAMAL, 2013; OLDENBURG; EL-MAARRI; SCHWAAB, 2002).

No caso da Hemofilia A leve, alguns tipos de mutação estão particularmente associados ao desenvolvimento de inibidor, em particular as mutações com sentido trocado nos domínios A1–A2 (entre os resíduos 482–501) e na junção C1–C2 do fator VIII. Essas mutações poderiam alterar a imunogenicidade da proteína do FVIII, levando a uma resposta inibitória contra o epítipo mutado. As mutações que se encontram mais comumente associadas ao desenvolvimento de inibidor em hemofilia A leve/moderada são Arg593Cys, Arg2150His e Trp2229Cys. Mutações em outros genes, tal como no gene da *IL-10* e polimorfismos de HLA, parecem se associar ao desenvolvimento de inibidores (ASTERMARK, 2015; BRASIL, 2008; KARIM e JAMAL, 2012; OLDENBURG; EL-MAARRI; SCHWAAB, 2002).

Fatores étnicos ou raciais também parecem influenciar o desenvolvimento de inibidores, pois pacientes com ancestrais Africanos ou Latinos estão sob maior risco. No caso de descendentes de Africanos, o risco é 2-3 vezes maior (ASTERMARK, 2015; DUNN e ABSHIRE, 2004).

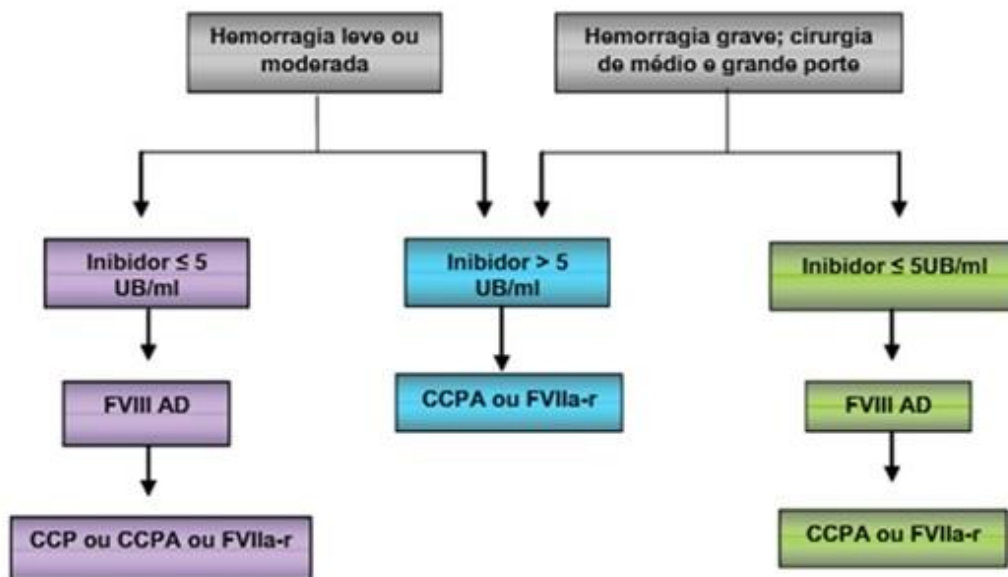
Por tudo isso, o tratamento de hemofílicos com inibidor ainda é considerado um desafio. Em uma análise multivariada, foi observado que a probabilidade de morte era

70% maior em pacientes com inibidor comparada com aqueles sem inibidor. Em um estudo avaliando as causas de morte entre hemofílicos nos EUA, foi verificado que os óbitos em pacientes com inibidor são muito mais relacionados a complicações de sangramentos do que em pacientes sem inibidor (42 vs. 12%, $P < 0.0001$). A conclusão foi que pacientes com Hemofilia A grave e inibidor tem risco aumentado de morte (WALCH; SOUCIE; MILLER, 2015).

O tratamento dos episódios hemorrágicos vai depender do título do inibidor: pacientes com baixo título devem ser tratados com concentrado de FVIII em altas doses: 50–100UI/kg/dose a cada 12–24 horas, na dependência da gravidade do sangramento. Os de alto título devem receber agentes *bypassing*, produtos que podem estimular a formação de um coágulo e parar a hemorragia, superando o requerimento do FVIII. Esses produtos agem em um ponto distante na cascata da coagulação, fazendo um *bypass*, ou seja, uma “ponte” através do “defeito” gerado pelo inibidor. Os dois principais agentes *bypassing* atualmente disponíveis são o concentrado de complexo protrombínico ativado (CCPA) e o FVII ativado recombinante (rFVIIa). O CCPA sofre algum grau de ativação durante sua industrialização e contém altos níveis dos fatores II, VII, X ativados e traços de fator VIII. A dose recomendada de CCPA é de 75 a 100UI/kg/dia, uma vez ao dia ou a cada 12 horas, não devendo a dose diária máxima ultrapassar 200UI/kg/dia (BRASIL, 2008; MAKRIS et al, 2012; OLDENBURG; EL-MAARRI; SCHWAAB, 2002).

O Fator VII ativado (rFVIIa-r) é produzido através de tecnologia recombinante de DNA em culturas de células renais de crias de *hamsters*. Seu mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido, podendo o mesmo atuar de forma dependente do fator tissular ou agir diretamente no local do dano tissular através de sua ligação a plaquetas ativadas. A maioria dos autores recomenda uma dose-padrão de 90 μ g/kg ou 4,5KUI/kg, em bolo endovenoso, podendo ser aumentada até 120 μ g/kg ou 6,0KUI/kg. Este produto tem um curto tempo de ação e múltiplas doses são necessárias a cada 2-4 horas para controlar a hemorragia. Estes agentes demonstraram ter o mesmo nível de eficácia quando usados para tratar sangramentos articulares moderados ou leves (BRASIL, 2008; MAKRIS et al, 2012).

O esquema de tratamento para hemofílicos A com inibidor está representado na figura 6.



Abreviaturas: FVIII AD- concentrado de FVIII em altas doses; CCPA: concentrado de complexo protrombínico ativado; FVIIa-r: concentrado de FVII ativado recombinante; CCP: concentrado de complexo protrombínico.

Figura 6. Tratamento de pacientes com Hemofilia A e Inibidores

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde, 2005

A relativa imunogenicidade dos produtos de FVIII recombinante comparados com os produtos derivados de plasma tem sido fonte de muito debate. Os dados publicados pelo grupo RODIN (Research Of Determinants of INhibitor Development among PUPs with haemophilia) em estudo prospectivo em 574 hemofílicos A não tratados previamente, não mostrou maior imunogenicidade dos produtos recombinantes em relação aos derivados de plasma (GOUW et al, 2013). O mesmo resultado foi observado por Josephson (2013).

No entanto, nenhum destes produtos tem a mesma eficácia que o FVIII para cessar o sangramento. A erradicação do inibidor é a terapia ideal, sendo a Indução da Imunotolerância (ITI) a mais difundida. Esta terapia imune consiste na erradicação do inibidor pela exposição recorrente e regular ao FVIII. Apesar da controvérsia quanto à dose, intervalo e produto a ser utilizado, os dados do Registro Americano relatam um percentual de 70% de sucesso na erradicação dos inibidores (DIMICHELI e KRONER, 2002).

Existem dois regimes de indução de Imunotolerância: O regime de altas doses utiliza 100-200UI/Kg/dia enquanto o regime de baixas doses utiliza 50UI/Kg, 3

vezes/semana. Os dois regimes são efetivos, porém foi observado um maior número de episódios hemorrágicos no regime de baixas doses (HAY e DIMICHELI, 2012).

Alguns grupos têm relatado o tratamento de pacientes com altos títulos de inibidor e não responsivos a ITI utilizando métodos extracorpóreos de retirada de anticorpos, como plasmaférese e aloadsorção. Além destes tratamentos considerados convencionais, nos últimos anos surgiu a possibilidade de tratamento dos pacientes através de depleção de linfócitos B. Este tratamento foi primeiramente recomendado para pacientes com estágio III-IV de linfoma folicular quimiorresistentes, mas, principalmente em países desenvolvidos, tem sido utilizado para o tratamento de pacientes com hemofilia A e inibidores de FVIII. A metodologia consiste em infusões intravenosas de rituximab (anticorpos monoclonais anti-CD20) que se liga às células B e iniciam um processo de lise celular (via sistema do complemento ou apoptose) (CHAVES e RODRIGUES, 2009; DUNN e ABSHIRE, 2004).

1.9 O estado de portadora do gene

A portadora de hemofilia é a mulher que possui um cromossomo X anormal, que carrega o gene da hemofilia. Um dos seus cromossomos X tem a mutação do gene do Fator VIII, acarretando assim uma produção diminuída do FVIII. As portadoras normalmente não apresentam sintomas da hemofilia, porque apesar de um cromossoma ser alterado o outro cromossomo X produz quantidades normais de FVIII. Entretanto, algumas portadoras apresentam sintomas hemorrágicos, em graus variáveis, que podem interferir na sua qualidade de vida (MAKRIS et al, 2012; WFH, 2015).

Enquanto existe uma enorme quantidade de informação sobre sangramento nos homens com hemofilia, poucos estudos tem o foco no sangramento das portadoras sintomáticas. Plug e colaboradores (2006) relataram um estudo comparativo com 274 portadoras de hemofilia A ou B e 245 não portadoras. Os resultados mostraram que as portadoras têm risco duas vezes maior de sangramento após pequenos traumas, risco três vezes maior de sangramento prolongado após avulsão dentária. Mais ainda, eles relataram que 8% das portadoras apresentaram hemorragia após procedimentos cirúrgicos e 3% destas necessitaram transfusão de sangue após amigdalectomia, o que não aconteceu com as não portadoras. O risco de sangramento era maior quanto menor o nível de fator da coagulação.

Cerca de 20% das portadoras tem o nível de FVIII abaixo de 40%, devido à lyonização. Estas portadoras têm sintomas hemorrágicos semelhantes à hemofilia leve, mas raramente podem ter sintomas semelhantes à hemofilia grave e são chamadas de portadoras sintomáticas de hemofilia (PEAKE et al, 1993).

Este diagnóstico é importante no caso de procedimentos cirúrgicos e parto, pois pode haver hemorragia de difícil controle nessas ocasiões, colocando em risco a saúde e a vida da portadora.

O nível esperado de fator de coagulação em uma portadora é igual a 50% da concentração encontrada na população saudável (MAKRIS et al, 2012).

A lyonização ou inativação do cromossomo X acontece no início do desenvolvimento da fase embrionária. Quando o embrião ainda está composto de poucas células, um dos cromossomos X dentro de cada célula é inativado, em um processo totalmente randômico (PEAKE et al, 1993; WFH, 2015).

Normalmente, cerca de 50% dos cromossomos X são desativados, mas, em alguns casos, mais cromossomos carregando a mutação da hemofilia serão desativados e, em outros casos, a maioria dos cromossomos “saudáveis” será desativado, causando maior tendência a sangramentos (WFH, 2015). A consequência principal é que nas mulheres se observa um verdadeiro mosaico de cromossomos X afetados e não afetados sendo expressos (PEAKE et al, 1993).

Clinicamente, podemos dizer que uma mulher é portadora obrigatória quando seu pai é hemofílico; se ela tem parentes do lado materno com hemofilia e um filho afetado; se ela tem mais de um filho afetado ou se ela tem um filho afetado e sua irmã também tem um filho afetado. Uma possível portadora é suspeitada quando tem parentes do lado materno com hemofilia, mas não tem filhos afetados ou, quando tem um filho afetado, sem parentes com hemofilia (MAUSER-BUNSCHOTEN, 2008).

É extremamente importante diagnosticar o estado de portadora. Particularmente em mulheres em idade fértil, permite que a mesma possa participar e decidir sobre o planejamento de sua família.

Além disso, o diagnóstico molecular das hemofilias permite estruturar um programa de aconselhamento genético/orientação familiar que permite determinar com precisão a condição genética da doença (hereditária ou esporádica). Os dados advindos dessa determinação disponibilizam potenciais informações quanto às características da doença, riscos de recorrência, modalidades de transmissão genética, arsenal diagnóstico

pré e pós-natal, assim como suporte psicológico e emocional (MAUSER-BUNSCHOTEN, 2008; TAGARIELLO et al, 2000).

O diagnóstico das portadoras tem importância prática no diagnóstico pré-natal em países onde o abortamento de indivíduos afetados por doenças graves é legal. Esta situação não é permitida no Brasil, tornando seu uso limitado para esta indicação.

Por último, o diagnóstico das portadoras é fundamental para o aconselhamento genético. Especialmente em casos esporádicos, sem história familiar prévia da doença, somente o conhecimento da mutação associada pode reconhecer a condição de portadora e prever o risco de recorrência da doença na futura prole (CASTRO et al, 2014; TAGARIELLO et al, 2000; WFH, 2015).

Em países desenvolvidos, o teste é ofertado a todos os pacientes com hemofilia ao diagnóstico, embora não seja ainda de rotina no Brasil. Vários métodos podem ser utilizados para esta detecção:

1- Dosagem do FVIII coagulante- é um método que mede a quantidade de FVIII no sangue. Este método é insatisfatório, pois não detecta todas as portadoras, uma vez que a maioria tem níveis de FVIII dentro dos parâmetros normais, acima de 40%. Outros fatores, como influência hormonal, uso de contraceptivos, estresse, infecções e exercícios físicos, dentre outros, podem interferir na dosagem do FVIII (SOARES; CHAMONE; BYDLOWSKI, 2001).

2- Testes Genéticos- estes testes podem identificar a exata mutação no gene *F8* em 90 a 99% das portadoras, podendo ser usado também no diagnóstico pré-natal, para determinar se o feto é portador da mutação genética, quando o pai é hemofílico ou a mãe é portadora obrigatória. Mulheres que tem um membro da família com diagnóstico de hemofilia também devem ser testadas para o estado de portadora do gene, para permitir o aconselhamento genético, porém raramente os testes genéticos estão disponíveis nos centros de tratamento de hemofilia (SOARES; CHAMONE; BYDLOWSKI, 2001; WFH, 2015).

2.1-Análise da Mutação- neste caso o laboratório procura pela alteração no gene *F8* primeiramente no homem afetado pela doença; reconhecida a mutação, o teste pode ser realizado nas possíveis portadoras. Inicialmente procura-se pela inversão no íntron 22, já que esta mutação é responsável por aproximadamente 40% casos de hemofilia A grave. Se esta mutação não estiver presente, outras alterações no gene serão estudadas. Este tipo de estudo tem alguns complicadores, como o fato do gene *F8* ser grande (186 Kb), com uma organização genômica complexa (26 éxons com tamanho variando de 50 pb a 3,2

Kb) e uma grande heterogeneidade de mutações descritas (NORDIC HEMOPHILIA COUNCIL, 2015).

2.2-Detecção Indireta da Mutação- pode ser feita por análise de ligação empregando marcadores polimórficos localizados próximos ao gene, pelo reconhecimento de desequilíbrio de ligação de microsátélites. O método é baseado na análise dos polimorfismos do DNA associado ao *F8*. Estes Polimorfismos genéticos representam uma variação natural da sequência do genoma, que ocorre na população em geral, e que pode ser convenientemente utilizado como marcador para rastrear genes mutantes dentro das famílias. Os marcadores utilizados são aqueles situados próximos ao gene ou dentro dos íntrons (ex: *BclI* intragênico, microsátélite intragênico IVS13 (CA) n e microsátélite extragênico P39(CA) n (JAYANDHARAN et al, 2005; KLEIN et al, 2001; TAGARIELLO et al, 2000). Em seguida, o heredograma é analisado para distinguir qual é o haplótipo que acompanha a mutação.

2. APLICABILIDADE

Atualmente o HEMOPA tem em seu cadastro 346 pacientes diagnosticados clinicamente como hemofílicos A. Levando em consideração que as famílias do estado do Pará têm em média quatro filhos, sendo dois homens e duas mulheres, é possível estimar que existam cerca de 690 mulheres possíveis portadoras de mutações que levam à hemofilia A nessas famílias.

Se levarmos em consideração a possibilidade de transmissão mãe/filha do alelo mutante da hemofilia A, este número pode ser ainda maior.

A identificação de mulheres heterozigotas (portadoras) para o gene da hemofilia A é importante tanto do ponto de vista clínico como social.

Clinicamente, os hemofílicos convivem diariamente com a possibilidade de sangramentos graves, que podem levar a deformidades articulares, muitas vezes com ameaça à vida, além de dores e limitações funcionais.

A identificação das portadoras permite o diagnóstico precoce, instituição de tratamento profilático ainda nos primeiros anos de vida, evitando ou minimizando as complicações articulares e incapacitações físicas.

Do ponto de vista emocional, muitas mulheres demonstram grande preocupação com a possibilidade de transmitir a doença a sua prole, existindo grande sentimento de culpa nas mães dos pacientes afetados, especialmente logo após o diagnóstico (MYRIN-WESTESSON; BAGHAEI; FRIBERG, 2013). Valores morais, culturais e religiosos na sociedade impõem stress adicional aos pais, que podem se sentir pressionados pela possibilidade de conceberem uma criança afetada com uma patologia com grande morbidade (PEAKE et al, 1993).

No Estado do Pará, não é realizada a identificação das portadoras, assim como não é feito o aconselhamento genético das mulheres que são portadoras obrigatórias e nem das possíveis portadoras. Essa identificação também não é realizada regularmente na maioria dos Centros de Tratamento de Hemofilia (CTH) do Brasil.

Identificar com acurácia mulheres portadoras sem identificar a própria mutação que afeta o gene é um desafio constante.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Neste trabalho pretende-se criar metodologia necessária para identificação molecular de alterações no gene *F8* de pacientes e portadoras da hemofilia A a partir da análise dos pacientes diagnosticados e de seus parentes consanguíneos.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer protocolo de investigação molecular para o gene *F8*.
- Analisar a viabilidade da utilização de microsátélites para a investigação indireta das portadoras.
- Aplicar o protocolo estabelecido em uma população controle para estimar a diferenciação entre indivíduos.
- Identificar as prováveis portadoras do gene da hemofilia A entre parentes de hemofílicos cadastrados no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará - HEMOPA.
- Verificar a existência, ou não, de padrão de haplótipo nos pacientes com hemofilia A e pesquisa de inibidor do Fator VIII positiva.
- Propor um protocolo de acompanhamento e tratamento das portadoras.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 ESCOLHA DOS MARCADORES

No presente trabalho, os marcadores selecionados foram os denominados de STRs (Short Tandem Repeats- pequenas sequências de DNA repetidas em série). Os marcadores STRs tem um número elevado de alelos, o que permite ter um maior poder de discriminação entre diferentes indivíduos. Eles são especialmente empregados quando o objetivo do trabalho é o de discriminar diferentes indivíduos de uma população e são comumente empregados em testes de Investigação de Paternidade e testes de identificação pessoal com objetivos forenses.

Inicialmente, foram selecionados cinco diferentes STRs localizados dentro do gene *F8* (GAA1N21, GT1N24) e na região 3' do referido gene (CTT3, TAAA2 e TTTA3). No entanto, os STRs GAA1N21, GT1N24 não foram validados para o presente estudo. Esses dois marcadores foram substituídos por outros três STRs, localizados em regiões um pouco mais distantes do gene investigado, e amplamente utilizados em estudos do cromossomo X, visando aumentar o poder de discriminação do haplótipo: DXS 10011, DXS 7423, GATA31E08. (RODRIGUES et al, 2008). Um esquema da localização física destes marcadores está apresentado na figura 7.

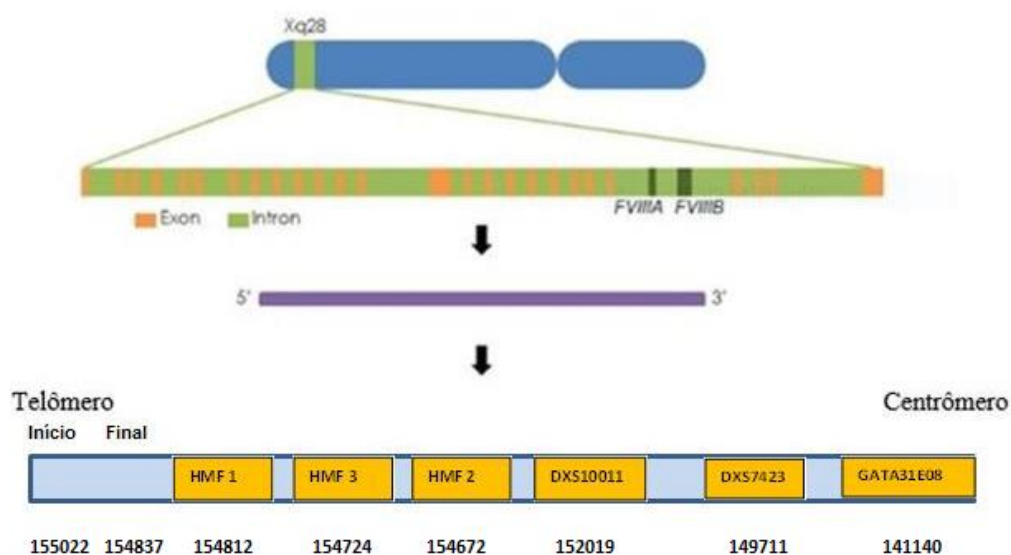


Figura 7 – Representação esquemática da localização dos seis STRs no cromossomo X

Fonte: Adaptado de Synapse Koreamed (www.synapse.koreamed.org)

Em termos mais práticos, os marcadores foram renomeados da seguinte maneira: os marcadores CTT3 como HMF-01, TAAA3 como HMF-03 e TTTA3 como HMF-02.

A maior distância entre dois marcadores contíguos (DXS 7423 e GATA31E08) é de 8.57 Kb (Kilobases) e a menor distância (CTT3 e TAAA3) é de 52 Kb. A distância entre os dois marcadores extremos é de 13.673 Kb (TTTA3 e GATA 31E08).

Todos os marcadores escolhidos têm elevada variabilidade. A heterozigosidade média destes marcadores é da ordem de 70% (0.7). Isto significa que a chance de se encontrar dois indivíduos do sexo masculino (não aparentados) na população com o mesmo haplótipo é menor do que 1% e que a chance de encontrar duas mulheres com o mesmo genótipo é menor do que 0,0001. Dos dados levantados é possível inferir que a variabilidade desses marcadores permitirá identificar com segurança as mulheres heterozigotas para a mutação, entre as parentas de afetados.

4.1.2 SELEÇÃO DOS PRIMERS

Após a seleção dos marcadores foram desenhados os *primers* aqui empregados, utilizando o programa Primer3 (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) de forma a garantir a amplificação conjunta dos seis marcadores, em uma única temperatura de anelamento de 60°C. Este programa permite selecionar temperaturas de anelamento específicas, o comprimento dos iniciadores, o conteúdo de GC (Guanina e Citosina) e o tamanho dos produtos de amplificação.

Após a escolha dos primers, foi empregado o software Autodimer (Vallone & Butler, 2004), para testar sobre as possibilidades de formação de estruturas secundárias ou dímeros entre os *primers* selecionados.

Para verificar a possível ocorrência de anelamento inespecífico em outras regiões do genoma humano o conjunto de *primers* foi testado no programa BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).

Para otimização da PCR multiplex, moléculas fluorescentes (6FAM, HEX e NED) foram inseridas na posição 5' em um dos primers de cada marcador selecionado, nas cores azul, verde e amarelo, respectivamente. Depois dessa criteriosa seleção foram escolhidas as sequências de primers descritas no quadro 4.

No quadro abaixo, estão apresentados os dados dos marcadores que serão investigados. Os dados incluem as sequências dos primers, a localização dos marcadores no cromossomo X e o tamanho da sequência amplificada para cada marcador.

Quadro 4 - Polimorfismos estudados com Primers utilizados e posição no cromossomo X

Polimorfismo	Primer	Posição
CTT3 (Hemofilia 1)	5'GCTCCTTTGATTGGATAATTTCA3' 5'ATTCCTCAACATCAGAATAGACC3'	154.672.188= 267pb
TAAA3 (Hemofilia 3)	5'CAGTATGTGGAGGTTGCAGTTAG3' 5'GTTTCCCAAGGCAAGTGATG3'	154.724.268= 181pb
TTTA3 (Hemofilia 2)	5'GTCATGTGAGTAGAGGGATGACT3' 5'GGCAAATCTCCCTCCCATTCTA3'	154.812.788= 186 pb
DXS10011	5'AGAGGTATGCTGGAGAATTGCC3' 5'TCCCAGCTACTTGGGAGACTAA3'	152.019.628= 369 pb
DXS 7423	5'GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC3' 5'TAGCTTAGCGCCTGGCACATA3'	149.711.040= 210 pb
GATA31E08	5'GCAAGGGGAGAAGGCTAGAA3' 5'TCAGCTGACAGAGCACAGAGA3'	141.140.068= 230 pb

4.2 Métodos

4.2.1 CASUÍSTICA

Foram selecionadas 35 famílias de pacientes com diagnóstico de hemofilia A acompanhados no ambulatório de hematologia da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (Fundação HEMOPA). Os critérios de inclusão selecionavam:

- a) Pacientes com Hemofilia A, com dosagem de Fator VIII inferior a 40% (dosagem efetuada pelo método coagulométrico);
- b) Mãe e parentes do sexo feminino do lado materno.

Nove mães não compareceram para a coleta, sendo os pacientes retirados do estudo.

O estudo familiar compreendeu 63 indivíduos provenientes de 26 famílias de pacientes com hemofilia A. Destas, dezenove famílias eram compostas pelo afetado e sua mãe, sendo que em duas famílias haviam dois afetados; cinco famílias eram formadas pelo afetado, sua mãe e parentes consanguíneos do lado materno; duas famílias eram compostas apenas de pacientes e filhas.

Como controle da população de Belém, foram utilizadas neste trabalho amostras de DNA de 110 indivíduos do sexo masculino, sendo que todas fazem parte do banco de dados de amostras do Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) da Universidade Federal do Pará.

4.2.2 EXTRAÇÃO DO DNA

Em todas as amostras da presente investigação (63 amostras da casuística e 110 amostras controle de Belém), o DNA foi extraído pelo método convencional com fenol-clorofórmio, segundo Sambrook *et al.* (1989). Após a extração do DNA, as amostras foram quantificadas no equipamento NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies – USA).

4.2.3 OTIMIZAÇÃO DA PCR MULTIPLEX

Cada marcador aqui investigado foi amplificado inicialmente de forma isolada, para testar a especificidade do primer escolhido. Nesta PCR foram utilizados os seguintes produtos: 5 µL de QIAGEN® Multiplex PCR Kit; 1 µL de Q-solution; 1 µL de mix de *primers* (Forward + Reverse - 2 µM cada *primer*); 1 µL de DNA (5 a 10 nanogramas) e 2 µL de água. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti-96

Well Thermal Cycler (Life Technologies, CA, USA) nas seguintes condições de ciclagem:

Denaturação inicial - 95° C por 15 min

Denaturação - 94° C por 30 segundos

Anelamento - 60° C por 90 segundos

Extensão - 72° C por 60 segundos

Extensão final - 72° C for 30 min

O produto amplificado foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%. Após constatação de que cada par de *primer* está amplificando perfeitamente foram realizados testes para amplificação conjunta dos seis marcadores escolhidos. Nesta etapa foi identificada a concentração ideal de cada par de *primer* para o melhor desempenho do sistema, (estas concentrações estão apresentadas na tabela 6), que revela a quantidade de primer necessária para formar a solução de uso a 10 µM. Para cada reação de PCR foram empregados 1µL da solução de uso, conforme descrito a seguir.

Tabela 6 - Mix de Primer

Primer	<i>Forward</i> µL	<i>Reverse</i> µL
HEMF 1	19,2	19,2
HEMF 2	14,4	14,4
HEMF 3	14,4	14,4
DXS 10011	48	48
DXS 7423	7,2	7,2
GATA 31E08	9,6	9,6
TOTAL 225,6 µL		

Para a realização da PCR multiplex o volume de cada reagente foi o mesmo descrito para a PCR individual. No entanto, as condições de ciclagem foram modificadas, como apresentado abaixo:

Denaturação inicial - 95° C por 15 minutos

Denaturação - 94° C por 30 segundos

Anelamento - 60° C por 90 segundos

Extensão - 72° C por 60 segundos

Denaturação - 94° C por 30 segundos

Anelamento - 58° C por 90 segundos

Extensão - 72° C por 60 segundos

Extensão final - 72° C por 60 minutos.

4.2.4 DETECÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR MULTIPLEX

Os produtos da PCR multiplex foram separados e analisados por meio de eletroforese capilar, no instrumento ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Para a identificação dos produtos amplificados foi utilizada a matriz de filtro virtual G5, que é específica para a identificação dos fluoróforos 6FAM (azul), HEX (verde), NED (amarelo) e LIZ (laranja), que foram utilizados na marcação dos *primers*. Para a eletroforese capilar as amostras foram preparadas com 8,7 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), 0,3 µL GS-500 LIX como padrão de peso molecular e 1,0 µL do produto de PCR.

Após a eletroforese capilar as amostras foram analisadas no software GeneMapper®3.7 (Applied Biosystems). Este programa calcula o tamanho dos alelos com base no algoritmo determinado pelo padrão de peso molecular LIZ 500. A seguir apresentamos o Eletroferograma de uma amostra investigada no presente trabalho, de forma a comprovar a excelência dos resultados obtidos na genotipagem da amostra (Figura 8).

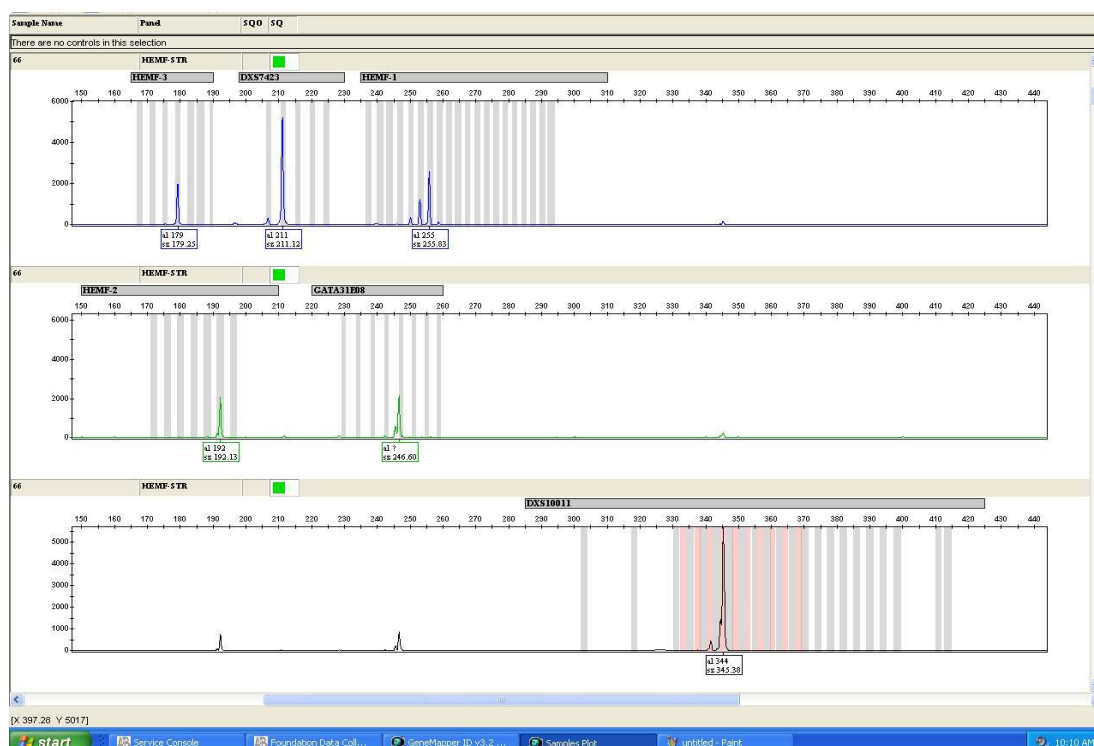


Figura 8 - Eletroferograma dos seis marcadores em uma amostra estudada

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Frequências alélicas dos polimorfismos investigados

Foram investigados seis marcadores do tipo STR (descritos anteriormente) em uma amostra de 110 indivíduos na população de Belém, que foram utilizadas como grupo controle e geraram uma base de dados para ser comparada com as famílias de afetados. Os dados foram gerados de forma a permitir calcular probabilidades de compartilhamento dos mesmos haplótipos entre indivíduos não aparentados. Esta base de dados é essencial para identificar a probabilidade de compartilhamento de haplótipos entre parentes do afetado, em relação à probabilidade de compartilhamento entre indivíduos da população de Belém. Esta relação pode demonstrar uma estimativa confiável do poder real de identificar mulheres portadoras da mutação, entre parentes dos afetados.

A seguir, foi descrita a variabilidade de cada marcador investigado entre os 110 indivíduos tomados como controles da população de Belém, tendo como referência o estudo de Ribeiro-Rodrigues et al (2011).

5.1.1 HMF-01

O marcador HMF-01 corresponde a um trinucleotídeos cuja unidade de repetição é CTT. Entre os indivíduos analisados, 19 diferentes alelos foram identificados, nenhum deles com frequência maior do que 10%. Quatro alelos apresentam as frequências mais elevadas (9,1%): alelo de 261 pares de bases nucleotídicas (261 pb, correspondente a 59 repetições); alelo 267pb; alelo 270pb; e alelo 276pb. Estes dados foram empregados para calcular parâmetros estatísticos sobre o poder deste marcador de diferenciar (ou identificar) pessoas. Todos os parâmetros estatísticos calculados para este (e para todos os outros marcadores) estão apresentados na Tabela 7.

Os parâmetros estatísticos analisados foram os seguintes: i) Poder de Discriminação entre Mulheres (PDM) que mede a possibilidade que duas mulheres quaisquer da população investigada (no caso, a população de Belém) tenham o mesmo genótipo; ii) Poder de Discriminação ente Homens (PDH) que estima a possibilidade de que dois homens quaisquer da população investigada tenham o mesmo alelo; iii) Poder de Exclusão do Trio (PDT) que estima a possibilidade daquele marcador investigado tem de excluir a paternidade de qualquer indivíduo, em relação a qualquer criança do sexo feminino (ou adulto) da população; iv) *Locus Diversity* (LD) que corresponde a heterozigiosidade média da população, em relação àquele marcador investigado.

No que se refere ao marcador HEMF-01 foi possível estimar que a chance que duas mulheres quaisquer da população tenham genótipos diferentes (PDM) corresponde a 99,18% (ou seja, a chance que tenham genótipos iguais é de 0,82%); que a chance de que dois homens quaisquer da população tenham alelos diferentes (PDH) é de 93,44% (ou seja, a chance que dois homens tenham o mesmo alelo é de 6,56%); que apenas este marcador poderia excluir uma falsa acusação de paternidade em 58% dos casos; e que a heterozigosidade observada deste marcador é elevada (próximo de 94%).

Tabela 7 - Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador HMF-01

Marcador	Alelo	Frequência	Desvio Padrão
HMF 01	237	0,009	0,009091
	240	0,018	0,012797
	243	0,054	0,021751
	246	0,045	0,019951
	249	0,036	0,01793
	252	0,045	0,019951
	255	0,045	0,019951
	258	0,027	0,015601
	261	0,091	0,027536
	264	0,064	0,023381
	267	0,091	0,027536
	270	0,091	0,027536
	273	0,082	0,026253
	276	0,091	0,027536
	279	0,045	0,019951
	282	0,055	0,021751
	285	0,055	0,021751
291	0,045	0,019951	
294	0,009	0,009091	

5.1.2 HMF-03

O marcador HMF-03 corresponde a um tetranucleotídeos cuja unidade de repetição é AAAT. Entre os indivíduos analisados foram identificados apenas cinco diferentes alelos na população de Belém. Um dos alelos encontrados, o alelo 179, correspondente a 11 repetições AAAT, tem frequência muito elevada (87,3%) sendo a frequência dos demais alelos reduzida (menor do que 5%).

No que se refere aos parâmetros estatísticos é possível identificar que este marcador apresenta os menores valores médios de estimativas (o menor poder de discriminação entre indivíduos), em relação aos demais marcadores: i) o Poder de Discriminação entre Mulheres (PDM) deste marcador é da ordem de 40,5%; o Poder de Discriminação entre Homens (PDH) é de 23,4%; O poder de excluir uma falsa acusação de paternidade deste marcador é de 13,2%; e que a Heterozigosidade Média deste marcador é de apenas 23,4%.

A Tabela 8 mostra os alelos identificados para este marcador, com as frequências e desvio padrão de cada um deles.

Tabela 8 - Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador HMF-03

Marcador	Alelo	Frequência	Desvio Padrão
HMF-03	167	0,01	0,01
	171	0,027	0,015
	175	0,045	0,019
	179	0,873	0,032
	183	0,045	0,019

5.1.3 HMF-02

O marcador HMF02 corresponde a um tetranucleotídeos cuja unidade de repetição é TTTA. Entre os indivíduos analisados, sete diferentes alelos foram identificados na população de Belém. Um dos alelos encontrados, o alelo 176, correspondente a seis repetições TTTA, tem frequência muito elevada (52,7%). Interessantemente, a distribuição das frequências dos alelos é bimodal, com valores elevados de frequência do alelo 176 e do alelo 188, que tem frequência de 21,8%.

Tabela 9 - Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador HMF-02

Marcador	Alelo	Frequência	Desvio Padrão
HMF-02	172	0,054	0,021751
	176	0,527	0,04782
	180	0,036	0,01793
	184	0,082	0,026253
	188	0,218	0,039559
	192	0,073	0,024874
	196	0,009	0,009091

No que se refere aos parâmetros estatísticos é possível identificar que este marcador apresenta valores médios de estimativas, em relação aos demais marcadores: i) o Poder de Discriminação entre Mulheres (PDM) deste marcador é da ordem de 84,6%; o Poder de Discriminação entre Homens (PDH) é de 65,8%; O poder de excluir uma falsa acusação de paternidade deste marcador é de 62%; e que a Heterozigosidade Média deste marcador é de 66%.

5.1.4 DXS10011

O marcador DXS10011 corresponde a um STR dito complexo, pois se apresenta como um marcador que tem repetições tetranucleotídicas (GAAA) combinadas com um evento de inserção ou deleção de um dinucleotídeo, durante a evolução humana. Este fato gera um número elevado de alelos que podem variar seguindo diferenças alélicas de quatro ou dois pares de nucleotídeos. Este tipo de variação deu origem a um número muito elevado de alelos em todas as populações do mundo, inclusive na cidade de Belém (RIBEIRO RODRIGUES et al, 2008; www.chrx-str.org). No presente trabalho, foram identificados 26 alelos diferentes entre os 110 indivíduos analisados, nenhum deles com frequência maior do que 10%. Quatro alelos apresentam as maiores frequências alélicas: alelo 370 e alelo 378 com frequências de 9,1%; e alelos 348 e 374, ambos com frequências de 8,2%.

No que se refere aos parâmetros estatísticos é possível identificar que este marcador apresenta as maiores estimativas, em relação aos demais marcadores: i) o Poder de Discriminação entre Mulheres (PDM) deste marcador é da ordem de 99,5%; o Poder de Discriminação entre Homens (PDH) é de 94,8%; O poder de excluir uma falsa acusação de paternidade deste marcador é de 94,6%; e que a Heterozigosidade Média deste marcador é de 95,2%.

Tabela 10 - Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador DXS10011

Marcador	Alelo	Frequência	Desvio Padrão
DXS 10011	330	0,036	0,0361
	334	0,027	0,015601
	336	0,009	0,009091
	338	0,064	0,023381
	340	0,018	0,012797
	342	0,018	0,012797
	344	0,027	0,015601

Marcador	Alelo	Frequência	Desvio Padrão
DXS 10011	346	0,045	0,019951
	348	0,082	0,026253
	350	0,27	0,015601
	352	0,036	0,01793
	354	0,036	0,01793
	356	0,018	0,012797
	358	0,045	0,019951
	360	0,018	0,012797
	362	0,045	0,019951
	366	0,036	0,01793
	370	0,091	0,027536
	374	0,082	0,026253
	378	0,091	0,027536
	382	0,027	0,015601
	386	0,018	0,012797
	390	0,027	0,015601
	394	0,027	0,015601
	398	0,018	0,012797
410	0,009	0,009091	

5.1.5 DXS7423

O marcador DXS7423 corresponde a um tetranucleotídeos cuja unidade de repetição é GGAT. Entre os indivíduos analisados, cinco diferentes alelos foram identificados na população de Belém. Um dos alelos encontrados, o alelo 215, correspondente a 22 repetições GGAT, tem a frequência mais elevada (47,2%), seguido do alelo 211 (frequência de 34,5%). Os demais alelos tem frequência reduzida.

Tabela 11 - Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador DXS7423

Marcador	Alelo	Frequência	Desvio Padrão
DXS 7423	207	0,018	0,0128
	211	0,345	0,04555
	215	0,472	0,04776
	219	0,1	0,02874
	223	0,063	0,02338

No que se refere aos parâmetros estatísticos é possível identificar que este marcador apresenta valores relativamente reduzidos de estimativas (é o segundo menor poder de discriminação entre indivíduos): i) o Poder de Discriminação entre Mulheres

(PDM) deste marcador é da ordem de 81%; o Poder de Discriminação entre Homens (PDH) é de 64,3%; O poder de excluir uma falsa acusação de paternidade deste marcador é de 58%; e que a Heterozigosidade Média deste marcador é de 64,5%.

5.1.6 GATA31E08

O marcador GATA31E08 corresponde a um tetranucleotídeos cuja unidade de repetição é GATA. Entre os indivíduos analisados, oito diferentes alelos foram identificados na população de Belém. Um dos alelos encontrados, o alelo 251, correspondente a 12 repetições GATA, tem a frequência mais elevada (23,6%) e apenas dois alelos tem frequência reduzida: alelo 231 com frequência de 2% e alelo 259 com frequência de 1%.

Tabela 12 - Frequência e Desvio Padrão de cada alelo do marcador GATA31E08

Marcador	Alelo	Frequência	Desvio Padrão
GATA 31E08	231	0,02	0,0128
	235	0,136	0,0328
	239	0,109	0,0298
	243	0,136	0,0328
	247	0,209	0,0389
	251	0,236	0,0406
	255	0,145	0,0337
	259	0,01	0,001

No que se refere aos parâmetros estatísticos é possível identificar que este marcador apresenta valores relativamente elevados de estimativas (é o terceiro maior poder de discriminação entre indivíduos): i) o Poder de Discriminação entre Mulheres (PDM) deste marcador é da ordem de 94,8%; o Poder de Discriminação entre Homens (PDH) é de 83%; O poder de excluir uma falsa acusação de paternidade deste marcador é de 80,7; e que a Heterozigosidade Média deste marcador é de 83%.

Todas as estimativas de parâmetros de diferenciação entre indivíduos foram agrupadas e todos os dados foram empregados para estimar as mesmas medidas considerando o conjunto dos seis marcadores. Os dados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros de diferenciação entre indivíduos para cada marcador

Marcador/ Parâmetro	HEMF 01	HEMF 03	HEMF 02	DXS 10011	DXS 7423	GATA 31E08	CONJUNTO
PD Mulher	0,9918	0,4050	0,8457	0,9948	0,8092	0,9483	0,999999962
PD Homem	0,9344	0,2335	0,6580	0,9479	0,6429	0,8298	0,999945555
PEXC. TRIO	0,9305	0,2260	0,6207	0,9455	0,5796	0,8071	0,999909748
LD	0,9384	0,2343	0,6609	0,9520	0,6449	0,8333	0,7106

PD: Poder de Discriminação; PEXC: Poder de Exclusão; LD: *Locus Diversity*

Os dados acima permitem inferências que podem ajudar a compreender a amplitude das estimativas realizadas, a partir dos marcadores investigados, na tentativa de inferir sobre a possibilidade de identificar mulheres portadoras de mutações, entre as parentas de investigados.

De uma forma sucinta os dados obtidos com os seis marcadores investigados permitem concluir que: i) A Heterozigosidade Média dos marcadores investigados é de 71%.

ii) O Poder de Discriminação entre Mulheres é da ordem de 99,999996%. Isto significa que empregando esses marcadores a chance de que duas mulheres escolhidas ao acaso na população de Belém terem os mesmos genótipos, para todos os seis marcadores, é da ordem de 4 em 100.000.000 (cem milhões) de mulheres.

iii) O Poder de Discriminação estimado entre Homens é da ordem de 99,995%. Isto significa que empregando os seis marcadores a chance que dois homens da população de Belém tenham o mesmo haplótipo é da ordem de 5 em 100.000 (cem mil) homens da população.

iv) O poder de excluir uma falsa acusação de paternidade deste conjunto de marcadores é da ordem de 99,991%, muito maior que a exigida na maioria dos tribunais de justiça do país.

Os dados apresentados são comumente empregados em análises forenses e perfeitamente aplicáveis em casos de identificação de mulheres portadoras.

5.2 Análises das famílias estudadas

Dos 63 indivíduos estudados, 28 (44,44%) eram do sexo masculino e 35 (55,56%) do sexo feminino.

Dentre os 28 pacientes participantes, havia dois pares de irmãos, sendo então representadas apenas 26 famílias.

Dois pacientes cujas mães já eram falecidas, mas que possuíam filhas, portanto eram portadoras obrigatórias, foram aceitos para participar no grupo de familiares de pacientes e ajudaram a comprovar a eficácia da metodologia.

Das 26 famílias estudadas, cinco famílias apresentavam possíveis portadoras, com necessidade de diagnóstico. As outras 17 famílias eram compostas apenas de mãe e filho, sendo utilizadas para validar a metodologia.

O Quadro 5 mostra o grau de parentesco nas sete famílias dos afetados, num total de 11 mulheres estudadas. As demais 24 mulheres eram mães dos afetados.

Quadro 5 - Grau de parentesco das mulheres estudadas em sete famílias

Paciente	Grau de Parentesco				
	Irmã	Tia	Prima	Filha	Total
B7		1			1
B9	1				1
B15				1	1
B17	3				3
B18				2	2
B22		1	1		2
B23	1				1
Total	5	2	1	3	11

Legenda: B= afetado

5.3 Caracterização da amostra de pacientes

A média de idade dos pacientes foi de 38,5 anos, variando entre dois anos e setenta e cinco anos.

Quanto à gravidade da manifestação clínica dos pacientes, três pacientes (11,5%) tinham hemofilia Leve, três pacientes (11,5%) tinham hemofilia Moderada e vinte pacientes (77%) tinham hemofilia Grave.

Quatro pacientes (15,38%) apresentavam pesquisa de inibidor para FVIII Positiva, estando todos em Indução de Imunotolerância (ITI).

O Quadro 6 mostra os dados referentes aos pacientes estudados, no que se refere a idade, a manifestação clínica da doença e a pesquisa de inibidor do Fator VIII, além do haplótipo de cada um deles. Vale ressaltar que dentre os afetados, não encontramos dois haplótipos exatamente iguais.

Quadros 6 - Dados dos pacientes estudados quanto à idade, classificação da hemofilia, pesquisa de inibidor e haplótipo

Paciente	Idade (anos)	Classificação Clínica	Pesquisa de Inibidor	Haplótipo
B1	5	GRAVE	NEGATIVA	255; 179; 188; 382; 207; 247
B2	7	GRAVE	POSITIVA	276; 179; 176; 382; 215; 247
B3	2	MODERADO	NEGATIVA	261; 179; 188; 358; 215; 251
B4	10	GRAVE	NEGATIVA	240; 179; 188; 370; 215; 239
B5	5	GRAVE	POSITIVA	294; 175; 180; 366; 215; 235
B7	17	GRAVE	NEGATIVA	261; 179; 188; 370; 215; 247
B8	17	GRAVE	NEGATIVA	249; 179; 176; 370; 211; 235
B9	8	GRAVE	NEGATIVA	276; 179; 176; 358; 223; 243
B10	8	GRAVE	NEGATIVA	261; 179; 176; 340; 215; 251
B11	9	GRAVE	NEGATIVA	252; 179; 192; 330; 215; 251
B12	19	GRAVE	NEGATIVA	288; 179; 176; 338; 223; 247
B13	17	GRAVE	NEGATIVA	264; 179; 180; 378; 215; 235
B14	4	GRAVE	POSITIVA	276;179;172; 302; 215; 239
B15	57	GRAVE	NEGATIVA	264; 179; 176; 370; 219; 235
B16	55	GRAVE	NEGATIVA	273; 179; 188; 362; 215; 255

Paciente	Idade (anos)	Classificação Clínica	Pesquisa de Inibidor	Haplótipo
B17	13	GRAVE	NEGATIVA	279; 179; 176; 386; 211; 247
B18	75	LEVE	NEGATIVA	249;179; 176; 342; 211; 255
B19	4	LEVE	NEGATIVA	294; 179; 176; 340; 211; 243
B20	9	GRAVE	POSITIVA	273; 179; 176; 332; 211; 247
B21	4	GRAVE	NEGATIVA	282; 175; 180; 378; 215; 247
B22	3	MODERADO	NEGATIVA	273; 179; 176; 362; 211; 243
B23	13	MODERADO	NEGATIVA	273; 175; 188; 356; 211; 247
B24	12	GRAVE	NEGATIVA	273; 175; 188; 348; 211; 239
B25	4	LEVE	NEGATIVA	249; 179; 176; 348; 219; 255
B26	4	GRAVE	NEGATIVA	294; 179; 188; 338; 211; 255
B27	6	GRAVE	NEGATIVA	243; 179; 188; 362; 215; 243

Legenda: B= Afetado

5.4 Haplótipos das famílias

Cada família recebeu um número de identificação, de 1 até 27, seguido de uma letra, de acordo com o parentesco: mães receberam letra A, afetados receberam letra B, irmãs receberam as letras C, D, E, tias receberam a letra F e primas a letra F seguida do número 1 (F1). Filhas de afetados receberam a letra B com o número 1 e 2 (B1, B2). Os irmãos dos afetados receberam a letra C e o número 1 (C1).

Com base na análise dos haplótipos dos afetados e de sua família, foi possível identificar ou excluir as portadoras nas sete famílias que tinham mulheres com possível caráter de portadora, confirmando ainda as portadoras obrigatórias, além de termos identificado como portadoras as mães dos afetados, como pode ser visto no quadro 7.

Das onze mulheres estudadas nestas sete famílias, sete (63,7%) eram portadoras e quatro (36,3%) eram não portadoras, sendo que dentre as sete portadoras identificadas, três eram portadoras obrigatórias, por serem filhas de afetados, tendo obrigatoriamente recebido do pai afetado o gene mutante.

Quadro 7 - Haplótipo de cada indivíduo estudado nos seis marcadores e portadora identificada

Marcador/ Indivíduo Nº	HMF 01		HMF 03		HMF 02		DXS10011		DXS7423		GATA 10011		Portadora Identificada
1A	255	279	179	179	176	188	350	382	207	215	247	247	SIM
1B	255		179		188		382		207		247		
2A	249	276	179	179	176	180	382	394	215	219	243	247	SIM
2B	276		179		176		382		215		247		
3A	261	261	179	179	176	188	358	374	215	215	247	251	SIM
3B	261		179		188		358		215		251		
4A	240	273	179	179	176	188	350	370	215	219	239	255	SIM
4B	240		179		188		370		215		239		
5A	276	294	175	179	176	180	346	366	211	215	235	255	SIM
5B	294		175		180		366		215		235		
5C1	294		175		180		366		215		255		
7A	261	285	179	179	176	188	346	370	211	215	247	259	SIM
7B	261		179		188		370		215		247		
7F	261	265	179	179	176	188	366	374	211	211	247	247	NÃO
8A	243	249	179	179	176	176	348	370	211	219	235	235	SIM
8B	249		179		176		370		211		235		
9A	252	276	179	179	172	176	358	394	215	223	243	255	SIM
9B	276		179		176		358		223		243		
9C	276	279	175	179	176	188	358	362	215	223	243	255	SIM
10A	261	279	179	179	176	176	340	378	215	215	251	251	SIM
10B	161		179		176		340		215		251		
11A	252	285	171	179	188	192	330	414	215	215	251	255	SIM
11B	252		171		192		330		215		255		
12A	288	288	179	181	172	176	302	338	211	223	239	247	SIM
12B	288		179		176		338		223		247		
13A	264	273	179	179	176	180	366	378	215	215	235	251	SIM
13B	264		179		180		378		215		235		
14A	273	276	179	179	172	176	302	358	211	215	239	243	SIM
14B	176		179		172		302		215		239		
15B	264		179		176		370		219		235		
15B1	258	264	179	179	176	176	366	370	215	219	231	235	SIM *
16A	264	273	175	179	188	188	362	390	211	215	247	255	SIM

Marcador/ Família Nº	HMF 01		HMF 03		HMF 02		DXS 10011		DXS 7423		GATA 10011		Portadora Identificada
16B	273		179		188		362		215		255		
17A	279	282	179	179	176	176	386	394	211	219	247	247	SIM
17B	279		179		176		386		211		247		
17C	264	279	179	179	176	188	364	386	211	215	243	247	SIM
17D	264	282	179	179	176	188	360	394	215	219	243	247	NÃO
17E	264	282	179	179	176	188	360	394	215	219	243	247	NÃO
18B	249		179		176		342		211		255		
18B1	249	282	179	179	176	176	342	374	211	215	247	255	SIM *
18B2	249	282	179	179	176	176	342	374	211	215	247	255	SIM *
19A	273	294	179	179	176	176	338	340	211	219	243	247	SIM
19B	294		179		176		340		211		243		
20A	273	279	179	183	176	176	332	334	211	215	247	247	SIM
20B	273		179		176		332		211		247		
21A	267	282	175	179	180	184	344	378	207	215	239	247	SIM
21B	282		175		180		378		215		247		
22A	249	273	179	179	172	176	352	362	211	215	243	251	SIM
22B	273		179		176		362		211		243		
22F	249	273	179	179	172	176	352	362	211	215	235	251	SIM
22F1	249	288	179	179	172	180	352	368	215	215	235	251	NÃO
23A	270	273	175	179	184	188	344	356	207	211	235	247	SIM
23B	273		175		188		356		211		247		
23C	273	288	175	183	176	188	356	378	211	211	247	251	SIM
24A	270	273	175	179	184	188	348	356	211	219	239	247	SIM
24B	273		175		188		348		211		239		
25A	249	270	179	179	176	176	348	378	207	219	247	255	SIM
25B	249		179		176		348		219		255		
26A	246	294	179	179	172	188	338	348	211	211	239	255	SIM
26B	294		179		188		338		211		255		
27A	243	243	179	179	188	188	362	366	215	215	243	247	SIM
27B	243		179		188		362		215		243		
27C1	243		179		188		362		215		243		

Legenda: A= Mãe de Afetado; B= Afetado; B1= Filha de Afetado; B2= Filha de Afetado; C,D,E=Irmãs de Afetado; C1= Irmão de Afetado, também afetado; F= Tia de Afetado; F1= Prima de Afetado e Filha de F;

*Portadora obrigatória

5.5 Análise das famílias com possíveis portadoras

Analisando os resultados obtidos entre famílias de afetados foi possível identificar as seguintes características. Duas famílias se referem a filhas de afetados que são obrigatoriamente portadoras, na medida em que ambas recebem obrigatoriamente um cromossomo X paterno. Elas se referem às famílias 15 (portadora obrigatória 15B1) e 18 (duas portadoras obrigatórias (18B1 e 18B2)). As outras cinco famílias (7, 9, 17, 22 e 23) eram compostas por indivíduos os quais se pretendia investigar a possibilidade de serem portadoras da mesma mutação que afeta os pacientes selecionados.

Abaixo está apresentado o haplótipo e heredograma de cada família, com sua respectiva análise quanto ao caráter de portadora.

7A	261	285	179	179	176	188	346	370	211	215	247	259
7B	261		179			188		370		215		247
7F	261	265	179	179	176	188	366	374	211	211	247	247

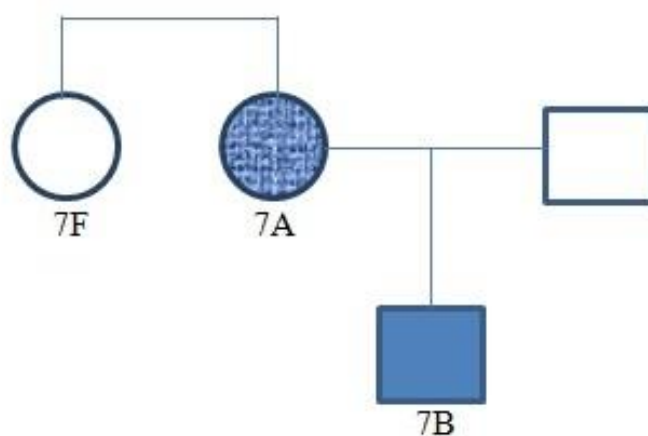


Figura 9 – Haplótipo e Heredograma da família 7

Na família 7, três indivíduos foram analisados do ponto de vista dos marcadores utilizados nesta investigação. O indivíduo 7B é o afetado pela hemofilia, sua mãe (7A) é portadora obrigatória (na ausência de mutação *de novo*) e a tia materna do afetado (7F) a qual se pretendia investigar a possibilidade de ser portadora da mesma mutação que afeta 7B. Dentro do que foi possível observar, 7F não tem o mesmo haplótipo que acompanha a mutação que afeta 7B. Pode-se concluir que ela não é portadora da mutação.

9A	252	276	179	179	172	176	358	394	215	223	243	255
9B	276		179		176		358		223		243	
9C	276	279	175	179	176	188	358	362	215	223	243	255

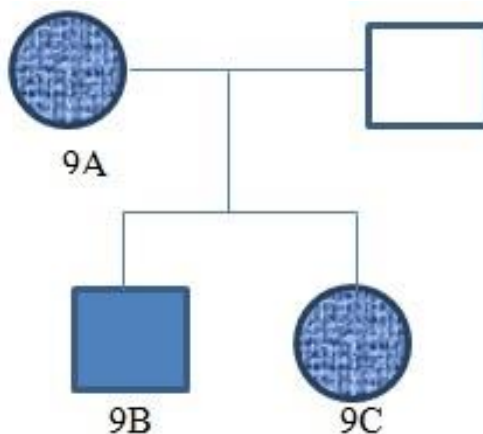


Figura 10. Haplótipo e Heredograma da família 9

Na família 9, três indivíduos foram analisados do ponto de vista dos marcadores utilizados nesta investigação. O indivíduo 9B é o afetado pela hemofilia, sua mãe (9A) é portadora obrigatória (na ausência de mutação *de novo*) e a irmã do afetado (9C) a qual se pretendia investigar a possibilidade de ser portadora da mesma mutação que afeta 9B. Do que foi possível observar, a irmã 9C tem todos os marcadores presentes no haplótipo que acompanha a mutação que afeta 9B, o que nos indica que ela pode ser considerada como uma portadora da mutação.

Nos casos em que é possível investigar o genótipo materno (como é este o caso), a inferência sobre a possibilidade da irmã do afetado ser portadora é mais clara. Nos casos em que a mãe não está disponível para as análises ou nos casos em que se trabalha com parentes (primas, por exemplo) de afetados as estimativas são um pouco mais complexas.

Na ausência de dados sobre a mãe de ambos, existe uma condição que pode levar a 9C ter o mesmo haplótipo sem estar acompanhado da mutação presente em 9A. Esta condição pressupõe que ela não recebeu este haplótipo da mãe (a mesma mãe de 9B) e que este haplótipo tenha vindo do pai biológico, na premissa que ele tenha o mesmo haplótipo, sem a mutação. Baseado nas frequências alélicas, a chance de que exista na população um haplótipo semelhante, herdado de indivíduos não aparentados é da ordem de 12×10^{-6} , qual seja de 12 em 1 milhão de homens.

15B	264		179		176		370		219		235	
15B1	258	264	179	179	176	176	366	370	215	219	231	235

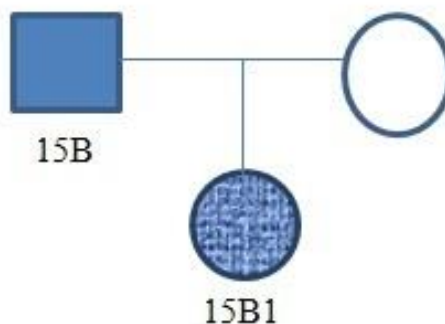


Figura 11 – Haplótipo e Heredograma da família 15

Na família 15 dois indivíduos foram analisados do ponto de vista dos marcadores utilizados nesta investigação. O indivíduo 15B é o afetado pela hemofilia e sua filha (15B1) é portadora obrigatória. Como era esperado, pode-se observar que a filha (15B1) tem todos os marcadores presentes no haplótipo que acompanha a mutação que afeta 15B.

Explorando todas as situações possíveis, existe uma chance de que a filha 15B1 tenha haplótipo semelhante ao do afetado 15B, mas não tenha recebido este haplótipo do indivíduo hemofílico. A chance é de que ela não seja filha biológica do afetado e que o verdadeiro pai tenha o mesmo haplótipo do indivíduo em questão. Calculando a frequência destes haplótipos tomando por base as frequências alélicas de cada marcador é possível identificar que a chance ao acaso de existirem dois homens na população portadores do mesmo haplótipo (relativo aos seis marcadores investigados) é da ordem de $85/10^{-6}$. Claro está que estas são chances estatísticas, que não levam em conta informações primordiais relativas a dados pessoais dos envolvidos nas famílias.

17A	279	282	179	179	176	176	386	394	211	219	247	247
17B	279		179		176		386		211		247	
17C	264	279	179	179	176	188	364	386	211	215	243	247
17D	264	282	179	179	176	188	360	394	215	219	243	247
17E	264	282	179	179	176	188	360	394	215	219	243	247

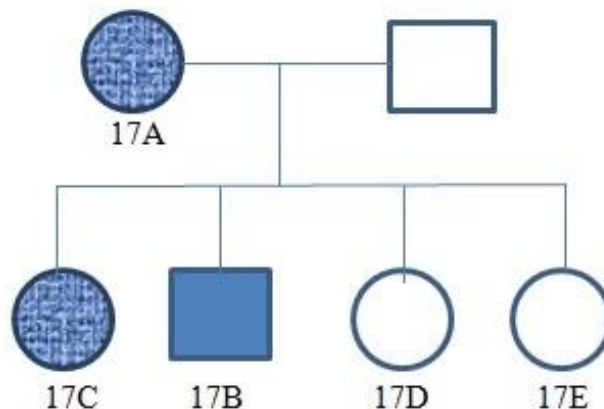


Figura 12 – Haplótipo e Heredograma da família 17

Na Família 17, a maior família aqui estudada, foram analisados cinco indivíduos do ponto de vista dos marcadores utilizados nesta investigação. O indivíduo 17B é o afetado pela hemofilia, sua mãe (17A) é portadora obrigatória (na ausência de mutação *de novo*) e as três irmãs do afetado (17C, 17D e 17E) as quais se pretendia investigar a possibilidade de serem portadoras da mesma mutação que afeta 9B. Do que foi possível observar, as irmãs 17D e 17E não tem o mesmo haplótipo que acompanha a mutação que afeta 17B. A conclusão é que elas não são portadoras da mutação do gene FVIII.

No que se refere à irmã 17C, pode ser observado que a mesma apresenta todos os marcadores presentes no haplótipo que acompanha a mutação que afeta 17B, o que indica que ela pode ser considerada como uma portadora da mutação. Se a genotipagem da mãe do paciente não estivesse disponível, haveria uma situação em que 17C tem o mesmo haplótipo, mas ele não está acompanhado da mutação. À semelhança do calculado para a família 9, baseados nas frequências alélicas, a chance de que exista na população um haplótipo semelhante, herdado de indivíduos não aparentados é da ordem de $12/10^{-5}$, ou seja, 12 em 100 mil homens.

18B	249		179		176		342		211		255	
18B1	249	282	179	179	176	176	342	374	211	215	247	255
18B2	249	282	179	179	176	176	342	374	211	215	247	255

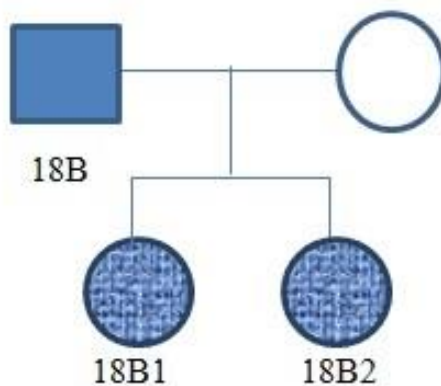


Figura 13 – Haplótipo e Heredograma da família 18

Na família 18, três indivíduos foram analisados do ponto de vista dos marcadores utilizados nesta investigação. O indivíduo 18B é o afetado pela hemofilia e suas filhas (18B1 e 18B2) são portadoras obrigatórias. Foi observado que, como era esperado, as filhas 18B1 e 18B2 têm todos os marcadores presentes no haplótipo que acompanha a mutação que afeta 18B, uma vez que receberam o cromossomo X paterno.

Explorando todas as situações possíveis, existe uma chance de que as filhas 18B1 e 18B2 tenham haplótipos semelhantes ao do afetado 18B, mas não tenham recebido este haplótipo do indivíduo hemofílico. A chance é de que elas não sejam filhas biológicas do afetado e que o verdadeiro pai tenha o mesmo haplótipo do indivíduo em questão. Calculando a frequência destes haplótipos tomando por base as frequências alélicas de cada marcador é possível identificar que a chance ao acaso de existirem dois homens na população portadores do mesmo haplótipo é da ordem de $51/10^{-7}$.

22A	249	273	179	179	172	176	352	362	211	215	243	251
22B	273	179	176	362	211	243						
22F	249	273	179	179	172	176	352	362	211	215	235	251
22F1	249	288	179	179	172	180	352	368	215	215	235	251

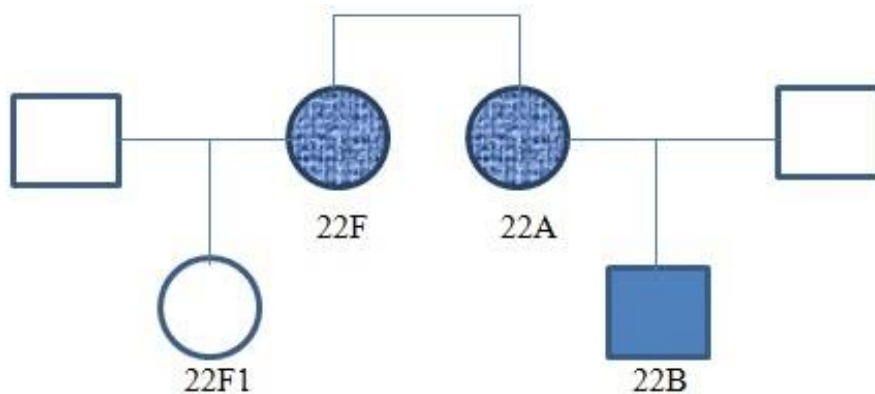


Figura 14 – Haplótipo e Heredograma da família 22

Na família 22, quatro indivíduos foram analisados do ponto de vista dos marcadores utilizados nesta investigação. O primeiro, o indivíduo 22B é o afetado pela hemofilia. A segunda pessoa investigada (22A) é a mãe do afetado e, portanto, é portadora obrigatória (na ausência de mutação *de novo*). As duas outras investigadas eram uma tia do lado materno do afetado (22F) e sua filha (22F1), as quais se pretendia investigar a possibilidade de serem portadoras da mesma mutação que afeta 22A.

Do que foi possível observar, a prima (22F1) do afetado não tem o mesmo haplótipo que acompanha a mutação que afeta 22B, o que indica que ela não pode ser considerada como uma portadora.

Cenário diferente ocorre em relação à tia (22F) do afetado. Ela tem o mesmo haplótipo que acompanha a mutação que afeta 22B em cinco dos seis marcadores investigados (HMF-01, HMF-02, HMF-03, DXS7423, DXS10011). De todos, apenas o marcador GATA31E08, que tem a localização mais distante do gene FVIII, é diferente do haplótipo do paciente. Esta diferença pode ter sido causada tanto por *crossing over* durante a meiose materna como por mutação.

Existe uma condição que pode levar a 22F ter o mesmo haplótipo (considerando cinco marcadores), sem estar acompanhado da mutação presente em 22A e 22B. Esta condição pressupõe que ela não recebeu este haplótipo da mãe e que este haplótipo tenha vindo de seu pai biológico (que seria diferente do pai biológico de 22A). Baseado nas

frequências alélicas, a chance de que exista na população um haplótipo semelhante, herdado de indivíduos não aparentados é da ordem de $47/10^{-5}$ ou seja de 47 em 100 mil homens da população.

23A	270	273	175	179	184	188	344	356	207	211	235	247
23B	273		175		188		356		211		247	
23C	273	288	175	183	176	188	356	378	211	211	247	251

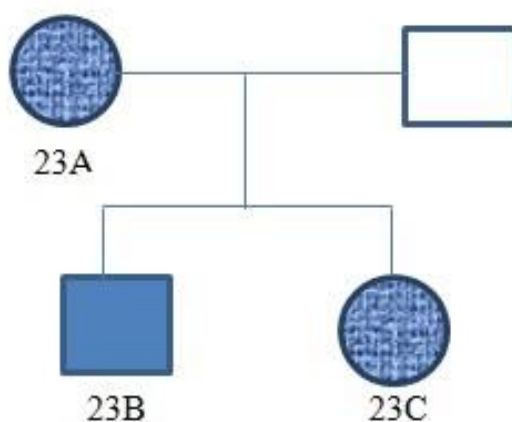


Figura 15 – Haplótipo e Heredograma da família 23

Na família 23, três indivíduos foram analisados do ponto de vista dos marcadores utilizados nesta investigação. O indivíduo 23B é o afetado pela hemofilia, sua mãe (23A) é portadora obrigatória (na ausência de mutação *de novo*) e a irmã do afetado (23C) a qual se pretendia investigar a possibilidade de ser portadora da mesma mutação que afeta 23B. Do que foi possível observar, a irmã 23C tem todos os marcadores presentes no haplótipo que acompanha a mutação que afeta 23B, o que indica que ela pode ser considerada como uma portadora da mutação.

Se a genotipagem da mãe do paciente não tivesse sido realizada, haveria uma situação em que 23C tem o mesmo haplótipo, mas ele não está acompanhado da mutação. À semelhança do calculado para a família 09, baseados nas frequências alélicas, a chance de que exista na população um haplótipo semelhante, herdado de indivíduos não aparentados, é da ordem de $46/10^{-9}$, ou seja, 46 em um bilhão de homens.

6. CONCLUSÕES

A Hemofilia A é uma coagulopatia hereditária, ocasionada por mutação no gene *F8*, localizado no cromossomo X. A mutação causa deficiência total ou parcial na atividade coagulante do Fator VIII (FVIII), uma glicoproteína plasmática indispensável para a coagulação normal do sangue. De acordo com o EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*), existem mais de 2.000 mutações descritas no gene *F8*. A identificação das mutações só é possível com o sequenciamento direto de todo o gene, que tem alto grau de dificuldade tanto pelo grande tamanho do gene como por sua organização genômica complexa. Sendo assim, torna-se inviável a utilização rotineira desta técnica para o diagnóstico das portadoras, que pode ser substituída pela identificação indireta, por análise de ligação com marcadores polimórficos localizados dentro ou próximos ao gene.

É importante salientar que as possíveis portadoras, quando chegam à idade adulta, demonstram grande preocupação quanto à possibilidade de gerar filhos hemofílicos, principalmente naquelas com irmãos afetados, que convivem diariamente com o quadro de sangramento dos pacientes. Para essas mulheres, é fundamental diagnosticar ou excluir o estado de portadora, antes que as mesmas iniciem uma família e a lacuna existente na identificação de mulheres portadoras precisa ser preenchida.

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia para identificação molecular de alterações no gene *F8*, através da análise indireta da mutação, procurando identificar as mulheres portadoras dentre 26 famílias de pacientes afetados pela hemofilia A, cadastrados no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA).

Neste sentido, a utilização de STRs mostrou-se eficaz para identificação molecular de alterações no gene *F8*, permitindo a identificação indireta das portadoras na população estudada. Empregando os seis STRs foi possível identificar, em todos os casos analisados, as portadoras da mutação familiar ou eliminar a possibilidade de que elas sejam portadoras.

No grupo controle, diferentes medidas de discriminação foram estimadas, incluindo o Poder de Discriminação entre Mulheres (PDM), o Poder de Discriminação entre Homens (PDH), o Poder de Exclusão do Trio (PDT) e o Locus Diversity (LD) tomando por base a variabilidade observada em seis *Short Tandem Repeats* (STRs) localizados próximos ao gene *F8*. A heterozigosidade média encontrada nestes

marcadores foi da ordem de 71%. Os parâmetros de PDM, PDH e PDT foram todos superiores a 99,99%, comprovando que o protocolo proposto é perfeitamente aplicável em casos de identificação de mulheres portadoras.

Os seis marcadores utilizados (CTT3=HMF-01, TAAA3=HMF-3, TTTA3=HMF-2, DXS10011, DXS7423 e GATA31E08) se mostraram úteis tanto na identificação como na exclusão das portadoras, sendo que todas as portadoras obrigatórias foram identificadas.

Nas cinco famílias onde havia possíveis portadoras, no total de oito mulheres, foi realizada a identificação deste caráter em quatro famílias, no total de quatro mulheres, e o caráter de portadora foi excluído em três famílias, que também perfizeram o total de quatro mulheres.

Foi observado ainda que, nos indivíduos afetados com pesquisa de inibidor positiva para o Fator VIII, não foi possível estabelecer um padrão nos haplótipos encontrados que nos orientasse para a possibilidade de haver uma mesma mutação levando ao desenvolvimento de inibidor.

Esta metodologia de identificação indireta da mutação, utilizando seis STRs como marcadores, localizados na região 3' do gene *F8*, pode ser proposta como teste de identificação, assim como o protocolo de acompanhamento das portadoras, descrito no Apêndice A, a ser realizado na rotina do HEMOPA.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico e acompanhamento das portadoras da hemofilia A ainda é um objetivo distante na maioria dos Centros Tratadores de Hemofilia (CTHs) do Brasil.

A validação de um protocolo factível no estado do Pará pode dar início à implantação de centros de referência nas diversas regiões do Brasil e viabilizar o diagnóstico das portadoras na rotina dos CTHs.

Um fator relevante observado foi o fato de não ter sido encontrado dois indivíduos afetados com o mesmo haplótipo. Este fato indica que não existe nenhuma mutação mais frequente entre os indivíduos investigados e pode fomentar o desenvolvimento de novas pesquisas que possam identificar as mutações existentes na população de pacientes afetados pela hemofilia A no estado do Pará.

No decorrer do trabalho, foi observado que ainda há muito a ser feito para oferecer um acompanhamento adequado às portadoras, principalmente no que diz respeito à identificação das portadoras sintomáticas e ao oferecimento de aconselhamento genético. No entanto, também se pode observar que muito foi feito, ao se estabelecer uma metodologia viável para ser realizada rotineiramente na identificação das portadoras, que possibilitará diagnóstico e tratamento precoce tanto dos afetados quanto das portadoras.

8. REFERÊNCIAS

A HISTÓRIA da hemofilia. Em ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE HEMOFILIA E OUTRAS CCOAGULOPATIAS CONGÊNITAS, Disponível em <<http://www.aphemofilia.pt>> acesso em: 17 de julho de 2015.

ASTERMARK, J. Factor VIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. *Blood* 125 (13): p. 2045-2051, 2015.

BAUER, K.A. Current challenges in the management of hemophilia. *Am J Manag care* 21 (6): p. 112-122, 2015.

BOLTON-MAGGS, P.H.; PASI, K.J. Haemophilias A and B. *Lancet* 361: p. 1801-1809, 2003.

BOWEN, D.J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 55 (2): p. 127–144, 2002.

BRASIL, Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001. Regulamenta as ações relativas à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, Brasília, DF, 22 março. 2001. Seção 1, 1p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias. Brasília: MS, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias. Brasília: MS, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil 2011 – 2012. Brasília: MS, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova as diretrizes básicas da Política Nacional do Sangue – Pró-sangue. Portaria Interministerial nº 7, de 30 de abril de 1980. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, Brasília, DF, 08 de maio de 1980, p. 8226-8229.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova o Protocolo de Uso de Profilaxia Primária para Hemofilia Grave. Portaria nº 364, de 06 de maio de 2014. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, Brasília, DF, 07 de maio de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Hemofilia congênita e inibidor: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos. Brasília: MS, 2008.

CAHILL, M.R.; COLVIN, B.T. Classic diseases revisited: Hemophilia. *Postgrad Med J* 73: p. 201-206, 1997.

CASTRO, H.E.; BRICEÑO, M.F.; CASAS, C.P.; RUEDA, J.D. The history and evolution of the clinical effectiveness of haemophilia type A treatment: a systematic review. *Indian J Hematol Blood Transfus* 30 (1): p. 1–11. 2014.

CHAVES, D.G.; RODRIGUES, C.V. Desenvolvimento de inibidores do fator VIII na hemofilia A. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 31 (5): p. 384-390, 2009.

DE SOUZA, T.B.; DUARTE, L.P.; SOUTO FILHO, J.T.D.; FERNANDEZ, J.H.; MEDINA-ACOSTA, E. Farmacogenética do desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII na hemofilia A. *Revista Científica da FMC* 6 (1): p. 7-13, 2011.

DIMICHELE D.M.; KRONER, B.L. The North American immune tolerance registry: practices, outcomes, outcome predictors. *Thromb Haemost* 87: p. 52–7, 2002.

DIMICHELE, D.M.; NEUFELD, E.J. Hemophilia A New Approach to an Old Disease. *Hematol/Oncol Clinics of North America* 12 (6): p. 1315-1344, 1998.

DUNN, A.L.; ABSHIRE, T.C. Recent advances in the management of the child who has hemophilia. *Hematol Oncol Clin N Am* 18: p. 1249–1276, 2004.

European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD). Disponível em <http://www.eahad.org>. Acesso em 02/01/2017.

EVATT, B.L. The tragic history of AIDS in the hemophilia population; 1982-1984. *J Thromb Haemost* 4: p. 2295-2301, 2006.

FANG, H.; WANG, L.; WANG, H. The protein structure and effect of factor VIII. *Trombosis Research* 119: p. 1-13, 2007.

FELDMAN, B.M.; PAI, M.; RIVARD, G.E.; ISRAELS, S.; POON, M.-C.; DEMERS, C.; ROBINSON, S.; LUKE, K.-H.; WU, J.K.M.; GILL, K.; LILICRAP, D.; BABYN, M.; MCLIMONT, M.; BLANCHETTE, V.S. Tailored prophylaxis in severe hemophilia A: interim results from the first 5 years of the Canadian Hemophilia Primary Prophylaxis Study. *JTH* 4 (6): p. 1228–1236, 2006.

FERREIRA, A.A.; LEITE, I.C.G.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M.T.; GUERRA, M.R. Hemophilia A in Brazil – epidemiology and treatment developments. *Journal of Blood Medicine* 5, p. 175–184, 2014.

FERREIRA PIO, S.; DE OLIVEIRA, G.C.; REZENDE, S.M. As bases moleculares da hemofilia. *Rev Assoc Med Bras* 55 (2): p. 213-219, 2009.

FISCHER, K.; CARLSSON, K.S.; PETRINI, P.; HOLMSTRÖM, M.; JUNG, R.L.; VAN DEN BERG, H.M.; BERNTORP, E. Intermediate-dose versus high-dose prophylaxis for severe hemophilia: comparing outcome and costs since the 1970s. *Blood* 122 (7): p. 1129–1136, 2013.

FORENSIC ChrX Research, Disponível em <http://www.chrx-str.org> acesso em 28 de novembro de 2016.

FRANCHINI, M. The modern treatment of haemophilia: a narrative review. *Blood Transfus* 11 (2): p. 178–182, 2013.

GOUW S.; VAN DEN BERG H.M.; OLDENBURG J., ASTERMARK J., DE GROOT P., MARGAGLIONE M., *et al.* F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*; 119 (12): p. 2922-2934, 2012.

GOUW, S. et al for the PedNet and RODIN Study Group. Factor VIII Products and Inhibitor Development in Severe Hemophilia. *N Engl J Med* 368: p. 231-239, 2013.

HAMSTeR. Haemophilia A Mutation Search Test and Resource Site, disponível em <<http://europium.mrc.rpms.ac.uk>> acesso em: 20 de julho de 2015.

HAY C.R.; DIMICHELE D.M. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* 119 (6): p. 1335–1344, 2012.

HEDNER, U.; GINSBURG, D.; LUSHER, J.M.; HIGH, K.A. Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the pathophysiology and treatment of hemophilia. *ASH Education Book 1*: p. 241-265, 2000.

HISTÓRIA da hemofilia. In CENTRO DOS HEMOFÍLICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em <<http://www.chesp.org.br>> acesso em: 19 de julho de 2015.

IORIO, A. et al. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J Thromb Haemost* 8 (6): p. 1256–1265, 2010.

JAYANDHARAN, G.; SHAJI, R.V.; BAIDYA, S.; NAIR, S.C.; CHANDY, M.; SRIVASTAVA, A. Identification of fator VIII gene mutations in 101 patients with

haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia* 11 (5): p. 481-491, 2005.

JOSEPHSON, N. The hemophilias and their clinical management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: p. 261-267, 2013.

KARIM, A.; JAMAL, C.Y. A review on hemophilia in children. *Bangladesh J Child Health* 37 (1): p. 27-40, 2013.

KEENEY, S.; MITCHEL, M.; GOODEVE, A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia* 11: p. 387–397, 2005.

KLEIN, I.; ANDRIKOVICS, H.; BORS, A., NEMES, L.; TORDAI, A.; VÁRADI, A. A haemophilia A and B molecular genetic diagnostic programme in Hungary: a highly informative and cost-effective strategy. *Haemophilia* 7: p. 306–312, 2001.

KONKLE, B.A.; JOSEPHSON, N.C.; FLETCHER, S.N.B.S. Hemophilia A. *Gene Reviews*. Initial Posting: September 21, 2000; Last Update: June 5, 2014. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1404>> acesso em 20 de julho de 2015.

LEE, C.A.; BERNTORP, E.E.; HOOTS, W.K. *Textbook of hemophilia*. Second ed. Wiley-Blackwell, 2010. 482p.

MAKRIS, M.; HAY, C.R.M.; GRINGERI, A.; D'OIRON, R. How I treat inhibitors in haemophilia. *Haemophilia* 10 (1111): p. 1365-2516, 2012.

MANCO-JOHNSON, M.J. Prophylaxis versus Episodic Treatment to Prevent Joint Disease in Boys with Severe Hemophilia. *N Engl J Med* 44: p. 357-535, 2007.

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

MANNUCCI, P.M. Modern treatment of haemophilia: from the shadows towards the light. *Thromb Haemost* 70: p. 17-23, 1993.

MANNUCCI, P.M.; TUDDENHAM, E.G.D. The Hemophilias—From royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 344 (23): p. 1773-1779, 2001.

MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P. Symptomatic carriers of hemophilia. Quebec: World Federation of Hemophilia, 2008. 17p.

MYRIN-WESTESSON, L.; BAGHAEI, F.; FRIBERG, F. The experience of being a female carrier of haemophilia and mother of a haemophilic child. *Haemophilia* 19 (2): p. 219-224, 2013.

NORDIC HEMOPHILIA COUNCIL (NHC). Nordic hemofilia guidelines, 2015. Disponível em <<http://www.nordhemophilia.org>> acesso em 11 de novembro de 2016.

OLDENBURG, J.; EL-MAARRI, O.; SCHWAAB, R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia* 8 (2): p. 23-29, 2002.

PACHECO, L.L.R.; WOLFF, A.L.P. Ortopedia e fisioterapia em hemofilia. Editora Manole, 1ª edição, 2013.

PEAKE I.R.; LILLICRAP D.P.; BOULYJENKOV, V.; BRIET, E.; CHAN, V.; GINTER, E.K.; et al. Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bulletin of the World Health Organization*; 71(3/4): p. 429-458, 1993.

PLUG, I.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P.; BROCKER-VRIENDS, A.H.J.T.; VAN AMSTEL, H.K.P.; VAN DER BOM, J.G.; VAN DIEMEN-HOMAN J.E.M.; et al. Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood* 108 (1): p. 52-56, 2006.

PURANDARE, S.M.; PATEL, P.I. Recombination hot spots and human disease. *Genome Research* 7: p. 773-786, 1997.

RIBEIRO-RODRIGUES, E.M.; LEITE, F.P.N.; HUTZ, M.H.; PALHA, T.J.B.F.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; SANTOS, S. A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. *Forensic Science International Genetics* 2: p. 154–158, 2008.

RIBEIRO-RODRIGUES, E.M.; PALHA, T.J.B.F.; BITTENCOURT, E.A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; SANTOS, S. Extensive survey of 12 X-STRs reveals genetic heterogeneity among Brazilian populations. *International Journal of Legal Medicine (Print)*: p. 221-229, 2011.

ROCINO, A.; COPPOLA, A.; FRANCHINI, M.; CASTAMAN, G.; SANTORO, C.; ZANON, E.; SANTAGOSTINO, E.; MORFINI, M. On behalf of the Italian Association of Haemophilia. Principles of treatment and update of recommendations for the management of haemophilia and congenital bleeding disorders in Italy *Centres Blood Transfus* 12(4): p. 575-598, 2014.

SALVIATO et al. F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 13(4): 361-372, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTAGOSTINO, E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use. *Drug Des Devel Ther* 8: p. 2507-2515, 2014.

SILVA, M.; LUCK, J.V.; LEISSINGER, C. Opinions on radiosynovectomy for chronic haemophilic synovitis: point/counterpoint. *Haemophilia* 18: p. 836-842, 2012.

SILVA, M.C.; RESENDE, C.C.; VECHI, D.P. Frequência da infecção pelo vírus da síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV) em hemofílicos e portadores de

doença de Von Willebrand no Brasil. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter 16 (166): p. 243-9, 1994.

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

SRIVASTAVA, A.; BREWER, A.K.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P.; KEY, N.S.; KITCHEN, S.; LLINAS, A.; LUDLAM, C.A.; MAHLANGU, J.N.; MULDER, K.; POON, M.C.; STREET, A. Guidelines for the management of hemofilia. Haemophilia: p. 1–47, 2012.

TAGARIELLO, G.; BELVINI, D.; SALVIATO, R.; ARE, A.; DE BIASI, E.; GOODEVE, A.; DAVOLI, P.G. Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. Haematologica 85: p. 525-529, 2000.

TANTAWY, A.A.G. Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. Egyptian Journal of Medical Human Genetics 11(2): 105-114, 2010.

TRAORE, A. N.; CHAN, A.K.C.; WEBERT, K.E.; HEDDLE, N.; RITCHIE, B.; ST-LOUIS, J.; TEITEL, J.; LILLICRAP, D.; IORIO, A.; WALKER, I. First analysis of 10-year trends in national factor concentrates usage in haemophilia: data from CHARMS, the Canadian Hemophilia Assessment and Resource Management System. Haemophilia 20: e251–e259, 2014.

VALLONE, P.M.; BUTLER, J.M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. BioTechniques 37: p. 226-231, 2004.

WALSH, C.E.; SOUCIE, J.M.; MILLER, C.H. Impact of inhibitors on hemophilia A mortality in the United States. Am J Hematol 90 (5): p. 400-5, 2015.

WHITE, G.C. 2nd; ROSENDAL, F.; ALEDORT, L.M.; LUSHER, J.M.; ROTHSCHILD, C.; INGERSLEV, J. Definitions in hemophilia: on behalf of the

Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 85 (3): p. 560, 2001.

WITMER, C.; YOUNG, G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. *Ther Adv Hematol* 4 (1): p. 59–72, 2013.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. Guidelines for the Management of Hemophilia, 2012. Disponível em <<http://www.wfh.org/publications>> acesso em 19 de julho de 2015.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA (WFH). Treatment of hemophilia: Genetic counseling for hemophilia, 2015. 25p.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA (WFH). Annual Global Survey, 2014. Disponível em <<http://www.wfh.org/en/resources>> acesso em 22 de fevereiro de 2016.

APÊNDICE A - PROPOSTA DE PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DAS PORTADORAS DA HEMOFILIA A.

1. INTRODUÇÃO

A hemofilia A é um distúrbio da coagulação em que há ausência ou redução na produção do FVIII da coagulação, levando a uma tendência a sangramentos, que podem ser espontâneos ou após pequenos traumas. A tendência ao sangramento é proporcional à concentração do FVIII.

Sendo a hemofilia uma doença hereditária ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene *F8*, afeta preferencialmente os homens, sendo as mulheres portadoras. A expectativa é de que existam três possíveis portadoras para cada homem com hemofilia.

O nível de FVIII nas portadoras costuma ser em torno de 50% do nível das mulheres não portadoras, devido à inativação do cromossomo X, mas estes níveis podem variar desde valores muito baixos até valores acima do normal. Por esta razão, algumas portadoras tem nível de FVIII no mesmo patamar que hemofílicos moderados, necessitando de suporte hemostático durante cirurgias, após traumas e no parto.

É de fundamental importância realizar o diagnóstico das portadoras, a fim de proporcionar tratamento adequado quando necessário, oferecer aconselhamento genético e realizar o diagnóstico precoce de hemofilia nos filhos afetados dessas mulheres.

Uma vez que os níveis de FVIII são extremamente variáveis nas portadoras e os sintomas hemorrágicos são diretamente ligados à diminuição do FVIII, é importante realizar o acompanhamento clínico e laboratorial em todas as Portadoras Obrigatórias e nas Possíveis Portadoras do gene da hemofilia A.

1.1 Assim que for realizado o diagnóstico de Hemofilia A, classificar a mãe do paciente afetado em Portadora Obrigatória ou Possível Portadora, segundo os critérios da Federação Mundial de Hemofilia:

Portadoras Obrigatórias são:

- Todas as filhas de um homem com hemofilia;
- Mãe de um filho com hemofilia e pelo menos um membro da família com hemofilia (irmão, avô materno, tio, sobrinho ou primo);
- Mãe de um filho com hemofilia e um membro da família que é portadora do

gene da hemofilia (mãe, irmã, avó materna, tia, sobrinha, prima);

- Mãe de dois ou mais filhos com hemofilia ou um filho com hemofilia e uma filha que também é mãe de hemofílico.

Possíveis Portadoras são:

- Todas as filhas de portadora
- Mãe de um filho com hemofilia sem outros membros da família com hemofilia ou que sejam portadoras de hemofilia
- Irmãs, mães, avó materna, tias, sobrinhas, primas de portadoras.

Portadoras Excluídas: mulheres que possuem um hemofílico na família do lado paterno, sem que seu próprio pai seja afetado.

1.2 Se o paciente possuir irmãs, realizar esta mesma classificação quanto ao estado de portadora.

1.3 Fornecer às demais mulheres da família, pelo lado materno, a oportunidade de realizar a classificação do estado de portadora.

1.4 Realizar a quantificação do FVIII em todas as Portadoras Obrigatórias e nas Possíveis Portadoras.

1.5 Se a dosagem do FVIII for inferior a 30%, cadastrar a paciente no sistema Hemovida web coagulopatias, do Ministério da Saúde, de acordo com a quantificação do FVIII:

< 1% = Hemofilia Grave

1% a 5% = Hemofilia Moderada

>5% = Hemofilia Leve

1.6 Fornecer orientação quanto à possibilidade de sangramento, de acordo com a quantificação do FVIII.

1.7 Encaminhar as portadoras obrigatórias em idade fértil para o serviço de aconselhamento genético.

1.8 Preencher o escore de sangramento da ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*) disponível em ww.isth.org/resource/resmgr/ssc/bleeding.

2. DIAGNÓSTICO

O estado de portadora é diagnosticado inicialmente pela história familiar de pacientes afetados pela hemofilia, de acordo com as definições citadas para portadora obrigatória e possível portadora.

A partir desta classificação, serão realizados testes de laboratório para confirmação do status.

- 1- Hemograma com contagem de plaquetas
- 2- Triagem da coagulação: Tempo e Atividade da Protrombina (TAP) e Tempo da Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)
- 3- Dosagem do Fator VIII
- 4- Dosagem do Co-fator da Ristocetina
- 5- Dosagem do Antígeno de von Willebrand
- 6- Estudo genético para confirmação da mutação no cromossomo X (metodologia indireta).

3. TRATAMENTO DOS EPISÓDIOS HEMORRÁGICOS NAS PORTADORAS

Apesar de que a maioria das portadoras é assintomática no dia-a-dia, elas podem apresentar hemorragia após trauma ou procedimentos cirúrgicos. Nesses casos, devem ser tratadas da mesma maneira que os pacientes hemofílicos. A dose e duração do tratamento dependerão do nível de Fator VIII e da gravidade do sangramento.

3.1 TRATAMENTO DE EPISÓDIOS HEMORRÁGICOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Menorragia

A menorragia pode aparecer desde a menarca ou em qualquer período da adolescência. As meninas com baixo nível de FVIII devem ser orientadas quanto a este sangramento, assim como devem conhecer as opções de tratamento.

Na maioria dos casos, a menorragia pode ser tratada com ácido tranexâmico (AT) nos primeiros dias do período menstrual, diminuindo a perda de sangue. A dose geralmente utilizada é de 10 mg/kg/dose, por via intravenosa a cada 8 horas, ou 15-20 mg/kg/dose a cada 8 horas, por via oral. Quando não houver resposta satisfatória ao AT, contraceptivos orais (CO) contendo estrógeno podem ser usados e se o uso for contínuo,

podem suprimir a menstruação.

Se estas terapias não tiverem sucesso, pode ser utilizada Desmopressina (DDAVP), na dose de 0.3µg/kg a cada 12 ou 24 horas (duas a três doses), sendo recomendada diluição em 50-250 mL de solução salina e infusão endovenosa em 30-40 minutos. Após a terceira dose a resposta é menos efetiva, devido ao esgotamento dos estoques de FVIII preexistentes. O DDAVP pode ser reutilizado após um intervalo de cinco dias.

Se o nível de FVIII for inferior a 5% pode ser necessária reposição de concentrado de FVIII, na dose de 15 a 20UI/kg. Pode ser utilizado AT em conjunto com o concentrado de FVIII.

É fundamental o acompanhamento com ginecologista, em parceria com o hematologista, para indicar a melhor terapia hormonal, quando esta se fizer necessária, além de excluir outras causas de sangramento.

3.1.2 Gravidez e Parto

A gravidez deve ser acompanhada por uma equipe multiprofissional, incluindo o hematologista com experiência em coagulopatias, obstetra e anestesista.

Os níveis de FVIII costumam aumentar duas a três vezes durante a gravidez, não havendo necessidade de tratamento de reposição nesse período. Durante o parto, a necessidade irá depender do nível de FVIII, portanto deve ser realizada esta quantificação no terceiro trimestre de gravidez. Se o nível de FVIII estiver acima de 50%, não há necessidade de reposição. Geralmente esta reposição é necessária quando acontecem complicações como ruptura uterina, parto cesariano ou episiotomia, de acordo com o quadro 1. O uso de DDAVP é contraindicado nesse período.

Deve ser realizada ultrassonografia no terceiro trimestre de gravidez para identificar o sexo do feto, que será importante para a decisão obstétrica da via de parto escolhida.

Como em nosso centro não há diagnóstico pré-natal disponível, deve ser evitado uso de fórceps ou qualquer procedimento traumático que possa levar à hemorragia no Sistema Nervoso Central (SNC), se o feto for do sexo masculino. A vitamina K deve ser dada ao Recém Nascido (RN) por via oral.

Se o feto for do sexo feminino, não é necessária nenhuma medida preventiva.

A portadora deve receber um plano, escrito, das medidas terapêuticas necessárias para o parto, que deve ser realizado em um hospital que tenha o acompanhamento de

médico hematologista. A troca de informações entre obstetra e o centro de tratamento deve acontecer durante toda a gravidez.

RN do sexo masculino deve ser encaminhado ao centro de tratamento de hemofilia, de preferência no primeiro mês de vida, para realizar a dosagem de fator VIII e receber as orientações quanto à administração de vacinas intramusculares.

3.1.3 Hemorragia Pós-parto

No período pós-parto, os níveis de FVIII vão diminuir progressivamente, podendo ocorrer hemorragia, principalmente nas portadoras com nível de FVIII menor que 5%. Nestas, deve ser feita a reposição com concentrado de FVIII (20UI/kg) durante 5-7 dias ou até o controle da hemorragia. Pacientes com nível de fator superior a 5% devem ser tratadas com ácido tranexâmico e, se o sangramento persistir, utilizar DDAVP.

O tratamento da anemia, se houver, deve ser iniciado prontamente.

3.1.4 Procedimentos cirúrgicos

Nos procedimentos cirúrgicos eletivos, deve haver o preparo das portadoras com baixos níveis de FVIII, do mesmo modo como ocorre nos hemofílicos. O objetivo é manter os níveis de fator em torno de 60%. Na maioria das vezes, a correção dos níveis de FVIII pode ser feita com DDAVP. Se houver necessidade de correção por mais de três dias, haverá necessidade de concentrado de FVIII, uma vez que após este período ocorre depleção dos estoques endógenos. A reposição nos casos de cirurgia deve ser feita de acordo com o nível de FVIII, como demonstrado no quadro 1.

3.1.5 Trauma

As portadoras devem estar bem informadas de que, se apresentam baixos níveis de FVIII, correm risco de sangramento grave após trauma. Portanto, em caso de trauma, acidentes de trânsito, contusão cerebral, trauma abdominal ou na região do pescoço, deve ser realizada a reposição com Fator VIII pelo tempo necessário (em geral uma semana), e acompanhamento com médico experiente no tratamento de hemofilia e monitoramento dos níveis de FVIII, para calcular a dose ideal e o intervalo entre as mesmas.

3.1.6 Extração Dentária

A maioria das portadoras refere hemorragia após extração dentária, algumas vezes com necessidade de transfusão de sangue (PLUG et al, 2006). Se o nível de FVIII for superior a 30%, ácido tranexâmico deve ser administrado, iniciando no dia anterior ao procedimento e mantido durante sete dias. Portadoras com nível de FVIII entre 5-30% devem receber ácido tranexâmico juntamente com DDAVP. Se o nível de FVIII for inferior a 5%, é necessária reposição com concentrado de FVIII (20UI/kg), além de ácido tranexâmico.

Nos casos não complicados, uma dose de DDAVP ou de concentrado de FVIII é suficiente para realizar a hemostasia, combinado com ácido tranexâmico durante sete dias. É necessário realizar sutura e medidas locais de hemostasia.

O quadro 1 resume o tratamento dos diversos episódios hemorrágicos nas portadoras.

Quadro 1. Tratamento dos episódios hemorrágicos nas portadoras de Hemofilia A

Nível de FVIII/ Sangramento	<5%	5%-30%	>30%
Metrorragia	AT CO FVIII 20UI/kg	AT CO DDAVP	AT CO DDAVP
Parto	FVIII 50UI/kg	FVIII 40UI/kg	FVIII 30UI/kg
Hemorragia pós Parto	AT FVIII 25UI/kg	AT DDAVP	AT DDAVP
Cirurgia	FVIII 50UI/kg	FVIII 40UI/kg	DDAVP
Extração Dentária	AT e FVIII 20UI/kg	AT e DDAVP	AT DDAVP
Procedimento invasivo	FVIII 50UI/kg	FVIII 40UI/kg	DDAVP
Trauma grave	FVIII 50UI/kg	FVIII 40UI/kg	DDAVP
Hemorragia	FVIII 20UI/kg	DDAVP	DDAVP
Hemorragia grave	FVIII 25UI/kg	DDAVP	DDAVP

Fonte: Adaptado da WFH (2008)

AT= Ácido Tranexâmico

CO= Contraceptivo Oral

DDAVP = Desmopressina; dose 0.3µg/kg

4. RECOMENDAÇÕES

4.1- Todas as portadoras obrigatórias e as possíveis portadoras devem ter o seu nível de FVIII quantificado;

4.2- Todas as portadoras com níveis de FVIII inferior a 50% devem realizar nova quantificação no terceiro trimestre de gravidez;

4.3- Portadoras com baixos níveis de FVIII devem ser tratadas como os hemofílicos leves.

4.4- Quando uma portadora apresentar níveis de FVIII inferior a 60% é indicado a correção dos níveis de FVIII após trauma grave, antes de procedimento cirúrgico, durante o parto e nos episódios hemorrágicos.

4.5- As portadoras devem estar bem informadas quanto à possibilidade de ter um filho com hemofilia.

4.6- As portadoras devem ser acompanhadas por equipe multiprofissional, com experiência em acompanhamento de pessoas com coagulopatias, de preferência em um CTH.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Manual de Hemofilia. Brasília: MS, 2015.

NATIONAL HEMOPHILIA FOUNDATION. MASAC guidelines for women with bleeding disorders and carriers of hemofilia A and B, 2009.

NORDIC HEMOPHILIA COUNCIL (NHC). Nordic hemofilia guidelines, 2015. Disponível em <<http://www.nordhemophilia.org>> acesso em 11 de novembro de 2016.

PEAKE I.R.; LILLICRAP D.P.; BOULYJENKOV, V.; BRIET, E.; CHAN, V.; GINTER, E.K.; et al. Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bulletin of the World Health Organization*; 71(3/4): p. 429-458, 1993.

PLUG, I., MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P., BROCKER-VRIENDS, A.H.J.T., VAN AMSTEL, H.K.P., VAN DER BOM, J.G., VAN DIEMEN-HOMAN J.E.M., *et al.* Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood* 108 (1): p. 52-56, 2006.

SAGER, R. Women with haemophilia: more than just carriers. *The Journal of Haemophilia Practice* 1 (2): 2-7, 2014.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA (WFH). Treatment of hemophilia: Genetic counseling for hemophilia, 2015. 25p.