

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E**  
**TOXICOLÓGICAS**

**FERNANDA MARTINS LOTT FONSECA**

**DIVERSIDADE DOS EFEITOS CLÍNICOS DA HEMOFILIA A: INFLUÊNCIA DE**  
**VARIANTES GENÉTICAS E AVALIAÇÃO GLOBAL DA HEMOSTASIA**

**Belo Horizonte**

**2018**

**FERNANDA MARTINS LOTT FONSECA**

**DIVERSIDADE DOS EFEITOS CLÍNICOS DA HEMOFILIA A: INFLUÊNCIA DE  
VARIANTES GENÉTICAS E AVALIAÇÃO GLOBAL DA HEMOSTASIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho – UFMG

Coorientador: Dr. Daniel Gonçalves Chaves  
– Fundação Hemominas

**Belo Horizonte**

**2018**

F676d Fonseca, Fernanda Martins Lott.  
Diversidade dos efeitos clínicos da hemofilia a: influência de variantes genéticas e avaliação global da hemostasia / Fernanda Martins Lott Fonseca. – 2018.

84 f. : il.

Orientadora: Maria das Graças Carvalho.  
Coorientador: Daniel Gonçalves Chaves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Hemofilia A – Teses. 2. Sangue – Coagulação – Teses. 3. Hemorragia – Teses. 4. Trombina – Teses. 5. Grupos sanguíneos – Teses. 6. Variação genética – Teses. 7. Hemostasia – Teses. I. Carvalho, Maria das Graças. II. Chaves, Daniel Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.14



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**DIVERSIDADE DOS EFEITOS CLÍNICOS DA HEMOFILIA A:  
INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS E AVALIAÇÃO GLOBAL  
DA HEMOSTASIA**

**FERNANDA MARTINS LOTT FONSECA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 05 de março de 2018, pela banca constituída pelos membros:

*Maria das Graças Carvalho*  
Prof.ª Maria das Graças Carvalho - Orientadora  
UFMG

*Daniel Gonçalves Chaves*  
Prof. Daniel Gonçalves Chaves  
HEMOMINAS

*Luciana Werneck Zuccherato*  
Prof.ª Luciana Werneck Zuccherato  
UFMG

*Karina Braga Gomes Borges*  
Prof.ª Karina Braga Gomes Borges  
UFMG

Belo Horizonte, 5 de março de 2018.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente.

À minha orientadora, professora Maria das Graças Carvalho pelo apoio, incentivo e ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Dr. Daniel Gonçalves Chaves pela sugestão do projeto de pesquisa, apoio e pela ajuda.

À Fundação Hemominas pela acolhida.

Ao departamento de Pesquisa da Fundação Hemominas por ceder o laboratório para as análises do estudo.

Aos pacientes com hemofilia A e suas famílias e doadores da Fundação Hemominas que voluntariamente participaram do estudo.

Aos colegas da Fundação Hemominas e Faculdade de Farmácia que colaboraram nas análises do projeto, Larissa, Marcos e Naomi.

À Dra. Rita Carolina Figueiredo Duarte pela colaboração no teste de geração de trombina.

À Professora Dra. Edna Afonso Reis, do Departamento de Estatística do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, pela orientação e realização das análises estatísticas.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelos ensinamentos.

Aos meus pais, que sempre priorizaram meus estudos, me incentivaram e apoiaram as minhas decisões.

À minha irmã pelo companheirismo.

Ao Thiago pelo incentivo, companheirismo, apoio e compreensão.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do estudo.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro do estudo.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

-Aristóteles

## RESUMO

A hemofilia A é um distúrbio hemorrágico ligado ao cromossomo X que atinge de 1-2 a cada 10.000 meninos nascidos vivos em todo mundo. Este distúrbio se caracteriza pela diminuição de Fator VIII circulante no plasma e é classificada de acordo com a atividade resultante desse fator em grave, moderada e leve. Sabe-se que há uma heterogeneidade de manifestações clínicas, sangramento e consumo de Fator VIII, entre indivíduos com a mesma classificação da hemofilia. Este estudo tem como objetivo investigar mutações e polimorfismos de proteínas da coagulação que poderiam influenciar na diversidade clínica dos pacientes com hemofilia moderada e grave e, ainda, determinar o potencial de geração de trombina dos mesmos. Foram incluídos no estudo 51 pacientes com hemofilia A moderada (n=13) e grave (n=38) atendidos na Fundação Hemominas e 37 doadores de sangues, como grupo controle. Foram realizados a análise dos dados clínicos dos pacientes, pesquisa de genótipos das mutações do Fator V Leiden (G1691A), da Protrombina (G20210A), polimorfismos do Fator VII (G10976A), da Proteína C (A-1641G e A-1476T) e Proteína S (A2148G), e teste de geração de trombina. Para verificar a influência das variantes genéticas, os pacientes foram distribuídos em dois grupos, baixo perfil hemorrágico e alto perfil hemorrágico, de acordo com o consumo do fator VIII, em U/kg/ano. Não foram encontradas diferenças nas frequências alélicas das variantes genéticas entre os dois grupos. A geração de trombina dos pacientes foi significativamente menor do que a dos controles, porém não houve diferença entre a geração de trombina dos dois grupos de pacientes, com relação ao perfil hemorrágico. Contrariamente, houve diferença significativa dos parâmetros de geração de trombina entre pacientes com tipo sanguíneo não-O e O. Conclui-se que a presença de variações genéticas nos genes das proteínas envolvidas na coagulação e anticoagulação natural e o potencial de geração de trombina não influenciaram manifestações hemorrágicas de pacientes com hemofilia A moderada e grave. Esse estudo foi realizado em um número limitado de amostras, portanto novos estudos devem ser feitos em uma amostragem mais robusta visando investigar fatores que contribuam para a variedade clínica dos pacientes com hemofilia A.

**Palavras-chave:** Hemofilia A. Perfil hemorrágico. Variantes genéticas. Geração de trombina. Grupo sanguíneo ABO.



## ABSTRACT

Hemophilia A is an X-linked hemorrhagic disorder that affects 1-2 boys born alive worldwide. This disorder is characterized by the decrease of circulating Factor VIII in plasma and is classified according to the activity resulting from this factor in severe, moderate and mild. It is known that there is a heterogeneity of clinical manifestations, bleeding and consumption of Factor VIII, among individuals with the same classification of hemophilia. This study aims to investigate mutations and polymorphisms of coagulation proteins that could influence the clinical diversity of patients with moderate and severe haemophilia and to determine ~~verify~~ the thrombin generation potential of these patients. The study included 51 patients with moderate (n = 13) and severe (n = 38) haemophilia A attended at the Hemominas Foundation and 37 blood donors, as a control group. We have performed analysis of the clinical data of the patients, genotyping of the Factor V Leiden (G1691A), Prothrombin (G20210A), Factor VII (G10976A), Protein C (A-1641G and A-1476T) and of Protein S (A2148G), and thrombin generation test. To investigate the influence of the genetic variants, the patients were distributed in two groups, low and high hemorrhagic profiles, according to factor VIII consumption, in U / kg / year. No differences were found in the allelic frequencies of the genetic variants between the two groups. The thrombin generation of the patients was significantly lower than that of the controls, but there was no difference between the thrombin generation of the two groups of patients, in relation to the hemorrhagic profile. In contrast, there was a significant difference in thrombin generation parameters between patients with non-O and O blood types. It was concluded that the presence of genetic variations in the genes of the proteins involved in the coagulation and natural anticoagulation, and the potential of thrombin generation did not influence hemorrhagic manifestations of patients with moderate and severe hemophilia A. This study was performed in a limited number of samples, therefore new studies should be done in a more robust sample to investigate factors that contribute to the clinical variety of patients with hemophilia A.

**Keywords:** Hemophilia A. Hemorrhagic profile. Genetic variants. Thrombin generation. ABO blood type.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cascata de coagulação sanguínea dividida em vias intrínseca, extrínseca e comum.....	16
Figura 2 - Modelo celular da coagulação sanguínea.....	18
Figura 3 - Inversões do FVIII.....	22
Figura 4 - Princípio do método de Geração de Trombina por CAT (Calibrated Automated Thrombogram). .....	27
Figura 5 - A curva de geração de trombina é descrita em <i>Lag time</i> , <i>peak time</i> , <i>peak height</i> e <i>endogenous thrombin potencial</i> – ETP.....	28
Figura 6 - Análise do perfil de sangramentos espontâneos e consumo de FVIII dos pacientes incluídos no estudo. ....	44
Figura 7- Frequência genotípica do polimorfismo Arg353Gln para o FVII.....	45
Figura 8 - Frequência genotípica do polimorfismo A – 1641G para a proteína C.....	46
Figura 9 - Frequência genotípica do polimorfismo A- 1476T para a proteína C.....	47
Figura 10 - Frequência genotípica do polimorfismo A2148G para a proteína S.....	47
Figura 11 - Perfil de Geração de Trombina em função do tempo.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> e tamanhos de fragmentos da genotipagem do FV em reação RFLP.....	36
Tabela 2 - <i>Primers</i> e tamanhos de fragmentos da genotipagem do polimorfismo Arg353Gln para o fator VII em reação RFLP.....	37
Tabela 3 - <i>Primers</i> e tamanhos de fragmentos da genotipagem da mutação G20210A para a protrombina em reação RFLP.....	38
Tabela 4 - <i>Primers</i> e tamanhos de fragmentos das genotipagens dos polimorfismos A-1641G e A -1476T para a proteína C em reação RFLP.....	39
Tabela 5 - <i>Primers</i> e tamanhos de fragmentos da genotipagem do polimorfismo A2148G para a proteína S em reação RFLP .....	40
Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes com hemofilia A grave e moderada expressas em mediana e intervalo interquartilico (IQR).....	42
Tabela 7 - Dados gerais dos pacientes com hemofilia A.....	43
Tabela 8 - Características clínicas dos pacientes com hemofilia A com baixo e alto perfil hemorrágico expressas em mediana e intervalo interquartilico (IQR).....	44
Tabela 9 - Frequência alélica dos polimorfismos nos grupos APH e BPH.....	48
Tabela 10 - Frequência dos genótipos na população com hemofilia A estudada e em diferentes grupos populacionais.....	49
Tabela 11 - Frequência dos genótipos do polimorfismo A-1476T da proteína C na população com hemofilia A estudada e na população brasileira.....	49
Tabela 12 - Análise comparativa dos parâmetros de geração de trombina em mediana e IQR dos grupos controle e pacientes com hemofilia A.....	50

Tabela 13 - Comparação dos parâmetros de geração de trombina entre pacientes com hemofilia A e os grupos sanguíneos não - O e O, expressos em mediana.....52

Tabela 14 - Análise dos parâmetros de geração de trombina dos grupos BPH e APH dos pacientes com hemofilia A.....53

Tabela 15 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros de geração de trombina do grupo controle.....54

Tabela 16 - Comparação entre os parâmetros de geração de trombina no grupo controle em relação aos grupos sanguíneos não - O e O.....54

Tabela 17 - Análise do grupo sanguíneo ABO dos perfis hemorrágicos dos pacientes com hemofilia A.....55

Tabela 18 - Perfis hemorrágicos dos pacientes com hemofilia A em função dos grupos sanguíneos não - O e O.....56

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

- APH – Alto perfil hemorrágico
- BPH – Baixo perfil hemorrágico
- CAT – *Calibrated automated thrombogram*
- DP – Desvio Padrão
- ETP – *Endogen thrombin potential*
- FIX – Fator IX
- FIXa – Fator IX ativado
- FT – Fator tissular
- FV – Fator V
- FVa – Fator V ativado
- FVII – Fator VII
- FVIIa – Fator VII ativado
- FVIII – Fator VIII
- FVIIIa – Fator VIII ativado
- FvW – Fator de von Willenbrand
- FX – Fator X
- FXa – Fator X ativado
- FXI – Fator XI
- FXIa – Fator XI ativado
- FXII – Fator XII
- FXIIa – Fator XII ativado
- HA – Hemofilia A
- HBH – Hemocentro de Belo Horizonte
- IQR – Intervalo interquartílico
- nAPCsr – *Normalized activated protein C sensitivity ratio*
- PC – Proteína C
- PCa – Proteína C ativada
- PPP – Plasma pobre em plaquetas
- PS – Proteína S
- RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- RS – *Reference snip cluster ID*
- TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
- TGT – Teste de geração de trombina

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	15
2. Revisão bibliográfica.....	16
2.1. Hemostasia.....	16
2.2. Hemofilia A.....	19
2.3. Características clínicas dos pacientes com hemofilia A.....	20
2.4. Fator VIII.....	21
2.5. Fator VII.....	22
2.6. Fator V.....	23
2.7. Proteína C.....	23
2.8. Proteína S.....	24
2.9. Protrombina (fator II).....	24
2.11. Teste de geração de trombina.....	25
2.12. Grupo sanguíneo ABO.....	28
3. Hipótese .....	30
4. Importância do estudo.....	31
5. Objetivos .....	32
5.1. Objetivo geral .....	32
5.2. Objetivos específicos.....	32
6. Metodologia.....	34
6.1. Seleção de pacientes, grupo controle, coleta e processamento de amostras.....	34
6.2. Análise dos dados clínicos .....	34
6.3. Grupo sanguíneo ABO .....	35
6.4. PCR-RFLP .....	35
6.4.1. Fator V Leiden.....	36
6.4.2. Fator VII.....	36
6.4.3. Protrombina.....	37

6.4.4. Proteína C -1641 e -1476 .....	38
6.4.5. Proteína S .....	39
6.6. Análise estatística.....	41
7. Resultados .....	42
7.1. Partipantes do estudo e dados clínicos dos pacientes com hemofilia A.....	42
7.2. Hemofilia A e análise de dados genéticos.....	45
7.3. Hemofilia A e análise de geração de trombina (GT).....	50
7.4. Hemofilia A, análise de GT e grupo sanguíneo ABO .....	51
7.5. Hemofilia A, consumo de fator e grupo sanguíneo ABO .....	55
8. Discussão.....	57
9. Considerações finais .....	64
10. Conclusões.....	65
11. Referências bibliográficas .....	66
ANEXOS .....	77
ANEXO 1 .....	77
ANEXO 2.....	78
ANEXO 3.....	79
ANEXO 4.....	80

## 1. INTRODUÇÃO

A hemofilia A é a coagulopatia hereditária ligada ao cromossomo X mais comum, atingindo 1-2 em 10.000 meninos nascidos vivos. Como complicações decorrentes da hemofilia têm-se hemorragias em mucosas e em articulações, que podem causar artropatias irreversíveis com perda de movimentação motora.

A literatura tem reportado que, apesar dos pacientes com hemofilia A grave apresentarem níveis de fator VIII (FVIII) menor que 1%, ocorre uma grande diversidade nas manifestações clínicas individuais. Como o número de eventos hemorrágicos e a necessidade de reposição do FVIII têm sido heterogêneos entre aqueles com hemofilia A grave, há necessidade de estudos adicionais com o objetivo de entender melhor os mecanismos envolvidos na diversidade dos efeitos da doença nestes pacientes. Este fato bastante intrigante tem remetido à ideia da existência de fatores que contrapõem à predisposição hemorrágica de pacientes graves.

À luz do conhecimento que polimorfismos em genes de proteínas da coagulação e da anticoagulação natural podem favorecer um estado de hipercoagulabilidade, vislumbra-se no presente estudo investigar se a presença de tais alterações poderia, pelo menos em parte, explicar o vasto espectro de manifestações clínicas nos pacientes com hemofilia A grave.

Nesse contexto, o presente estudo pretende analisar a hipótese de que a presença de polimorfismos nos genes das proteínas envolvidas na coagulação e anticoagulação natural podem influenciar as manifestações hemorrágicas de pacientes com hemofilia A grave.

Maiores esclarecimentos sobre esta questão poderão contribuir para um melhor manejo clínico dos sangramentos dos pacientes e conhecer as tendências hemorrágicas dos mesmos.

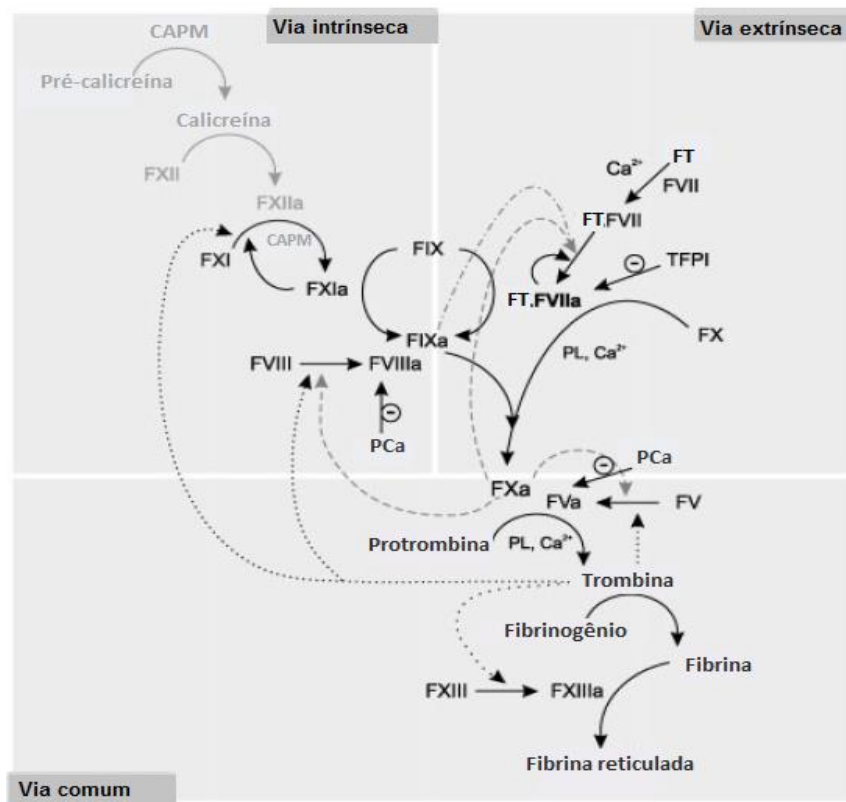


## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. HEMOSTASIA

A hemostasia é o sistema fisiológico responsável por manter a fluidez do sangue no interior dos vasos e, também, por impedir extravasamento sanguíneo quando estes sofrem danos. Os componentes envolvidos na hemostasia incluem o endotélio dos vasos sanguíneos, as plaquetas e as proteínas plasmáticas como fatores de coagulação e de anticoagulação (VERSTEEG *et al.*, 2013). Em 1964, foi proposto por MacFarlane um modelo de cascata para a coagulação (**Figura 1**), no qual os fatores de coagulação agem como zimogênios que são ativados por outros fatores ativados anteriormente em reações sucessivas que culminam com a formação da fibrina e, conseqüentemente, do coágulo.

**Figura 1 - Cascata de coagulação sanguínea dividida em vias intrínseca, extrínseca e comum.**



**Fonte:** SPRONK, GOVERS-RIEMSLAG, TEN CATE, 2003. **Legenda:** As setas pretas indicam as reações que culminam com a formação do coágulo de fibrina. As setas pontilhadas apresentam os locais de atuação da trombina. As setas tracejadas reações onde o sistema de anticoagulação natural atua.

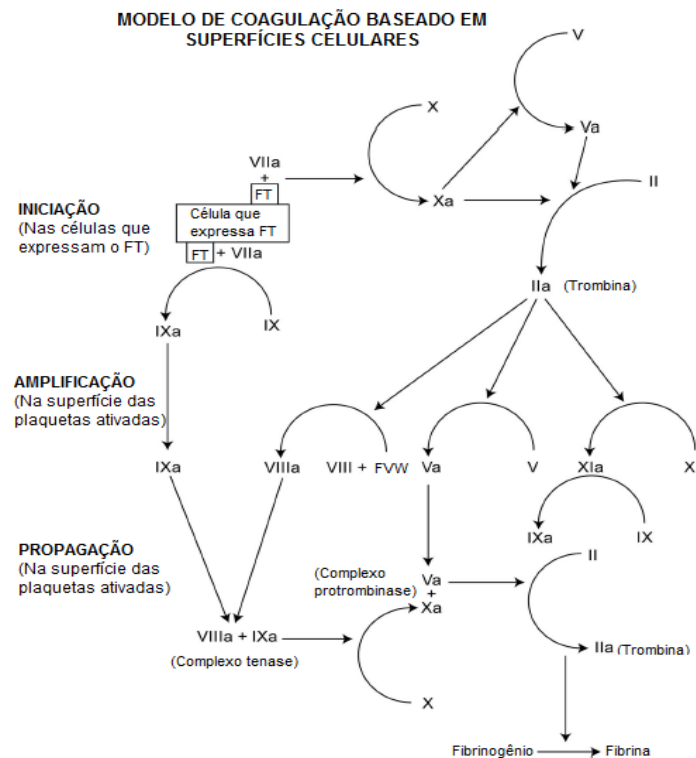
Conforme revisado por Dahlbäck & Villoutreix (2005), a hemostasia primária (dependente de plaquetas) e a coagulação do sangue evoluíram como importantes mecanismos de defesa. Quando há uma lesão vascular, inicialmente ocorre a formação do tampão de plaquetas e, simultaneamente, a ativação do sistema de coagulação pelo fator tecidual (FT) exposto pelas células lesionadas. O fator VII (FVII) circulante é ativado (FVIIa) e se liga ao FT gerando o complexo FT-FVIIa que ativa eficientemente o fator X (FX). O fator XII, por sua vez, ativado previamente por polifosfatos carregados negativamente secretados pelos grânulos densos de plaquetas ativadas (MULLER et al., 2009), ativa o fator XI que converte o fator IX à sua forma ativada (FIXa). O FIXa, juntamente com o fator VIII ativado (FVIIIa), ativado previamente pela trombina, e cálcio iônico, formam o complexo tenase, o qual é formado na superfície de membranas celulares carregadas negativamente como, por exemplo, nas plaquetas ativadas e no endotélio. O complexo tenase também é capaz de ativar o FX a FXa. O FXa, em conjunto com o fator V ativado (FVa), também ativado pela trombina, mais o cálcio iônico, formam o complexo protrombinase, que assim como o complexo tenase, é formado em superfícies de membranas celulares carregadas negativamente. Esse complexo ativa a protrombina (fator II) em trombina (fator II ativado). A trombina formada ativa o fibrinogênio (fator I) a fibrina (fator I ativado). A fibrina é responsável pela formação de uma rede capaz de estabilizar o coágulo. Conforme citado acima, a trombina apresenta outras funções pró-coagulantes ativando FV, FVIII e plaquetas, além de ativar o FXIII (FXIIIa) que estabilizará a fibrina formada. Ainda segundo Dahlbäck & Villoutreix (2005), a coagulação sanguínea é controlada por vários anticoagulantes naturais, cuja ação em condições normais prevalece sobre o potencial pró-coagulante. Um sistema anticoagulante natural, composto pelas proteínas C e S exerce o seu efeito anticoagulante através da regulação da atividade de FVa e FVIIIa, os co-factores dos complexos protrombinase e tenase, respectivamente.

A proteína C (PC) circula como um zimogênio e é ativada pela trombina ligada à trombomodulina (TM), proteína de membrana endotelial, com a participação do EPCR (*Endothelial Protein C Receptor*). Os dois co-factores, proteína S (PS) e a forma intacta do FV, aumentam a atividade anticoagulante da proteína C ativada. A proteína S é suficiente para a inativação de FVa, ao passo que a regulação de FVIIIa no complexo tenase requer a contribuição sinérgica de PS e FV. Além da PC e da PS, o

mecanismo da anticoagulação natural é mediado também pela ação do inibidor da via do fator tissular (TFPI), impedindo o desencadeamento da via extrínseca. A antitrombina (AT) inibe a ativação da trombina, fator essencial para ativação de outros fatores da cascata (DAHLBÄCK & VILLOUTREIX, 2005) (**Figura 1**).

Embora o modelo clássico da cascata de coagulação suporte a avaliação laboratorial de distúrbios da hemostasia, demonstrando a interação entre os diferentes fatores, ele não é capaz de explicar adequadamente os mecanismos que conduzem o processo hemostático *in vivo*. Além disso, o modelo de cascata não consegue explicar porque a deficiência de um determinado fator não é compensada pelos fatores da outra via. Como a hipótese da cascata não pode explicar várias tendências hemorrágicas e diversas observações clínicas que resultam da deficiência de diferentes componentes das duas vias foi proposto um novo modelo para a coagulação baseado em superfícies celulares. Esse modelo enfatiza a interação de fatores da coagulação com superfícies celulares específicas ocorrendo em três etapas que se sobrepõem: iniciação, amplificação e propagação (HOFFMAN, 2003; VINE & ANDREW, 2009) (**Figura 2**).

**Figura 2 - Modelo celular da coagulação sanguínea**



Fonte: VINE & ANDREW, 2009.

Conforme revisado por VINE & ANDREW, 2009 A fase de iniciação começa com o contato entre o FVII circulante no sangue e células que expressam o FT, que rapidamente se ligam, ativando o FVII. O complexo FT/FVIIa ativa o FX e o FIX. Por sua vez, o FXa ativa o FV. Se houver dissociação entre o FXa e a superfície da célula, ele pode ser inativado pela antitrombina III e o inibidor da via do FT. O FXa ligado à superfície celular juntamente com o FVa convertem uma pequena quantidade de protrombina em trombina, essencial na fase de amplificação.

Na fase de amplificação, as plaquetas se aderem ao colágeno subendotelial através de uma ponte entre a glicoproteína Ia/IIa, presente na superfície celular, e o Fator von Willebrand (FvW), ativando-as. A trombina gerada na primeira fase amplifica esse processo ativando as plaquetas, aumentando a adesão plaquetária. A trombina também ativa o FV, o FVIII, através da clivagem da ligação entre FVIII e FvW, e o FXI.

Na fase de propagação há a formação dos complexos tenase e protrombinase, que também ocorrem na superfície das plaquetas. O FIXa, essencial para o complexo tenase, desloca-se da superfície das células com FT, onde foi ativado na primeira fase, para as plaquetas ativadas. Como resultante da atuação desses complexos, há a formação de mais trombina que atua convertendo o fibrinogênio em fibrina.

## **2.2. HEMOFILIA A**

A hemofilia A (HA) é um dos distúrbios hemorrágicos mais comuns com transmissão hereditária, sendo que cerca de 2/3 dos pacientes apresentam histórico familiar da doença (GRAW *et al.* 2005). Essa coagulopatia resulta da deficiência ou da baixa atividade do FVIII circulante. Os indivíduos afetados pela doença apresentam tempo prolongado de coagulação sanguínea e, não raro, sangramentos espontâneos. O gene para o fator VIII (FVIII) está localizado no cromossomo X e a HA apresenta herança recessiva ligada a esse cromossomo (HOYER, 1994). A frequência da hemofilia A é de 1-2 em 10.000 (0,01-0,02%) meninos nascidos vivos em todos os grupos étnicos (RIZZA & SPOONER, 1983; HOYER, 1987). Em 2015, no Brasil, 9.908 pacientes com hemofilia A estavam registrados, sendo que 855 deles eram de Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A gravidade e a frequência de hemorragias

nos pacientes estão diretamente relacionadas à atividade residual do FVIII no plasma. Nesse mesmo ano, 39,36% dos diagnósticos de HA se referiam à forma grave da doença, com atividade de FVIII menor que 1% do normal. Esses pacientes apresentam frequentes hemorragias espontâneas nas articulações, músculos e órgãos internos. A forma moderada da HA, caracterizada por atividade de FVIII de 2-5% do normal, ocorreu em 22,98% dos pacientes, os quais apresentam quadros hemorrágicos após pequenos traumas. A forma leve, a qual ocorreu em 24,67% dos pacientes, está associada à atividade do FVIII de 5-40%, quando ocorrem hemorragias somente após traumas significativos ou cirurgias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O tratamento adequado desta doença requer infusões de concentrados do FVIII purificado de plasma humano ou FVIII recombinante. O esquema de administração de dose pode ser a profilaxia ou sob demanda. A primeira é de caráter preventivo e consiste no uso regular dos fatores de coagulação, mesmo na ausência de sangramentos. Ela pode ser classificada em primária, iniciada antes da primeira hemartrose e até os 3 anos de idade, secundária, iniciada após duas ou mais hemartroses e antes de evidência de alteração osteocondral, e terciária, iniciada após alteração osteocondral. A profilaxia é uma das principais medidas disponíveis para garantir a integridade física dos pacientes. O tratamento sob demanda é a administração dos fatores de coagulação somente após a ocorrência de um sangramento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

### **2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM HEMOFILIA A**

Os pacientes com HA grave (menos de 1% da atividade residual de FVIII) têm geralmente 15-35 sangramentos espontâneos musculares por ano quando não recebem tratamento profilático (SCHRAMM *et al.*, 2002; MOLHO *et al.*, 2000; ALEDORT *et al.*, 1994). Essas hemorragias, quando ocorrem nas articulações, podem levar a artropatias irreversíveis, incapacidade de movimento e subsequente perda de participação plena na sociedade. No entanto, existe uma considerável heterogeneidade na apresentação clínica da doença em suas formas moderada e grave. Uma parcela dos pacientes (10-15%) com HA grave, por exemplo, tem a doença clinicamente leve, ou seja, apresenta número de sangramento semelhante àqueles que têm hemofilia leve (ALEDORT *et al.*, 1994; POLLMANN *et al.*, 1999; MOLHO *et al.*, 2000; BOLTON-MAGGS & PASI, 2003). Variações importantes na

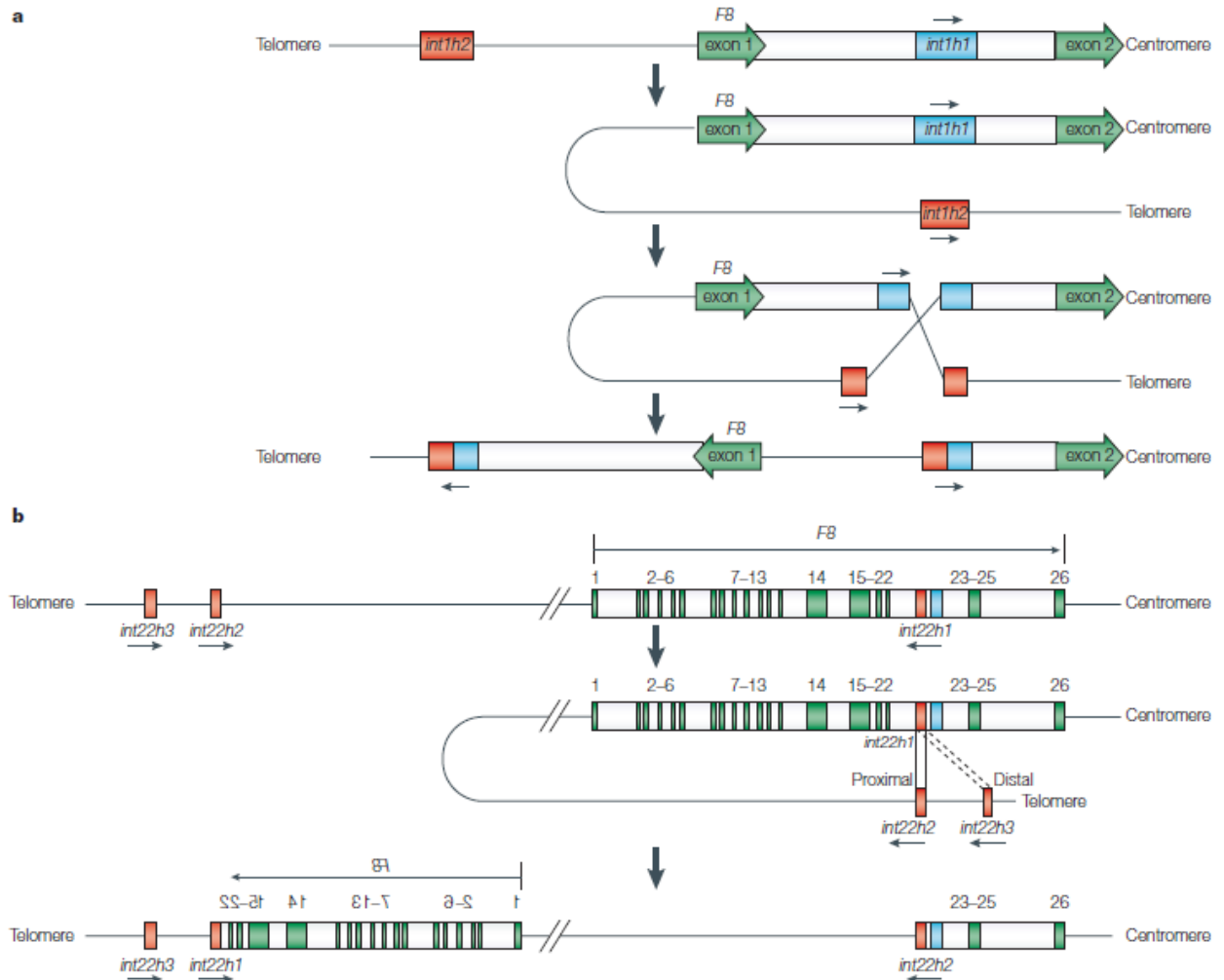
frequência dos sangramentos, na idade dos pacientes quando do primeiro sangramento e na extensão dos danos nas articulações têm sido relatadas em pacientes com hemofilia A grave por muitos grupos (ALEDORT *et al.*, 1994; POLLMANN *et al.*, 1999; MOLHO *et al.*, 2000; BOLTON-MAGGS & PASI, 2003; BLANCHETTE *et al.*, 2004). Embora a heterogeneidade fenotípica seja intrigante, poucos estudos têm tentado resolver a sua base. Fatores, tais como níveis variáveis de atividade de FVIII abaixo de 1%, a farmacocinética do concentrado de fator de coagulação infundido, o tipo de mutação e a presença concomitante de fatores pró-trombóticos têm sido associados ao fenótipo variável da HA grave (ESCURIOLA *et al.*, 2001; GHOSH *et al.*, 2001; SHIMA *et al.*, 2002; TUTEN *et al.*, 2004; BELTRAN-MIRANDA *et al.*, 2005; KUBISZ *et al.*, 2005; VAN DIJK *et al.*, 2005; BUTENAS, 2006; SHETTY *et al.*, 2007; BRUMMEL-ZIEDINS, 2011; AR *et al.*, 2009; FRANCHINI, 2010; DI PERNA *et al.*, 2011; ROJNUCKARIN *et al.*, 2012; RENDO *et al.*, 2013; KACHOOEI *et al.*, 2014;).

#### 2.4. FATOR VIII

O FVIII é uma glicoproteína sintetizada principalmente em hepatócitos, mas também nos rins, células endoteliais e tecido linfático. Seu gene está localizado no cromossomo X (Xq28). A proteína madura possui 2.332 aminoácidos e tem o peso molecular de aproximadamente 265 kDa, sendo uma das maiores proteínas plasmáticas. O FVIII circula no plasma associado ao FvW em uma ligação não-covalente (VEHAR *et al.*, 1984; GITSCHIER *et al.*, 1984; TOOLE *et al.*, 1984). Esse complexo protege o FVIII de uma proteólise prematura, aumentando seu tempo de meia-vida para 12 horas. Duas mutações no gene do FVIII são mais comuns em portadores de HA grave, sendo elas a inversão do intron 1, presente em 1-4% dos casos, e do intron 22 (**Figura 3**) presente em 50% dos casos. Essas mutações são causadas por uma recombinação com uma região homóloga fora do FVIII. Na inversão do intron 1 (int1h1), a região homóloga (int1h2) está localizada a aproximadamente 140 kb do telômero. Uma recombinação homóloga intracromátide e intracromossomal desloca o exon 1 para 140 kb do telômero. Na inversão do intron 22 (int22h1), há duas regiões homólogas (int22h2 e int22h3) a ele localizadas a aproximadamente 500 kb do gene do FVIII em direção ao telômero. Uma

recombinação intracromossomal entre o intron 22 e umas das regiões homólogas leva a uma inversão de parte do gene do FVIII (GRAW *et al.* 2005).

**Figura 3 - Inversões do FVIII**



**FONTE:** GRAW *et al.* 2005. **Legenda:** a- inversão do intron 1. b – inversão do intron 22.

## 2.5. FATOR VII

O Fator VII (FVII) é um zimogênio vitamina K-dependente composto de 406 aminoácidos (HAGEN *et al.*, 1986). É sintetizado pelos hepatócitos e secretado no sangue, onde circula a uma concentração média de 0,5 µg/mL (FAIR, 1983). Os níveis de FVII são regulados por fatores ambientais e genéticos. Um polimorfismo, caracterizado por uma mudança do nucleotídeo G para A na posição 10.976 do gene do FVII resulta na troca de uma Arginina por uma Glutamina, Arg353Gln (G10976A), na proteína madura. Na forma de homozigose, esse polimorfismo reduz os níveis de

FVII em 50% e, quando em heterozigose, em 25% (HUNAULT *et al.*, 1997). No caso de presença desse polimorfismo, o indivíduo estará mais hipocoagulado, e espera-se que o indivíduo com hemofilia que possua esse polimorfismo tenha a sua clínica agravada.

## 2.6. FATOR V

O fator V (FV) da coagulação é uma grande glicoproteína plasmática de 330 kDa que circula com baixa ou nenhuma atividade residual. O FV é convertido à sua forma ativa (FVa) pela trombina. Após ativação, sua cadeia pesada se associa à cadeia leve por íons de cálcio. O FVa é uma proteína essencial para a cascata de coagulação e atua como cofator na conversão da protrombina a trombina pelo FXa. Após sua atuação, o FVa é inativado pela Proteína C ativada (KANE & DAVIE, 1986; CRIPE *et al.*, 1992). Alguns indivíduos apresentam casos de trombose devido à resistência do FVa à ação da Proteína C ativada causada pela mutação R506Q no gene *F5* (BERTINA *et al.*, 1994). Essa variante é conhecida como fator V Leiden (FVL) e tem sido frequentemente pesquisada em casos de trombofilia. Em um estudo realizado por RAMACCIOTTI *et al* em 2003 em pacientes com câncer na cidade de São Paulo, 1,5% dos pacientes que apresentaram tromboembolismo venoso tinham o FVL em heterozigose e 2,7% dos pacientes que não apresentaram tromboembolismo venoso tinham essa mutação do FV. Em grande parte dos países desenvolvidos, onde a frequência dessa mutação é maior, a variante Leiden é pesquisada em pacientes com hemofilia para se tentar prevenir casos de trombose devido à infusão de grandes quantidades de concentrados de FVIII (cirurgias e hemorragias importantes) (SHETTY *et al*, 2007; FRANCHINI e LIPPI, 2010).

## 2.7. PROTEÍNA C

A proteína C (PC) é um zimogênio e sua forma ativada desempenha um papel importante na regulação da coagulação, na inflamação, apoptose e na manutenção da permeabilidade das paredes dos vasos sanguíneos. Nesse contexto, a proteína C ativada (APC) inativa proteoliticamente os FVa e FVIIIa. Em humanos, a proteína C é codificada pelo gene *PROC*, que é encontrado no cromossomo 2 (FOSTER *et al.*, 1985). Por causa do papel crucial que a proteína C desempenha como um



anticoagulante, indivíduos com deficiência dessa proteína ou algum tipo de resistência à APC, apresentam um aumento significativo do risco de formar coágulos (trombose). No caso de pacientes com HA, a diminuição nos níveis de atividade da proteína C pode estar associada a um efeito atenuador dos episódios hemorrágicos. Alguns polimorfismos na região promotora do gene *PROC* (C-1654T, A -1641G e A-1476T) estão significativamente associados à síntese diferencial de proteína C, podendo, a princípio, influenciar os diferentes quadros hemorrágicos de pacientes com HA (SPEK *et al.*, 1994).

## 2.8. PROTEÍNA S

A proteína S (PS) é uma glicoproteína plasmática dependente de vitamina K sintetizada no endotélio. Na circulação, a proteína S pode ser encontrada em duas formas: livre ou complexada à proteína do complemento C4b. Em humanos, a proteína S é codificada pelo gene *PROS1* (LUNDWALL *et al.*, 1986; LONG *et al.*, 1988). A proteína S participa das vias de anti-coagulação, quando sua forma livre atua como um cofator da proteína C na inativação dos fatores V e VIII (CASTOLDI *et al.*, 2008). Alguns polimorfismos no gene da proteína S têm sido descritos por influenciar a quantidade dessa proteína no plasma. A substituição de nucleotídeo A por G na posição 2148 do gene *PROS1* induz uma diminuição significativa da proteína S na circulação (LEROY-MATHERON *et al.*, 1999). Essa diminuição está associada a casos de trombose e no caso de pacientes com HA, pode-se imaginar que tenha um efeito atenuador nos episódios hemorrágicos, embora nenhum trabalho avaliando esta variante tenha sido conduzido no grupo de pessoas com hemofilia A.

## 2.9. PROTROMBINA (FATOR II)

A protrombina é um elemento protéico da coagulação sanguínea, também denominada de fator II, sintetizada pelos hepatócitos de forma vitamina K dependente. Essa proteína, sob ação do Ativador de Protrombina (complexo protrombinase) transforma-se em trombina, a qual catalisa a reação de transformação do fibrinogênio em fibrina, constituindo-se em elemento fundamental da cascata de coagulação. A variante G20210A da protrombina pode dobrar e até mesmo triplicar o risco de formação de coágulos venosos e sua presença está associada a níveis

circulantes aumentados de protrombina (STEFANO *et al.*, 2002). Essa variante é comumente associada a tromboembolismo venoso, o que inclui a trombose venosa profunda e o embolismo pulmonar. A variante G20210A da protrombina foi identificada na década de 1990 e está presente predominantemente na população caucasiana, sendo que cerca de 2 a 3% dos caucasianos são portadores (POORT *et al.*, 1996; ROSENDAAL & REITSMA, 2009; ROSENDAAL, 2005).

## 2.10. TROMBINA

A trombina (IIa) é uma enzima chave na cascata de coagulação, combinando funções pro e anticoagulantes (TEN CATE, 2011). Esta é gerada no final da cascata de coagulação sendo responsável pela conversão do fibrinogênio (I) em fibrina (Ia), a qual dará origem ao coágulo. Também atua em outras etapas da cascata, ativando os fatores V, VIII, IX e XIII (ação procoagulante) e na ativação da proteína C (ação anticoagulante). Utilizando a técnica de geração de trombina, verificou-se que a quantidade de trombina gerada é dependente da concentração de protrombina plasmática. Esse efeito é principalmente baseado em um aumento no pico de trombina produzido. Essas descobertas podem explicar por que a variante genética 20210 G>A no gene da protrombina, que está associada a uma maior concentração de protrombina, é um fator de risco para a trombose venosa (SPRONK *et al.*, 2003).

## 2.11. TESTE DE GERAÇÃO DE TROMBINA

Os métodos coagulométricos tradicionais (tempo de protrombina e tempo de tromboplastina ativada) medem apenas o tempo de coagulação (que corresponde ao processo inicial de coagulação) e o ponto final destes exames já ocorre com apenas 5% da trombina total (HEMKER & BEGIN, 1995). Portanto, estes exames refletem apenas o processo inicial de coagulação, uma vez que ainda continuará ocorrendo formação de trombina e fibrina com maior consistência (MANN *et al.*, 2003; WOLBERG, 2007), o que indubitavelmente, fornece mais informação sobre o *status* hemostático de um indivíduo.

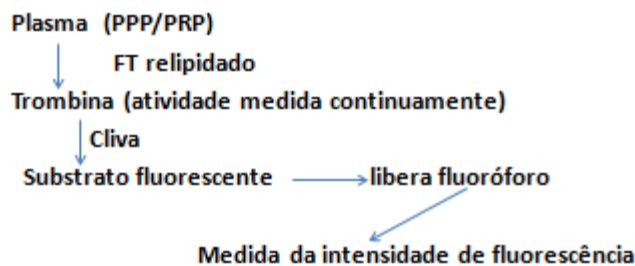
Assim que uma maior quantidade de trombina é gerada, os mecanismos de amplificação e de inibição são ativados, resultando em um aumento exponencial de

trombina, cujo sistema passa a ser inativado pelos anticoagulantes fisiológicos (alfa-2-macroglobulina, AT, PC e PS) (LE CUT, 2015). Dessa forma, a introdução de um método capaz de avaliar globalmente o processo da coagulação é altamente desejável, pois poderia refletir melhor o risco hemorrágico ou trombótico. Dessa forma, o teste de geração de trombina (TGT) se baseia na determinação do potencial de geração de trombina, o ETP, a partir de um ativador da via tradicionalmente conhecida como via extrínseca, que geralmente é o fator tecidual (FT). O teste comercial mais conhecido é o *Calibrated Automated Thrombogram*® (CAT) da empresa Trombinoscope/Stago. Este se baseia na adição de FT + fosfolípidos, para simular o papel das plaquetas, ao plasma rico (PRP) ou pobre em plaquetas (PPP), com posterior adição de um substrato fluorogênico com baixa afinidade para trombina. O substrato fluorogênico usado é o Z-Gly-Gly-Arg-AMC, ao qual é adicionado o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ). Essa reação usa um substrato fluorogênico porque a turbidez do coágulo gerado não irá interferir na formação de um produto fluorescente (HEMKER e KREMERS, 2013).

O substrato é consumido durante o experimento de forma que, com o andamento da reação, a velocidade da formação do produto por unidade de enzima diminui. Porém, a intensidade de fluorescência diminui de maneira não linear com a velocidade, devido ao efeito de filtro interno, definido pela aparente diminuição na emissão de fluorescência devido à reabsorção da radiação emitida. Portanto, é necessário que o aparelho de leitura faça uma compensação desse efeito a partir de modelos matemáticos. Uma última correção também deve ser feita em função da cor do plasma que difere de doador para doador. Assim, para cada amostra deve ser feito um calibrador, para que as diferenças de leitura provocadas por diferentes amostras de plasma possam ser anuladas (HEMKER e KREMERS, 2013). Em outras palavras, para gerar a curva de geração de trombina (GT) pelo método de CAT é preciso fazer a medida da GT do plasma teste em paralelo à medida da GT usando um calibrador de trombina de concentração conhecida. Desse modo, adiciona-se em um poço da placa o plasma a ser avaliado e, em outro poço, coloca-se o conversor de atividade do substrato, ou seja, o calibrador de trombina com concentração conhecida. Nos dois poços adiciona-se o substrato fluorogênico com cloreto de cálcio. O valor obtido no poço de calibração gera um valor de fluorescência linear, e é usado para converter o valor de fluorescência obtido com o plasma teste em unidade de concentração de

trombina (em nanomolar). O *software Thrombinoscope BV* é capaz de corrigir desvios da fluorescência definindo com exatidão a curva de geração de trombina. Em suma, o método de CAT foi desenvolvido para fazer o TGT quantitativo. A **Figura 4** mostra esquematicamente o princípio do método de CAT (HEMKER *et al.*, 2003).

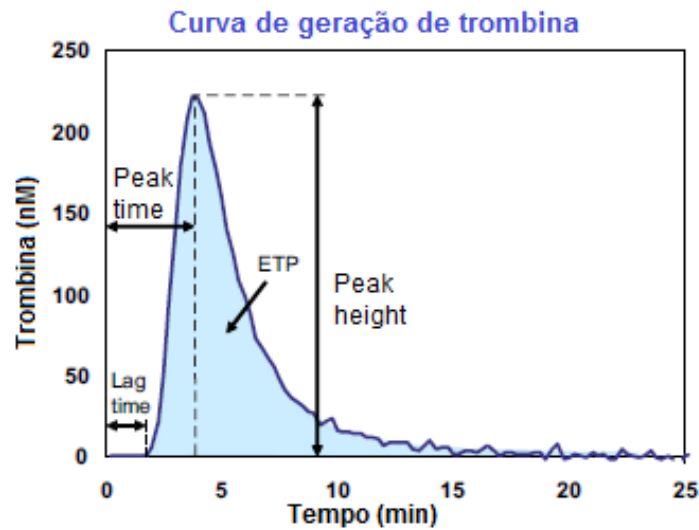
**Figura 4 - Princípio do método de Geração de Trombina por CAT (Calibrated Automated Thrombogram).**



**Intensidade de fluorescência pode ser convertida em concentrações de trombina (nM) usando uma curva de referência preparada medindo a taxa de conversão do substrato por um calibrador de trombina de concentração conhecida.**

Após leitura em um Fluorímetro (*Fluoroscán Ascent®*), o *software* calcula os parâmetros do trombograma que são *Lag time*, ETP (*Endogen Thrombin Potential*), *Peak time*, *Peak height*, etc (**Figura 5**). O *Lag time* representa o tempo transcorrido entre a adição do reagente e o início da geração de trombina e, grosseiramente, corresponde ao tempo de coagulação, enquanto o ETP representa o potencial endógeno de trombina total formada (área sob a curva) resultante do equilíbrio entre procoagulantes (trombina formada) e inibidores da trombina, e o *Peak* indica a taxa de formação de trombina até atingir o pico, *Peak time* and *Peak height* correspondem ao tempo para atingir o *Peak* e a altura do *Peak*, respectivamente.

**Figura 5 - A curva de geração de trombina é descrita em *Lag time*, *peak time*, *peak height* e *endogenous thrombin potencial – ETP*.**



Fonte: CASTOLDI, E.; ROSING, J. Thrombin generation tests. *Thrombosis research*, n. 127, p. 22, 2011 (Adaptada pela autora).

Segundo Castoldi & Rosing (2011) o *Lag time* da curva é a representação gráfica da fase de iniciação da formação do coágulo, e é definida como o tempo necessário para que a concentração de trombina alcance 1/6 da concentração do pico e mostra uma boa correlação com o tempo de coagulação. Já o ETP, indica a atividade enzimática total da trombina e é usado como parâmetro para a previsão de risco de sangramento ou trombose. O *peak height* está relacionada à capacidade de GT do plasma.

## 2.12. GRUPO SANGUÍNEO ABO

Alguns estudos têm mostrado que o grupo sanguíneo ABO influencia na coagulação, mais especificamente nos níveis plasmáticos de fator de von Willenbrand (FvW) (ALBANEZ *et al.*, 2016). Pessoas com o tipo sanguíneo O tem 25% a menos de FvW circulante no plasma do que indivíduos do tipo não O, ou seja, A, B e AB. Assim, o nível plasmático de FVIII também pode sofrer alterações em função dos níveis plasmáticos de FvW, já que o primeiro circula no plasma ligado ao segundo, fato que aumenta seu tempo de meia-vida, pois diminui sua degradação (MATSUI *et al.*, 1992). Uma hipótese que tem sido estudada é de que o grupo sanguíneo influencia na proteólise do FvW pelo ADAMTS 13, em que o grupo O apresenta uma atividade maior dessa enzima (BOWEN, 2003).

Assim, indivíduos do tipo O apresentam menor tendência à hipercoagulação. Essa diferença quantitativa de FvW e de FVIII é percebida na clínica através de exames de rotina, como o teste de tromboplastina parcial ativada (TTPa), utilizado para avaliar a via intrínseca da cascata de coagulação. Foi relatado que pessoas do tipo O apresentaram um tempo de TTPa prolongado, quando comparado com pessoas do tipo não O (CHOI *et al.* 2010).

### **3. HIPÓTESE**

A presença de polimorfismos nos genes das proteínas envolvidas na coagulação e anticoagulação natural e variações hemostáticas avaliadas pelo potencial de geração de trombina podem influenciar as manifestações hemorrágicas de pacientes com hemofilia A moderada e grave.

#### 4. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Esse estudo busca uma explicação para a heterogeneidade de manifestações clínicas em pacientes com hemofilia A moderada e grave, o que pode contribuir para um melhor manejo clínico dos sangramentos por meio do conhecimento das tendências hemorrágicas do paciente. A definição de fatores que podem diminuir o estado de hipocoagulação do paciente com hemofilia A moderada e grave também poderá contribuir, em uma extrapolação, para o desenvolvimento de outros tipos de tratamento, além da reposição do FVIII.

Conforme mencionado acima, pacientes com hemofilia moderada e grave apresentam diferentes fenótipos hemorrágicos. Dessa forma, o manejo clínico de tais pacientes não é uniforme, apesar de apresentarem níveis plasmáticos similares do fator deficiente. Segundo Tripodi (2016), o Teste de Geração de Trombina (TGT) é potencialmente útil para monitoração de pacientes com doenças hemorrágicas, representando uma ferramenta importante para investigação do *status* hemostático de pacientes em diferentes situações, seja para diagnóstico, seja para guiar o tratamento naqueles com ou sem inibidores. Nesse contexto, estudos envolvendo avaliação de pacientes com coagulopatias graves, mediante o uso do TGT, são promissores. Como uma útil complementação ao presente estudo, foi incluída também uma análise do perfil hemorrágico em função dos grupos sanguíneos não-O e O dos pacientes com hemofilia grave. Não é do nosso conhecimento investigações no Brasil com a abordagem acima, o que vem conferir ineditismo ao nosso estudo.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar a influência de polimorfismos em genes de proteínas da coagulação e da anticoagulação natural, e ainda as variações hemostáticas avaliadas pelo potencial de geração de trombina na diversidade fenotípica da hemofilia A moderada e grave.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

A. Realizar genotipagem para o polimorfismo G10976A (rs6046) no gene do FVII para pacientes com hemofilia A moderada e grave;

B. Realizar genotipagem da mutação G1691A (rs6025) do Fator V de Leiden e G20210A (rs1799963) da protrombina para pacientes com hemofilia A moderada e grave;

C. Realizar genotipagem para os polimorfismos A -1476T e A -1641G (rs1799809) na região promotora do gene de Proteína C para pacientes com hemofilia A moderada e grave;

D. Realizar a genotipagem para o polimorfismo A 2148G no gene da Proteína S para pacientes com hemofilia A moderada e grave;

E. Determinar os níveis de geração de trombina em amostras de pacientes com hemofilia A moderada e grave;

F. Correlacionar os genótipos encontrados com a diversidade clínica encontrada nos pacientes com hemofilia A incluídos no estudo;

G. Correlacionar o perfil global da coagulação, teste de geração de trombina, com a diversidade clínica encontrada nos pacientes com hemofilia A incluídos no estudo;

H. Correlacionar os genótipos encontrados com o perfil global da coagulação dos pacientes com hemofilia A incluídos no estudo.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. SELEÇÃO DE PACIENTES, GRUPO CONTROLE, COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Foram convidados a participar da pesquisa todos aqueles com hemofilia A moderada (FVIII:C <2,0) e grave, cadastrados e atendidos no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas que compareceram ao centro durante o período de Janeiro de 2015 a Dezembro de 2016. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (**Anexo 1**) e os pacientes que aceitaram participar do projeto assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**). Os participantes foram encaminhados ao Serviço de Coleta do HBH para a coleta de 5mL de sangue periférico em tubo *vacutainer* (Becton Dickinson, NJ, USA) contendo citrato de sódio 3,2% como anticoagulante. As amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas entre 1 e 7 dias após administração do fator VIII. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas e do concentrado de leucócitos. As amostras de plasma foram rapidamente estocadas, em alíquotas, a -80°C até utilização no teste de geração trombina. Os concentrados de leucócitos foram utilizados para extração do DNA genômico utilizando kit comercial (Qiagen, NRW, Alemanha).

O grupo controle foi formado por doadores de sangue saudáveis, com sorologia negativa para doenças infecto-contagiosas, do sexo masculino, com idade similar ao do grupo de pacientes, que compareceram à Fundação Hemominas em fevereiro de 2017. Aos participantes desse grupo também foi informado o conteúdo do projeto de pesquisa e todos que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 3**). As amostras desse grupo foram colhidas e processadas nas mesmas condições das amostras do grupo de pacientes.

### 6.2. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos dos pacientes que assinaram o TCLE foram obtidos retrospectivamente, por meio de análise de seus prontuários. Os dados relativos ao período de 2009 a 2011 foram coletados utilizando formulário específico (**Anexo 4**).

Essas informações foram posteriormente transferidas para uma planilha de Excel, incluindo dados referentes à idade do paciente quando do diagnóstico da hemofilia, peso, menor dosagem de fator VIII, classificação da hemofilia, histórico familiar da doença, unidades de FVIII (recombinante e plasmático) e concentrado de complexo protrombínico parcialmente ativado (CPPA) infundidos, número de internações, número de eventos hemorrágicos espontâneos, traumáticos e após cirurgias, articulações alvo, presença de inibidor, pico histórico de inibidores, sorologia, hemograma, comorbidades e medicamentos de uso contínuo.

### **6.3. GRUPO SANGUÍNEO ABO**

Para a classificação ABO dos pacientes e controles, utilizou-se a técnica de tipagem sanguínea indireta. Foram preparadas papas de hemácias tipo A e tipo B a 3% em PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ). Em placa de 96 poços com fundo em U, dois poços receberam 50 µL do plasma de cada participantes. Em seguida adicionou-se em um poço 50 µL da papa de hemácias tipo A e no outro poço 50 µL da papa de hemácias tipo B. A placa foi agitada por 10 segundos e em seguida foi centrifugada a 1.000 rpm por 2 minutos. Após centrifugação, a placa foi novamente agitada por 10 segundos. A classificação ABO foi feita através da observação, a olho nu, da aglutinação das hemácias

### **6.4. PCR-RFLP**

O kit da enzima Taq DNA Polimerase HotStart (Promega, WI, USA), *primers* específicos (Ludwig Biotecnologia, RS, Brasil) e dNTPS (Biorad, FR, SWI) foram utilizados para a realização das reações de PCR. Como controle de contaminação das reações, um tubo “branco”, contendo água para injeção no lugar de DNA foi utilizado para todos os experimentos.

#### 6.4.1. FATOR V LEIDEN

A PCR da mutação G1691A para o fator V Leiden foi realizada em reação com volume final de 12,5µL, contendo tampão de reação 1X, 4,4mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPS, 5 pmoles de *primers* (**Tabela 1**) e 0,5U de Taq Polimerase. À reação foram adicionados 100ng de DNA. A reação foi realizada com o seguinte ciclo de temperaturas: 3 min a 95°C; 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C e 1 min a 72°C; 10 seg a 72°C.

Após a PCR foi feita a reação de restrição RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) em volume final de 20 µL. A restrição foi realizada com 0,5 U da enzima Hind III, 0,1µg/µL de BSA (Promega, WI, USA). A reação foi incubada a 37°C por 2 horas. O produto final da digestão enzimática foi analisado em gel de poliacrilamida 12% (**Tabela 1**).

**Tabela 1 - Primers e tamanhos de fragmentos da genotipagem do FV em reação RFLP.**

<b>Primer F</b>	5' TCA GGC AGG AAC AAC ACC AT 3'		
<b>Primer R</b>	5' TAC TTC AAGT GAC AAA ATA CCT GTA AA 3'		
<b>Genótipo</b>	<b>GG</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>
<b>Fragmentos esperados</b>	241 pb	209 pb + 32 pb	241pb + 209 pb+ 32pb

#### 6.4.2. FATOR VII

A PCR do polimorfismo Arg353Gln para o fator VII foi realizada em reação com volume final de 25µL, contendo tampão de reação 1X, 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPS, 5 pmoles de *primers* (**Tabela 2**) e 0,5U de Taq Polimerase. À reação foram adicionados 150ng de DNA. A reação foi realizada com o seguinte ciclo de temperaturas: 15 min a 96°C, 35 ciclos de 45 seg a 94°C e 1 min e 30 seg a 61°C e 2 min e 15 seg a 72°C e ao fim desses ciclos, 10 seg a 72°C.

Após a PCR foi feita a RFLP em volume final de 10 µL. A digestão enzimática foi realizada com 0,5 U da enzima MspI (BioLabs, NE, USA). A reação foi incubada a 37°C por 3 horas. O produto final da restrição foi analisado em gel de agarose 2% (Tabela 2).

**Tabela 2 - Primers e tamanhos de fragmentos da genotipagem do polimorfismo Arg353Gln para o fator VII em reação RFLP.**

<b>Primer F</b>	5' GCA GCA AGG ACT CCT GCA AG 3'		
<b>Primer R</b>	5' CCA CAG GCC AGG GCT GCT GG 3'		
<b>Genótipo</b>	<b>GG</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>
<b>Fragmentos esperados</b>	239 pb	186 pb + 53 pb	239pb + 186 pb+ 53pb

#### 6.4.3. PROTROMBINA

A PCR da mutação G20210A para a protrombina foi realizada em reação com volume final de 12,5µL, contendo tampão de reação 1X, 3,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPS, 5 pmoles de *primers* (Tabela 3) e 0,5U de Taq Polimerase. À reação foram adicionados 100ng de DNA. A reação foi realizada com o seguinte ciclo de temperaturas: 3 min a 95°C, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C e 1 min a 72°C e ao fim desses ciclos, 10 seg a 72°C.

Após a PCR foi feita a RFLP em volume final de 20 µL. A digestão enzimática foi realizada com 1 U da enzima Hind III, 0,1µg/µL de BSA (Promega, WI, USA). A reação foi incubada à 37°C por 2 horas e 15 min a 68°C para inativação. O produto final da restrição foi analisado em gel de poliácridamida 12% (Tabela 3).

**Tabela 3 - Primers e tamanhos de fragmentos da genotipagem da mutação G20210A para a protrombina em reação RFLP.**

<b>Primer F</b>	5' GGT CAT TGA TAA GCT TGG AGA GTA 3'		
<b>Primer R</b>	5' AAT AGC ACT GGG AGC ATT GAA GCT 3'		
<b>Genótipo</b>	<b>GG</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>
<b>Fragmentos esperados</b>	135 pb + 11 pb	111 pb + 24 pb + 11 pb	135 pb + 111 pb + 24 pb + 11 pb

#### 6.4.4. PROTEÍNA C -1641 E -1476

As PCR dos polimorfismos A -1641G e A -1476T para a proteína C foram realizadas em reações com volume final de 12,5µL, contendo tampão de reação 1X, 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPS, 5 pmoles de *primers* (**Tabela 4**) e 0,5U de Taq Polimerase. À reação foram adicionados 75ng de DNA. A reação foi realizada com o seguinte ciclo de temperaturas: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C e ao fim desses ciclos, 5 min a 72°C. Para essa reação foram utilizados dois *primers forward* para um polimorfismo muito frequente na população, porém sem significado clínico, presente na região que não interferisse na amplificação do material genético

Após a PCR foi feita a RFLP para o polimorfismo A -1641G em volume final de 10 µL. A restrição foi realizada com 3,6 U da enzima BSTXI, 1µg/µL de BSA (Promega, WI, USA). A reação foi incubada a 50°C por 2 horas. A digestão enzimática para o polimorfismo A-1476T em volume final de 20 µL. A restrição foi realizada com 0,25 U da enzima RSAI, 0,1µg/µL de BSA (Promega, WI, USA). A reação foi incubada a 37°C por 4 horas. Os produtos finais das restrições foram analisados em gel de poliacrilamida 12% (**Tabela 4**).

**Tabela 4 - Primers e tamanhos de fragmentos das genotipagens dos polimorfismos A -1641G e A -1476T para a proteína C em reação RFLP.**

<b>Primer 2.1<sup>(1)</sup></b>	5' CCT GCT GGA <u>I</u> GG CCA CCT TGG T 3'		
<b>Primer 2.2<sup>(1)</sup></b>	5' CCT GCT GCA <u>C</u> GG CCA CCT TGG T 3'		
<b>Primer 3.2</b>	5' GGC GGG TCG TGG AGA TAC TGC 3'		
<b>Genótipo A-1641G</b>	<b>AA</b>	<b>GG</b>	<b>AG</b>
<b>Fragmentos esperados</b>	193 pb + 20 pb	213 pb	213 pb + 193 pb + 20 pb
<b>Genótipo A-1476T</b>	<b>AA</b>	<b>TT</b>	<b>AT</b>
<b>Fragmentos esperados</b>	211 pb	186 pb + 25 pb	186 pb + 25 pb + 211 pb

(1) *Primers* com bases modificadas para amplificação da região de interesse onde ocorre um polimorfismo frequente sem implicações clínicas.

#### 6.4.5. PROTEÍNA S

A PCR do polimorfismo A2148G para a proteína S foi realizada em reação com volume final de 12,5µL, contendo tampão de reação 1X, 2,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPS, 5 pmoles de *primers* (**Tabela 5**) e 0,5U de Taq Polimerase. À reação foram adicionados 75ng de DNA. A reação foi realizada com o seguinte ciclo de temperaturas: 5 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min e 30 seg a 50°C e 2 min e 15 seg a 72°C e ao fim desses ciclos, 5 min a 72°C.

Após a PCR foi feita a RFLP em volume final de 10 µL. A digestão enzimática foi realizada com 1,2 U da enzima BSTXI (Promega, WI, USA). A reação foi incubada a 50°C por 2 horas. O produto final da restrição foi analisado em gel de agarose 2% (**Tabela 5**).



**Tabela 5 - Primers e tamanhos de fragmentos da genotipagem do polimorfismo A2148G para a proteína S em reação RFLP.**

<b>Primer 1</b>	5' CAA GAT GCT AAA AGT CTT GG 3'		
<b>Primer 2</b>	5' CAA GAT GCT AAA AGT CTT GG 3'		
<b>Genótipo</b>	<b>AA</b>	<b>GG</b>	<b>AG</b>
<b>Fragmentos esperados</b>	267 pb	177 pb + 90 pb	267 pb + 177 pb + 90 pb

### 6.5. TESTE DE GERAÇÃO DE TROMBINA

A determinação da geração de trombina foi realizada em plasma pobre em plaquetas (PPP) utilizando o método de *CAT (Thrombinoscope BV®)*. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 80 µL de PPP das amostras de pacientes e controles a serem testadas e 5 µL do tampão HNBSA (5,957 g de Hepes + 10,227 g de NaCl, q.s.p. 1000 mL de água destilada. Ajustar o pH para 7,7 e acrescentar 0,5 g de albumina bovina). Para cada amostra, foi adicionado um poço para o calibrador, constituído de 80 µL de PPP, 5 µL de HNBSA e 20 µL do reagente calibrador (*Thrombin Calibrator - STAGO®*). Uma vez preenchida a placa com as amostras de plasma a serem testadas e seus respectivos calibradores, a placa foi colocada no fluorímetro (*Fluoroskan Ascent, Thermo Laboratories*) para incubação a 37°C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados, somente nos poços com as amostras de PPP a serem testadas, 20 µL do Fator Tissular (FT) em alta concentração (*PPP Reagent High - 5 pM - STAGO®*) ou em baixa concentração (*PPP Reagent Low - 1 pM - STAGO®*). Em seguida, 20 µL do substrato fluorescente + CaCl<sub>2</sub> (*Fluca-Kit - STAGO®*) foi dispensado em todos os poços e foi realizada leitura da placa por 60 minutos. O software *Thrombinoscope®* foi utilizado para a construção da curva de tempo (min) versus concentração de trombina (nM) e para o cálculo dos seguintes parâmetros de geração de trombina: *Lagtime*, *time to peak (ttPeak)*, *endogenous thrombin potential (ETP)* e *peak*. A formação dessa curva pode ser observada cineticamente na tela do computador.

## 6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os pacientes foram distribuídos em dois grupos considerando o perfil hemorrágico individual, baseando-se na média de consumo de concentrados de fatores de coagulação (UI/kg/ano). Os pacientes com consumo acima da média do grupo estudado foram considerados como de alto perfil hemorrágico (APH). Por outro lado, indivíduos com consumo abaixo da média foram considerados como de baixo perfil hemorrágico (BPH).

Além da análise de frequência alélica, os pacientes foram classificados segundo um escore considerando a presença/ausência de genótipos a aumento da atividade de coagulação sanguínea. Para construção do escore, para cada alelo associado a aumento da coagulação foi atribuído 1 ponto. Já para os alelos não associados a aumento na coagulação, nenhum ponto foi atribuído. Após somatório dos pontos, cada paciente teve seu escore definido dentro de uma faixa de 0 a 8, onde o máximo de pontos representou o maior potencial de coagulação.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Minitab, PA, USA. O teste realizado para comparação de variáveis categóricas foi o qui-quadrado. As variáveis não categóricas, sem distribuição normal, foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. PARTICIPANTES DO ESTUDO E DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM HEMOFILIA A

Foram incluídos neste estudo 51 pacientes do sexo masculino com hemofilia A, sendo que 38 (74,5%) apresentavam a forma grave da doença com atividade residual de FVIII <1,0%, enquanto 13 (25,5%) apresentavam a forma moderada da doença com atividade residual de FVIII <2,0% (pacientes moderadamente graves). Os pacientes apresentaram mediana de idade de 25,4 anos (intervalo interquartil [IQR], 12,4 - 34,2). Foram também incluídos 37 doadores de sangue saudáveis, do sexo masculino, para constituição de grupo controle, com mediana de idade de 27,0 anos (IQR, 22,5 - 30,0).

Considerando que não houve diferença significativa quanto às características clínicas básicas dos pacientes com hemofilia A grave e moderada incluídos neste estudo, esses participantes foram unidos em um único grupo comparador (**Tabela 6**).

**Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes com hemofilia A grave e moderada expressas em mediana e intervalo interquartil (IQR).**

	HA grave (n = 38)	HA moderada (n = 13)	Valor-p
<b>Idade (anos)</b>	26,8 (13,6 - 34,8)	18,3 (9,8 - 35,8)	0,35
<b>Idade ao diagnóstico (anos)</b>	1,5 (0,7 - 7,3)	0,8 (0,1 - 13,0)	0,29
<b>Consumo de FVIII (UI/ano/peso)</b>	595,2 (268,5 - 1712,0)	546,4 (178,5 - 1376,0)	0,51
<b>Número de sangramentos espontâneos/ano</b>	11,2 (5,3 - 26,0)	7,3 (3,1 - 21,6)	0,27
<b>Número de sangramentos após trauma e cirurgia/ano</b>	1,3 (0,3 - 4,1)	2,3 (0,1 - 4,8)	0,66
<b>Número de articulações afetadas/ ano</b>	4,0 (2,0 - 8,0)	4,0 (1,5 - 7,5)	0,94

HA = hemofilia A; IQR = intervalo interquartil.

Os dados gerais do grupo único constituído pelos pacientes estão apresentados na **Tabela 7**. Esses dados foram apresentados em mediana e intervalo interquartilício (IQR), exceto para grupo sanguíneo, histórico familiar de hemofilia e sorologia os quais foram apresentados em números absolutos e relativos.

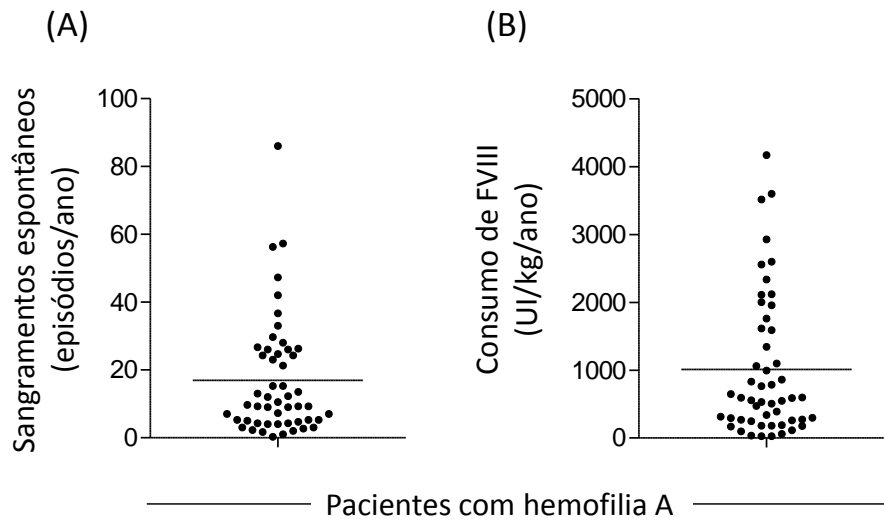
**Tabela 7 - Dados gerais dos pacientes com hemofilia A.**

	Pacientes com hemofilia A (n = 51)
<b>Idade (anos)<sup>(3)</sup></b>	28,0 (15,0 – 37,0)
<b>Grupo sanguíneo</b>	
<b>O</b>	n = 20 (39,2%)
<b>A</b>	n= 12 (23,5%)
<b>B</b>	n= 14 (27,5%)
<b>AB</b>	n= 05 (9,8%)
<b>Idade ao diagnóstico (anos)<sup>(3)</sup></b>	1,3 (0,6 - 7,9)
<b>Histórico familiar de hemofilia</b>	n = 33 (64,7%) <sup>(1)</sup>
<b>Consumo de FVIII (UI/ano/peso)<sup>(3)</sup></b>	591,1 (262,5 - 1615,0)
<b>Número de sangramentos espontâneos/ano<sup>(3)</sup></b>	9,7 (4,7 - 26,0)
<b>Número de sangramentos após trauma e cirurgia/ano<sup>(3)</sup></b>	1,3 (0,3 - 4,3)
<b>Número de articulações afetadas/ano<sup>(3)</sup></b>	4,0 (2,0 - 8,0)
<b>Sorologia<sup>(2)</sup></b>	
<b>HIV</b>	n=2 (3,9%)
<b>HTLV</b>	n=1 (1,9%)
<b>HBV</b>	n=10 (19,6%)
<b>HCV</b>	n=13 (25,5%) <sup>(1)</sup>

(1) Dados disponíveis para 50 pacientes (98,0%); (2) Histórico positivo de infecções; (3) Dados expressos em mediana e intervalo interquartilício (IQR).

Dentro do período avaliado (2009-2011), os pacientes incluídos no estudo apresentaram uma variação importante no número de sangramentos espontâneos e no consumo de FVIII, conforme mostrado na **Figura 6**. As médias de sangramentos espontâneos por ano e de consumo de FVIII foram de 18,1 episódios/ ano e 1011,1 UI/kg/ano, respectivamente.

**Figura 6 - Análise do perfil de sangramentos espontâneos e consumo de FVIII dos pacientes incluídos no estudo.**



**Legenda:** A) Sangramentos espontâneos por ano dos pacientes com hemofilia A. B) Consumo do FVIII em UI/peso/ano. As linhas horizontais representam a média encontrada para cada parâmetro avaliado

Com base na média de consumo anual de FVIII dos pacientes incluídos (1.011,0 UI/kg/ano; Desvio padrão [DP] = 1.043,0), os pacientes foram distribuídos em grupos com alto (APH; n=17; mediana de 2.109,0 UI/kg/ano, IQR 1602,0 - 2764,0) e baixo (BPH; n=34; mediana de 305,8 UI/kg/ano, IQR 179,9 - 591,9) perfil hemorrágico. As características clínicas dos pacientes APH e BPH podem ser observadas na **Tabela 8**.

**Tabela 8** - Características clínicas dos pacientes com hemofilia A com baixo e alto perfil hemorrágico expressas em mediana e intervalo interquartil (IQR).

	BPH (n = 34)	APH (n = 17)	Valor - p
<b>Idade (anos)</b>	24,7 (IQR 12,4 - 33,9)	27,0 (IQR 12,3 - 36,7)	0,64
<b>Idade ao diagnóstico (anos)</b>	1,4 (IQR 0,7 - 9,9)	1,0 (IQR 0,6 - 6,8)	0,68
<b>Consumo de FVIII (UI/Kg/ano)</b>	305,8 (IQR 179,9 - 591,9)	2109,0 (IQR 1602,0 - 2764,0)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Número de sangramentos espontâneos/ano</b>	6,2 (IQR 3,8 - 12,1)	28,0 (IQR 25,2 - 44,7)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Número de sangramentos após trauma e cirurgia/ano</b>	0,9 (IQR 0,2 - 2,5)	4,3 (IQR 0,5 - 5,7)	<b>0,02</b>
<b>Número de articulações afetadas</b>	4,0 (IQR 2,0 - 7,3)	4,0 (IQR 3,0 - 8,0)	0,32

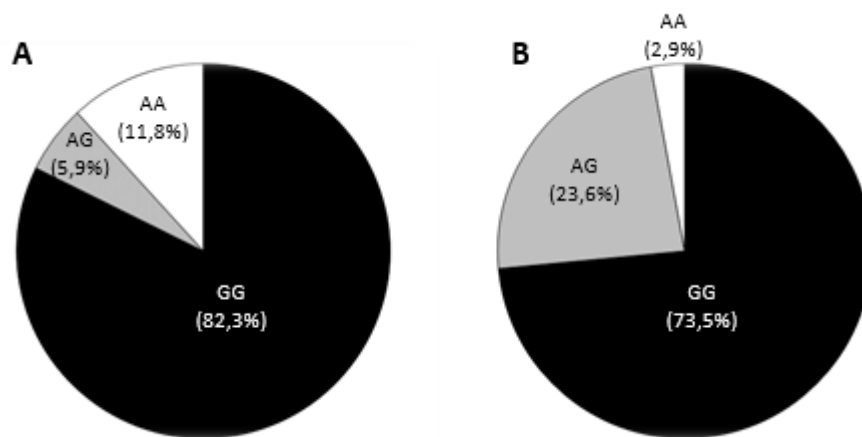
BPH = Baixo perfil hemorrágico; APH = Alto perfil hemorrágico.

## 7.2. HEMOFILIA A E ANÁLISE DE DADOS GENÉTICOS

Os dois grupos de pacientes definidos a partir da média de consumo anual de FVIII foram comparados quanto às frequências dos polimorfismos e mutações em genes da coagulação e anti-coagulação natural estudados neste trabalho. Nenhum paciente incluído no estudo apresentou as mutações G1691A para o fator V Leiden e G20210A para a protrombina.

Em relação ao polimorfismo Arg353Gln para o FVII, o grupo BPH apresentou 25 indivíduos (73,5%) com genótipo GG, oito (23,6%) com genótipo AG e um (2,9%) com genótipo AA. No grupo APH as frequências foram 82,3% (n=14), 5,9% (n=1) e 11,8% (n=2), respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados ( $p=0,16$ ) (**Figura 7**).

**Figura 7- Frequência genotípica do polimorfismo Arg353Gln para o FVII**

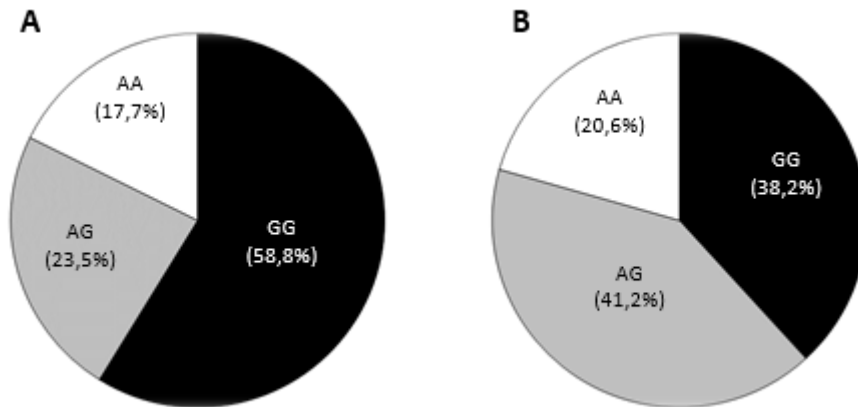


**Legenda:** A) Frequência genotípica do polimorfismo Arg353Gln para o FVII para pacientes com baixo perfil hemorrágico (BPH). B) Frequência genotípica do polimorfismo Arg353Gln para o FVII para pacientes com alto perfil hemorrágico (APH).

Quanto ao polimorfismo A-1641G para Proteína C, o grupo BPH apresentou 13 indivíduos (38,2%) com genótipo GG, 14 (41,2%) com genótipo AG e sete (20,6%) com genótipo AA. No grupo APH as frequências foram 58,8% (n=10), 23,5% (n=4) e

17,7% (n=3), respectivamente. Também não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados ( $p=0,35$ ) (**Figura 8**).

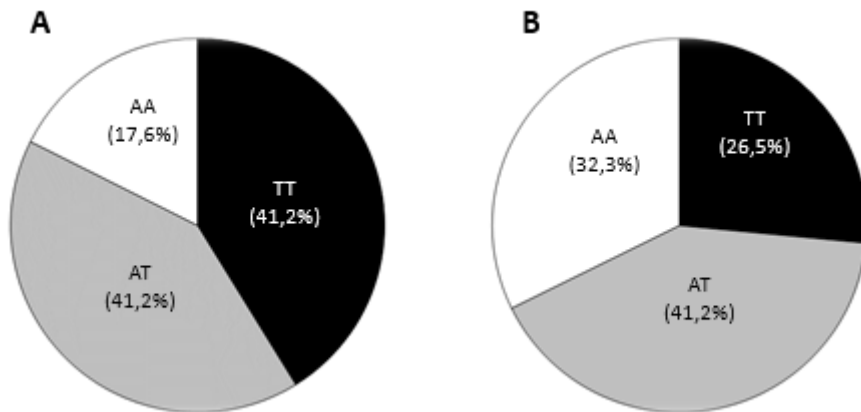
**Figura 8 - Frequência genotípica do polimorfismo A – 1641G para a proteína C**



**Legenda:** A) Frequência genotípica do polimorfismo A – 1641G para a proteína C para pacientes com baixo perfil hemorrágico (BPH). B) Frequência genotípica do polimorfismo A- 1641G para a proteína C para pacientes com alto perfil hemorrágico (APH).

Considerando o polimorfismo A-1476T para Proteína C, o grupo BPH apresentou nove indivíduos (26,5%) com genótipo TT, 14 (41,2%) com genótipo AT e 11 (32,3%) com genótipo AA. Já no grupo APH as frequências foram 41,2% (n=7), 41,2% (n=7) e 17,6% (n=3), respectivamente. Novamente, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados ( $p=0,43$ ) (**Figura 9**).

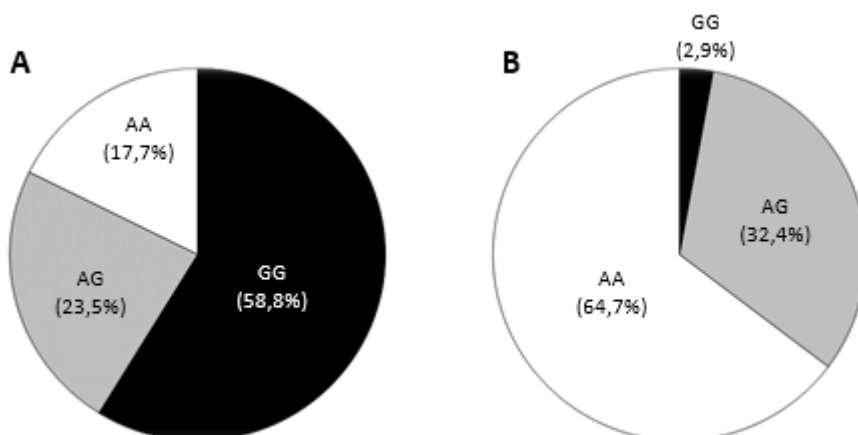
**Figura 9 - Frequência genotípica do polimorfismo A- 1476T para a proteína C**



**Legenda:** A) Frequência genotípica do polimorfismo A- 1476T para a proteína C para pacientes com baixo perfil hemorrágico (BPH). B) Frequência genotípica do polimorfismo A- 1476T para a proteína C para pacientes com alto perfil hemorrágico (APH).

Em relação ao polimorfismo A2148G para a proteína S, o grupo APH apresentou um indivíduo (2,9%) com genótipo GG, 11 (32,4%) com genótipo AG e 22 (64,7%) com genótipo AA. No grupo BPH as frequências foram 5,8% (n=1), 47,1% (n=8) e 47,1% (n=8), respectivamente. Assim como nos outros polimorfismos, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados ( $p=0,47$ ) (**Figura 10**).

**Figura 10 - Frequência genotípica do polimorfismo A2148G para a proteína S**



**Legenda:** A) Frequência genotípica do polimorfismo A2148G para a proteína S para pacientes com baixo perfil hemorrágico (BPH). B) Frequência genotípica do polimorfismo A2148G para a proteína S para pacientes com alto perfil hemorrágico (APH).



Ao analisar a frequência alélica dos polimorfismos nos grupos BPH e APH dos pacientes com hemofilia A, não foi encontrada diferença significativa (**Tabela 9**).

**Tabela 9 - Frequência alélica dos polimorfismos nos grupos APH e BPH.**

	BPH (n = 34)	APH (n = 17)	Valor-p
<b>Fator VII</b>			
<b>G</b>	0,853	0,853	0,98
<b>A</b>	0,147	0,147	
<b>Proteína C (-1641)</b>			
<b>G</b>	0,588	0,706	0,35
<b>A</b>	0,412	0,294	
<b>Proteína C (-1476)</b>			
<b>T</b>	0,471	0,618	0,23
<b>A</b>	0,429	0,382	
<b>Proteína S</b>			
<b>G</b>	0,191	0,294	0,36
<b>A</b>	0,809	0,706	

APH: Alto perfil hemorrágico; BPH: Baixo perfil hemorrágico.

Na análise do escore de sangramento, o grupo BPH, a mediana do escore foi 4,0 (IQR 3,0 - 5,0). No grupo APH, a mediana foi 5,0 (IQR 4,0 - 6,0). A diferença entre os dois grupos não foi significativa ( $p=0,13$ ).

Foi feita a comparação da frequência alélica dos polimorfismos e mutações dos pacientes no *1,000 Genome Project Phase 3* utilizando a versão Genome Reference GRCh37 (<http://grch37.ensembl.org/index.html>). A frequência dos alelos dos pacientes foi similar com a frequência encontrada nas outras populações. Para o polimorfismo A-1641G da proteína C na população estudada apresentou maior semelhança com a distribuição encontrada na população africana (**Tabela 10**). Não foram encontrados os *reference snip cluster ID (rs)* dos polimorfismos A- 1476T da proteína C e A2148G da proteína S, assim não foi possível a verificação da frequência alélica das mesmas no *1,000 Genome Project Phase 3*.

**Tabela 10 - Frequência dos genótipos na população com hemofilia A estudada e em diferentes grupos populacionais.**

<b>Fator V Leiden G1691A (rs6025)</b>						
	<b>HÁ</b>	<b>AFR</b>	<b>AMR</b>	<b>EAS</b>	<b>EUR</b>	<b>SAS</b>
<b>G</b>	100,0%	100,0%	99,0%	100,0%	98,8%	98,9%
<b>A</b>	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%	1,2%	1,1%
<b>Protrombina G20210A (rs1799963)</b>						
	<b>HÁ</b>	<b>AFR</b>	<b>AMR</b>	<b>EAS</b>	<b>EUR</b>	<b>SAS</b>
<b>G</b>	100,0%	100,0%	98,6%	100,0%	99,2%	100,0%
<b>A</b>	0,0%	0,0%	1,4%	0,0%	0,8%	0,0%
<b>FVII G10976A (rs6046)</b>						
	<b>HÁ</b>	<b>AFR</b>	<b>AMR</b>	<b>EAS</b>	<b>EUR</b>	<b>SAS</b>
<b>G</b>	85,3%	88,3%	87,8%	95,3%	88,9%	69,9%
<b>A</b>	14,7%	11,7%	12,2%	4,7%	11,1%	30,1%
<b>Proteína C A-1641G (rs1799809)</b>						
	<b>HÁ</b>	<b>AFR</b>	<b>AMR</b>	<b>EAS</b>	<b>EUR</b>	<b>SAS</b>
<b>G</b>	62,7%	74,4%	29,0%	18,1%	41,5%	38,1%
<b>A</b>	37,3%	25,6%	71,0%	81,9%	58,5%	61,9%

HA = Pacientes com hemofilia A incluídos no estudo; AFR = Africanos; AMR = Ameríndios; EAS = Asiáticos orientais; EUR = Europeus; SAS = Sul asiáticos.

As frequências dos genótipos determinados pelo polimorfismo A-1476T da proteína C encontrada no estudo foi comparada às frequências encontradas na população brasileira (MENDES *et al.*, 1999) (**Tabela 11**). A frequência do genótipo AA foi semelhante à população branca e negra, porém observa-se que o genótipo TT tem maior frequência nos pacientes com hemofilia A estudados.

**Tabela 11 - Frequência dos genótipos do polimorfismo A-1476T da proteína C na população com hemofilia A estudada e na população brasileira.**

	<b>HA</b>	<b>ÍNDIOS DA AMAZONIA</b>	<b>BRANCOS</b>	<b>NEGROS</b>
<b>AA</b>	25,5%	69,9%	26,1%	20,5%
<b>AT</b>	43,2%	30,1%	68,1%	76,9%
<b>TT</b>	31,3%	0,0%	5,8%	2,6%

HA = Pacientes com hemofilia A.

### 7.3. HEMOFILIA A E ANÁLISE DE GERAÇÃO DE TROMBINA (GT)

Na análise de geração de trombina (GT), foram avaliados os parâmetros de ETP (*Endogen Thrombin Potential*), *Lag time*, *time to peak* (TTPeak) e *Peak* utilizando o reagente de fator tissular (FT) em baixas concentrações (*Low tissue factor* [LT]), e em altas concentrações (*High tissue factor* [HT]). Dezesesseis amostras (31,4%) apresentaram geração de trombina muito baixa, inviabilizando o cálculo de seus parâmetros. Dessa forma, as análises a seguir representam o resultado de geração de trombina de 35 amostras de pacientes. Adicionalmente, 37 amostras de doadores aptos da Fundação Hemominas foram analisadas como grupo comparador.

Ao comparar os parâmetros da geração de trombina do grupo controle e do grupo de pacientes com hemofilia A, encontrou-se diferença significativa quando os valores de ETP-LT, TTPeak-LT, *peak*-LT, ETP-HT, TTPeak-HT e *peak*-HT foram comparados (Tabela 12).

**Tabela 12 - Análise comparativa dos parâmetros de geração de trombina em mediana e IQR dos grupos controle e pacientes com hemofilia A.**

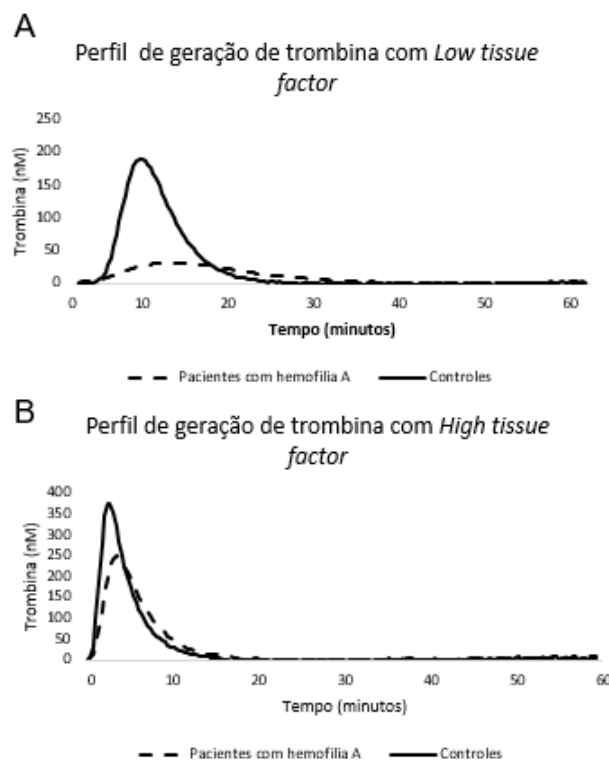
Parâmetros	Controle (n = 37)	Pacientes (n = 35)	Valor – p
		<i>Low tissue fator</i>	
<b>Lag time (min)</b>	4,33 (3,17 – 5,33)	4,00 (3,67 – 6,33)	0,333
<b>Peak (nM/min)</b>	249,0 (188,8 – 269,8)	20,01 (11,75 – 51,42)	<b>&lt;0,001</b>
<b>TTpeak (min)</b>	8,33 (6,34 – 9,33)	14,42 (10,33 – 19,67)	<b>&lt;0,001</b>
<b>ETP (nM/min)</b>	1420,3 (1146,0 – 1676,9)	388,7 (260,8 – 788,0)	<b>&lt;0,001</b>
		<i>High tissue fator</i>	
<b>Lag time (min)</b>	2,00 (1,67 – 2,50)	2,05 (2,00 – 2,33)	0,217
<b>Peak (nM/min)</b>	397,1 (345,7 – 437,3)	264,0 (218,9 – 328,9)	<b>&lt;0,001</b>
<b>TTpeak (min)</b>	4,00 (3,67 – 5,17)	4,67 (4,33 – 5,33)	<b>0,007</b>
<b>ETP (nM/min)</b>	1735,2 (1539,0 – 1926,1)	1536,0 (1223,0 – 1739,0)	<b>0,003</b>

ETP = *Endogen thrombin potential*; TTPeak = *Time to peak*. Min = minuto.

O perfil de geração de trombina mostrado na **Figura 11** foi definido para os grupos controle e pacientes levando-se em consideração a média dos resultados de geração

de trombina em função do tempo, usando o fator tissular em baixa (*Low tissue factor*) e em alta (*High tissue factor*) concentração. Nesta figura, é possível observar uma baixa geração de trombina nos pacientes com hemofilia A (curva em linha tracejada) quando comparada à geração de trombina observada no grupo controle (curva em linha contínua).

**Figura 11 - Perfil de Geração de Trombina em função do tempo**



**Legenda:** A) Perfil de Geração de Trombina com *Low tissue factor* em função do tempo. B) Perfil de Geração de Trombina com *High tissue factor* em função do tempo.

#### 7.4. HEMOFILIA A, ANÁLISE DE GT E GRUPO SANGUÍNEO ABO

Os parâmetros de GT dos pacientes foram analisados em função dos grupos sanguíneos classificados como grupo “não - O *versus* grupo O”. Foi observado que para todos os parâmetros, exceto *Lag time* - LT, *Lag time* - HT e *time to peak* - HT, houve diferença significativa entre os grupos O e não - O. Uma análise global dos resultados de geração de trombina revelou que o grupo não - O apresenta maior potencial de geração de trombina (**Tabela 13**).

**Tabela 13 - Comparação dos parâmetros de geração de trombina entre pacientes com hemofilia A e os grupos sanguíneos não - O e O, expressos em mediana.**

Parâmetros da geração de trombina	Não - O (n = 23)	O (n = 12)	Valor p
<i>Lag time</i> – LT (min)	4,860	4,860	0,305
<i>Peak</i> – LT (nM/min)	35,77	11,95	<b>0,007</b>
<i>TTPeak</i> – LT (min)	12,67	17,33	0,099
<i>ETP</i> – LT (nM/min)	625,1	311,6	<b>0,018</b>
<i>Lag time</i> -HT (min)	2,050	2,165	0,643
<i>Peak</i> – HT (nM/min)	300,3	255,1	0,089
<i>TTPeak</i> – HT (min)	4,670	4,835	0,484
<i>ETP</i> – HT (nM/min)	1583	1345	<b>0,034</b>

LT = *Low tissue factor*. HT = *High tissue factor*, *TTPeak* = *Time to peak*, *ETP* = *Endogen thrombin potential*; Min = minuto.

Ao se comparar o perfil de geração de trombina dos dois grupos de pacientes com hemofilia A (BPH e APH) não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros (**Tabela 14**).

**Tabela 14 - Análise dos parâmetros de geração de trombina dos grupos BPH e APH dos pacientes com hemofilia A.**

	BPH (n = 23)	APH (n = 12)	Valor - p
<b>Low Tissue Factor</b>			
<b>Lag Time (min)</b>	4,7 (3,7 - 7,3)	4,0 (3,7 - 7,3)	0,56
<b>Peak (nM/min)</b>	28,4 (11,8 - 52,1)	16,6 (11,5 - 40,6)	0,44
<b>TTPeak (min)</b>	14,7 (10,3 - 19,0)	13,2 (10,4 - 20,8)	0,91
<b>ETP (nM/min)</b>	588,7 (307,0 - 801,4)	315,8 (229,5 - 699,8)	0,19
<b>High Tissue Factor</b>			
<b>Lag Time (min)</b>	2,3 (2,0 - 2,4)	2,0 (2,0 - 2,3)	0,17
<b>Peak (nM/min)</b>	290,1 (219,8 - 335,0)	255,1 (194,1 - 282,7)	0,11
<b>TTPeak (min)</b>	4,7 (4,3 - 5,3)	4,7 (4,0 - 5,7)	0,91
<b>ETP (nM/min)</b>	1550,0 (1385,0 - 1739,0)	1330,0 (1137,0 - 1721,0)	0,31

BPH = Baixo potencial hemorrágico; APH = Alto potencial hemorrágico; *TTPeak* = *Time to peak*; ETP = *Endogen thrombin potential*; Min = minuto.

Visando conhecer os valores de referência para uma população considerada hígida, como a de doadores de sangue, e na inexistência desses valores para a população brasileira, os dados de geração de trombina foram analisados nesta população. Dessa forma, os valores médios dos parâmetros de geração de trombina e respectivos desvios-padrão, estimados para uma pequena população de 37 indivíduos saudáveis do sexo masculino, de idade compreendida entre 17 e 38 anos, estão apresentados na **Tabela 15**.

**Tabela 15 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros de geração de trombina do grupo controle.**

<i>Low tissue fator</i>			
<i>Lag time (min)</i>	<i>Peak (nM/min)</i>	<i>TTPeak (min)</i>	<i>ETP (nM/min)</i>
4,08 (± 1,35)	236,26 (± 68,81)	7,61 (± 2,24)	1410,291 (± 376,66)
<i>High tissue fator</i>			
<i>Lag time (min)</i>	<i>Peak (nM/min)</i>	<i>TTPeak (min)</i>	<i>ETP (nM/min)</i>
2,53 (± 1,31)	384,62 (± 79,40)	4,86 (± 2,02)	1752,623 (± 308,36)

TTPeak = Time to peak; ETP = Endogen thrombin potential; Min = minuto.

O potencial de geração de trombina em relação aos grupos não - O e O do grupo controle foi também determinado com o objetivo de investigar a possível influência da presença dos antígenos A e B sobre a hemostasia. Porém, observou-se que não houve diferença significativa entre qualquer parâmetro do teste de geração de trombina (Tabela 16).

**Tabela 16 - Comparação entre os parâmetros de geração de trombina no grupo controle em relação aos grupos sanguíneos não - O e O.**

Parâmetros geração de trombina	Não - O (n = 18)	O (n = 19)	Valor - p
<i>Lag time - LT (min)</i>	4,33 (3,27 - 5,33)	4,67 (2,67 - 5,33)	0,988
<i>Peak - LT (nM/min)</i>	249,8 (214,3 - 273,2)	236,1 (181,7 - 265,3)	0,412
<i>TTPeak - LT (min)</i>	8,17 (6,43 - 8,75)	8,67 (6,00 - 9,67)	0,475
<i>ETP - LT (nM/min)</i>	1467,9 (1174,6 - 1732,1)	1323,5 (1139,3 - 1531,8)	0,316
<i>Lag time - HT (min)</i>	2,00 (1,67 - 2,68)	2,00 (1,67 - 2,67)	0,627
<i>Peak - HT (nM/min)</i>	394,0 (351,7 - 471,0)	400,8 (318,6 - 433,4)	0,553
<i>TTPeak - HT (min)</i>	4,00 (3,67 - 5,19)	4,00 (3,67 - 5,67)	0,867
<i>ETP - HT (nM/min)</i>	1748,0 (1591,1 - 1952,6)	1734,9 (1523,9 - 1911,1)	0,543

LT = Low tissue factor. HT = High tissue factor, TTPeak = Time to peak, ETP = Endogen thrombin potential; Min = minuto.

## 7.5. HEMOFILIA A, CONSUMO DE FATOR E GRUPO SANGUÍNEO ABO

Para verificar se há influência do grupo sanguíneo ABO no consumo de fator e, conseqüentemente, no número de sangramentos anuais, foi feito o teste de qui-quadrado comparando o grupo sanguíneo e o grupo de consumo de fator BPH e APH (**Tabela 17**). Percebe-se que o tipo A e tipo B estão distribuídos de forma similar entre os dois grupos. O tipo B encontra-se, em sua maioria, no grupo APH e o tipo O no grupo BPH. A diferença encontrada não foi significativa ( $p= 0,576$ ). No entanto, curiosamente, observa-se que o grupo B está em uma maior proporção no grupo dos indivíduos com Hemofilia A quando se compara com a população brasileira em geral. Uma análise dos dados contidos na **Tabela 17**, revela que no grupo de pacientes com Hemofilia A, 12 (23,5%) eram do grupo sanguíneo A; 5 (9,8%), AB; 14 (27,5%), B e 20 (39,2), do grupo O. Já no grupo controle, tem-se que 13 (35,1%) eram do grupo sanguíneo A, 5 (1,5%) do grupo B e 19 (51,4%) do grupo O. Nenhum indivíduo do grupo controle teve grupo sanguíneo AB.

**Tabela 17 - Análise do grupo sanguíneo ABO dos perfis hemorrágicos dos pacientes com hemofilia A.**

Grupo sanguíneo	BPH	APH
<b>A</b>	6 (24%)	6 (23,1%)
<b>AB</b>	1 (4 %)	4 (15,4%)
<b>B</b>	7 (28%)	7 (26,9%)
<b>O</b>	11 (44%)	9 (34,6%)
<b>Total</b>	25 (100,00%)	26 (100,00%)

BPH = Baixo perfil hemorrágico; APH = Alto perfil hemorrágico.

Quando se investigou se havia relação do grupo sanguíneo dos pacientes, classificados como não-O e O, com os grupos de consumo de fator PBH e APH, não houve diferença significativa,  $p=0,493$  (**Tabela 18**).



**Tabela 18 - Perfis hemorrágicos dos pacientes com hemofilia A em função dos grupos sanguíneos não - O e O.**

Grupo sanguíneo/	BPH	APH	Total
<b>Não - O</b>	14 (45,16%)	17 (54,84%)	31 (100,00%)
<b>O</b>	11 (55,00%)	9 (45,00%)	20 (100,00%)
<b>Total</b>	25 (49,02%)	26 (50,98%)	51 (100,00%)

BPH = Baixo perfil hemorrágico; APH = Alto perfil hemorrágico.

A presença de infecção por HIV, hepatite B e C e HTLV, não influenciou na mediana de consumo dos pacientes com hemofilia A (**Tabela 19**).

**Tabela 19 - Mediana de consumo de fator VIII dos pacientes com hemofilia A com e sem infecção.**

Sim (n= 18)	Não (n= 33)	Valor - p
796,9	555,6	0,214

## 8. DISCUSSÃO

A hemofilia A é a coagulopatia hereditária ligada ao cromossomo X mais comum. Os pacientes com essa doença apresentam hemorragias em mucosas e em articulações, que podem causar artropatias irreversíveis com perda de movimentação motora. A hemofilia A se manifesta diferentemente, podendo ser classificada como leve, moderada ou grave, dependendo da quantidade de FVIII residual presente no plasma dos pacientes (GRAW *et al.* 2005). Além disso, sabe-se que alguns pacientes com hemofilia A grave e moderada apresentam manifestações clínicas não compatíveis com seu diagnóstico, podendo apresentar clínica mais branda do que se espera (ALEDORT *et al.*, 1994; POLLMANN *et al.*, 1999; MOLHO *et al.*, 2000; BOLTON-MAGGS & PASI, 2003). Nesse sentido, há necessidade de estudos adicionais para compreender melhor os mecanismos envolvidos na diversidade dos efeitos da doença nos pacientes. Neste estudo Investigou-se a influência de polimorfismos em genes de proteínas da coagulação e da anticoagulação natural, e ainda do potencial de geração de trombina na diversidade dos efeitos clínicos da hemofilia A moderada e grave. Para atingir esse objetivo, foram incluídos neste estudo 51 pacientes com hemofilia A, sendo 38 (74,5%) com a forma grave da doença (atividade residual de FVIII <1,0%) e 13 (25,5%) com a forma moderada da doença (atividade residual de FVIII <2,0%). Foram também incluídos 37 doadores de sangue saudáveis, do sexo masculino, para constituição de grupo controle.

Os pacientes foram distribuídos em dois grupos de acordo com a quantidade residual do FVIII no plasma, pacientes com hemofilia A grave (FVIII <1,0%) e moderada (FVIII entre 1,0 a 2,0%). As análises dos dados clínicos dos dois grupos revelaram que não houve diferenças significativas em nenhum deles. Para facilitar as análises em função do perfil hemorrágico, o qual reflete o consumo de fator dos pacientes com hemofilia A (média de 1.011,0 UI/kg/ano), tais pacientes foram distribuídos em dois grupos, baixo (BPH) e alto perfil hemorrágico (APH).

Nessa análise foi possível perceber que há diferença significativa no número de sangramentos espontâneos ( $p < 0,001$ ) e pós-trauma e cirurgias ( $p = 0,02$ ). Esses resultados estão de acordo com os achados de trabalhos anteriores que descrevem diferenças em relação ao perfil hemorrágico dos pacientes com a mesma

porcentagem de atividade residual de FVIII plasmático (RENDO *et al*, 2013; KACHOOEI *et al*, 2014). Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos outros dados clínicos analisados, mesmo aqueles que poderiam ser afetados pelo perfil hemorrágico dos pacientes como idade ao diagnóstico ( $p=0,68$ ) e número de articulações afetadas por sangramentos ( $p=0,32$ ).

A análise molecular realizada não evidenciou maior ou menor frequência de um determinado alelo nos grupos BPH e APH em relação às mutações e aos polimorfismos estudados. Esse resultado sugere que o perfil genotípico desses grupos é semelhante, porém este pode estar sendo influenciado pelo número limitado de pacientes incluídos no estudo ou por outros polimorfismos não estudados

A frequência dos alelos para o fator V Leiden G1691A, protrombina G20210A e do polimorfismo G10976A do FVII foram semelhantes às frequências de todas as populações presentes no *1000 Genomes Project*. Para o polimorfismo A-1641G da proteína C, houve diferença considerável quando a frequência alélica encontrada para os pacientes do estudo foi comparada às frequências das populações americana, asiática oriental, europeia e sul-asiática. Por outro lado, a frequência encontrada foi semelhante ao resultado da população africana. Acredita-se que este resultado possa ser explicado pelo alto grau de miscigenação da população brasileira, com grande incidência de polimorfismos de ancestralidade africana relacionada à população africana. Na comparação do polimorfismo A-1476T da proteína C dos pacientes estudados com a população brasileira, houve uma diferença na frequência do genótipo TT, os pacientes com hemofilia A apresentaram uma frequência maior do que a população brasileira.

Na busca de uma estratégia para melhor compreender o impacto dos genótipos na clínica dos pacientes, um escore foi criado para se avaliar o possível efeito das variantes genéticas na diferença hemostática entre os grupos BPH e APH. Os resultados indicaram que as variantes genéticas estudadas parecem não influenciar no perfil hemorrágico dos pacientes com hemofilia A. Estudos prévios reportaram que as mutações do Fator V Leiden e Protrombina G20210A apresentam relação entre a presença do alelo mutante e a diferença na clínica dos pacientes, favorecendo a hipercoagulação (LEE *et al.*, 2000, ESCURIOLA-ETTINGHAUSEN *et al.* 2001, DI

PERNA *et al* 2011). Neste estudo nenhum paciente apresentou essas mutações, impossibilitando a análise entre estas e o perfil hemorrágico. Entretanto, em dois outros estudos (JAYANDHARAN *et al.*, 2009, RENDO *et al.*, 2013), as mutações do fator V Leiden e protrombina G20210A não influenciaram no número de sangramento dos pacientes.

Um estudo (JAYANDHARAN *et al.*, 2009) demonstrou que a presença do polimorfismo do FVII aumentou em 3,5 vezes o risco do paciente com hemofilia A apresentar o fenótipo grave da doença. No entanto, como os dados desse estudo, não foi possível observar esse aumento de risco relacionado à presença do polimorfismo do FVII relatado no estudo citado.

O polimorfismo A-1641G da proteína C foi associado a um maior risco tromboembólico e menor taxa de sobrevivência em pacientes com sepse (AIACH, *et al.*, 1999). Entretanto, nesse estudo, esse polimorfismo não reproduziu a tendência de hipercoagulação esperada.

O perfil do tipo sanguíneo dos pacientes com hemofilia A dos grupos BPH e APH não apresentou diferença significativa. Apesar de esperar-se que o grupo APH ser composto por mais indivíduos do tipo sanguíneo O, os resultados apresentaram uma proporção diferente. Esse grupo era composto, em sua maioria, por indivíduos não – O. Mais uma vez, o número amostral pode ter influenciado esse resultado.

Conforme esperado, os pacientes com hemofilia A apresentaram uma redução da geração de trombina (GT), reflexo dos baixos níveis de FVIII (<2,0%), demonstrando laboratorialmente como a deficiência deste fator pode afetar tão drasticamente o processo hemostático. A diferença dos parâmetros da geração de trombina entre o grupo controle e pacientes foi significativa, demonstrando, mais uma vez, que a deficiência do FVIII afeta a hemostasia de maneira importante. Todos os parâmetros apresentaram diferenças significativas, exceto o *Lag time* tanto com o *Low tissue factor* (LT) ( $p=0.333$ ), quanto com o *High tissue factor* (HT) ( $p=0.217$ ). O *Lag time*, representa o tempo entre a adição do reagente e o início da GT (corresponde ao tempo de coagulação de uma amostra de plasma) e não tem tanta importância clínica quanto o *Endogen thrombin potential* (ETP) e *Peak*, já que esses últimos indicam as

quantidades total, e máxima de trombina gerada até atingir o pico, respectivamente. Estes parâmetros são os mais utilizados porque correlacionam melhor com os eventos clínicos (BERNTORP & SALVAGNO, 2008; LECUT *et al.*, 2015). Dessa forma, esses parâmetros refletem de maneira global a condição hemostática do paciente e são mais afetados pela deficiência de fatores da coagulação (LECUT *et al.*, 2015)

A diferença entre a GT do grupo controle e paciente foi mais significativa quando o fator tissular foi usado em baixas concentrações (**Figura 11**). Ao analisar a GT de determinadas amostras de pacientes na condição de *Low tissue factor*, não foi possível obter leitura devido a um estado de severa hipocoagulabilidade.

Considerando que o FVIII é componente da via intrínseca e que a GT quando desencadeada por baixas concentrações de FT é mais sensível às alterações dos fatores FXI, FIX e VIII, o resultado acima era de fato esperado, devido ao impacto da deficiência do FVIII nesta via (HEMKER *et al.*, 2003; DAHLBÄCK & VILLOUTREIX, 2005). Dada à sua sensibilidade na discriminação entre os dois grupos, controles e pacientes, o teste de GT pode ser útil na avaliação e monitoração de coagulopatias que cursam com frequentes eventos hemorrágicos, particularmente hemofilia A grave. O uso de fator tissular em altas concentrações favorece a geração de trombina através da ativação da via extrínseca. Esta, após estímulo com altas concentrações de fator tissular, tem início mais rápido e a reação termina com mínima participação da via intrínseca. Nesse contexto, portanto, a trombina gerada é um reflexo predominantemente da ativação das vias extrínseca e comum (HEMKER *et al.*, 2003).

Dentro do contexto do uso do teste de GT na população de indivíduos com hemofilia A, torna-se importante ressaltar os achados na literatura sobre esta importante questão. Segundo Beltran-Miranda *et al.*, 2005 e Dargaud *et al.*, 2005, o ETP e altura do pico de GT foram os parâmetros mais fortemente reduzidos nos pacientes com hemofilia A e B, refletindo as concentrações plasmática de FVIII e FIX. Tais cujos parâmetros permitiram diferenciar pacientes com hemofilia de indivíduos normais; e dentre os pacientes com hemofilia aqueles com a forma grave, moderada ou leve. Ainda segundo Dargaud *et al.*, 2005, parece haver uma boa correlação entre os parâmetros de GT e fenótipo hemorrágico. Um outro estudo realizado por Dargaud *et*

*al.*, 2005, os quais utilizaram o teste de GT para decisões terapêuticas, foi observada uma correlação entre os parâmetros de GT e sangramento em pacientes com hemofilia A e B. Com relação à heterogeneidade da expressão clínica observada entre os pacientes com taxas residuais de FVIII e FIX comparáveis, essas diferenças podem ser detectadas por meio do ETP (TROSSAERT *et al.*, 2008). Foi reportado por Santagostino *et al.*, 2010, que o ETP, medido em plasma rico em plaquetas (PRP), permitiu identificar entre os hemofílicos graves (<1% FVIII ou FIX) aqueles com uma fraca tendência hemorrágica.

Com base nesta última citação, pode-se pensar que o teste de GT realizado em PRP poderia ser mais sensível do que em PPP, adequando-se melhor aos objetivos do presente estudo, o que pode ter interferido nos nossos resultados. No entanto, é alta a potencialidade deste teste como uma ferramenta que poderá ajudar a esclarecer questões ainda sem resposta no que tange à variabilidade de manifestações clínicas dos pacientes com Hemofilia A e B graves.

Diante dos nossos achados aliados aos da literatura, pode-se atribuir credibilidade ao teste de GT como uma útil ferramenta de *screening* para coagulopatias, além de poder avaliar a capacidade de coagulação dos pacientes com hemofilia, com e sem inibidores, e ainda otimizar doses dos fatores VIII e IX e outros tipos de tratamento.

Quando se comparou a GT dos pacientes com hemofilia A dos diferentes tipos sanguíneos, não-O e O, encontrou-se diferença significativa nos parâmetros *Peak* – LT ( $p=0,007$ ), ETP – LT ( $p=0,018$ ) e ETP – HT ( $p=0,034$ ). Estudos prévios reportam que indivíduos do grupo não-O apresentam níveis significativamente mais elevados de FvW, o que sugere níveis também mais elevados de FVIII (TEIXEIRA MELLO *et al.*, 2009; COHEN *et al.*, 2012; ALBANEZ *et al.*, 2016). Em analogia aos estudos anteriores e extrapolando a ideia para nossos resultados, pode-se admitir que os indivíduos com hemofilia A dos tipos sanguíneos não-O, apresentam maior potencial de GT. Esse maior potencial de GT poderia ser explicado parcialmente pelo possível aumento do FvW plasmático contribuindo para um maior tempo de meia-vida do FVIII residual presente no plasma dos pacientes.

Na comparação de GT dos grupos de pacientes BPH e APH, não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados. Entretanto, foi observada uma tendência à redução do potencial de GT (ETP com LT e HT) no grupo com maior perfil hemorrágico (APH). Acredita-se que não tenha sido observada uma diferença significativa entre os dois grupos de pacientes, com baixo e alto perfil hemorrágico, devido ao número limitado de amostras testadas, particularmente, do último grupo. Além do mais, os resultados de GT refletem apenas um único momento dos pacientes, enquanto os dados de BPH e APH se referem ao período de 2009 a 2011.

O grupo controle, composto por indivíduos do sexo masculino, hígidos, com mediana de idade de 27 anos (IQR 22,5 – 30,0), teve a média e o desvio padrão dos parâmetros da GT calculados. Como valores de referência inicial para esse pequeno grupo, considerou-se a média de cada parâmetro de GT  $\pm$  1DP. Dessa forma, os seguintes intervalos foram obtidos para *Lag time* LT (2,73 – 5,43 minutos), *Peak* LT (167,45 – 305,07 nM/minuto), *TTPeak* LT (5,37 – 9,85 minutos), *ETP* LT (1033,63 – 1786,95 nM/minuto), *Lag time* HT (1,23 – 3,84 minutos), *Peak* HT (305,62 – 464,02 nM/minuto), *TTPeak* HT (2,84 – 6,88 minutos), *ETP* HT (1444,02 – 2060,98 nM/minuto). Segundo Ferreira & Andriolo, 2008, a criação de intervalos próprios é, indubitavelmente, a melhor escolha para a grande maioria dos testes, uma vez que reflete melhor a condição da população, com base em suas características sociodemográficas e outras, para a qual os testes serão aplicados. Em consonância com a afirmativa acima, o presente estudo possibilitou uma estimativa destes intervalos próprios para o teste de TG, nas condições de *Low* e *High tissue factor*, com base em uma pequena população de doadores de sangue. No entanto, além do pequeno número de amostras ensaiadas, outras limitações merecem ser citadas tais como apenas inclusão de indivíduos do sexo masculino e de apenas uma faixa etária (mediana de 27,0 anos [IQR, 22,5 - 30,0]). Comparando os dados apresentados na **Tabela 14** com os escassos relatos da literatura para valores de referência para o teste de GT (HEMKER *et al.*, 2003; BAGOT & LEISHMAN, 2015), é possível observar uma consistência entre os dados obtidos por nós e os reportados pelos autores acima, embora os nossos desvios padrões tenham sido discretamente superiores.

Quando a GT do grupo controle foi analisada de acordo com o tipo sanguíneo (não O e O), não houve diferença significativa nos parâmetros de GT. Contrariamente, relatos

da literatura sobre níveis mais elevados de FvW e de FVIII em indivíduos do grupo não-O (WU *et al.*, 2008; TEIXEIRA MELLO *et al.*, 2009; COHEN *et al.*, 2012), sugerem que indivíduos pertencentes aos grupos sanguíneos A, B e AB teriam maior chance de tromboembolismo venoso. Dessa forma, extrapolando tal conceito para nosso estudo, esperar-se-ia que os componentes do grupo controle classificados como não-O apresentassem maior GT em função de níveis mais elevados de FvW e de FVIII. No entanto, conforme mencionado acima, isso não ocorreu. A explicação mais provável para esse resultado também é o fato do número amostral ser pequeno, o que prejudicou a análise estatística desse dado.

Por fim, aproximadamente 50% dos pacientes apresentaram alguma infecção, predominantemente HCV. As análises estatísticas realizadas não revelaram diferença entre o grupo infectado e não infectado para qualquer dos parâmetros avaliados. Mais uma vez, o número limitado de pacientes pode ter impossibilitado o encontro de diferença significativa entre os grupos.



## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma reflexão dos dados nos remete à ideia da necessidade de dar continuidade a este estudo. Embora tenha havido limitações no presente estudo, como o número limitado de pacientes, a falta da dosagem dos níveis plasmáticos das proteínas S, C e FVII, a análise de GT realizada apenas em um momento, alguns dados foram promissores. A sensibilidade mostrada pelo teste de GT na distinção entre pacientes e controles, particularmente na condição experimental de *Low tissue factor* a tentativa de se estimar uma faixa de referência para os parâmetros de GT valendo-se de uma população comprovadamente saudável (doadores de sangue); a maior tendência dos indivíduos dos grupos não-O apresentaram maior GT, são alguns dos aspectos positivos deste estudo.

Considerando o alto risco de sangramento permanente que um paciente portador de coagulopatia grave exhibe, com sérias limitações em seu cotidiano, esforços merecem ser envidados continuamente no sentido de uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos nas manifestações clínicas desses pacientes, bem como em seu manejo. Assim, como perspectivas, vislumbra-se estudos com foco na aplicação do teste de GT, em diferentes momentos, nos pacientes com hemofilia A e B, doença de Von Willebrand, além de outras coagulopatias, atendidos na Fundação Hemominas. Como oportuna complementação, tais resultados seriam correlacionados ao perfil genético de cada paciente. Em paralelo, vislumbra-se também o estabelecimento de valores de referência para os diversos parâmetros de GT, sob as condições de *Low* e *High tissue factor*, de acordo com o sexo e faixa etária, valendo das amostras de sangue dos doadores da referida Instituição.

## 10. CONCLUSÕES

Uma análise dos dados em conjunto nos permitiu concluir que:

- A presença de variações genéticas nos genes das proteínas envolvidas na coagulação e anticoagulação natural e o potencial de geração de trombina não influenciaram manifestações hemorrágicas de pacientes com hemofilia A moderada e grave. Consequentemente, não influenciaram o consumo de fator destes pacientes.
- Os grupos sanguíneos não-O e O não influenciaram a tendência hemorrágica e, consequentemente, nem o consumo de fator.
- O teste de Geração de trombina, particularmente na condição *Low tissue factor*, proporcionou uma boa discriminação entre pacientes com hemofilia A e controles, mas não foi capaz de discriminar entre aqueles com baixo e alto perfil hemorrágico.
- Os pacientes dos grupos sanguíneos não-O apresentaram maior geração de trombina em comparação àqueles do grupo sanguíneo O.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIACH, M.; NICAUD, V.; ALHENC-GELAS, M.; GANDRILLE, S.; ARNAUD, E.; AMIRAL, J.; GUIZE, L.; FIESSINGER, J. N.; EMMERICH, J. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.19(6), p.1573-6, 1999.
2. ALBÁNEZ, S.; OGIWARA, K.; MICHELS, A.; HOPMAN, W.; GRABELL, J.; JAMES, P.; LILLICRAP, D. Aging and ABO blood type influence von Willebrand factor and factor VIII levels through interrelated mechanisms. **J Thromb Haemost**, v.14, p.953–63, 2016.
3. ALEDORT, L. M.; HASCHMEYER, R. H.; PETTERSSON, H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. **J Intern Med**, v.236, p.391–9, 1994.
4. AR, C. M.; BAYKARA, O.; BUYRU, N. and BASLAR, Z. The Impact of Prothrombotic Mutations on Factor Consumption in Adult Patients with Severe Hemophilia. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v.15(6) p. 660-5, 2009.
5. BAGOT, C. N. e LEISHMAN, E. Establishing a reference range for thrombin generation using a standard plasma significantly improves assay precision. **Thrombosis Research**. v.136, p.139–143, 2015.
6. BELTRAN-MIRANDA, C. P.; KHAN, A.; JALOMA-CRUZ, A. R.; LAFFAN, M. A. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. **Haemophilia**, v.11, p.326-34, 2005.
7. BERNTORP, E.; SALVAGNO, G. L. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. **Semin Thromb Hemost.** v.34(7), p.670-82. 2008.

8. BERTINA, R. M.; KOELEMAN, B. P. C.; KOSTER, T.; ROSENDAAL, F. R.; DIRVEN, R. J.; DE RONDE, H.; VAN DER VELDEN, P. A.; REITSMA, P. H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, v.369, p.64-7, 1994.
9. BLANCHETTE, P.; RIVARD, G.; ISRAELS, S.; ROBINSON, S.; ALI, K.; WALKER, I.; STAIN, A. M.; BLANCHETTE, V. A survey of factor prophylaxis in the Canadian haemophilia A population. **Haemophilia**, v.10, p.679-83, 2004.
10. BOLTON-MAGGS, P.H.; PASI, K.J. Haemophilias A and B. **Lancet**, v.361, p.1801-9, 2003.
11. BOWEN, D. J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v.1, p.33-42, 2003.
12. BRUMMEL-ZIEDINS, K. E.; WHELIHAN, M. F.; RIVARD, G. E. and BUTENAS, S. Activated protein C inhibitor for correction of thrombin generation in hemophilia A blood and plasma. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.9, p. 2262-7, 2011.
13. BUTENAS, S.; ORFEO, T.; KALAFATIS, M. and MANN, K. G. Peptidomimetic inhibitors for activated protein C: implications for hemophilia management. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.4, p.2411-6, 2006.
14. CASTOLDI, E.; HACKENG, T. M. Regulation of coagulation by protein S. **Curr. Opin. Hematol**, v.15, p.529–36, 2008.
15. CASTOLDI, E.; ROSLING, J. Thrombin generation tests. **Thrombosis Research**. v.127, p.21 – 5, 2011.

16. CHOI, S. J.; AHN, H. J.; LEE, J. I. Comparison of coagulation factors and blood loss between O and non-O blood types following hydroxyethyl starch infusion. **Korean J Anesthesiol**, v.58(4), p. 344-50, 2010.
17. COHEN, W.; CASTELLI, C.; ALESSI, M. C.; AILLAUD, M. F.; BOUVET, S.; SAUT, N.; BRUNET, D.; BARTHET, M. C.; TREGOUET, D. A.; LAVIGNE, G.; MORANGE, P. E. ABO Blood Group and von Willebrand Factor Levels Partially Explained the Incomplete Penetrance of Congenital Thrombophilia. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v.32, p.2021-8, 2012.
18. CRIPE, L.D.; MOORE, K.D.; KANE, W.H. Structure of the gene for human coagulation factor V. **Biochemistry**, v.31, p.3777-85, 1992.
19. DAHLBACK, B.; VILLOUTREIX, B. O.; The anticoagulant protein C pathway. **FEBS Letters**, v.579(15), p.3310 – 6, 2005.
20. DARGAUD, Y.; BÉGUIN, S.; LIENHART, A.; AL DIERI, R.; TRZECIAK, C.; BORDET, J. C.; HEMKER, H. C.; NEGRIER, C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. **Thromb Haemost.** v.93(3), p.475-80. 2005.
21. DARGAUD, Y.; LIENHART, A.; MEUNIER, S.; HEQUET, O.; CHAVANNE, H.; CHAMOULARD, V.; MARIN, S.; NEGRIER, C. Major surgery in a severe haemophilia A patient with high titre inhibitor: use of the thrombin generation test in the therapeutic decision. **Haemophilia**. v.11(5), p. 552-8, 2005.
22. DE STEFANO, V; ROSSI, E; PACIARONI, K; LEONE, G. Screening For Inherited Thrombophilia: Indications And Therapeutic Implications. **Haematologica**, v.87, p.1095-108, 2002.
23. DI PERNA, C.; FRANCHINI, M.; RICCARDI, F.; RIVOLTA, G. F.; ANGERI, F. and TAGLIAFERRI, A. Association between haemophilia and inherited thrombophilia: A single centre survey. **Haemophilia**, v.17, p.155-71, 2011.

24. ESCURIOLA ETTINGSHAUSEN, C.; HALIMEH, S.; KURNIK, K.; et al. Symptomatic onset of severe hemophilia A in childhood is dependent on the presence of prothrombotic risk factors. **Thromb Haemost**, v.85, p.218-20, 2001.
25. FAIR, D. S. Quantitation of factor VII in the plasma of normal and warfarin-treated individuals by radioimmunoassay. **Blood**. v.62, p.784-91, 1983.
26. FERREIRA, C. E. S.; ANDRIOLO, A.. Intervalos de referência no laboratório clínico. **J Bras Patol Med Lab**. v.44 (1), p.11-6, 2008.
27. FOSTER, D. C.; YOSHITAKE, S.; DAVIE, E. W. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v.82, p.4673–7, 1985.
28. FRANCHINI, M. and LIPPI, G. Factor V Leiden and hemofilia. **Thrombosis Research**, v.125, p.119-23, 2010.
29. FRANCO, H. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Hemostasia e trombose**, v.34, p. 229-37, 2001.
30. GHOSH, K.; SHETTY, S.; MOHANTY, D. Milder clinical presentation of haemophilia A with severe deficiency of factor VIII as measured by one-stage assay. **Haemophilia**, v.7, p.9-12, 2001.
31. GITSCHIER, J.; WOOD, I. W.; GORALKA, T. M.; WION, K. L.; CHEN, E. Y.; EATON, D. H.; LEHAR, G. A.; CAPON, D. J.; LAWN, R. M. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v.312, p.326–30, 1984.
32. GRAW, J.; BRACKMANN, H. H.; OLDENBURG, J.; SCHNEPPENHEIM, R.; SPANNAGL, M.; SCHWAAB, R. Haemophilia a: from mutation analysis to new therapies. **Natura**, v.6, p.488-501, 2005.

33. HAGEN, F.S.; GRAY, C.L.; O'HARA, P.; et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, p.2412-6, 1986.
34. HEDNER, U.; GINSBURG, D.; LUSHER, J. M.; HIGH, K. A. Congenital Hemorrhagic Disorders: New Insights into the Pathophysiology and Treatment of Hemophilia. **American Society of Hematology**. p.241 – 265, 2000.
35. HEMKER & BEGUIN. Subsampling to a cuvet with a thrombin-specific chromogenic substrate. **Verh K Acad Geneesk Belg**, v.47, p.321-39, 1985.
36. HEMKER, H. C.; WIELDERS, S.; KESSELS, H.; BÉGUIN, S. Continuous registration with a weak thrombin-specific fluorogenic substrate in full plasma. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v.33, p.4–15, 2003.
37. HEMKER, H. C.; KREMERS, R. Data management in Thrombin Generation. **Thrombin Research**, v.131(1), p.3 – 11, 2013.
38. HEMKER, H. C.; WIELDERS, S.; KESSELS, H.; BEGUIN, S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. **Thromb Haemost**, v.70, p.617–24, 1993.
39. HEMKER, H. C.; BEGUIN, S. Thrombin Generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. **Thromb Haemost**, v.74, p.134-8, 1995.
40. HEMKER, H. C.; DIERI, R.; SMEDT, E. Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system. **Thromb Haemost**, v.96, p.553-61, 2006.
41. HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIIa. **Blood Reviews**, v.17, p.S1-S5, 2003.
42. HOYER, L.W. Hemophilia A. **New England Journal of Medicine**, v.330, p.38-47, 1994.

43. HOYER, L. W. Molecular pathology and immunology of factor VIII (hemophilia A and factor VIII inhibitors). **Human Pathology**, v.18, p.153-61, 1987.
44. HUNAULT, M.; ARBINI, A. A.; LOPACIUK, S.; et al. The Arg353Gln polymorphism reduces the level of coagulation factor VII. In vivo and in vitro studies. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.17, p.2825-9, 1997.
45. JAYANDHARAN, G. R.; NAIR, S. C.; POONNOOSE, P. M.; THOMAS, R.; JOHN, J.; KESHAV, S. K. Polymorphism in factor VII gene modifies phenotype of severe haemophilia. **Haemophilia**, v.15, p.1228–36, 2009.
47. KACHOOEI, A. R.; BADIEI, Z.; ZANDINEZHAD, M. E.; EBRAHIMZADEH, M. H.; MAZLOUMI, S. M.; OMIDI-KASHANI, F.; MORADI, A.; MAHDAVIAN-NAGHASHZARGAR, R. and RAZI, S. Influencing factors on the functional level of haemophilic patients assessed by FISH. **Haemophilia**, v.20, p.185-9, 2014.
48. KANE, W. H.; DAVIE, E. W. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, p.6800-4, 1986.
49. LECUT, C.; PETERS, P.; MASSION, P. B.; GOTHOT, A. Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory?. **Ann Biol Clin**. v.73(2), p.137-49, 2015.
50. LEE, D. H.; WALKER, I. R.; TEITEL, J. Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A. **Thromb Haemost**, v.83, p.387–91, 2000.
51. LEROY-MATHERON, C.; DUCHEMIN, J.; LEVENT, M.; GOUAULT-HEILMANN, M. Genetic modulation of plasma protein S levels by two frequent dimorphisms in the PROS1 gene. **Thromb Haemost**, v.82, p.1088-92, 1999.



52. LONG, G.L.; MARSHALL, A.; GARDNER, J.C.; NAYLOR, S.L. Genes for human vitamin K-dependent plasma proteins C and S are located on chromosomes 2 and 3, respectively. **Somat. Cell Mol. Genet**, v.14, p.93–8, 1988.
53. LUNDWALL, A.; DACKOWSKI, W.; COHEN, E.; et al. Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulator of blood coagulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.83, p.6716–20, 1986.
54. MACFARLANE, R. G. A clotting scheme for 1964. **Thromb Diath Haemorrh Suppl**, v.17, p.45 – 52, 1965.
55. MACFARLANE, R. G.; BIGGS, R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. **J Clin Pathol**, v.6(1), p.3 – 8, 1953.
56. MANN, K. G.; BUTENAS, S.; BRUMMEL, K. The dynamics of thrombin formation. **Arterioscler, Thromb Vasc Biol**. v.23, p.17–25, 2003.
57. MARCHETTI, M.; CASTOLDI, E.; SPRONK, H. M.; VAN OERLE, R.; BALDUCCI, D.; BARBUI, T.; ROSING, J.; TEN CATE, H.; FALANGA, A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Blood**. v112, p.4061-8, 2008.
58. MATSUI, T.; TITANI, K.; MIZUOCHIS, T. Structures of the Asparagine-linked Oligosaccharide Chains of Human von Willebrand. **The journal of biological chemistry**. V.267(13), p. 8723-31, 1992.
59. MENDES, C. P.; HACKEL, C.; ARRUDA, V. R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. Determination of the allele frequencies of three polymorphisms in the promoter region of the human protein C gene in three Brazilian ethnic groups. **Human Heredity**. v.49(1), p.27-30, 1999.
60. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil 2015**. p.1-69, 2017.

61. MOLHO, P.; ROLLAND, N.; LEBRUN, T.; et al. Epidemiological survey of the orthopaedic status of severe haemophilia A and B patients in France. The French Study Group. **Haemophilia**, v.6, p.23-32, 2000.
62. MÜLLER, F.; MUTCH, N. J.; SCHENK, W. A.; SMITH, S. A.; ESTERL, L.; SPRONK, H. M.; SCHMIDBAUER, S.; GAHL, W.; MORRISSEY, J. H.; RENNE, T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. **Cell**, v.139(6), p.1143-56, 2009.
63. POLLMANN, H.; RICHTER, H.; RINGKAMP, H.; JURGENS, H. When are children diagnosed as having severe haemophilia and when do they start to bleed? A 10-year single-centre PUP study. **Eur J Pediatr**, v.158, p.166-70, 1999.
64. POORT, S. R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M.; A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**. v. 88, p.3698-703, 1996.
65. RAMACCIOTTI, E. A.; WOLOSKER, N. A.; PUECH-LEAOA, P.; ZERATTI, E. A. A.; GUSSONB, P. R.; DEL GIGLIOB, A.; FRANCO, R. F. Prevalence of factor V Leiden, FII G20210A, FXIII Val34Leu and MTHFR C677T polymorphisms in cancer patients with and without venous thrombosis. **Thrombosis Research**. v.109, p.171 – 4, 2003.
66. RENDO, P.; SHAFER, F.; KORTH-BRADLEY, J.M.; SIVAMURTHY, K. and KORIN, J.. Factors That Influence The Bleeding Phenotype In Severe Hemophilic Patients. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**. v. 24, p.683-90, 2013.
67. RIZZA, C.R.; SPOONER, R.J. Treatment of haemophilia and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom. **British Medical Journal (Clinical Research Ed.)**, v.286, p.929-33, 1983.


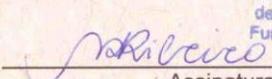
68. ROJNUCKARIN, P.; UAPRASERT, N.; AKKAWAT, B.; SETTAPIBOON, R.; T. and NANAKORN, T.; INTRAGUMTORNCHAI, T. Protein C, protein S and von Willebrand factor levels correlate with bleeding symptoms: A population-based study. **Haemophilia**. v. 18, p. 457-62, 2012.
69. ROSENDAAL, F.R. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**. v.1, p.1–12, 2005.
70. ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H. Genetics of VT. **J. Thromb. Haemost.**, v.7, p.301–4, 2009.
71. SANTAGOSTINO, E.; MANCUSO, M. E.; TRIPODI, A.; CHANTARANGKUL, V.; CLERICI, M.; GARAGIOLA, I.; MANNUCCI, P. M. Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. **J Thromb Haemost.** v.8(4), p.737-43, 2010 .
72. SCHRAMM, W.; ROYAL, S.; KRONER, B.; et al. Clinical outcomes and resource utilization associated with haemophilia care in Europe. **Haemophilia**, v.8, p.33-43, 2002.
73. SHETTY, S. and GHOSH, K. Reduced Clinical Severity in a Mutationally Well-Characterized Cohort of Severe Hemophilia With Associated Thrombophilia. **American Society for Clinical Pathology**. v. 130, p.84-7, 2008.
74. SHETTY, S.; VORA, S.; KULKARNI, B.; MOTA, L.; VIJAPURKAR, M.; QUADROS, L. and GHOSH, K. Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. **British Journal of Haematology**. v. 138, p.541-4, 2007.
75. SHIMA, M.; MATSUMOTO, T.; FUKUDA, K.; et al. The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A patients with very low levels of factor VIII activity (FVIII:C). **Thromb Haemost**, v.87, p.436-441, 2002.

76. SPEK, C.A.; POORT, S.R.; BERTINA, R.M.; REITSMA, P.H. Determination of the allelic and haplotype frequencies of three polymorphisms in the promoter region of the human protein C gene. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.5, p.309-11, 1994.
77. SPRONK, M. H. H.; GOVERS-RIEMSLAG, W. P. J.; TEN CATE, H. The blood coagulation system as a molecular machine. **BioEssays**, v.2, p.1220–8, 2003.
78. TEIXEIRA, T. B. M.; MACHADO, T. F.; MONTAVÃO, S. A.; OZELLO, M. C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. Assessing the coagulation factor levels, inherited thrombophilia, and ABO blood group on the risk for venous thrombosis among Brazilians. **Clin Appl Thromb Hemost**. v.15(4), p.408-14, 2009.
79. TOOLE, J.J., KNOPF, J.L., WOZNEY, J.M., SULTZMAN, L.A., BECKER, J.L., PITTMAN, D.D., KAUFFMAN, R.J., BROWN, E. Molecular cloning of a cDNA encoding human antiheamophilic factor. **Nature**, v.312, p.342–7, 1984.
80. TRIPODI, A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 62(5), p. 699-707, 2016.
81. TROSSAERT, M.; REGNAULT, V.; SIGAUD, M.; BOISSEAU, P.; FRESSINAUD, E.; LECOMPTE, T. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. **J Thromb Haemost**. v.6(3), p.486-93, 2008.
82. TUTEN, H.; HALIT, C. A. M; ZDEMIR, M. O.; BEZGAL, F.; BUYRU, N.; LFIKAR, B. L. Z. and CELKAN, T. Effect of Prothrombotic Mutations on Factor Consumption in Children With Hemophilia. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**. v. 19, p.445-8, 2004.

83. VAN DEN BERG, H. M.; DE GROOT, P. H. G. and FISCHER, K. Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 5, p.151-156, 2007.
84. VAN DIJK, K.; VAN DER BOM, J. G.; FISCHER, K.; DE GROOT, P. G. and VAN DEN BERG, H. M. Phenotype of severe hemophilia A and plasma levels of risk factors for thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.5, p.1062-90, 2007.
85. VAN DIJK, K.; VAN DER BOM, J.G.; LENTING, P.J.; et al. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A. **Haematologica**, v.90, p.494-8, 2005.
86. VEHAR, G.A., KEYT, B., EATON, D., RODRIGUEZ, H., O'BRIEN, D.P., ROTBLAT, F., OPPERMANN, H., KECK, R., WOOD, W.I., HARKINS, R.N., TUDDENHAM, E.G.D., LAWN, R.M., CAPON, D.J. Structure of human factor VIII. **Nature**, v.312, p.337-42, 1984.
87. VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**.v. 93(1), p.327-58, 2013.
88. VINE, M.D.; ANDREW, K. Recent Advances in Haemostasis and Thrombosis. **Retina**, v.29(1), p.1-7, 2009.
89. WOLBERG, A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Rev**. v.21, p.131-42, 2007.
90. WU, O., BAYOUMI, N., VICKERS, M. A., CLARK, P. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. **J Thromb Haemost**. v.6, p.62-9, 2008.

## ANEXOS

## ANEXO 1

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas</p>	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO</b>	
1. Título do Projeto de Pesquisa: Influência de polimorfismos em genes de proteínas da coagulação sanguínea na diversidade dos efeitos clínicos da hemofilia A	
<b>SUJEITOS DA PESQUISA</b>	
2. Número de sujeitos No Centro: 60 Total: 60	3. Grupos Especiais: ( ) Menor de 18 anos; ( ) Portador de deficiência mental ( ) Embrião/feto; ( ) Relação de dependência (militares, presidiários...) ( ) Outros; (X) Não se aplica
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>	
4. Nome: Daniel Gonçalves Chaves	
5. Instituição a que pertence: Fundação Hemominas – Serviço de Pesquisa	
<b>INSTITUIÇÃO (ÕES) ONDE SERÁ REALIZADO</b>	
6. Nome: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais	
7. Unidade/Órgão: Administração Central / Serviço de Pesquisa	
8. Participação Estrangeira: Sim ( ) Não (X)	
9. Projeto Multicêntrico: Sim ( ) Não (X) Nacional ( ) Internacional ( )	
<b>PATROCINADOR</b> Não se aplica (X)	
10. Nome:	
<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP</b>	
11. Data de Entrada: 02/04/2011	12. Registro no CEP: 306
13. Objetivos: O projeto tem por objetivo investigar a influência de polimorfismos em genes de proteínas da coagulação sanguínea na diversidade dos efeitos clínicos da hemofilia A.	
14. Sumário do Projeto:  Trata-se de projeto de pesquisa a ser realizado no Hemocentro de Belo Horizonte com pacientes portadores de hemofilia A. Os pacientes participantes do estudo serão submetidos a coleta de 5ml de sangue periférico. O projeto prevê a realização de testes genéticos para a identificação de mutações nos genes do FVII, proteína S e proteína C além de ensaios de doseamento dos níveis séricos dessas proteínas e de suas atividades. Os pacientes que aceitarem participar da pesquisa terão seus prontuários médicos analisados para o fim da pesquisa.	
15. Comentário dos Relatores:  O presente projeto, após as adequações apresentadas ao CEP, contempla as diretrizes da Resolução CNS/MS 196/96.: Diante do exposto, este CEP considera o projeto aprovado.	
16. Parecer: Aprovado (X) Pendência ( ) Não Aprovado ( ) Data: 20/05/2011 Data: Data:	
17. Cronograma de execução:  Início: 1º semestre/2011 Fim: 2º semestre/2012	18. Enviar relatórios em: janeiro de 2013
19. Encaminhamento à CONEP:  Os dados acima para registro ( ) O projeto para apreciação ( ) Data:	20. Coordenador  <div style="text-align: right;">             Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hemominas Assinatura         </div>

## ANEXO 2

### TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CIENTÍFICA

Nº Registro CEP-HEMOMINAS: 306

**Título do Projeto: *Influência de polimorfismos em genes de proteínas da coagulação sanguínea na diversidade dos efeitos clínicos da hemofilia A***

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você a participar de um projeto de pesquisa que envolve a Fundação Hemominas. A participação neste estudo é voluntária. Você não terá nenhum gasto com a sua participação no estudo. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento. Neste caso, você não perde qualquer benefício na Fundação Hemominas.

Você tem hemofilia do tipo A. A pessoa que tem hemofilia não produz uma proteína chamada Fator 8 em quantidade suficiente para fazer a coagulação do sangue. Algumas pessoas que têm hemofilia podem apresentar episódios mais graves de hemorragia sem motivo aparente. Existem algumas características genéticas que podem influenciar manifestações mais graves da hemofilia A.

Os objetivos deste estudo são: 1) retirar do sangue coletado o material genético chamado DNA e o plasma; 2) analisar o seu DNA e proteínas do sangue para verificar se algumas características genéticas estão associadas a alguns episódios graves ligados à hemofilia A (hemartrose, inibidores, hemorragias).

Se você concordar em participar deste estudo, você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames laboratoriais. Este material será separado e estocado no Laboratório de Pesquisa no Hemocentro de Belo Horizonte e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Você poderá ser convidado a retornar a Hemominas para novas consultas com o médico, caso você e o médico concordem.

Os riscos e desconfortos deste estudo incluem o desconforto de coletar o sangue: este inclui a dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da punção.

O conhecimento que for adquirido na pesquisa poderá trazer informações e orientações futuras em relação às hemorragias espontâneas. Você não será identificado quando o seu sangue ou seu registro for utilizado, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza a leitura de seus prontuários. Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você sigilo e privacidade. Os resultados alcançados serão repassados ao seu médico e a você. Após a avaliação dos resultados alcançados e associação com as características clínicas dos pacientes, seus resultados serão anexados ao seu prontuário.

#### Declaração de consentimento

Declaro que fui informado sobre os métodos e meios de coleta de material a ser utilizado, as inconveniências, riscos que podem vir a ocorrer em consequência da pesquisa. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar como sujeito da pesquisa deste projeto.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

#### Identificação do participante:

Nome: \_\_\_\_\_ Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço residencial: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador - Daniel Gonçalves Chaves

\_\_\_\_\_  
Local e Data

Contato com o pesquisador: (31) 3768 4587 - 3248 4535 - daniel.chaves@hemominas.mg.gov.br

## ANEXO 3

### TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CIENTÍFICA

Nº Registro CEP-HEMOMINAS: 306

**Título do Projeto: *Influência de polimorfismos em genes de proteínas da coagulação sanguínea na diversidade dos efeitos clínicos da hemofilia A***

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você a participar de um projeto de pesquisa que envolve a Fundação Hemominas. A participação neste estudo é voluntária e você não terá nenhum gasto para participar. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento. Neste caso, você não perde qualquer benefício na Fundação Hemominas.

Caso aceite participar, você será incluído em um grupo controle, constituído por pessoas saudáveis. O objetivo desse estudo é verificar alguns aspectos genéticos dos pacientes com hemofilia A. A pessoa que tem hemofilia não produz uma proteína chamada Fator 8 que atua na coagulação do sangue e têm sangramentos graves. Algumas pessoas que têm hemofilia podem apresentar episódios mais graves de hemorragia sem motivo aparente. Existem algumas características genéticas que podem influenciar manifestações mais graves da hemofilia A.

Os procedimentos deste estudo incluem: 1) retirar do sangue o material genético chamado DNA e o plasma; 2) comparar o seu DNA e proteínas para verificar se existe alguma relação genética com os fatores complicadores da hemofilia A.

Se você concordar em participar deste estudo, você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames laboratoriais. Este material será separado e estocado no Laboratório de Pesquisa no Hemocentro de Belo Horizonte e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. O seu DNA e o seu plasma serão utilizados para análise de proteínas da coagulação: Proteína C, Proteína S, Fator VII, Fator V e Protrombina. Caso seja detectada alguma alteração, você será informado pela equipe do projeto e receberá as orientações (acompanhamento médico e aconselhamento genético). Você pode ter acesso aos resultados da pesquisa se quiser. Em caso de danos decorrentes da pesquisa, você tem direito a indenização e, se necessário, receberá assistência integral, pelo tempo que for necessário, sem custos.

Os riscos e desconfortos deste estudo podem incluir a dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da punção. Para evitar nova punção (picada de agulha), o seu sangue será coletado durante o processo de doação.

Você não será identificado quando o seu material for utilizado. Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você sigilo e privacidade.

#### Declaração de consentimento

Declaro que fui informado sobre os métodos de coleta de material a ser utilizado, as inconveniências, riscos que podem vir a ocorrer em consequência da pesquisa. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar deste projeto. Estou ciente de que receberei uma via original desse TCLE assinado.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

#### Identificação do participante:

Nome: \_\_\_\_\_ Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço residencial: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador - Daniel Gonçalves Chaves

\_\_\_\_\_  
Local e Data

Contato com o pesquisador: (31) 3768 4587 - daniel.chaves@hemominas.mg.gov.br

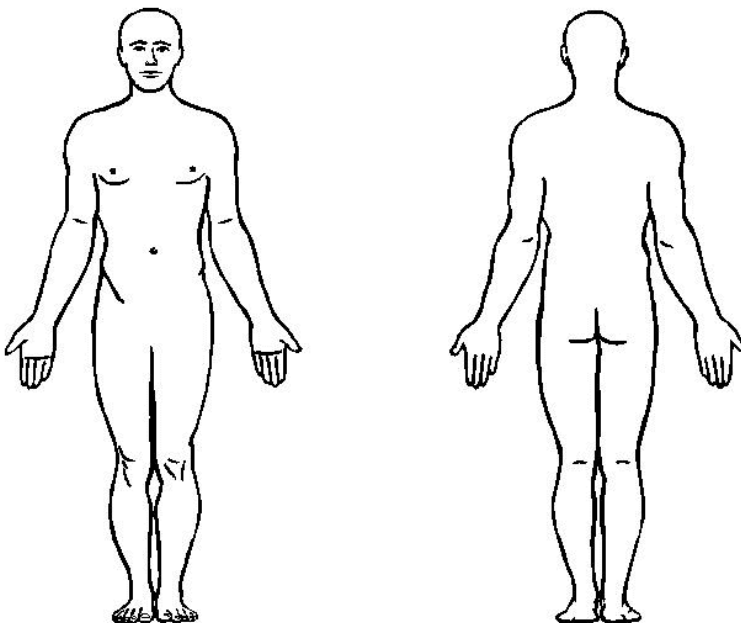
Contato com o CEP-Hemominas: (31) 3768 4535 - cep@hemominas.mg.gov.br







10. Marcar no desenho articulações acometidas:



11. Presença de inibidor? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual a dosagem nos últimos 10 anos?

2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016

12. Relato de infecção após transfusão? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual? ( ) HBV ( ) HCV ( ) HIV

( ) HTLV ( ) Sífilis ( ) Chagas

**III – OUTROS DADOS:**

## 1. Doenças:

- |   |   |                                       |
|---|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Hipertensão arterial       | <input type="checkbox"/> Insuficiência cardíaca | <input type="checkbox"/> Arritmia     |
| <input type="checkbox"/> Doença coronariana         | <input type="checkbox"/> Asma, enfisema         | <input type="checkbox"/> Doença renal |
| <input type="checkbox"/> Doença hepática            | <input type="checkbox"/> Doença hemorrágica     | <input type="checkbox"/> Tromboses    |
| <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus          | <input type="checkbox"/> Doença da tireóide     | <input type="checkbox"/> Neoplasias   |
| <input type="checkbox"/> Não relatado no prontuário | <input type="checkbox"/> Outras: _____          |                                       |

## 2. Medicamentos em uso e dose:

---

---

---

---

---

---

#### IV- EXAMES MAIS RECENTES

Hemácias	Hemoglobina	VCM	HCM	CHCM
Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__
RDW	Plaquetas	Leucócitos	Neutrófilos (segmentado)	Neutrófilos (bastonetes)
Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__
Neutrófilos (metamielócitos)	Neutrófilos (mielócitos)	Linfócitos	Basófilos	Eosinófilos
Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__
Monócitos	Blastos	Promielócitos	Mielócitos	Metamielócitos
Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__	Data: __/__/__