

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

UMA AMPLA ABORDAGEM *IN SILICO* NA ANÁLISE DE MUTAÇÕES DE
SENTIDO TROCADO (*MISSENSE*) NAS HEMOFILIAS A E B

MARIANA ROST MEIRELES

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

Orientador: Prof.Dr.Francisco M. Salzano (*in memorian*), Prof.Dr.Gustavo F. Vieira

Co- orientadora: Profa.Dra.Eliane Bandinelli

Porto Alegre, Outubro de 2021

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hemostasia e no Núcleo de Imunoinformática do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Ninguém faz nada sozinho, por mais independente que seja. Chega o momento em que temos que dividir. Dividir opiniões, discutir resultados, buscar incentivos para continuar, compartilhar descobertas, falar um pouco sobre a vida, as alegrias, as dificuldades... Agradeço aos meus companheiros e incentivadores, que dividiram não só experiências de cunho científico, mas também sua vida comigo. Certamente é uma grande honra.

Agradeço ao inesquecível Prof. Salzano, cujos ensinamentos e conhecimentos iam muito além da vida acadêmica, sempre curioso e desafiador.

À Profa. Eliane Bandinelli (nossa querida Bandi), que me proporcionou tantas trocas e discussões, presente no dia a dia e sendo uma grande companheira.

Ao Prof. Gustavo Vieira, que procura fazer do seu laboratório um ambiente interativo, conhecendo a fundo seus alunos e criando com eles relações de amizade.

Considero tais não só como mestres, mas como amigos.

Aos professores do Departamento de Genética e sua busca pelo conhecimento, que colocam o PPGBM em um local de excelência em termos de ensino e produção científica.

Em especial às Professoras Mara Hutz e Ursula Matte, pelas quais tenho grande admiração, e que, em tempos presenciais, eram vizinhas do Laboratório de Hemostasia, e sempre se mostraram extremamente competentes e gentis.

Agradeço às minhas queridas colegas e ex-colegas do Laboratório de Hemostasia, com as quais convivi por longo período, e tenho uma relação de amizade e compartilhamento, em especial a Ana Paula e Mariana.

Agradeço aos meninos do Núcleo de Imunoinformática, parceiros nos trabalhos e sempre dispostos a colaborar: Bragatte e Eduardo (Dudu).

E agradeço, especialmente, àqueles que estavam comigo na rotina de terminar um Doutorado na pandemia, com todas as ausências e complicações do momento: meu noivo, Eduardo, que se mostrou um torcedor absoluto de meu sucesso, e minha família, que me ensina ao longo de toda a vida a ser forte, determinada, acreditando em mim e me ensinando o que é relevante na vida.

SUMÁRIO:

1. CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	12
1.1. Hemostasia e Via da Coagulação Sanguínea	12
1.1.1. <i>Hemostasia</i>	12
1.1.2. <i>Modelo Celular da Coagulação Sanguínea</i>	16
1.2. Hemofilia e Genética	19
1.2.1. <i>O gene F8</i>	20
1.2.2. <i>O Fator VIII da coagulação</i>	21
1.2.3. <i>O gene F9</i>	23
1.2.4. <i>O Fator IX da coagulação</i>	23
1.2.5. <i>Espectro Mutacional das Hemofilias A e B</i>	28
1.3. Tratamentos	30
1.3.1. <i>Desenvolvimento de inibidores</i>	31
1.3.2. <i>Terapia gênica na Hemofilia B</i>	34
1.4. Bioinformática Estrutural	34
1.5. Objetivo Geral	36
1.5.1. <i>Objetivo Específico 1</i>	36
1.5.2. <i>Objetivo Específico 2</i>	37
1.5.3. <i>Objetivo Específico 3</i>	37
1.5.4. <i>Objetivo Específico 4</i>	37
2. CAPÍTULO II – A NEW <i>IN SILICO</i> APPROACH TO INVESTIGATE MOLECULAR ASPECTS OF FACTOR IX MISSENSE CAUSATIVE MUTATIONS AND THEIR IMPACT ON HEMOPHILIA B SEVERITY	38

3. CAPÍTULO III- UNVEILING THE ROLE OF FACTOR VIII PHYSICAL-CHEMICAL SIGNIFICANT PROPERTIES AND THEIR PHENOTYPIC EFFECT IN HEMOPHILIA A THROUGH AN <i>IN SILICO</i> METHODOLOGY	50
4. CAPÍTULO IV - PREDICTING COAGULATION FACTOR IX HYPERACTIVE VARIANTS BY PHYSICOCHEMICAL CROSS-EXAMINATION THROUGH COMPUTATIONAL METHODS	116
5. CAPÍTULO V- POLYMORPHIC VARIANTS IN HEMOPHILIA A: ANALYZING THE ROLE OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES	151
6. CAPITULO VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS	178
7. REFERÊNCIAS	181
8. ANEXOS	187

ABREVIATURAS:

APC: proteína C ativada

areaSAS ou aSAS: *surface accessible-solvent area* (português: área de acessibilidade ao solvente)

areaSES ou aSES: *surface exposure-solvent area* (português: área de exposição ao solvente)

EP: *electrostatic potential* (português: potencial eletrostático)

FI: Fator I da coagulação

FII: Fator II da coagulação ou trombina

FIII: Fator III da coagulação

FIV: Fator IV da coagulação

FV: Fator V da coagulação

FVI: Fator VI da coagulação

FVII: Fator VII da coagulação

F8: Gene do FVIII

FVIII: Fator VIII da coagulação – envolvido na Hemofilia A

FVIIIa: FVIII ativado *

F9: Gene do FIX

FIX: Fator IX da coagulação - envolvido na Hemofilia B

FX: Fator X da coagulação

FvW: Fator von Willebrand

*A abreviatura dos fatores de coagulação seguidas da letra “a” indicam que aquele encontra-se ativado. Exemplo: FVIIIa corresponde a Fator VIII ativado.

HA: Hemofilia A

HB: Hemofilia B

kb: kilobases

kDa: kiloDaltons

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

kb: kilobases

kDa: kiloDaltons

pb: pares de base

RNAm: RNA mensageiro

TP: Tempo de protrombina

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de Tampão Plaquetário	15
Figura 2. O modelo celular da coagulação sanguínea	17
Figura 3. Padrão de transmissão genética da hemofilia	20
Figura 4. O Fator VIII, seus domínios e ativação	22
Figura 5. Fases do FIX: do gene à ativação.	25
Figura 6. Modificações pós-traducionais do fator IX.	27
Figura 7. A estrutura do eixo principal do FIX ativado.	28
Figura 8. Gráfico mostrando os tipos de mutações e a respectiva prevalência na Hemofilia A.	29
Figura 9. Variantes na Hemofilia B e sua distribuição nos domínios do Fator IX.	30
Figura 10. Resumo das informações que podem ser obtidas da estrutura tridimensional, relacionando com a função biológica	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variantes de sentido trocado relacionadas ao desenvolvimento de inibidores anti-FVIII	32
--	-----------

RESUMO

A hemofilia consiste em uma desordem da coagulação sanguínea de herança recessiva e ligada ao cromossomo X. Existem dois tipos de hemofilia, a hemofilia A e a B, causadas respectivamente por mutações nos genes *F8* e *F9*, que codificam os fatores VIII (FVIII) e IX (FIX) da coagulação sanguínea. Conforme a deficiência do fator correspondente, a hemofilia é classificada em leve (5-40%), moderada (1-5%) e grave (<1%). Ambas as condições possuem heterogeneidade alélica, existindo uma gama de mutações reportadas como suas causas. Existem cerca de 1.451 e 667 mutações de sentido trocado reportadas nos bancos de dados da hemofilia A e B, respectivamente, tendo uma grande contribuição na determinação da desordem. Mutações de sentido trocado são alvos de investigações sobre seu impacto, uma vez que seus efeitos variam conforme a região onde ocorre a troca de aminoácidos e pela troca em si, pelas propriedades que são alteradas na substituição. É crucial, para o bom diagnóstico, acompanhamento e interferência em pacientes, que as variantes sejam corretamente interpretadas entre patogênicas ou não. O presente trabalho investigou mais de 200 variantes para entender a determinação da patogenicidade nas hemofilias. As investigações foram conduzidas através de uma abordagem *in silico* desenvolvida e que leva em conta as características físico-químicas da estrutura proteica para relacioná-las ao fenótipo e inferir seu efeito. A abordagem é baseada em modelagem molecular seguida da avaliação das propriedades físico-químicas dos modelos, que são então combinadas em uma análise de clusterização hierárquica. Tal abordagem se mostrou eficiente na identificação de propriedades importantes para domínios proteicos e para determinar que tipo de atributos estão modificados nas variantes patogênicas. Assim, conseguimos acessar dados que ferramentas prévias não revelam. Também foi possível estabelecer parâmetros para variantes polimórficas e hiperativas, identificando clusters com características semelhantes e procurando estabelecer relação com o seu fenótipo. A abordagem elaborada contribui para elucidar efeitos de variantes de sentido trocado e para entender um pouco mais sobre os fatores VIII e IX, suas variantes e propriedades alteradas. Esperamos que essa abordagem possa ser expandida a uma aplicação clínica, e à outras desordens Mendelianas com heterogeneidade alélica.

ABSTRACT

Hemophilia is an X-linked recessive blood clotting disorder. There are two types of hemophilia, hemophilia A (HA) and B (HB), caused respectively by mutations in the *F8* and *F9* genes, which encode blood clotting factors VIII and IX. According to factor deficiency, hemophilia is classified as mild (5-40%), moderate (1-5%) and severe (<1%). Both conditions have allelic heterogeneity, with a range of mutations reported as disorders' cause. There are about 1,451 and 667 missense mutations reported in the HA and HB databases respectively, with a large contribution of such mutations in determining the disorder. Missense mutations lead to wide investigations since their effects vary according to the region where the amino acid exchange occurs and according to the exchange itself, due to the substitutions altered properties. The correct interpretation of which variants are pathogenic, and which are not, is crucial for correct diagnosis and patient interferences. The present work investigated more than 200 variants to understand the determination of pathogenicity in hemophilia. The investigations were conducted using an *in silico* approach developed by us, that takes into account the physicochemical characteristics of the protein structure, in order to infer and relate these features with substitutions' effect. The approach is based on molecular modeling followed by the evaluation of physicochemical properties, which are then combined in a hierarchical clustering analysis (HCA). This approach proved to be efficient in identifying important properties for protein domains and in determining which type of attributes are modified in pathogenic variants. Thus, we were able to access from it, data that other tools do not reveal. We were also able to establish parameters for polymorphic and hyperactive variants by identifying clusters with similar characteristics and trying to establish a relationship with their phenotype. The application of the elaborated approach should contribute to elucidate the effects of missense variants and to understand more about the coagulation factors, their variants and altered properties. We hope and believe that this approach can be expanded to a clinical application and to other Mendelian disorders with allelic heterogeneity.

1. Introdução

Coagulopatias hereditárias são condições herdáveis que levam a deficiência na coagulação. Isso ocorre pela redução ou ausência (qualitativa ou quantitativa) na atividade de proteínas chamadas fatores de coagulação sanguínea. Existem diferentes desordens e condições clínicas que se enquadram neste grupo, porém as mais representativas em número de casos são: a Hemofilia A, Hemofilia B e deficiência no Fator VW (Doença de von Willebrand). Apesar da prevalência das hemofilias no sexo masculino, o que reduz sua ocorrência, juntas elas correspondem a cerca de 50% dos casos de coagulopatias hereditárias, e se somadas a doença de von Willebrand, abrangem cerca de 90% dos casos de desordens hemorrágicas. Dito isso, é importante que se investigue os mecanismos pelos quais as hemofilias são estabelecidas e como se dá a patologia molecular da doença de maneira ampla. Um entendimento mais profundo dos aspectos citados pode contribuir positivamente com a implementação de tratamentos mais eficientes para estas condições.

1.1. Hemostasia e Via da Coagulação Sanguínea

1.1.1. Hemostasia

A hemostasia consiste em um processo fisiológico para evitar sangramentos excessivos, com a finalidade de manter o sangue fluido nos vasos sanguíneos sem que haja a ocorrência tanto de hemorragias quanto de trombozes. Além disso, o fenômeno também é crucial para o início do reparo tecidual, sendo altamente regulado e dinâmico (Schenone et al., 2004). As vias da coagulação sanguínea regulam a hemostasia de maneira refinada, evitando que haja algum tipo de colapso, pois erros em qualquer etapa desta via podem comprometer a coagulação.

O processo hemostático envolve desde a formação de um coágulo (coagulação) até a sua degradação (fibrinólise) (Marcus and Safier, 1993). Quando ocorre uma injúria vascular, a hemostasia acontece por meio de etapas sucessivas que incluem

a vasoconstrição (quando o estímulo do vaso traumatizado determina a contração da parede); a formação de um tampão plaquetário (o qual envolve a adesão, ativação e agregação das plaquetas); a ativação da cascata de coagulação sanguínea, a qual culmina na produção de uma rede de fibrina; e a dissolução desta rede, a fibrinólise.

Diariamente os vasos sofrem com rupturas vasculares que são, e em sua maioria, controladas através de oclusão pelo tampão plaquetário. A coagulação sanguínea é iniciada por substâncias ativadoras do endotélio vascular, da superfície plaquetária e por proteínas da coagulação sanguínea. Esta via é regulada por três componentes básicos: a parede vascular, as plaquetas e os fatores de coagulação (proteínas).

Quando ocorre dano em um vaso sanguíneo, as células sanguíneas (principalmente as plaquetas, que estão junto a parede dos vasos) tornam-se expostas ao colágeno e a fibroblastos do endotélio subjacente e ocorre a vasoconstrição, diminuindo o fluxo sanguíneo no local de injúria vascular, minimizando a perda de sangue. A etapa seguinte é a hemostasia primária, que consiste no processo que leva à formação do tampão plaquetário.

Durante a hemostasia primária, o Fator Von Willebrand (FvW) faz uma ligação com o colágeno subendotelial e o endotélio lesado. O FvW consiste em uma glicoproteína multimérica, que se liga a uma glicoproteína presente na membrana superficial das plaquetas (GPIb). Inicialmente o FvW está em uma conformação enovelada, mas com a ligação ao colágeno subendotelial e às células endoteliais lesadas, ocorre o desenovelamento deste fator. A partir deste desenovelamento ocorre a exposição dos domínios A1 do FvW, que fazem a ligação com o GPIb. A ligação do domínio A1 com GPIb, ativa outro receptor nas plaquetas, a integrina GPIIb/IIIa. A GPIIb/IIIa ativa liga-se ao domínio C1 do FvW e leva à autoativação das plaquetas.

O Fator Von Willebrand faz a integração das plaquetas com o endotélio. A ausência, diminuição ou mesmo problemas funcionais do Fator Von Willebrand levam à doença de Von Willebrand, que consiste em uma disfunção onde as plaquetas apresentam dificuldade em aderir ao subendotélio. Subsequentemente à adesão das plaquetas ao subendotélio, novas plaquetas são ativadas e se

aglutinam. No processo de ativação, as plaquetas têm a sua configuração alterada: tornam-se esféricas e emitem pseudópodos. Com a ativação, os trombócitos liberam grânulos citoplasmáticos (como ADP, tromboxano e serotonina) e estes recrutam novas plaquetas para o local da lesão vascular (Marcus and Safier, 1993). Células endoteliais fazem a sinalização para controlar este processo de auto-amplificação, visando conter o tampão plaquetário estritamente na região do dano vascular (Stassen et al., 2004). Além disso, mecanismos que restringem a agregação plaquetária e formação do coágulo de fibrina à região da injúria contribuem para a manutenção do sangue em um estado fluido (Hoffbrand, Pettit e Moss, 2001). Para que a coagulação sanguínea aconteça, um polímero de fibrina (coágulo) precisa ser formado a partir de fibrinogênio, por meio de uma reação catalisada pela trombina (Fator IIa), enzima formada a partir da protrombina, por uma reação estimulada por cálcio e tromboquinase (Riddel et al., 2007).

A interação entre as plaquetas e os fatores de coagulação sanguínea é o que dá origem a um tampão plaquetário, que acaba por estancar o sangramento no local da injúria vascular. A plaqueta adere-se a macromoléculas do tecido subendotelial na região lesada formando um tampão primário (Ruggeri and Mendolicchio, 2007). De maneira geral, as plaquetas estimulam a ativação desses fatores plasmáticos da coagulação, o que culmina na formação de um coágulo de fibrina, reforçando a agregação plaquetária (Berndt et al., 2014). À medida que ocorre a cicatrização na área do dano, o coágulo de fibrina é desfeito, bem como a agregação plaquetária.

As plaquetas (trombócitos) têm sua biogênese na medula óssea, consistindo em fragmentos anucleados de megacariócitos (ZAJICEK, 1954). Elas são recrutadas especialmente para a coagulação sanguínea, participando fisicamente e quimicamente deste processo. São ativadas por exposição ao colágeno e aderem-se ao subendotélio lesado, onde se agregam umas às outras e formam um trombo, que é posteriormente estabilizado. As plaquetas consistem em peças-chave da hemostasia primária e em um indivíduo adulto e saudável estão presentes em quantidades que vão aproximadamente de 150 a 400 bilhões de unidades por litro de sangue. Em eventos de injúria vascular, as plaquetas são altamente

especializadas para reconhecer perturbações junto às células endoteliais dos vasos sanguíneos ou exposição da matriz fibrosa (Berndt et al., 2014).

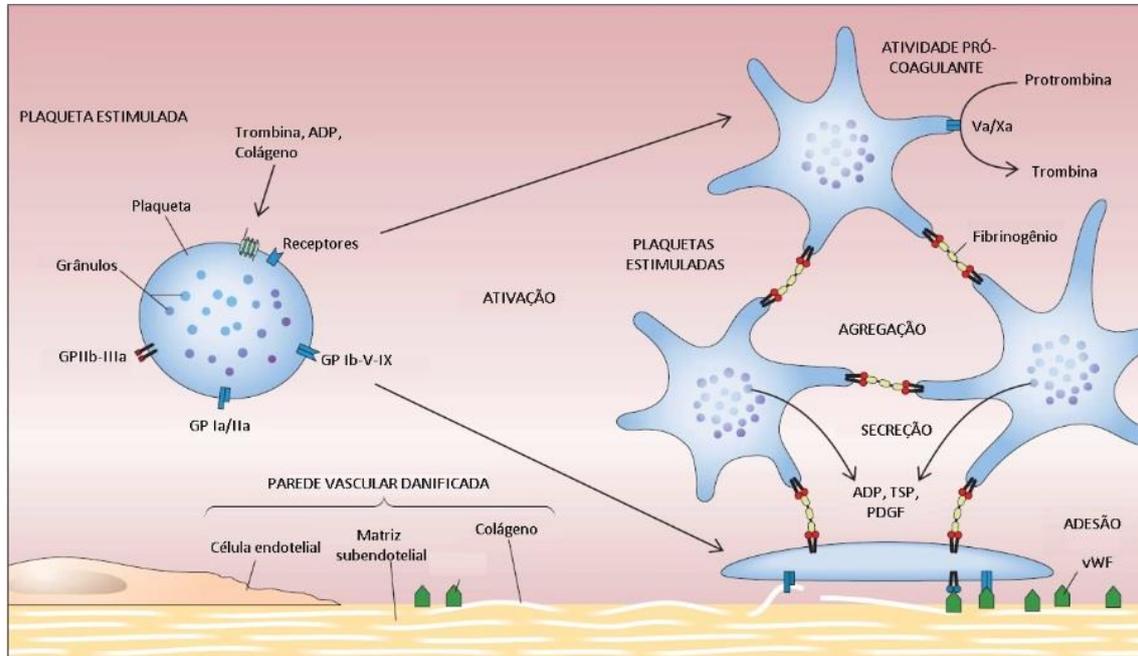


Figura 1. Formação de Tampão Plaquetário. O Fator von Willebrand (FvW) faz uma ponte entre a glicoproteína GPIb da superfície das plaquetas com as fibras colágenas. A glicoproteína GP IIb/IIIa também na superfície do complexo plaquetário, se liga ao fibrinogênio que está circulando, culminando na agregação plaquetária. A ativação das plaquetas leva a modificações morfológicas que as tornam adesivas, como a emissão de pseudópodes que as deixam numa forma mais “estrelada”. ADP = difosfato de adenosina; GP = glicoproteína; PDGF = fator de crescimento derivado de plaqueta; TSP = trombospondina; vWF = fator de Von Willebrand. Fonte: L.K. Leung L , MD. Hemostasis and its Regulation. ACP Medicine. 2012.

1.1.2. Modelo celular da coagulação sanguínea

Em 2001, além do presente modelo da “Cascata da Coagulação Sanguínea” no qual temos uma via intrínseca e uma via extrínseca (adicional), foi sugerido o “Modelo Celular de Coagulação Sanguínea” para melhor representar o que ocorre *in vivo* durante o reparo de uma lesão endotelial. Este novo modelo postula que o processo não ocorre como uma cascata, mas sim em estágios sobrepostos de iniciação, amplificação e propagação (Hoffman and Monroe, 2001) **(Figura 2)**.

Essas três etapas do modelo ocorrem na superfície de diferentes células. A iniciação acontece na superfície de fibroblastos com o fator tissular (TF)(Wilcox et al., 1989). A partir de um estímulo em favor da coagulação, os fatores Xa, IXa e a trombina são formados, com a finalidade de iniciar o processo de coagulação. O estímulo inicial (ativação) é direcionado para as plaquetas e elas vão tornar-se ativadas pelo processo de amplificação. As plaquetas são aderidas, ativadas e passam a acumular co-fatores ativados em suas superfícies. A etapa de propagação ocorre pela superfície ativada dessas plaquetas, quando os co-fatores ativados anteriormente se combinam com proteases ativas na superfície plaquetária. A atividade desses complexos pró-coagulantes leva a uma alta na concentração de trombina, resultando na polimerização de fibrina.

Existem muitos recursos que objetivam evitar uma coagulação imprópria, entre eles: (a) a inativação e a propagação ocorrem em diferentes superfícies celulares; e (b) os inibidores plasmáticos de proteases afetam as reações nas superfícies celulares inibindo proteases ativas difundidas no plasma.

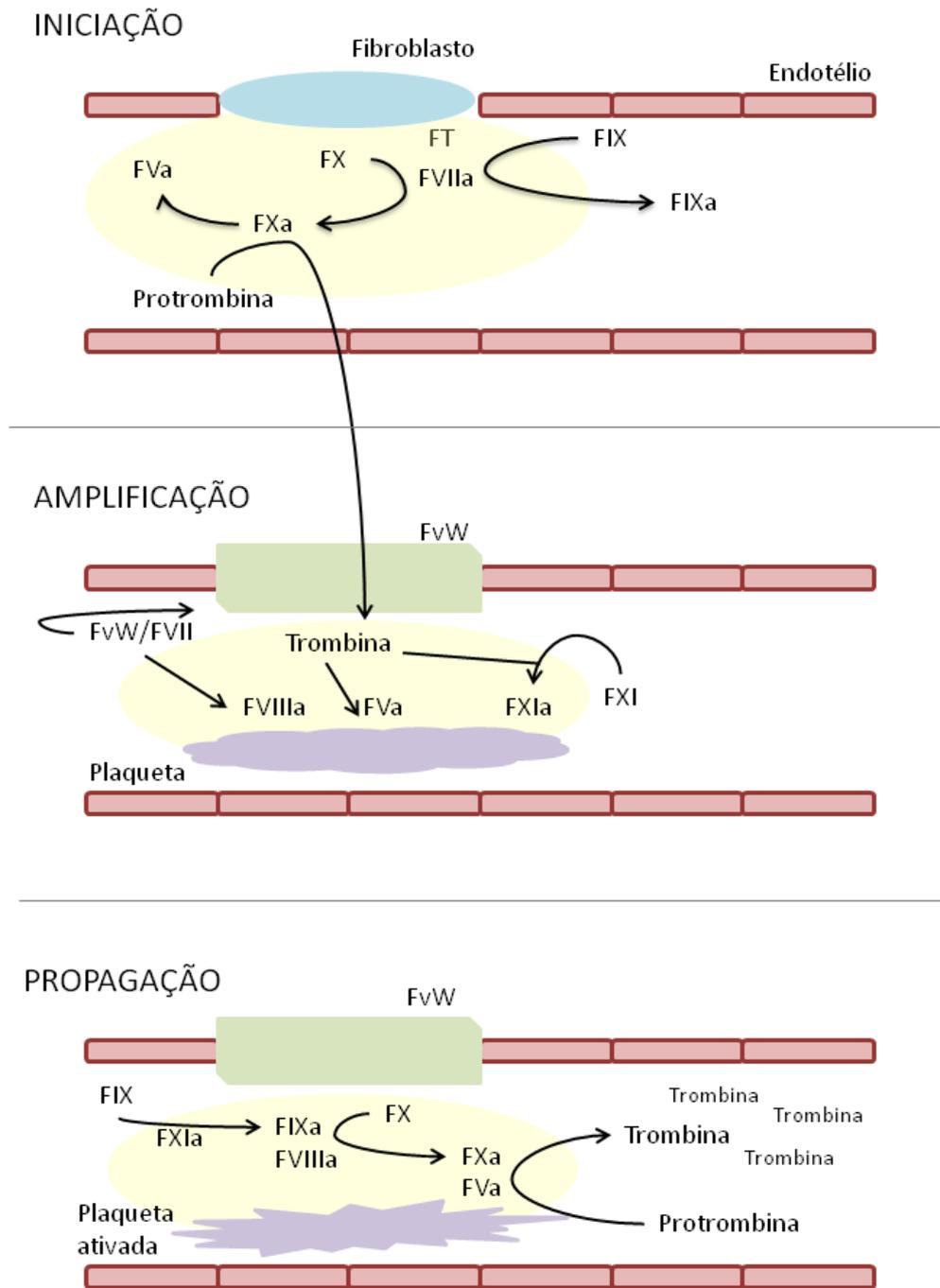


Figura 2. O modelo celular da coagulação sanguínea. Representação das etapas de iniciação, amplificação e propagação. **Figura original.**

Etapa de Iniciação: A coagulação é iniciada pelo fator tissular (FT), que consiste em uma proteína integral de membrana, não tendo relação estrutural com outras proteínas da coagulação, mesmo estando presente na estrutura da membrana onde esses fatores são sintetizados. A iniciação e a propagação ocorrem em superfícies de celulares distintas, o que possibilita uma regulação mais fina.

Quando ocorrem rompimentos na parede, o plasma entra em contato com o FT que está ligado a células extravasculares. O FVII acopla-se ao FT e é rapidamente ativado por proteases, que podem ou não estar associadas ao processo de coagulação (McMichael, 2012). A aproximação do complexo FVIIa/TF à superfície ativada das plaquetas é um passo chave no início da coagulação. Tal complexo leva à ativação de pequenas quantidades de FX e FIX. O FXa pode ativar o FV plasmático e algumas outras proteases celulares não envolvidas diretamente na coagulação sanguínea (Hoffman and Monroe, 2001).

Etapa de Amplificação: A amplificação da coagulação acontece na superfície das plaquetas (Hoffman and Monroe, 2001; Roberts et al., 2004). As plaquetas são ativadas pela trombina e passam a liberar o Fator V. O complexo Fator VIII/ FvW acopla-se aos receptores que foram expostos nas plaquetas, sendo então clivado e levando à ativação do FVIII e liberação do FvW (Federici, 2003). Enquanto o FVIII se mantém ligado às plaquetas, o FvW promove a adesão plaquetária no sub-endotélio, simultaneamente ao processo de coagulação. A trombina também é responsável por ativar o FXI na superfície plaquetária (Huntington, 2005), que por sua vez ativa quantidade maior de FIX, também nas plaquetas (Gailani, 2000). Deve ser também mencionado que uma pequena parcela de FIX já havia sido ativada durante a iniciação do processo.

Etapa de Propagação e finalização: Com todos os elementos ativados, ocorre a ligação dos cofatores VIIIa e Va nas plaquetas, e em seguida, a ligação das suas enzimas correspondentes, Fator IX ativado (FIXa) e FXa. O complexo tenase consiste em um sistema de ativação do FX, onde o FVIIIa está acoplado com o FIXa. O FVIII age como um catalisador que aumenta a ativação do FX pelo FIXa.

O FXa, juntamente com seu co-fator (FVa) forma o complexo protrombinase na superfície fosfolipídica das plaquetas ativadas. Esse complexo gera trombina a partir de protrombina (Versteeg et al., 2013). A trombina cliva os dímeros de fibrinogênio nas extremidades terminais das cadeias α e β , liberando os fibrinopeptídeos A e B que formam um monômero de fibrina capaz de auto-associação, levando à formação de um coágulo de fibrina. Ocorre a estabilização do coágulo por ativação do fator XIII, na presença de íons de cálcio (Hoffbrand, Pettit e Moss, 2001); (Butenas and Mann, 2002).

1.2. Hemofilia e Genética

As hemofilias A e B ocorrem devido a mutações nos genes *F8* e *F9* que codificam os fatores plasmáticos FVIII e FIX, respectivamente. Ambas as hemofilias possuem um padrão de herança recessivo e ligado ao cromossomo X, o que faz com que indivíduos do sexo masculino manifestem a condição mesmo que ela não seja evidenciada em sua mãe biológica, portadora. Existem muitas mutações que levam a hemofilia, sendo uma condição (tanto hemofilia A quanto hemofilia B) que possui uma elevada heterogeneidade alélica. A manutenção da doença na população ocorre por mutações de novo ou portadoras que transmitem a condição a sua prole. A hemofilia A tem uma prevalência cerca de 5 vezes maior que a hemofilia B, afetando 1 a cada 5.000 nascimentos no sexo masculino, enquanto a hemofilia B afeta cerca de 1 a cada 30.000. A figura F abaixo ilustra o padrão de transmissão genética da hemofilia (A e B).

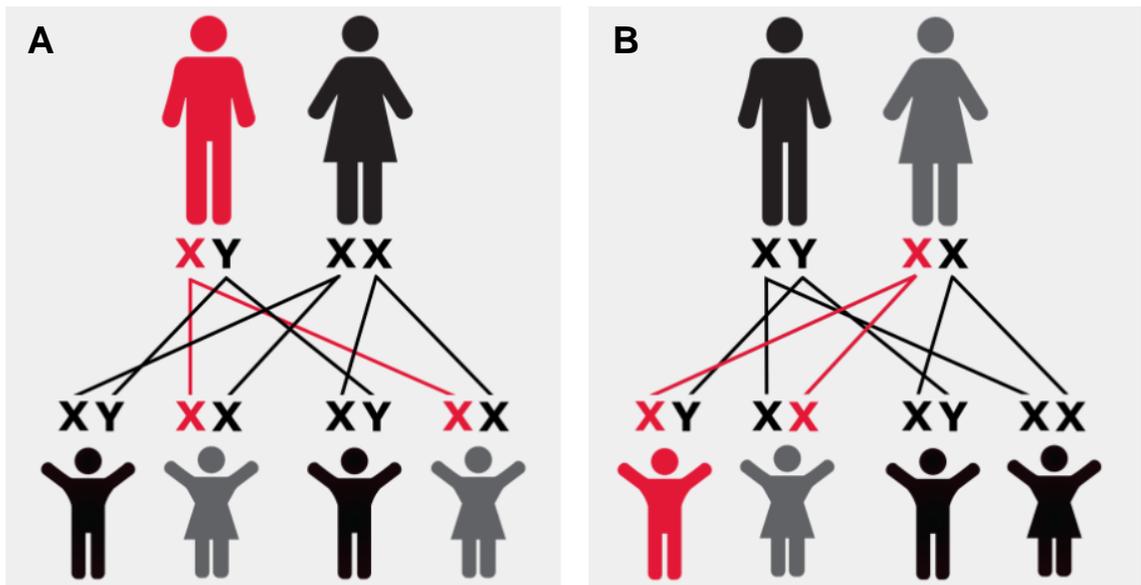


Figura 3. Padrão de herança da hemofilia. O modo de herança da hemofilia (A e B) é recessivo ligado ao cromossomo X – onde estão localizados os genes *F8* e *F9*. Isso faz com que mulheres muitas vezes sejam portadoras do gene mutado sem manifestar a doença. Indivíduos sem mutações nos alelos do gene *F8* ou *F9* hemofilia estão representados em preto, mulheres portadoras que possuem mutações em um dos alelos estão em cinza, e homens com manifestações estão em vermelho. **Em A** temos o cruzamento de um homem hemofílico com uma mulher não portadora, e como resultado nenhum filho/filha manifestou a condição, porém temos 100% das mulheres (que herdaram o X paterno mutado e um X materno sem mutação) como portadoras. Na geração seguinte, **em B**, temos o cruzamento entre uma dessas filhas portadoras com um homem não-hemofílico. Neste caso, a chance é de que 50% da prole possua o cromossomo mutado, que nos filhos homens levará à condição de hemofilia, e nas filhas mulheres levará à condição de portadora. **Adaptada do website da Federação Mundial de Hemofilia (WFH- World Federation of Hemophilia):** <https://www.wfh.org/en/home>.

1.2.1. O gene *F8*

O gene *F8*, que codifica a proteína FVIII, encontra-se no braço longo do cromossomo X (Xq28), possuindo 26 éxons, que variam em tamanho. O gene possui 186 kilo base (kb), sendo que cerca de 95% deste total é representado por íntrons (177kb) (Gitschier et al., 1984). Quanto ao tamanho dos fragmentos, os éxons variam de 69 a 3106 pares de base (pb), enquanto os íntrons variam de 14 a 32 kb.

O sítio de início da transcrição é mapeado na região -170, existindo um longo fragmento 5' não-traduzido no gene *F8*. O RNAm do *F8* é composto por aproximadamente 9.010 nucleotídeos que codificam 2.351 aminoácidos que compõe um polipeptídeo precursor. Esse polipeptídeo torna-se uma proteína madura com 2.332 aminoácidos após o processamento do peptídeo sinal (19 aminoácidos). Tal proteína madura foi inicialmente isolada e purificada por Fay et al. (1982)(Fay et al., 1982), tendo sua estrutura primária descrita em 1984 (Gitschier et al., 1984; Vehar et al., 1984).

1.2.2. O Fator VIII da coagulação

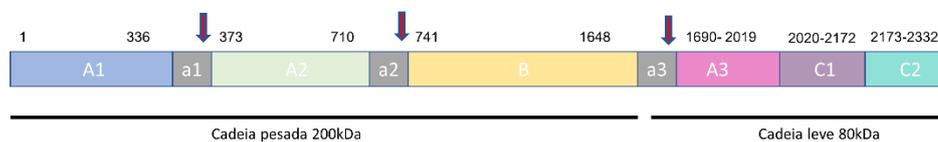
O FVIII possui três domínios estruturais, denominados, da extremidade amino para carboxi-terminal, de A, B e C (Kane and Davie, 1988). Existem espaçadores flanqueando os domínios A (a1, a2 e a3) os quais são ricos em grupamentos de ácido aspártico (Asp- D) e glutamina (Glu- E), e são denominadas “regiões acídicas” (Lenting et al., 1996). Existem também porções contendo resíduos de tirosina (Tyr- Y) sulfatados entre os domínios A1 e A2 (resíduos 337-372 da região acídica a1), na extremidade carboxiterminal do domínio A2 (resíduos 711-740 na região a2), e entre domínio B e A3 (resíduos 1649-1689 na região a3). Tais domínios e regiões acídicas estão representados na **Figura 3**.

Existem três domínios do tipo A (A1, A2 e A3), os quais compartilham aproximadamente 40% de identidade entre eles e com os respectivos domínios A do Fator V da coagulação. O mesmo ocorre para os domínios C1 e C2 do FVIII (identidade compartilhada entre eles e aqueles do FV). Tal identidade se estende a outras proteínas que se ligam a fosfolipídios, o que sugere função de tais domínios na interação com os fosfolipídios. Já o domínio B, que compreende do aminoácido 741 a 1698 codificados pelo éxon 14 do *F8*, não possui homologia de aminoácidos com outras proteínas, nem mesmo com o domínio B do FV, embora ambos (FVIII e FV) tenham glicosilação em resíduos de asparagina, serina e treonina (Asn, Ser e Thr) em seus domínios B. O domínio B do FVIII possui 19 dos 24 potenciais sítios de Asn para glicosilação, funcionando como um regulador no

processamento. Além disso, o domínio B possui sítios de clivagem para a ativação do FVIII e para sua secreção (**Figura 3**) (Bovenschen et al., 2005).

O FVIII circula na corrente sanguínea como um heterodímero inativo, possuindo uma cadeia pesada que compreende os domínios A1a1, A2a2, e B (com 200kDa) e cadeia leve com os domínios a3A3, C1, C2 (80kDa). Quando um indivíduo sofre injúria vascular, a trombina gerada no processo de início da coagulação, cliva o FVIII gerando um heterodímero de duas cadeias pesadas (A1 e A2) e uma leve. A trombina cliva o FVIII em três resíduos: primeiramente no resíduo Arg740, e então em Arg372 e Arg1689 subsequentemente. (Eaton and Vehar, 1986). Quando ocorre a clivagem no resíduo 1689, a conformação do FVIII é alterada e libera o FvW, que inibia a interação FVIII-fosfolipídeos, e agora FVIII interage com as plaquetas (Pittman and Kaufman, 1988). Os domínios A1, A3-C1-C2 estão unidos por ligações metálicas, e a associação de A2 a este dímero é mediada por interações eletrostáticas e é reversível.

A. FVIII – estrutura com seus domínios



B. Ativação FVIII em FVIIIa

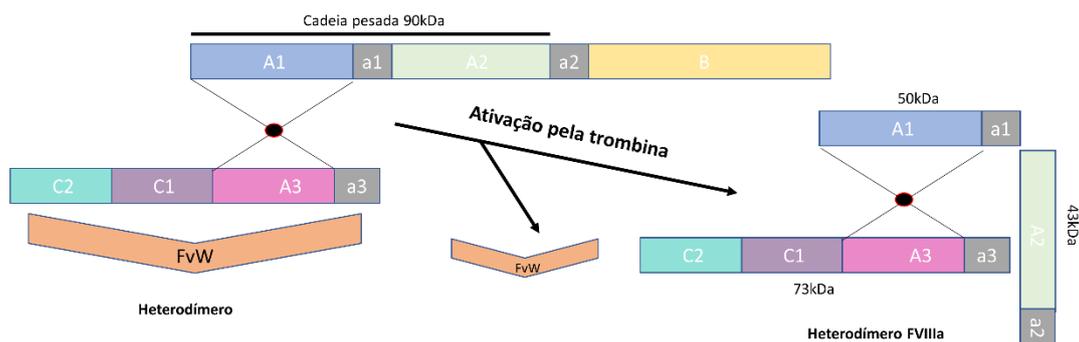


Figura 4. O Fator VIII, seus domínios e ativação. Em A, temos a estrutura e seus domínios. As setas apontam os sítios de clivagem em a1 (Arg372), a2 (Arg740), e a3 (Arg1689). Em B temos o heterodímero do FVIII lançado na circulação associado a um íon divalente e após, sua ativação com a clivagem pela trombina e liberação do FvW. Adaptado de (Lavigne-Lissalde et al., 2009).

1.2.3. O gene *F9*

O gene do FIX (*F9*) também está localizado no braço longo do cromossomo X, porém na banda Xq27.1 (Camerino et al., 1984). Ele foi clonado por diversos grupos entre 1982 e 1983. O *F9* possui 34kb e está organizado em 8 éxons que codificam os domínios proteicos do FIX (Anson et al., 1984; Chance et al., 1983). A região reguladora 5' do gene não tem a sequência consenso TATA Box e nem o elemento de iniciação. Embora não haja consenso sobre o assunto, o maior sítio de início da transcrição parece ocorrer 29 nucleotídeos a montante (*upstream*) do início de tradução (Lillicrap, 1998).

Se comparado ao *F8*, o gene do fator IX é consideravelmente menor e estruturalmente mais simples. O transcrito possui um comprimento de 2.802 bases (Yoshitake et al., 1985) e compreende uma pequena região 5' não traduzida (29 bases), uma fase de leitura somada ao códon de parada (1.383 bases), e uma região 3' não traduzida com 1.390 bases (Anson et al., 1984). Esta região inclui a sequência de clivagem AATAAA, 15 nucleotídeos à montante da cauda de poli-A.

O quadro de leitura aberta (*open reading frame*) codifica os domínios de Pré-peptídeo e de Pró-peptídeo. O Pré-peptídeo, ou sequência sinal, direciona o fator IX para a secreção, enquanto o Pró-peptídeo oferece um domínio de ligação para a carboxilase dependente de vitamina K. Esta enzima carboxila resíduos de ácido glutâmico no domínio GLA adjacente. O restante representa o zimogênio do FIX, o qual entra na circulação sanguínea após a remoção do Pré-peptídeo e do Pró-peptídeo (Anson et al., 1984). Os domínios do zimogênio são identificados de acordo com a sua estrutura e função.

1.2.4. O Fator IX da coagulação

O Fator IX é sintetizado nos hepatócitos como uma proteína precursora, com 461 aminoácidos e 57 kDa, que sofre processamentos pós-traducionais, como a remoção da sequência sinal e do pró-peptídeo, que são clivados em reações separadas antes da secreção para a circulação. Falhas na remoção dessas seqüências podem resultar em proteínas não funcionais (Green et al., 1989).

Na circulação, o fator IX está presente com uma cadeia de 415 aminoácidos e massa molecular de 55 kDa. A concentração do FIX em um plasma não deficiente é de aproximadamente 5µg/mL. Na circulação, a proteína madura (zimogênio da serino-protease), tem sua ativação proteolítica via complexo FVIIa/FT ou Fator XI ativado (FXIa) de acordo com o modelo celular da coagulação sanguínea, resultando na sua forma ativa (FIXa) (Schmidt and Bajaj, 2003).

Uma representação esquemática da relação gene – proteína é apresentada na **Figura 5**. O primeiro éxon do *F9* codifica uma sequência sinal (pré-peptídeo) que leva à liberação do FIX do hepatócito (Bowen, 2002). O pré-peptídeo direciona a proteína do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. Esse peptídeo sinal, quando traduzido, leva à ligação do ribossomo com a superfície do retículo endoplasmático, onde a tradução é continuada após a clivagem deste pré-peptídeo por uma peptidase sinal, uma enzima conhecida como PACE/furina (*paired basic amino acid cleaving enzyme*) que comanda a retomada da tradução e produção de uma proteína totalmente funcional (Bristol et al., 1996).

O éxon 2 codifica toda a seqüência do pró-peptídeo e a maior porção do domínio GLA (*Vitamin K-dependent carboxylation/gamma-carboxylglutamic*). O pró-peptídeo juntamente com o domínio GLA, forma o sítio de reconhecimento da γ carboxilase, uma enzima dependente de vitamina K, responsável pela modificação pós-traducional dos 12 primeiros resíduos de ácido glutâmico (*Glu*) do domínio GLA no peptídeo maduro. Essa carboxilação converte o ácido glutâmico em ácido γ carboxilglutâmico, que é necessário para a interação do fator IX com fosfolípidos e células endoteliais (Bentley et al., 1986; Chavali et al., 2011).

Após a γ carboxilação dos resíduos, que acontece antes da secreção do FIX, ocorre a separação do pró-peptídeo com relação ao FIX maduro, por meio de clivagem realizada por uma peptidase específica.

O domínio GLA liga-se à superfície das plaquetas por meio do Ca^{2+} , iniciando a ativação (Green et al., 1989). Ele compreende uma sequência da tirosina (*Tyr*) 47 ao ácido glutâmico (*Glu*) 92 e sua principal função é ancorar e concentrar o fator da coagulação na membrana ativada via pontes de Ca^{2+} (Zögg and Brandstetter, 2009). O éxon 3 codifica a parte final do domínio GLA (Harlos et al., 1987).

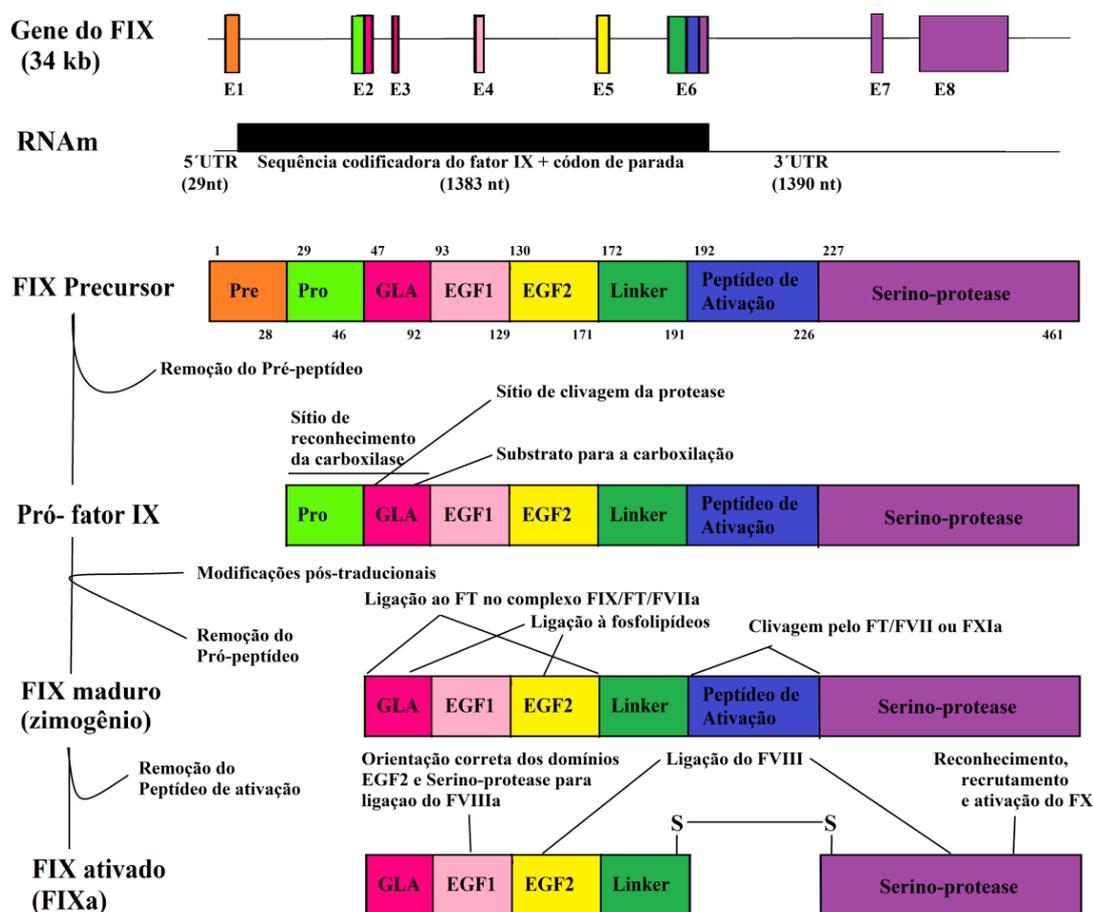


Figura 5. Fases do FIX: do gene à ativação. Representação das etapas de transcrição, tradução e modificações pós-traducionais que o FIX sofre até tornar-se ativado. **Figura original.**

O quarto e o quinto éxons codificam os domínios EGF (*epidermal growth factor*–fator de crescimento epidérmico). Existem dois domínios EGF que juntos abrangem do aminoácido 93, um ácido aspártico, ao resíduo na posição 191, uma arginina. A região amino-terminal dos domínios EGF liga-se ao Ca^{+2} , criando uma interface que permite interações de ligação (Handford et al., 1990). A capacidade de incorporação do FIX ao complexo tenase (FVIIIa/ FIXa) e sua ligação ao FVIIIa e FX são determinadas nestes domínios EGF (Chavali et al., 2011; Venkateswarlu, 2014).

O domínio EGF do tipo B (EGF1) contém inúmeros resíduos de aminoácidos, incluindo *Asp93*, *Asp 95*, *Asp 110* e *Gln96*, que estão envolvidos na ligação de alta afinidade com o cálcio. O resíduo *Asp110* sofre uma modificação pós-traducional por β -hidroxilação do ácido aspártico (Handford et al., 1990; Stenflo et al., 1987) enquanto os aminoácidos *Ser 99* e *Ser 107* sofrem glicosilação. Já o domínio EGF

do tipo A (o segundo deles), consiste em uma região que possui afinidade para interagir com o FVIIIa (fator VIII ativado), que funciona como co-fator do FIX. Além disso, este domínio contribui com a ligação do FIX às plaquetas (Chavali et al., 2011).

O peptídeo de ativação e uma parte N-terminal do domínio serino-protease são codificados pelo sexto éxon. Essa região leva ao reconhecimento e recrutamento do complexo FVIIa/FT ou FXI que determinam a clivagem do peptídeo de ativação. O peptídeo clivado possui aproximadamente 35 resíduos de aminoácidos, da alanina 192 até a arginina 226, que são removidos na ativação do zimogênio da serino-protease (Green et al., 1989).

Este domínio é rico em glutamato e aspartato e possui três modificações pós-traducionais descritas como principais: a sulfatação do resíduo 201, uma tirosina, N-glicosilação nos resíduos 203, 213 e 218, todos de asparagina, e a fosforilação do resíduo 204 de serina (Makino et al., 2000). Com essas alterações, o zimogênio fica preservado de ativações e clivagens antecipadas e torna-se solúvel.

A ativação proteolítica ocorre pela clivagem em duas regiões (Arg¹⁹¹-Ala¹⁹² e Arg²²⁶-Val²²⁷), correspondentes às margens do peptídeo de ativação que abrange do resíduo na posição 192 até a posição 226. Com a remoção do peptídeo de ativação, o FIXa forma duas cadeias unidas por uma ponte dissulfeto (Schmidt and Bajaj, 2003): uma cadeia leve que abrange do resíduo 47 ao 191, e uma cadeia pesada que vai do resíduo 227 ao 461. A ponte dissulfeto que liga a cadeia leve à cadeia pesada situa-se entre o resíduo 178 do domínio EGF2 e 335 do domínio serino-protease.

Os éxons 7 e 8 codificam o domínio serino-protease, que abriga uma tríade: *His 267*, *Asp315*, *Ser411*, altamente conservada em todas as serino-proteases (Lillicrap, 1998; Mahajan et al., 2004). Outros resíduos neste domínio devem contribuir como sítios de ligação do FIX com o FX e com o seu co-fator, o FVIIIa (Green et al., 1989). Esse domínio está envolvido na clivagem proteolítica do FX em FXa. Essas regiões que estão envolvidas como substrato ou parte enzimática da catálise do FIX são as que possuem altas taxas de mutações deletérias (Chavali et al., 2011).

Após as modificações pós-traducionais (Arruda et al., 2001) (**Figura 6**) e ativação, o FIX apresenta quatro domínios, bem como outras proteínas da cascata da coagulação que são dependentes de vitamina K, como o FX (Orlova et al., 2012). Na cadeia leve estão presentes o domínio Gla, EGF1 e EGF2 (fator de crescimento epidérmico 1 e 2), enquanto que na cadeia pesada está presente o domínio serino-protease (Schmidt and Bajaj, 2003).

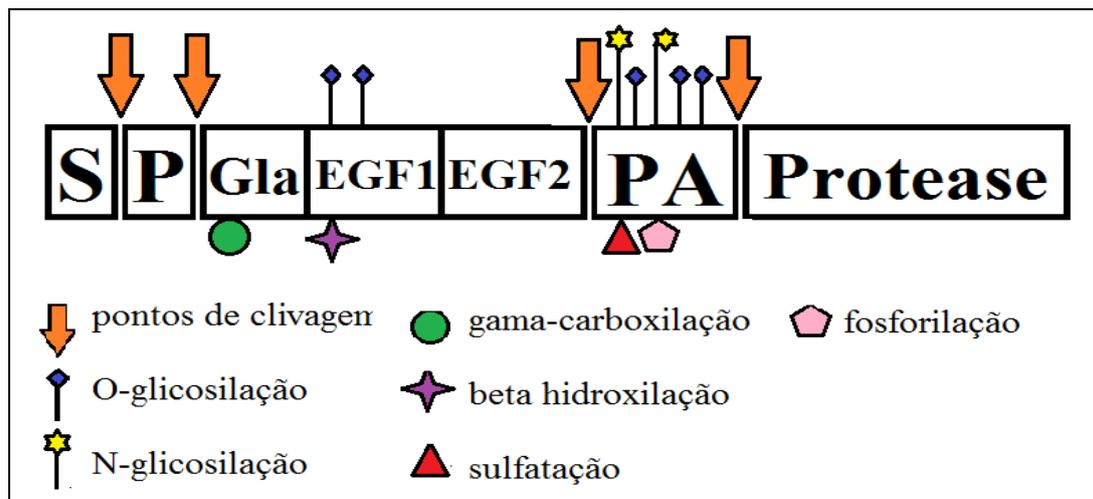


Figura 6. Modificações pós-traducionais do fator IX. Representação esquemática da estrutura proteica do FIX, com suas modificações pós -traducionais. Os domínios estão esquematicamente representados como S→ Peptídeo sinal ou Pré-peptídeo; P→ Pró-peptídeo; Gla→ domínioGla; EGF1→ fator de crescimento epidérmico; EGF2→fator de crescimento epidérmico 2; PA→ Peptídeo de ativação; Protease→ domínio serino-protease. **Figura original.**

A **Figura 7** mostra um modelo da estrutura tridimensional do FIX ativado, com os domínios GLA, EGF1, EGF2 e Serino-protease (Catalítico).

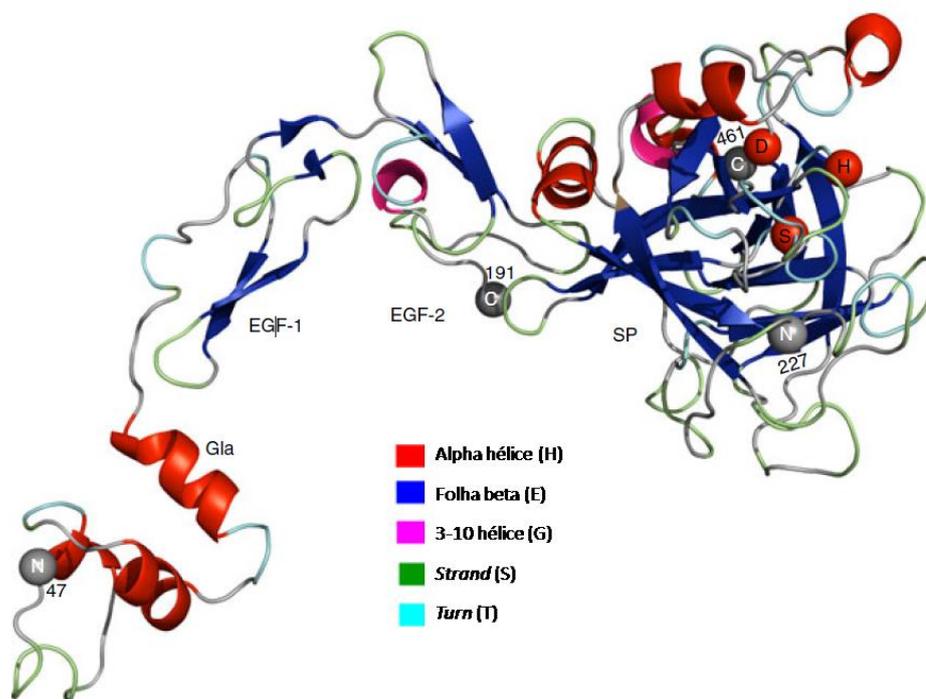


Figura 7. A estrutura do eixo principal do FIX ativado. Representação dos domínios GLA, EGF1, EGF2 e Serino-protease, presentes no FIX ativado, após a clivagem do peptídeo de ativação. A imagem mostra regiões de alfa hélice (vermelho), folhas beta (azul escuro), filamentos(verde), voltas (azul claro). Em cinza, está a tríade catalítica His267-Asp315-Ser411. **Adaptado de** (Rallapalli et al., 2013)).

1.2.5. Espectro mutacional das hemofilias A e B

Conforme observado anteriormente, os genes *F8* e *F9* possuem tamanhos bastante distintos (*F8* tem cerca de 186 kb enquanto *F9* tem cerca de 34 kb). Essa variação também se estende à ocorrência das hemofilias: enquanto a hemofilia A é mais prevalente, ocorrendo em cerca de 1 a cada 5000 nascimentos no sexo masculino, a hemofilia B tem uma frequência cerca de cinco vezes menor. Levando em conta os aspectos mutacionais, ambas possuem elevada heterogeneidade alélica com diferentes mutações levando às condições. O perfil mutacional de cada uma está descrito a seguir.

De acordo com o banco de dados “*European Association for Hemophilia and Allied Disorders- F8 gene*” existem cerca de 3.052 variantes únicas observadas no

gene *F8* (McVey et al., 2020). Cabe ressaltar que as inversões presentes no *F8* e que correspondem a cerca de 50% dos casos graves, não estão descritas no banco. Das 3.052 variantes descritas, 2.019 são mutações de ponto (66,2%), 715 são deleções (23,4%), 182 são duplicações (6%), o restante são indels, polimorfismos, inserções. Quando a distribuição destas mutações nos domínios, existe uma prevalência nos domínios A1, A2 e A3, que abrigam respectivamente, 577, 542 e 499 variantes (o que corresponde a 21,9%, 20,6% e 18,9%). Os domínios B, C1 e C2 possuem 488, 232 e 241 variantes únicas reportadas, o equivalente a 18,5%, 8,8% e 9,1%. Já os domínios de Peptídeo Sinal, a1, a2 e a3 abrigam menos de 1% das variantes cada (**Figura 8**).

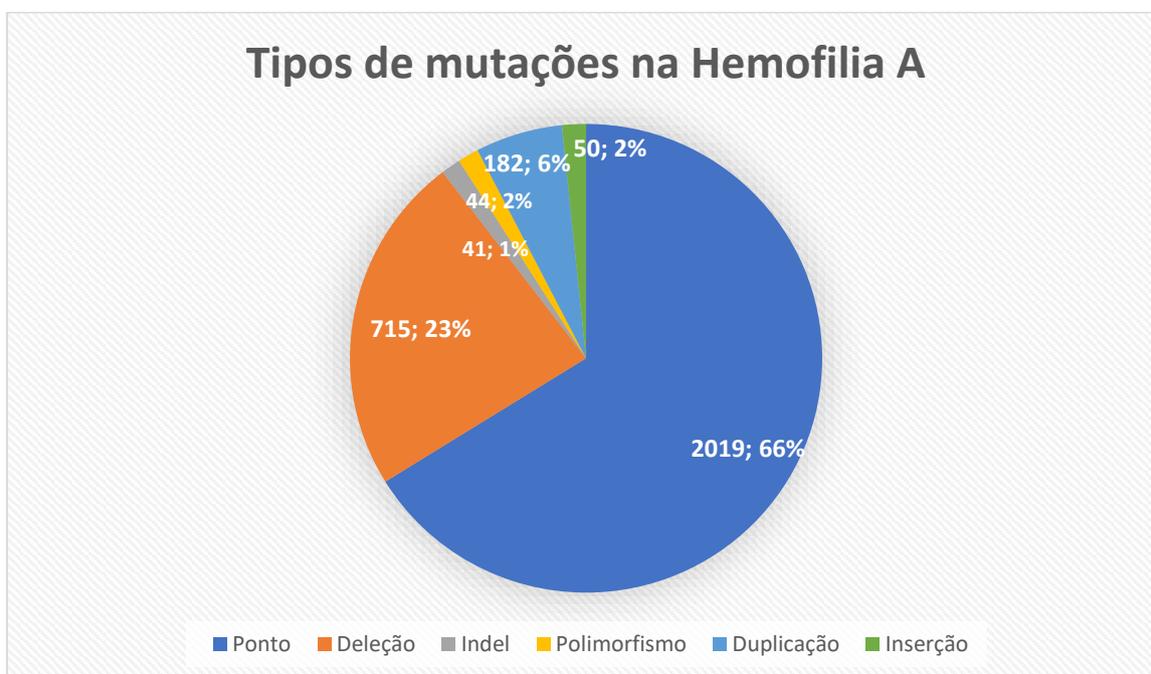


Figura 8. Gráfico mostrando os tipos de mutações e a respectiva prevalência na Hemofilia A.

Já para a hemofilia B, o mesmo banco (acessível através do link: https://f9-db.eahad.org/advance_search_results.php) possui 1244 diferentes variantes reportadas. Destas, 895 são mutações de ponto, 213 são deleções, 51 são polimorfismos, 48 são duplicações, 18 são indels, 14 são inserções, e 5 são mutações complexas, o que equivale a 71,9%, 17,1%, 4,1%, 3,9%, 1,4%, 1,1%, e 0,4%, respectivamente. Analisando os domínios, aquele que mais carrega

mutações é o de Serino Protease/ Catalítico (56,9%) – **Figura 9**. Porém, proporcionalmente, considerando o número de aminoácidos que compõe cada domínio, não há diferença significativa para ocorrência de mutações entre os domínios (Rallapalli et al., 2013).

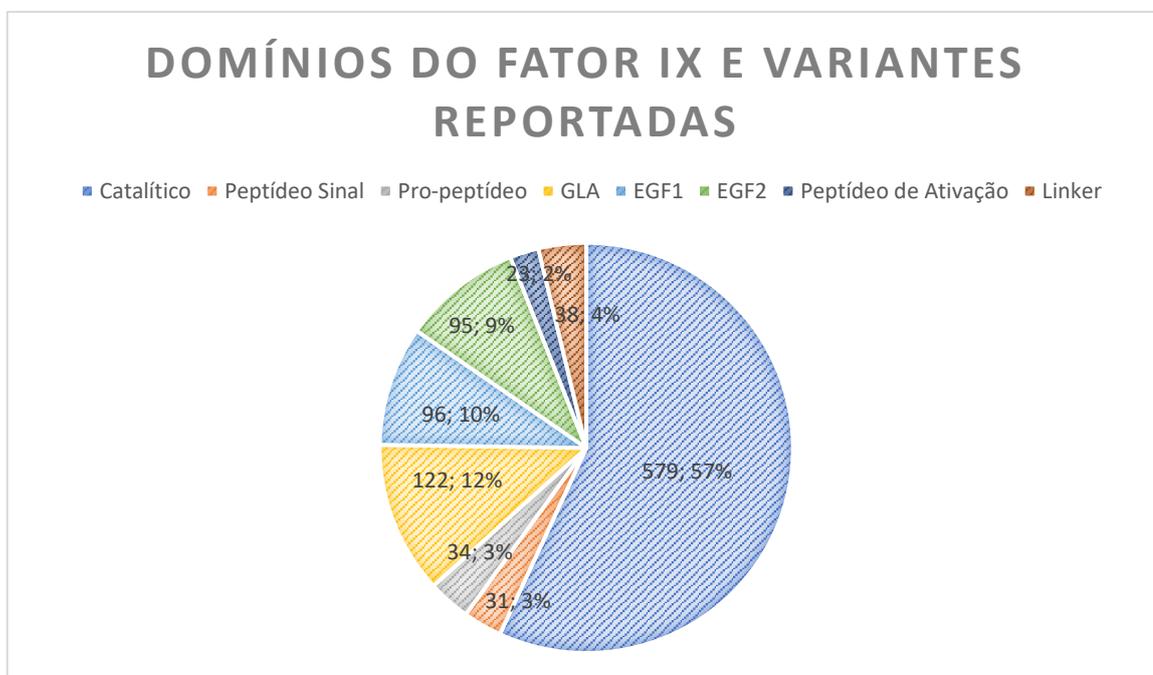


Figura 9. Variantes na Hemofilia B e sua distribuição nos domínios do Fator IX.

Cabe ressaltar que entre o tipo de variantes de maior ocorrência nas hemofilias A e B (variantes de ponto), temos grande participação de mutações de sentido trocado (*missense*): 1451 na hemofilia A e 670 na hemofilia B. E que estas consistem em um grande desafio na avaliação e entendimento de seu impacto, uma vez que não tem um efeito linear, como uma deleção ou mesmo uma mutação sem sentido, e seu impacto depende dos aminoácidos envolvidos na substituição e como suas propriedades diferem em relação ao tipo selvagem.

1.3. Tratamentos

A hemofilia requer um bom diagnóstico e cuidados de profissionais multidisciplinares, o que permite que indivíduos portadores da condição tenham uma melhor qualidade de vida. Esses cuidados envolvem, por exemplo: a prevenção de hemorragias através da profilaxia primária, prevenindo danos nas

articulações; o manejo rápido em casos de episódios hemorrágicos e fisioterapia de reabilitação após estes episódios; manejo de complicações musculoesqueléticas e do desenvolvimento de inibidores; e principalmente, a educação de indivíduos e famílias que convivem com a hemofilia em termos de tratamento e autocuidado (Fischer et al., 2013). Atualmente, o tratamento mais comumente empregado é a profilaxia primária, que permite que os níveis do fator se mantenham altos devido a sua manutenção no dia a dia do paciente. Assim, a prévia reposição do fator deficiente por via intravenosa impede sangramentos em casos de acidentes, por isso é tão importante que os pacientes e suas famílias conheçam sobre a hemofilia, pois eles participam ativamente da profilaxia primária (Colvin et al., 2008; Dunkley et al., 2018; Evatt and Robillard, 2000)

1.3.1. Desenvolvimento de Inibidores

Apesar dos avanços no tratamento, existem barreiras para o manejo clínico da doença. Além das questões habituais, como falta de adesão, existe uma complicação mor: o desenvolvimento de anticorpos ao tratamento. Por vezes pacientes que recebem a infusão intravenosa do Fator VIII ou Fator IX desenvolvem anticorpos a estes. Este fato leva a complicações que diminuem a qualidade de vida dos pacientes e aumentam significativamente a morbidade. Neste contexto, os anticorpos que neutralizam as atividades dos fatores VIII e IX são também denominados de inibidores anti-FVIII e anti-FIX, respectivamente. Cerca de 30% dos indivíduos em tratamento de reposição de fator, portadores de hemofilia A em sua forma grave, desenvolvem inibidores, enquanto para hemofilia B essa porcentagem é reduzida a 5% (Tieu et al., 2020).

Esta barreira imposta ao tratamento é relacionada a gravidade da doença: Pesquisas mostram que na hemofilia A, 20-35% dos pacientes graves e 3-13% dos leves/moderados desenvolvem inibidores (Hay, 1998). Diferentes drogas e tratamentos já foram testados em modelos experimentais e animais neste contexto, porém existem poucas alternativas ao desenvolvimento de inibidores, além disso eles apresentam uma efetividade variada e são financeiramente limitantes (Gomez et al., 2014). Muitos fatores são considerados como fatores de risco no

desenvolvimento de inibidores, como a mutação do paciente nos genes dos fatores de coagulação, o tipo de reposição, e o alótipo HLA do paciente, além de polimorfismos em outros genes (*necrosis factor, interleukin-10, ou CTLA-4*) (Astermark et al., 2006; Zhang et al., 2011). A mutação do paciente se relaciona com o risco de inibidores de uma maneira mais evidente: a presença ou ausência do antígeno do fator.

Mutações descritas com desenvolvimento de inibidores para hemofilia A:

Mediante o exposto acima, 557 diferentes variantes estão relacionadas ao desenvolvimento de inibidores na hemofilia A (considerando dados do banco EAHAD). Destas, apenas 159 são mutações de sentido trocado. Por outro lado, considerando o banco de dados CHAMP – “*CDC Hemophilia Mutation Project*”, temos 95 mutações de sentido trocado que levam a formação de anti-FVIII.

Aquelas variantes de sentido trocado que ocorrem em ambos os bancos de dados analisados (CHAMP e EAHAD) e que são relacionadas ao desenvolvimento de inibidores anti-FVIII estão especificadas na tabela a seguir (**Tabela 1**).

Tabela 1. Variantes de sentido trocado relacionadas ao desenvolvimento de inibidores anti-FVIII

HGVS_cDNA	HGVS_Protein	Exon	Domain	Reported_Severity
c.206T>C	<u>p.Leu69Pro</u>	2	A1	Severe
c.266G>C	<u>p.Gly89Ala</u>	3	A1	Severe
c.289G>C	<u>p.Ala97Pro</u>	3	A1	Severe
c.362G>C	<u>p.Gly121Ala</u>	3	A1	Severe
c.396A>C	<u>p.Glu132Asp</u>	4	A1	Mild/Severe
c.517C>T	<u>p.Leu173Phe</u>	4	A1	Mild
c.545A>T	<u>p.Asp182Val</u>	4	A1	Moderate
c.650T>A	<u>p.Leu217His</u>	5	A1	Moderate
c.667G>A	<u>p.Glu223Lys</u>	5	A1	Severe
c.883T>C	<u>p.Phe295Leu</u>	7	A1	Severe
c.886C>T	<u>p.Leu296Phe</u>	7	A1	Severe
c.986G>A	<u>p.Cys329Tyr</u>	7	A1	Severe
c.1207C>G	<u>p.His403Asp</u>	8	A2	Severe
c.1234T>C	<u>p.Trp412Arg</u>	8	A2	Severe
c.1316G>T	<u>p.Gly439Val</u>	9	A2	Moderate/Severe
c.1409C>G	<u>p.Pro470Arg</u>	9	A2	Mild
c.1466G>A	<u>p.Ser489Asn</u>	10	A2	Moderate
c.1492G>A	<u>p.Gly498Arg</u>	10	A2	Mild/Moderate/Severe

c.1537G>A	p.Gly513Ser	10	A2	Moderate
c.1648C>T	p.Arg550Cys	11	A2	Mild
c.1660A>G	p.Ser554Gly	11	A2	Mild
c.1834C>T	p.Arg612Cys	12	A2	Mild/Moderate
c.1910A>G	<u>p.Asn637Ser</u>	13	A2	Mild/Severe
c.2044G>T	<u>p.Val682Phe</u>	13	A2	Mild/Moderate
c.2107A>G	<u>p.Asn703Asp</u>	13	A2	Severe
c.2113G>C	<u>p.Gly705Arg</u>	13	A2	Severe
c.2159G>A	<u>p.Gly720Asp</u>	14	A2	Moderate/Severe
c.2159G>C	<u>p.Gly720Ala</u>	14	A2	Severe
c.2179G>T	<u>p.Val727Phe</u>	14	A2	Severe
c.2248C>G	p.Leu750Val	14	a2	Moderate
c.3196C>T	<u>p.His1066Tyr</u>	14	B	Severe
c.5177G>C	<u>p.Trp1726Ser</u>	14	A3	Severe
c.5178G>C	<u>p.Trp1726Cys</u>	14	A3	Severe
c.5182T>C	<u>p.Tyr1728His</u>	14	A3	Severe
c.5251A>G	p.Lys1751Glu	15	A3	Severe
c.5336G>A	p.Gly1779Glu	15	A3	Severe
c.5339C>A	p.Pro1780Gln	15	A3	Mild/Moderate
c.5375T>C	p.Val1792Ala	16	A3	Mild/Moderate
c.5392G>C	p.Ala1798Pro	16	A3	Severe
c.5414A>C	<u>p.Tyr1805Ser</u>	16	A3	Mild
c.5540A>G	<u>p.Asp1847Gly</u>	16	A3	Severe
c.5606G>A	p.Gly1869Asp	17	A3	Severe
c.5821A>G	<u>p.Asn1941Asp</u>	18	A3	Moderate/Severe
c.5825G>A	<u>p.Gly1942Asp</u>	18	A3	Severe
c.5881T>C	<u>p.Trp1961Arg</u>	18	A3	Severe
c.5999G>C	<u>p.Gly2000Ala</u>	19	A3	Severe
c.6047G>C	<u>p.Arg2016Pro</u>	19	A3	Severe
c.6053A>G	<u>p.Glu2018Gly</u>	19	A3	Severe
c.6055T>C	<u>p.Cys2019Arg</u>	19	A3	Severe
c.6082G>A	p.Gly2028Arg	19	A3	Mild/Moderate
c.6104T>C	<u>p.Val2035Ala</u>	19	A3	Mild/Severe
c.6140C>G	<u>p.Ala2047Gly</u>	20	C1	Severe
c.6172G>C	p.Ala2058Pro	20	C1	Moderate/Severe
c.6243G>C	p.Trp2081Cys	21	C1	Severe
c.6314C>A	p.Thr2105Asn	22	C1	Moderate
c.6344T>C	<u>p.Leu2115Pro</u>	22	C1	Mild
c.6362T>A	<u>p.Ile2121Asn</u>	22	C1	Mild
c.6371A>G	<u>p.Tyr2124Cys</u>	22	C1	Mild/Moderate/Severe
c.6506G>A	p.Arg2169His	23	C1	Mild/Moderate
c.6512A>G	p.His2171Arg	23	C1	Moderate
c.6545G>A	p.Arg2182His	23	C1	Mild/Moderate
c.6600G>T	p.Glu2200Asp	24	C2	Mild
c.6683G>A	<u>p.Arg2228Gln</u>	24	C2	Mild/Severe
c.6689A>C	<u>p.His2230Pro</u>	24	C2	Severe
c.6709G>A	<u>p.Ala2237Thr</u>	24	C2	Mild
c.6744G>T	<u>p.Trp2248Cys</u>	25	C2	Mild/Moderate
c.6746T>G	<u>p.Leu2249Arg</u>	25	C2	Severe
c.6752T>C	<u>p.Val2251Ala</u>	25	C2	Mild
c.6835T>A	p.Phe2279Ile	25	C2	Mild/Moderate
c.6836T>G	p.Phe2279Cys	25	C2	Severe
c.6915T>G	p.Asn2305Lys	26	C2	Moderate

A tabela mostra a alteração a nível de DNA e de proteína, com a nomenclatura HGVS. Mostra também o éxon, domínio e gravidade da hemofilia A relacionados a mutação.

Mutações descritas com desenvolvimento de inibidores para hemofilia B:

Conforme verificado anteriormente, segundo o banco de dados do FIX (EAHAD), existem 1244 diferentes mutações que ocorrem na hemofilia B. Destas, 39 estão reportadas em indivíduos que desenvolveram inibidores. Já no banco de dados do CDC para HB (CHBMP), temos 1133 diferentes variantes reportadas, e apenas 24 delas levam ao desenvolvimento de inibidores. A maioria destas são grandes deleções, indels, e mutações que levam a proteína truncada (stop códon), apenas a minoria das mutações em pacientes com anti-FIX são de sentido trocado (*missense*). Considerando os dois bancos de dados citados, apenas 6 mutações de sentido trocado levam a esta característica: p. Leu23Pro (reportada no EAHAD), p. Arg43Leu (EAHAD), p. Gln237Lys (ambos), p. Thr342Lys (EAHAD), p. Pro375Leu (EAHAD), e p. Ser411Gly (CHBMP).

1.3.2. Terapia genica e hemofilia B

Recentemente um novo tipo de terapia vem ganhando notoriedade na hemofilia B. Devido ao pequeno tamanho do gene *F9* (34kb) ele é facilmente transfectado em um vetor viral, se tornando alvo de muitos estudos envolvendo terapia gênica para a hemofilia B. De maneira geral, o uso de um vetor vírus adeno-associado (AAV – *adeno associated vector*) melhorou a expressão da proteína FIX em estudos *in vitro* e *in vivo*.

1.4. Bioinformática estrutural

A bioinformática torna-se um campo multidisciplinar na medida em que compreende a ideia do uso de ferramentas computacionais para o estudo de problemas e/ou situações biológicas sob diferentes pontos de vista e aspectos, trazendo o envolvimento de biologia celular e molecular, bioquímica, física e computação (Xu et al., 2015). Do ponto de vista da Genética, os aspectos que podem ser avaliados vão desde similaridades entre sequencias (bioinformática clássica) até possibilidades de atracamento molecular (envolvendo bioinformática estrutural).

Apesar da proteína ser codificada pelo genoma, suas análises (de sequências e estrutural) não são redundantes. O enovelamento de proteínas, por exemplo, depende tanto da sua sequência como de outros aspectos (ambiente celular, modificações pós traducionais, etc). Ambas as análises (tradicional e estrutural) pode trazer informações complementares e inferências: a exemplo de regiões de alças que são mais flexíveis na dinâmica da proteína e tendem a ser menos conservadas evolutivamente, tendo maior acúmulo de mutações, o que pode ser verificado a partir da análise de sequências (Chen and Pettitt, 2016; Khatri and Drăghici, 2005).

A bioinformática estrutural trabalha com a análise e a predição de estruturas 3D, usando proteínas (ou outra macromolécula) que já foram resolvidas experimentalmente (por meio de cristalografia, RMN, Raio-X) ou criando modelos computacionais de estruturas. Sendo assim, ela é descrita como uma abordagem que contribui para decifrar a informação biológica e seu significado por trás da estrutura proteica e permite comparações entre estruturas tridimensionais (Chandra et al., 2010). Sabemos que estruturas tendem a ser mais conservadas que sequências, sendo importantes para realizar associações funcionais, e inferências de mecanismos biológicos.

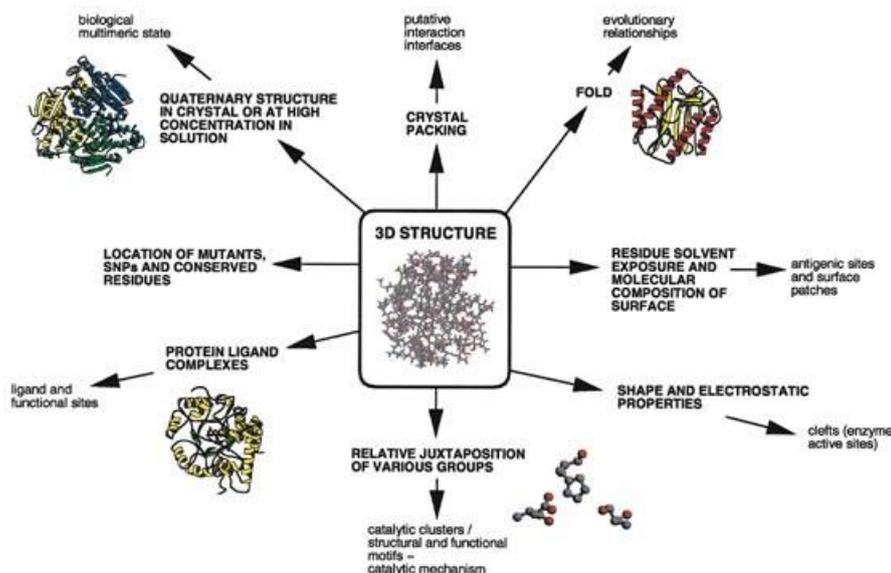


Figura 10. Resumo das informações que podem ser obtidas da estrutura tridimensional, relacionando com a função biológica. Figura de Thornton, 2000.

Dito isso, a modelagem molecular é definida, segundo a IUPAC, como a “investigação de estruturas e propriedades moleculares através da química computacional e técnicas de visualização gráfica, que visam fornecer uma representação tridimensional sobre um dado conjunto de circunstâncias”. A investigação de alterações nas propriedades de uma proteína a partir de modelagem molecular vem sendo amplamente aplicada em distintos níveis. (Ferreira et al., 2019; Svensson et al., 2016; Theocharopoulou and Vlamos, 2020). A estrutura mostra a organização proteica em três dimensões, permitindo que analisemos quais resíduos estão escondidos (*buried*) no core da proteína, e quais estão expostos na superfície proteica, sendo acessíveis ao solvente. Do ponto de vista das implicações funcionais de mutações, a análise a partir de comparações entre estruturas tridimensionais permite que tenhamos uma melhor avaliação de alterações em propriedades, o que é extremamente relevante se considerarmos alterações de sentido trocado.

1.5. Objetivo Geral

Estabelecer uma abordagem de análise computacional para avaliação de alterações nas propriedades físico-químicas das proteínas causadas por variantes de sentido trocado (*missense*) ocorrendo nos genes da hemofilia A e B (*F8* e *F9*, respectivamente), para um melhor entendimento do efeito destas na determinação das desordens.

1.5.1. Objetivo específico 1

Determinar quais os aspectos físico-químicos do Fator IX são modificados por mutações de sentido trocado, relacionando essas modificações com o desfecho da Hemofilia B e investigando como essas características determinam o espectro da condição e sua gravidade.

1.5.2. Objetivo específico 2

Avaliar como as propriedades afetam a função do Fator VIII, contribuindo para a relação genótipo-fenótipo. Nesse sentido, como as diferentes mutações nos resíduos estão alterando os aspectos avaliados e quais os efeitos no fenótipo. Quais são as características físico-químicas principais considerando o impacto funcional e os diferentes domínios do FVIII.

1.5.3. Objetivo específico 3

Investigar aspectos principais de modificações a nível da proteína Fator IX que podem contribuir com uma elevada funcionalidade, considerando que variantes hiperativas já foram descritas para o gene do *F9*. Assim, também buscamos encontrar potenciais novas variantes hiperativas que poderiam contribuir para opções terapêuticas.

1.5.4. Objetivo específico 4

Como tais propriedades são alteradas com relação a polimorfismos de sentido trocado em comparação àquelas alterações em mutações causativas da hemofilia A (gene *F8*) e qual o impacto dessas alterações quando ambos (polimorfismos e mutações de perda de função) tipos de modificações ocorrem juntos.

Existem cerca de 22.916 estudos reportados quando buscamos o termo “*Hemofilia A*” no PubMed e 5.181 envolvendo “*Hemophilia B*”. Quando adicionamos “*missense*” aos termos de busca, os números caem para 341 e 119, respectivamente. A intenção ao adicionar a palavra “*missense*” foi capturar artigos que buscassem interpretar ou relacionar o genótipo com o fenótipo em mutações de sentido trocado, considerando a dificuldade de se estabelecer as bases patogênicas desse tipo mutacional. Muitos dos artigos encontrados são *case reports* descrevendo mutações novas (Ershov et al., 2018; Qiao et al., 2014).

Ferramentas de bioinformática vêm sendo cada vez mais empregadas nas análises de variantes, contribuindo para gerar e interpretar resultados com maior qualidade. Neste sentido, aquelas que envolvem a bioinformática estrutural são grandes aliadas nas análises de propriedades das proteínas, e tal análise pode ser estendida para avaliar alterações geradas pelas mutações de sentido trocado. No presente momento, quando consideramos ainda o termo “*in silico*” junto a “*missense*” e “*hemophilia*”, verificamos uma queda drástica, e apenas 23 artigos são apontados no PubMed. E, se tentarmos capturar aqueles artigos que usam abordagens envolvendo estrutura tridimensional, modelagem, através da adição do termo “*modeling*” na busca, nosso resultado é de apenas 3 trabalhos (Hart, 2020; Meireles et al., 2019; Meléndez-Aranda et al., 2019). Entre eles um de nosso grupo. Isso demonstra a ausência de publicações envolvendo esse tipo de abordagem dentro da hemofilia.

No presente estudo, utilizamos o conhecimento técnico-científico sobre Genética, Biologia Molecular - e especificamente sobre as coagulopatias em questão, as Hemofilias A e B - e o aplicamos para desenvolver uma nova abordagem computacional para a avaliação de mutações de sentido trocado. Conseguimos reconhecer e verificar o impacto de propriedades físico-químicas na gravidade e na determinação da doença. Fizemos uma ampla avaliação e obtivemos resultados que não estavam previamente disponíveis na literatura e que podem ter ampla aplicabilidade.

As modificações em importantes atributos das proteínas, geradas por mutações de sentido trocado, foram extensivamente investigadas dentro das hemofilias e contribuem para estabelecimento de relação causal entre o genótipo e fenótipo, e para a predição do impacto que pode ser gerado a partir de mutações *de novo*. No presente escopo, o estudo trás ricas informações sobre como se dá essa interferência e variação do impacto conforme a proteína em estudo e o domínio proteico específico.

O estudo envolveu a avaliação de desordens genéticas através de ferramentas computacionais e agregando conhecimentos de bioquímica e biofísica. A investigação foi pautada em modelos tridimensionais de proteínas e nos possibilitou analisar alterações nas seguintes propriedades: potencial eletrostático, hidrofobicidade, área de acessibilidade/ exposição ao solvente, ruptura de ligações de hidrogênio e dissulfeto. Cabe ressaltar que tais propriedades foram avaliadas conforme a superfície proteica, não havendo apenas um valor pré-estabelecido para cada substituição específica conforme os aminoácidos envolvidos (com exceção da hidrofobicidade). Com isso, foi possível entender o impacto global que modificações de aminoácidos geram, e verificar o efeito de variantes prévias reportadas pelo grupo de pesquisa e por bancos de dados. O trabalho não se restringe a abordar variantes patogênicas, ele foi ampliado e incorporou variantes benignas (polimórficas) e com ganho de função (hiperativas) presentes nos genes *F8* e *F9*. Isso permitiu consolidar ainda mais o conhecimento sobre o impacto e diferenças entre esses tipos de variantes.

Acima de tudo, é destacado a importância do conhecimento sobre a função das proteínas em questão e suas interações, que foram elementos determinantes na interpretação dos resultados. O estudo foi baseado nos fatores de coagulação FVIII e FIX, codificados pelos respectivos genes *F8* e *F9*, que quando mutados podem acarretar hemofilia A e B. Apesar de tais genes/proteínas terem sido usados como modelos, a aplicabilidade do método não se restringe a hemofilia. Como perspectivas, acreditamos que os próximos passos do trabalho sejam inserir novos dados na ferramenta sobre locais específicos das proteínas onde pequenas alterações físico-químicas levem a grandes efeitos, para que consigamos distinguir o impacto de mutações ocorrendo nestes locais daqueles

gerados por variantes não-patogênicas. Em seguida, planejamos a automatização do método para cada uma das hemofilias, levando em consideração as particularidades proteicas (interações, regiões determinantes). E posteriormente ampliar o seu uso para outras desordens Mendelianas que possuem heterogeneidade alélica, considerando as características de cada proteína de maneira específica.

A aplicação e desenvolvimento de novas metodologias computacionais em análises genéticas pode contribuir com o campo, facilitando o acesso a informações não disponíveis até então e que podem colaborar na interpretação de variantes e suas consequências clínicas. Esse tipo de estudo pode reduzir futuros custos e dar artifícios para novas abordagens em diversos campos. No campo da genética, considerando a investigação de variantes e a urgência com que alguns resultados devem ser elucidados, quanto mais completas, específicas e curadas forem as análises, mais rápido teremos um melhor diagnóstico com uma menor taxa de erros, portanto toda informação nova é de grande estima.

Referências Bibliográficas:

- Ahmed RP, Ivaskevicius V, Kannan M, Seifried E, Oldenburg J, Saxena R (2005) Identification of 32 novel mutations in the factor VIII gene in Indian patients with hemophilia A. *Haematologica* 90, 283-284.
- Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG (1984). The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *EMBO J* 3, 1053-1060.
- Arruda VR, Pieneman WC, Reitsma PH, Deutz-Terlouw PP, Annichino-Bizzacchi JM, Briët E, Costa FF (1995) Eleven novel mutations in the factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. *Blood* 86, 3015-3020.
- Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, Heiman-Patterson T, Camire RM, Chu K, Fields PA, Herzog RW, Couto LB, Larson PJ, High KA (2001) Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* 97, 130-138.
- Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, Berntorp E, group, M.I.B.S.s(2005) The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica* 90, 924-931.
- Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert AK (2006) Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 108, 3739-3745.
- Becker J, Schwaab R, Möller-Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH, Grimm T, Olek K, Oldenburg J (1996) Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am J Hum Genet* 58, 657-670.
- Bentley AK, Rees DJ, Rizza C, Brownlee GG (1986) Defective propeptide processing of blood clotting factor IX caused by mutation of arginine to glutamine at position -4. *Cell* 45, 343-348.
- Berndt MC, Metharom P, Andrews RK (2014) Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia* 20 Suppl 4, 15-22.
- Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, Wermes C, Pollmann H, Todorova A, Chlystun M, Nowak-Göttl U, Horst J (2007). Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat* 28, 54-60.
- Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Göttl U, Eisert R, Wermes C, Todorova A, Eigel A, Dworniczak B and Horst J (2005) Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat* 26, 249-254.
- Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ and Mertens K (2005) The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost* 3, 1257-1265.
- Bowen DJ (2002) Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 55, 127-144.
- Bristol JA, Ratcliffe JV, Roth DA, Jacobs MA, Furie BC and Furie B (1996) Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood* 88, 2585-2593.
- Butenas S and Mann KG (2002) Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 67, 3-12.
- Camerino G, Grzeschik KH, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocq JP, Heilig R and Mandel JL, (1984) Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 498-502.

- Casaña P, Cabrera N, Cid AR, Haya S, Beneyto M, Espinós C, Cortina, V, Dasí MA and Aznar JA (2008) Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica* 93, 1091-1094.
- Castaman G, Giacomelli SH, Ghiotto R, Boseggia C, Pojani K, Bulò A, Madeo D and Rodeghiero F (2007) Spectrum of mutations in Albanian patients with haemophilia A: identification of ten novel mutations in the factor VIII gene. *Haemophilia* 13, 311-316.
- Chance PF, Dyer KA, Kurachi K, Yoshitake S, Ropers HH, Wieacker P and Gartler SM (1983) Regional localization of the human factor IX gene by molecular hybridization. *Hum Genet* 65, 207-208.
- Chandra N, Anand P and Yeturu K (2010) Structural bioinformatics: deriving biological insights from protein structures. *Interdiscip Sci* 2, 347-366.
- Chavali S, Mahajan A, Ghosh S, Mondal B and Bharadwaj D (2011). Protein molecular function influences mutation rates in human genetic diseases with allelic heterogeneity. *Biochem Biophys Res Commun* 412, 716-722.
- Chen C and Pettitt BM (2016) DNA Shape versus Sequence Variations in the Protein Binding Process. *Biophys J* 110, 534-544.
- Citron M, Godmilow L, Ganguly T and Ganguly A (2002) High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 20, 267-274.
- Colvin BT, Astermark J, Fischer K, Gringeri A, Lassila R, Schramm W, Thomas A, Ingerslev J and Group IDW (2008) European principles of haemophilia care. *Haemophilia* 14, 361-374.
- Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP and Savidge GF (2002). The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Hum Mutat* 19, 274-278.
- David D, Ventura C, Moreira I, Diniz MJ, Antunes M, Tavares A, Araújo F, Morais S, Campos M, Lavinha J and Kembell-Cook G (2006) The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica* 91, 840-843.
- Diamond C, Kogan S, Levinson B and Gitschier J (1992) Amino acid substitutions in conserved domains of factor VIII and related proteins: study of patients with mild and moderately severe hemophilia A. *Hum Mutat* 1, 248-257.
- Djambas Khayat C, Salem N, Chouery E, Corbani S, Moix I, Nicolas E, Morris MA, de Moerloose P, and Mégarbané A (2008) Molecular analysis of F8 in Lebanese haemophilia A patients: novel mutations and phenotype-genotype correlation. *Haemophilia* 14, 709-716.
- Dunkley S, Lam JCM, John MJ, Wong RSM, Tran H, Yang R, Nair SC, Shima M, Street A, Srivastava A, *et al* (2018) Principles of haemophilia care: The Asia-Pacific perspective. *Haemophilia* 24, 366-375.
- Eaton DL and Vehar GA (1986) Factor VIII structure and proteolytic processing. *Prog Hemost Thromb* 8, 47-70.
- Ershov VI, Gadaev IY, Perina FG, Surin VL, Salomashkina VV, Pshenichnikova OS and Zozulya NI (2018) Literature review and clinical observation of acquired idiopathic hemophilia with a new missense mutation in the factor VIII gene (His2026Arg). *Ter Arkh* 90, 118-122.
- Evatt BL and Robillard L (2000) Establishing haemophilia care in developing countries: using data to overcome the barrier of pessimism. *Haemophilia* 6, 131-134.
- Fay PJ, Chavin SI, Schroeder D, Young FE and Marder VJ (1982) Purification and characterization of a highly purified human factor VIII consisting of a single type of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7200-7204.
- Federici AB (2003) The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. *Haematologica* 88, EREP02.

- Fernández-López O, García-Lozano JR, Núñez-Vázquez R, Pérez-Garrido R and Núñez-Roldán A (2005) The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica* 90, 707-710.
- Ferreira GM, Calero-Rubio C, Sathish HA, Remmele RL and Roberts CJ (2019) Electrostatically Mediated Protein-Protein Interactions for Monoclonal Antibodies: A Combined Experimental and Coarse-Grained Molecular Modeling Approach. *J Pharm Sci* 108, 120-132.
- Fidanci ID, Kavakli K, Uçar C, Timur C, Meral A, Kiliñç Y, Sayilan H, Kazanci E and Çağlayan SH (2008) Factor 8 (F8) gene mutation profile of Turkish hemophilia A patients with inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis* 19, 383-388.
- Fischer K, Herman C and Board EHTS (2013) The European Principles of Haemophilia Care: a pilot investigation of adherence to the principles in Europe. *Haemophilia* 19, 35-43.
- Freson K, Peerlinck K, Aguirre T, Arnout J, Vermylen J, Cassiman JJ and Matthijs G (1998) Fluorescent chemical cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene. *Hum Mutat* 11, 470-479.
- Frusconi S, Passerini I, Girolami F, Masieri M, Linari S, Longo G, Morfini M and Torricelli F (2002). Identification of seven novel mutations of F8C by DHPLC. *Hum Mutat* 20, 231-232.
- Gailani D (2000) Activation of factor IX by factor XIa. *Trends Cardiovasc Med* 10, 198-204.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM, (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312, 326-330.
- Gomez K, Klamroth R, Mahlangu J, Mancuso ME, Mingot ME and Ozelo MC (2014) Key issues in inhibitor management in patients with haemophilia. *Blood Transfus* 12 Suppl 1, s319-329.
- Gorziza RP, Vieira IA, Kappel DB, Rosset C, Sinigaglia M, Leiria LB, Salzano FM and Bandinelli E (2013). Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 24, 164-169.
- Green PM, Bagnall RD, Waseem NH and Giannelli F (2008) Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol* 143, 115-128.
- Green PM, Bentley DR, Mibashan RS, Nilsson IM and Giannelli F (1989) Molecular pathology of haemophilia B. *EMBO J* 8, 1067-1072.
- Habart D, Kalabova D, Novotny M and Vorlova Z (2003) Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions. *J Thromb Haemost* 1, 773-781.
- Handford PA, Baron M, Mayhew M, Willis A, Beesley T, Brownlee GG and Campbell ID (1990). The first EGF-like domain from human factor IX contains a high-affinity calcium binding site. *EMBO J* 9, 475-480.
- Harlos K, Holland SK, Boys CW, Burgess AI, Esnouf MP and Blake CC (1987). Vitamin K-dependent blood coagulation proteins form hetero-dimers. *Nature* 330, 82-84.
- Hart DP (2020) FVIII Immunogenicity-Bioinformatic Approaches to Evaluate Inhibitor Risk in Non-severe Hemophilia A. *Front Immunol* 11, 1498.
- Hay CR (1998) Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia* 4, 558-563.
- Hoffman M and Monroe DM (2001) A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85, 958-965.
- Huntington JA (2005) Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost* 3, 1861-1872.

- Ivaskevicius V, Jurgutis R, Rost S, Müller A, Schmitt C, Wulff K, Herrmann FH, Müller CR, Schwaab R and Oldenburg J (2001) Lithuanian haemophilia A and B registry comprising phenotypic and genotypic data. *Br J Haematol* 112, 1062-1070.
- Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M and Srivastava A (2005) Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia* 11, 481-491.
- Johnsen JM, Fletcher SN, Huston H, Roberge S, Martin BK, Kircher M, Josephson NC, Shendure J, Ruuska S, Koerper MA, *et al* (2017) Novel approach to genetic analysis and results in 3000 hemophilia patients enrolled in the My Life, Our Future initiative. *Blood Adv* 1, 824-834.
- Kane WH and Davie EW (1988). Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 71, 539-555.
- Khatri P and Drăghici S (2005) Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics* 21, 3587-3595.
- Lavigne-Lissalde G, Rothschild C, Pouplard C, Lapalud P, Gruel Y, Schved JF and Granier C (2009) Characteristics, mechanisms of action, and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 37, 67-79.
- Lenting PJ, van de Loo JW, Donath MJ, van Mourik JA and Mertens K (1996) The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* 271, 1935-1940.
- Lillicrap D (1998) The molecular basis of haemophilia B. *Haemophilia* 4, 350-357.
- Liu ML, Nakaya S and Thompson AR (2002) Non-inversion factor VIII mutations in 80 hemophilia A families including 24 with alloimmune responses. *Thromb Haemost* 87, 273-276.
- Mahajan A, Chavali S, Kabra M, Chowdhury MR and Bharadwaj D (2004) Molecular characterization of hemophilia B in North Indian families: identification of novel and recurrent molecular events in the factor IX gene. *Haematologica* 89, 1498-1503.
- Makino Y, Omichi K, Kuraya N, Ogawa H, Nishimura H, Iwanaga S and Hase S (2000) Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. *J Biochem* 128, 175-180.
- Marcus AJ and Safier LB (1993) Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 7, 516-522.
- Markoff A, Gerke V and Bogdanova N (2009) Combined homology modelling and evolutionary significance evaluation of missense mutations in blood clotting factor VIII to highlight aspects of structure and function. *Haemophilia* 15, 932-941.
- McMichael M (2012) New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med* 27, 40-45.
- McVey JH, Rallapalli PM, Kembal-Cook G, Hampshire DJ, Giansily-Blaizot M, Gomez K, Perkins SJ and Ludlam CA (2020). The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) Coagulation Factor Variant Databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* 26, 306-313.
- Meireles MR, Bragatte MAS, Bandinelli E, Salzano FM and Vieira GF (2019) A new in silico approach to investigate molecular aspects of factor IX missense causative mutations and their impact on the hemophilia B severity. *Hum Mutat* 40, 706-715.
- Meléndez-Aranda L, Jaloma-Cruz AR, Pastor N and Romero-Prado MMJ (2019) In silico analysis of missense mutations in exons 1-5 of the F9 gene that cause hemophilia B. *BMC Bioinformatics* 20, 363.
- Nafa K, Baudis M, Deburgrave N, Bardin JM, Sultan Y, Kaplan JC and Delpech M (1992) A novel mutation (Arg-->Leu in exon 18) in factor VIII gene responsible for moderate hemophilia A. *Hum Mutat* 1, 77-78.
- Orlova NA, Kovnir SV, Vorobiev II and Gabibov AG (2012) Coagulation Factor IX for Hemophilia B Therapy. *Acta Naturae* 4, 62-73.

- Pittman DD and Kaufman RJ (1988) Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2429-2433.
- Qiao SK, Ren HY, Ren JH and Guo XN (2014) Compound heterozygous hemophilia A in a female patient and the identification of a novel missense mutation, p.Met1093Ile. *Mol Med Rep* 9, 466-470.
- Rallapalli PM, Kembal-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K and Perkins SJ (2013) An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J Thromb Haemost* 11, 1329-1340.
- Reitter S, Sturn R, Horvath B, Freitag R, Male C, Muntean W, Streif W, Pabinger I, Mannhalter C and Group, AMHS (2010) Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austria. *Thromb Haemost* 104, 78-85.
- Repešé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, Lavergne JM and Borel-Derlon A (2007) Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost* 5, 1469-1476.
- Riddel JP, Aouizerat BE, Miaskowski C and Lillicrap DP (2007) Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs* 24, 123-131.
- Roberts HR, Monroe DM and Escobar MA (2004) Current concepts of hemostasis: implications for therapy. *Anesthesiology* 100, 722-730.
- Rosset C, Vieira IA, Sinigaglia M, Gorziza RP, Salzano FM and Bandinelli E (2013) Detection of new mutations and molecular pathology of mild and moderate haemophilia A patients from southern Brazil. *Haemophilia* 19, 773-781.
- Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Goodeve A, Larripa IB and De Brasi CD (2007) Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica* 92, 842-845.
- Ruggeri ZM, Mendolicchio GL (2007) Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 100, 1673-1685.
- Salviato R, Belvini D, Radossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto D, Zanon E, Castaman G, Gandini G and Tagariello G (2007) F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 13, 361-372.
- Sanna V, Zarrilli F, Nardiello P, D'Argenio V, Rocino A, Coppola A, Di Minno G and Castaldo G (2008) Mutational spectrum of F8 gene and prothrombotic gene variants in haemophilia A patients from Southern Italy. *Haemophilia* 14, 796-803.
- Santacroce R, Aquila M, Belvini D, Castaldo G, Garagiola I, Giacomelli SH, Lombardi AM, Minuti B, Riccardi F, Salviato R *et al* (2008) Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in a group of 1,410 unselected Italian patients with hemophilia A. *J Hum Genet* 53, 275-284.
- Schenone M, Furie BC and Furie B (2004) The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 11, 272-277.
- Schmidt AE and Bajaj SP (2003) Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* 13, 39-45.
- Schwaab R, Oldenburg J, Schwaab U, Johnson DJ, Schmidt W, Olek K, Brackman HH and Tuddenham EG (1995) Characterization of mutations within the factor VIII gene of 73 unrelated mild and moderate haemophiliacs. *Br J Haematol* 91, 458-464.
- Sirocova N, Tsourea V, Vicol M, Barbacar N, Nakaya SM, Thompson AR and Pratt KP (2009) Factor VIII mutations in 42 Moldovan haemophilia A families, including 12 that are novel. *Haemophilia* 15, 942-951.
- Stassen JM, Arnout J and Deckmyn H (2004) The hemostatic system. *Curr Med Chem* 11, 2245-2260.

- Stenflo J, Lundwall A and Dahlbäck B (1987) beta-Hydroxyasparagine in domains homologous to the epidermal growth factor precursor in vitamin K-dependent protein S. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 368-372.
- Sukarova-Stefanovska E, Zisovski N, Muratovska O, Kostova S and Efremov GD (2002) Three novel point mutations causing haemophilia A. *Haemophilia* 8, 715-718.
- Svensson B, Autry JM and Thomas DD (2016) Molecular Modeling of Fluorescent SERCA Biosensors. *Methods Mol Biol* 1377, 503-522.
- Theocharopoulou G and Vlamos P (2020) Modeling the Critical Activation of Chaperone Machinery in Protein Folding. *Adv Exp Med Biol* 1194, 351-358.
- Tieu P, Chan A and Matino D (2020) Molecular Mechanisms of Inhibitor Development in Hemophilia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 12, e2020001.
- Timur AA, Gürgey A, Aktuglu G, Kavakli K, Canatan D, Olek K and Caglayan SH (2001) Molecular pathology of haemophilia A in Turkish patients: identification of 36 independent mutations. *Haemophilia* 7, 475-481.
- Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN *et al* (1984) Structure of human factor VIII. *Nature* 312, 337-342.
- Venkateswarlu D (2014) Structural insights into the interaction of blood coagulation co-factor VIIIa with factor IXa: a computational protein-protein docking and molecular dynamics refinement study. *Biochem Biophys Res Commun* 452, 408-414.
- Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M and Reitsma PH (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 93, 327-358.
- Waseem NH, Bagnall R, Green PM and Giannelli F (1999) Start of UK confidential haemophilia A database: analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Haemophilia Centres. Thromb Haemost* 81, 900-905.
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM and Gordon D (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2839-2843.
- Xu Q, Dai H, Zhao T and Wei D (2015) Introduction to structural bioinformatics. *Adv Exp Med Biol* 827, 1-7.
- Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW and Kurachi K (1985) Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 24, 3736-3750.
- ZAJICEK J (1954). Studies on the histogenesis of blood platelets. *Acta Haematol* 12, 238-244.
- Zhang LL, Yu ZQ, Zhang W, Cao LJ, Su J, Bai X and Ruan CG (2011) Relationship between factor VIII inhibitor development and polymorphisms of TNF α and CTLA-4 gene in Chinese Han patients with hemophilia A]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 32, 168-172.
- Zögg T and Brandstetter H (2009) Activation mechanisms of coagulation factor IX. *Biol Chem* 390, 391-400.

Artigos publicados ou submetidos durante o Doutorado além dos pertencentes a tese, em colaboração ou não.

Haemophilia

The Official Journal of the
World Federation of Hemophilia,
European Association for Haemophilia and
Allied Disorders and the Hemostasis &
Thrombosis Research Society



ORIGINAL ARTICLE

Variants p.Pro2063Ser and p.Arg324* co-segregate in type 3 von Willebrand disease patients from Southern Brazil

Ana Paula Ornaghi, Mariana Rost Meireles, Mariana Rodrigues Botton, Francisco Mauro Salzano, Eliane Bandinelli ✉ Ursula Matte,

First published: 06 February 2021 | <https://doi.org/10.1111/hae.14254>



Genetics and Molecular Biology, 43, 1(suppl 2), e20190025 (2020)
Copyright © 2020, Sociedade Brasileira de Genética.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0025>

Original Article

Identification of environmental and genetic factors that influence warfarin time in therapeutic range

Mariana R. Botton¹, Patrícia P. Viola¹, Mariana R. Meireles¹, Estela M. Bruxel¹, Priccila Zuchinali², Eliane Bandinelli¹, Luis E. Rohde², Tiago L. L. Leiria³, Joyce Y. Y. Salamoni², Arthur P. Garbin² and Mara H. Hutz¹

¹*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, RS, Brazil.*

²*Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.*

³*Fundação Universitária de Cardiologia, Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

**Y380Q novel mutation in receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein
together with C379W interfere in the neutralizing antibodies interaction**

Ivaine Tais Sauthier Sartor^{1*}; Fernanda Hammes Varela^{1,2*}; Mariana Rost Meireles³; Luciane Beatriz Kern¹; Thaís Raupp Azevedo¹; Gabriela Luchiarini Tumioto Giannini⁴; Mariana Soares da Silva⁵; Meriane Demoliner⁵; Juliana Schons Gularte⁵; Paula Rodrigues de Almeida⁵; Juliane Deise Fleck⁵; Gabriela Oliveira Zavaglia¹; Ingrid Rodrigues Fernandes¹; Caroline Nespolo de David¹; Amanda Paz Santos¹; Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida⁶; Victor Bertollo Gomes Porto⁶; Marcelo Comerlato Scotta^{1,2}; Gustavo Fioravanti Vieira^{3,7}; Fernando R. Spilki⁵; Renato T. Stein^{1,2}; Márcia Polese-Bonato¹; COVIDa study group¹.

Submetido a revista “*Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*” e disponível no MedRxiv:

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.09.10.21262695v1.full.pdf>

***Chlamydia trachomatis* HLA-A*02:01 and HLA-B*27:05 peptides presentation and cross-reactivity**

MARIANA ROST MEIRELES¹, ALEXANDRA ROCHA², GUSTAVO FIORAVANTI VEIRA^{1,2*}

¹*Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil*

²*Universidade LaSalle, Canoas, RS, Brasil*

* Correspondence: Gustavo F. Vieira

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

telephone: +55 51 33086722

E-mail: gustavo.vieira@unilasalle.edu.br

Submetido a revista: “*Immunoinformatics*”

Computational investigation of FVIII inhibitor development in missense mutations

MARIANA R. MEIRELES¹, and GUSTAVO F. VIEIRA^{2*}

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

² Universidade LaSalle, Canoas, RS, Brasil

Artigo em preparação.