

Hemofilia B sob um olhar panorâmico

Andrielle CASTILHO-FERNANDES^I

Alícia Greyce Turatti PESSOLATO^{II}

Aparecida Maria FONTES^{III}

^I Doutora pelo Departamento de Clínica Médica - Modalidade Biomédica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC) – Brasil, andrielle_dcf@yahoo.com

^{II} Mestre pelo Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, INCTC – Brasil, aliciagreyce@gmail.com

^{III} Professora Doutora vinculada ao Departamento de Clínica Médica e de Genética – FMRP - USP, INCTC – Brasil, fontesam@hemocentro.fmrp.usp.br

RESUMO: A hemofilia B é uma doença hereditária associada ao cromossomo X e consiste na deficiência do fator IX da coagulação sanguínea. Esta doença hemorrágica afeta um em cada 30.000 homens no mundo todo. O nível de Fator IX biologicamente ativo presente no plasma dos portadores está diretamente relacionado à gravidade e frequência dos episódios hemorrágicos. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante foi viável a clonagem do gene do fator IX, o que tornou possível a caracterização molecular do mesmo. O conhecimento das bases moleculares da hemofilia B permitiu uma melhor compreensão da relação entre a estrutura do gene fator IX e a função molecular da proteína Fator IX ativa, além do desenvolvimento da proteína FIX recombinante. O tratamento existente se dá pela terapia de reposição biológica, por meio de infusões intravenosas de Fator IX derivado do plasma humano ou recombinante. Este artigo visa sumarizar os conhecimentos sobre as bases moleculares da hemofilia B (gene, RNA e proteína), a cascata de coagulação sanguínea, os processos de desenvolvimento do Fator IX recombinante e a situação mundial e brasileira diante do tratamento atual e as perspectivas futuras para hemofilia B.

Palavras-chave: Hemofilia B; Fator IX; biologia molecular; coagulação sanguínea e tratamento.

Hemophilia B in a panoramic vision

ABSTRACT: Hemophilia B is a hereditary disease linked to chromosome X and consists in the deficiency of factor IX blood clotting. This hemorrhagic disease affects one in 30,000 men worldwide. The level of biologically active Factor IX in the patients' plasma is directly related to the severity and frequency of bleeding episodes. Since the advent of recombinant DNA technology, it was feasible to clone the gene for factor IX, which made possible its molecular characterization. Knowledge of the molecular basis of hemophilia B has allowed a better understanding of the relationships between factor IX gene structure and active Factor IX protein function. The existing treatment is given by biological replacement therapy, through intravenous infusions of Factor IX derived from human plasma or recombinant Factor IX. This article aims to summarize the knowledge about the molecular basis of hemophilia B (gene, RNA, and protein), the cascade of blood clotting, the process of development of recombinant Factor IX and the situation in worldwide and Brazil in face of the current treatment and the future prospects of hemophilia B.

Key-words: Hemophilia B; Factor IX; molecular biology; blood coagulation and therapeutics.

INTRODUÇÃO

A Hemofilia B é uma doença hereditária associada ao cromossomo X, que consiste na deficiência do fator IX (FIX) da coagulação sangüínea e afeta um em cada 30.000 homens no mundo todo¹⁻³. É conhecida também como doença de Christmas, em virtude do sobrenome do primeiro paciente descrito portador dessa doença (Stephen Christmas). Esse relato foi publicado no volume Christmas da *British Medical Journal* em 1952 por um grupo britânico liderado por Rosemary Biggs⁴, oito anos após a primeira descrição da Hemofilia A.

Clinicamente, esta doença apresenta muitas similaridades com a hemofilia A, isto é, o paciente apresenta freqüentes episódios de sangramento, na maioria das vezes em regiões muco-cutâneas, músculo-esqueléticas e em tecidos moles. O sangramento pode ocorrer também em outros espaços críticos como, por exemplo, no espaço intracranial ou retroperitoneal⁵.

A hemofilia B é classificada em graus leve, moderado e grave de acordo com o nível de FIX ativo presente no plasma. A forma leve possui níveis acima de 5% de FIX ativo circulante, e os pacientes raramente sangram; a moderada apresenta de 1 a 5 % deste fator circulante, e os sangramentos são escassos; por outro lado, a forma grave da doença é definida por quantidades de FIX ativo inferiores a 1%, e os pacientes apresentam

episódios de sangramentos espontâneos nos músculos, articulações e mucosas^{1,5-8}.

Dados obtidos do Registro das Coagulopatias Hereditárias do Brasil apresentados pela Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde revelam que no Brasil existem cerca de 1.300 hemofílicos do tipo B tratados com FIX concentrado derivado do plasma, o qual se calcula uma administração anual de 30.000 UI/paciente⁹.

Caracterização Molecular do FIX

Os estudos de caracterização molecular do cDNA e do gene do FIX iniciaram-se em 1982 por dois grupos, Kurachi & Davie de Washington² e Choo e Brownlee¹⁰ de Londres. Nestes estudos foi mostrada a caracterização parcial do gene do FIX. Posteriormente, esses mesmos grupos mostraram a caracterização completa do cDNA e do gene do FIX^{11,12}, passos esses críticos em futuros estudos que visavam a clonagem e expressão do FIX em células de mamíferos. Neste mesmo período, um terceiro grupo francês demonstrou a localização do gene do FIX no braço longo do cromossomo X na banda Xq27.1¹³ (FIGURA 1).

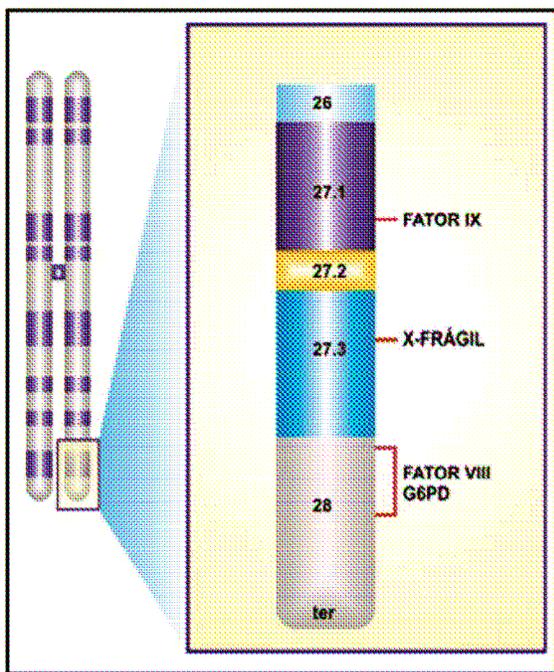


Figura 1 - Localização do gene do FIX. O gene do FIX está situado no braço longo do cromossomo X na banda Xq27.1 (figura modificada de Roberts⁵).

O gene do FIX contém 33.5 kilobases (FIGURA 2 A), incluindo sete íntrons e oito éxons. O transcrito possui 2.803 bases, composto por uma pequena região 5' UTR de 29 bases, 1.383 bases correspondentes à região codificadora e uma região 3' UTR de 1.390 bases^{10,12,14} (FIGURA 2 B).

O FIX é uma glicoproteína plasmática dependente de vitamina K, sintetizada inicialmente nos hepatócitos como uma proteína precursora de peso molecular 57 kDa^{15,16}. É também conhecida como zimogênio (forma inativa) de serino-protease, a qual é ativada proteoliticamente, de acordo com a via de coagulação moderna, pelo complexo Fator VIIa/fator tecidual, o que resulta na formação de sua forma ativada denominada FIXa¹⁷. A ativação do FIX ocorre no plasma após a clivagem em duas regiões

(Arg¹⁴⁵-Arg¹⁴⁶ e Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹) resultando na formação das cadeias leve (N-terminal de 145 aminoácidos e peso molecular de 16 kDa) e pesada (C-terminal de 234 aminoácidos e peso molecular 29 kDa), as quais são unidas por uma única ponte dissulfídica entre os resíduos de cisteína 132 e 279¹⁷.

A proteína deduzida da sequência de nucleotídeos do cDNA do gene do FIX contém 461 aminoácidos. Nesta forma é conhecida como proteína precursora e contém o peptídeo sinal de 27 aminoácidos que encaminha a proteína para o retículo endoplasmático e em seguida apresenta a sequência pró-peptídica a qual é reconhecida pela enzima γ -glutamil carboxilase (FIGURA 2C e 3). Esses dois segmentos peptídicos são removidos antes da proteína ser secretada para a circulação¹⁸.

Além da remoção das sequências pré e pró-peptídica, o FIX, antes de sua secreção, apresenta cinco outras modificações pós-traducionais, entre eles: γ -carboxilação; β -hidroxilação; glicosilação; sulfatação e fosforilação. Algumas modificações ocorrem no retículo endoplasmático rugoso (RER) e outras no Complexo de Golgi. Associadas, essas modificações objetivam o dobramento adequado da estrutura protéica, uma secreção e funcionamento apropriados da mesma, tornando-a biologicamente ativa se necessária^{8, 9,20}.

As principais características do FIX (FIGURA 2 e 3) são:

1) peptídeo sinal – da metionina -46 ao ácido glutâmico -20, o qual é clivado pela enzima peptidase sinal do REG e codificado pelo éxon 1 (117 pb);

2) região propeptídica – da cisteína -19 a arginina -1. É o sítio de reconhecimento para a interação com a enzima γ -glutamil carboxilase dependente de vitamina K, a qual é responsável pela γ -carboxilação dos 12 resíduos de ácido glutâmico (posições 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36 e 40) do domínio GLA da proteína. É codificada pelo éxon 2 (164 pb);

3) domínio GLA – da tirosina 1 ao ácido glutâmico 40. Além das modificações pós-traducionais acima mencionadas esse domínio apresenta elevada afinidade por íons cálcio (Ca^{2+}), os quais juntamente com a pequena região hidrofóbica (fenilalanina 41 a valina 46) são necessários para a interação do FIX com lipídeos da membrana plasmática durante a coagulação sanguínea. É codificado pelos éxons 2 (164 pb) e 3 (25 pb);

4) dois domínios de fator de crescimento epidérmico – do ácido aspártico 47 a arginina 145. O domínio EGF-1 do aminoácido 47 ao 83 apresenta dois tipos de modificações pós-traducionais: a) β -hidroxilação do ácido aspártico 64 e b) glicosilação dos aminoácidos serina (S53 e S61). Esse domínio contém sítios de interação com

íons Ca^{2+} . O domínio EGF-2 (da cisteína 88 a asparagina 145) apresenta sítios de interação com as plaquetas e o FVIIIa. Os dois domínios são unidos por uma região *linker* de 4 aminoácidos (leucina 84 a treonina 87). Esses domínios são codificados pelos éxons 4 (114 pb) e 5 (129 pb);

5) peptídeo de ativação – da alanina 146 a arginina 180. Esse domínio é responsável pela conversão do zimogênio serino-protease FIX para a forma FIXa. Durante a ativação esse domínio é removido gerando a cadeia leve (da tirosina 1 a arginina 145 = domínio GLA + domínio EGF-1 e EGF-2) e cadeia pesada (da valina 181 a treonina 415). Esse domínio apresenta três principais modificações pós-traducionais, entre elas: a) sulfatação na tirosina 155; b) glicosilação em seis aminoácidos (asparagina 157 e 167 e treonina 159, 169, 172 e 179) e c) fosforilação na serina 158. É codificado pelo éxon 6 (203 pb);

6) domínio catalítico – da valina 181 a treonina 415. Possui a tríade catalítica conservada das enzimas serino-proteases (Histidina-221, Serina-365 e Ácido aspártico-264). Como mencionado acima consiste na cadeia pesada do FIX. É codificado pelos éxons 7 (115 pb) e 8 (1.935 pb).

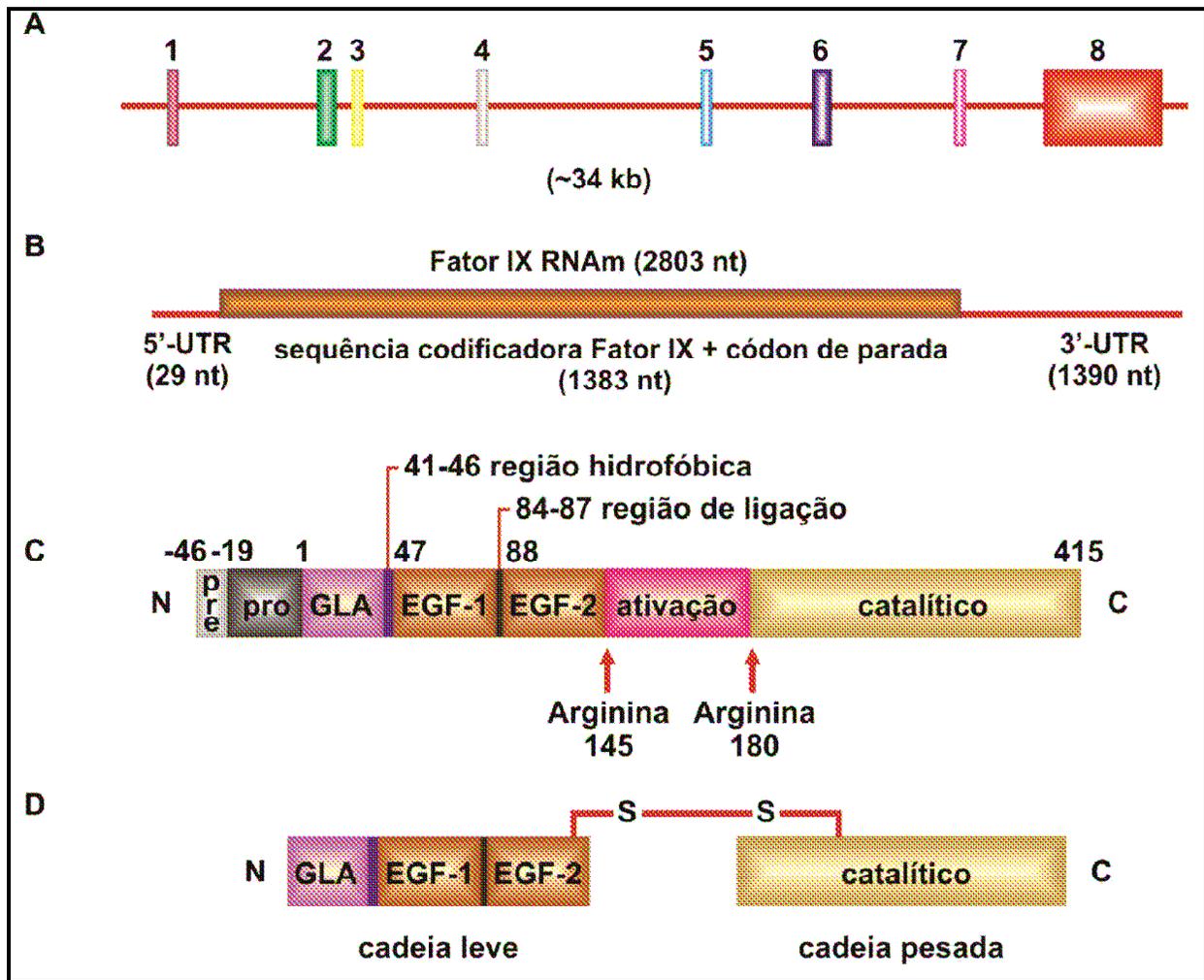


Figura 2 – Gene, RNA mensageiro, Proteína precursora e Proteína madura do FIX. (A) Organização genômica do gene FIX humano, os éxons estão numerados de 1 - 8. (B) RNA mensageiro do FIX mostrando as regiões 5' e 3'UTR e a região codificadora. (C) proteína de FIX precursora, compreendendo as sequências PRÉ (peptídeo sinal), PRÓ (propeptídeo) e com um peptídeo maduro de 415 aminoácidos, que contém a região ativação (peptídeo de ativação). (D) FIX ativado composto por cadeia leve (N-terminal) e uma cadeia pesada (C-terminal) unidas por uma ponte dissulfídica entre os resíduos de cisteína 132 e 279. Possui as regiões GLA (domínio GLA), EGF (domínios de fator de crescimento epidérmico) e catalítico (domínio serino-protease) (modificado de Bowen¹⁴).

PEPTÍDEO SINAL

-46 MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAE

SEQÜÊNCIA PROPETÍDEO

-19 CTVFLDHENA NKILNRPKR

DOMÍNIO GLA

1 YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE

REGIÃO HIDROFÓBICA

41 FWKQYV

DOMÍNIO EGF-1

47 DGDQ CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCPFGFEGK NCE

LINKER

84 LDVT

DOMÍNIO EGF-2

88 CNI KNGRCEQFCK NSADNKVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVPF

131 PCGRVSVSQT SKLTR

PEPTÍDEO DE ATIVAÇÃO

146 AETVFPDVDY VNSTEAEITL DNITQSTQSF NDFTR

DOMÍNIO CATALÍTICO

181 VVGEDAKPG QFPWQVVLNG KVDAFCGGSI VNEKWIVTAA HCVETGVKIT

231 VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV

281 LNSYVTPICI ADKEYTNI FL KFGSGYVSGW GRV FHKGRSA LVLQYLRVPL

331 VDRATCLRST KFTIYNNMFC AGFHEGGRDS CQGDSGGPHV TEVEGTSFLT

381 GIISWGECA MKGKYGIYTK VSRVNWIKI KTKLT

Figura 3 - Estrutura primária do FIX humano com sua seqüência de aminoácidos e respectivos domínios. Os aminoácidos que apresentam modificação pós-traducionais se encontram destacados. No peptídeo sinal o aminoácido metionina (M) é destacado em rosa. No domínio GLA os doze resíduos de Glu estão sublinhados e em vermelho. No domínio EGF-1 as S53 e S61 estão em verde; e o D64 em lilás. A posição de clivagem do peptídeo de ativação é encontrada em azul escuro R145 e R180. No peptídeo de ativação a Y155 sulfatada é destacada em azul, em vermelho os resíduos glicosilados N157, N167, T159, T169, T172 e T179, e em verde claro a S158 fosforilada.

Ativação da proteína FIX

No plasma humano o FIX encontra-se na concentração de 4-5 µg/mL com uma meia vida de 18-24 horas²¹.

Como mencionado anteriormente, os dois pontos essenciais para a ativação do FIX envolvem:

1) a γ -carboxilação dos resíduos de glutamina que são essenciais para a ligação de

cálcio ao domínio GLA, os quais por sua vez resultam em uma mudança conformacional na proteína que expõe os resíduos hidrofóbicos e permitem sua interação com a bicamada lipídica;

2) a clivagem da cadeia única em duas cadeias (leve e pesada) que permanecem unidas por uma ponte dissulfídica.

Há dois mecanismos propostos em relação à clivagem das ligações peptídicas, as quais resultarão na formação das cadeias leves e pesadas:

1) o primeiro modelo propõe que as duas clivagens do FIX são seqüenciais. Inicialmente, ocorre a clivagem entre os resíduos Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶, produzindo o intermediário FIX α , e em seguida, ocorre a segunda clivagem entre os resíduos Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹, que resulta na liberação do peptídeo de ativação e formação do produto final FIX $\alpha\beta$ ²²;

2) o segundo modelo propõe que as duas clivagens proteolíticas ocorrem simultaneamente sendo, portanto, utilizada uma única molécula de substrato. De acordo com esse modelo é inexistente a formação do produto intermediário FIX α ²³ (FIGURA 4).

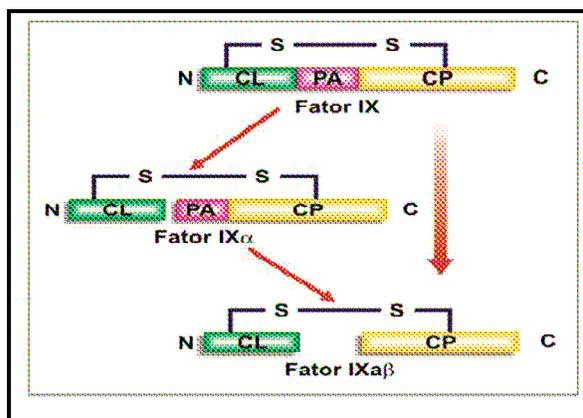


Figura 4 - Ativação do FIX. As setas mais largas indicam a ativação do FIX pelo fator VII/TF/Ca²⁺ por clivagens iniciais entre a cadeia leve (CL) e o peptídeo de ativação (PA) produzindo um precursor inativo FIX α . A segunda clivagem entre o PA e a cadeia pesada (CP) libera o PA e gera o produto final denominado FIX $\alpha\beta$. O caminho representado pela seta central degradada representa a ativação do FIX pelo fator XIa (figura modificada de Gailani²⁴).

De acordo com o modelo clássico da coagulação sanguínea, conhecida como “Cascata da Coagulação”, a principal protease da coagulação responsável pela ativação do FIX é o fator XIa, o qual se torna ativado pelo Fator XIIa que por sua vez se torna ativado após a interação do fator XII com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK), a pré-caliceína (PK) e o colágeno expostos na superfície endotelial após a lesão do vaso sanguíneo^{25,26}.

Vários avanços ocorreram no conhecimento dos mecanismos da coagulação sanguínea. Nos últimos anos, tem-se entendido melhor a importância da superfície celular como sítio contendo receptores específicos que organizam os processos hemostáticos. De acordo com o modelo moderno da coagulação sanguínea, o complexo FT/VIIa seria o principal ativador do FIX. Desta maneira, em uma primeira fase,

uma célula (fibroblasto, monócito ou endotelial) expressaria o fator tecidual (FT), o qual se associaria com o fator VIIa e conduziria à geração de Xa, IXa e trombina. Em uma segunda fase, a reação se moveria para a superfície das plaquetas, as quais são ativadas, bem como os co-fatores da coagulação (V e VIII). O fator VIIIa, como no modelo anterior, é o co-fator do FIXa e ativa o fator X convertendo-o em FXa. Este se associa com o fator Va formando o complexo FXa/FVa/Ca²⁺/fosfolípídeos, que resulta na formação de trombina. Esta, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina e conseqüentemente a formação do coágulo^{21,27,28}.

FIX recombinante

Atualmente existe apenas um FIX recombinante (rFIX) licenciado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) para o uso clínico no tratamento da hemofilia B, o BeneFIXTM^{29,30}.

A produção do rFIX, BeneFIXTM, envolveu quatro etapas. Inicialmente, em meados da década de 80 foi realizado o isolamento e a clonagem do cDNA relativo ao FIX a partir de uma biblioteca de cDNA de fígado humano³¹. A clonagem do FIX foi realizada em um vetor de expressão plasmidial convencional e o mesmo foi transfectado na linhagem celular de ovário de hamster chinês (*CHO*) deficiente em

dihidrofolato redutase (DHFR). Para a seleção de uma linhagem celular produtora de elevados níveis de rFIX foi realizada a co-transfecção com um plasmídeo portador do gene da DHFR. Após a seleção com alta estringência de metotrexato, seguido do tratamento com vitamina K foi possível a obtenção de uma população celular recombinante cujo nível de FIX biologicamente ativo presente no sobrenadante da cultura celular foi da ordem de 0,8 UI/mL. Esse nível de FIX inferior ao nível de FIX presente no plasma poderia ser explicado pelo processamento parcial da proteína recombinante.

De fato, estudos, em paralelo, envolvendo a caracterização de outras proteínas plasmáticas, entre elas, pro-albumina e pro-Fator von Willebrand mostraram a importância da enzima PACE-SOL (serino-protease PACE, do inglês *Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme*) para o processamento completo das mesmas^{32,33}. Em uma segunda etapa do processo de produção do rFIX, sete anos mais tarde, esse mesmo grupo mostrou que a co-transfecção da linhagem recombinante *CHO/rFIX* com o cDNA relativo ao gene PACE-SOL humano resultou em um aumento de 2-3 vezes na quantidade de FIX biologicamente ativo no sobrenadante dessas culturas celulares³⁴.

A terceira etapa consistiu na adaptação da linhagem celular recombinante *CHO/rFIX* para o crescimento em suspensão, em meios de cultura isentos de produtos de origem

animal e de proteínas derivadas do plasma humano.

Finalmente, a quarta etapa consistiu na adaptação ao crescimento em biorreatores em pequena escala (250 litros) a princípio, seguido de biorreatores em larga escala (2500 litros). O sobrenadante de cultura dessa suspensão celular foi submetido a várias etapas de purificação e concentração resultando na obtenção do liofilizado conhecido BeneFIX™. Em 11 de fevereiro de 1997, a organização americana FDA aprovou a comercialização desse produto pela empresa *Genetics Institute* (Cambridge/Andover, MA)^{20,35}. Esse produto foi patenteado sob número US Patent 5.171.569³⁶.

Em 2003, a organização *United Kingdom Haemophilia Center Doctors Organization* (UKHCDO) publicou no periódico *Haemophilia Journal* a estratégia para a seleção dos pacientes portadores de hemofilia B que se tornaram aptos ao uso do BeneFIX™ como forma de tratamento³⁷.

O produto recombinante tem sido fabricado em apenas algumas regiões por uma única empresa e isso leva a uma carência no fornecimento do produto. Atualmente no Reino Unido todos os hemofílicos podem ser tratados com a proteína recombinante, porém na América do Norte uma fração significativa recebe o tratamento com o FIX derivado do plasma (pdFIX)³⁸⁻⁴².

A situação brasileira é um pouco diferente. Até o momento, o Brasil não apresenta tecnologia para a produção do

pdFIX, bem como do rFIX. Há uma dependência total de produtos importados. O plasma brasileiro é fracionado por companhias européias e retorna ao país na forma de concentrado de fator liofilizado, tendo assim um elevado custo. O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais dos fatores concentrados⁴³, sendo estimado um gasto anual de R\$ 350 milhões na compra de hemoderivados⁴⁴.

Outro problema mundial a respeito do uso do pdFIX diz respeito à contaminação com agentes virais. Apesar dos avanços biotecnológicos que conduziram ao aprimoramento das metodologias de inativação viral, permitindo formulações mais seguras de pdFIX, a possibilidade de contaminação com parvovírus B19, príons infecciosos que causam a nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) e outros vírus emergentes é uma preocupação freqüente^{45,46}.

Em conjunto, o alto custo do BeneFIX™ e sua quantidade disponível limitada no mercado tem incentivado a comunidade científica ao desenvolvimento de novas formulações de rFIX com o intuito de torná-lo mais acessível a população de hemofílicos B^{38,47}.

ESFORÇOS ATUAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A forma como a Hemofilia B vem sendo tratada nos últimos 40 anos tem sofrido grandes melhoras, devido à disponibilidade da

terapia de reposição biológica (pdFIX e/ou rFIX). Dessa forma, o tratamento pode ocorrer via profilaxia primária – tratamento regular para prevenir sangramentos, iniciado nos primeiros anos de vida do paciente, e via profilaxia secundária - tratamento regular para interromper o ciclo de sangramento. Por consequência disto, um aumento significativo tem ocorrido tanto na qualidade de vida quanto na expectativa de vida dos pacientes hemofílicos B, levando-os a enfrentar novos desafios.

Durante o Congresso Mundial de Hemofilia 2010⁴⁸, foram discutidos os novos desafios relacionados ao tratamento da hemofilia. Neste encontro, foi possível constatar que ainda há pouca experiência em relação aos cuidados com as doenças mais relacionadas aos pacientes hemofílicos idosos⁴⁹. Constatou-se ainda, obstáculos no estabelecimento do uso profilático do fator concentrado em pacientes adolescentes e adultos jovens hemofílicos⁵⁰. Na tentativa de estabelecer a terapia profilática em adolescentes, dois importantes estudos estão simultaneamente em andamento, na Europa (*health-related quality of life, HyQoL-Europe*; NCT01053715) e no Canadá (*HyQoL-Canada*; NCT01034904).

Além disso, outros estudos vêm sendo realizados com o intuito de prolongar a meia vida do pdFIX e rFIX (18 – 34 horas), além de diminuir os intervalos de terapia de reposição (2 – 3 dias) que mantém os níveis FIX suficientes para prevenir sangramentos

espontâneos^{51,52}. Diante deste contexto, Metzner e colaboradores⁵³, financiados pela empresa CSL Behring, criaram uma nova proteína recombinante (rIX-FP), a qual se dá pela fusão da sequência de DNA que codifica a albumina humana com a região C-terminal do FIX humano. A albumina foi utilizada pelo fato de sua meia vida ser de cerca de 20 dias e por carrear naturalmente diversas proteínas⁵⁴. Os estudos pré-clínicos realizados com rIX-FP em camundongos, ratos e coelhos demonstraram que a fusão protéica manteve a atividade biológica do rFIX e a meia vida do rIX-FP 4 – 5 vezes superior quando comparada ao pdFIX e ao rFIX. Assim, a próxima etapa será o desenvolvimento de estudos clínicos utilizando o produto rIX-FP³⁸.

Durante o Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2010 e 2011, foram apresentados e discutidos assuntos sobre autossuficiência em produtos sanguíneos, avanços no tratamento e monitoramento das hemofilias, e os prós e contras dos fatores de coagulação derivados do plasma humano e recombinantes⁵⁸, demonstrando que os pesquisadores e especialistas estão traçando propostas pela melhoria nos tratamentos para hemofilia no Brasil. Neste contexto, vários incentivos surgiram nos últimos anos em prol da produção nacional e com baixo custo dos fatores de coagulação. Dados registrados pelo Tribunal de Contas da União⁴⁴ demonstram que no Brasil não é realizado como política de

saúde pública o tratamento de profilaxia primária para hemofilia, uma vez que eleva em três vezes o consumo de fator em comparação com a profilaxia secundária realizada atualmente. É importante ressaltar que de acordo com Constituição Federal Brasileira de 1988 e a lei 10.205, de maio de 2001, a coleta de plasma humano não pode ser remunerada e a comercialização de hemoderivados é proibida⁵. Diante desses fatos, o Instituto Butantã e a Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás) tem empenhado para obter o FIX por meio da tecnologia tradicional, a qual utiliza o plasma de doadores sanguíneos⁵⁵. Assim, o Brasil poderá suprir a demanda nacional de FIX, para ambos os tipos de terapia.

Pelo fato de haverem muitas patentes internacionais protegendo o desenvolvimento de medicamentos recombinantes, o que onera significativamente a produção nacional de biofármacos, a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) vem financiando projetos que visam o desenvolvimento da tecnologia brasileira de produção do rFIX, entre outros fatores da coagulação sanguínea⁵⁷.

Em 2011, pesquisadores do INCTC/FMRP-USP relataram pela primeira vez o desenvolvimento de uma plataforma biotecnológica brasileira para a produção da proteína rFIX utilizando linhagens de células humanas. O grupo relatou ainda que a proteína produzida apresenta um efeito coagulante e um perfil cinético similar ao

pdFIX (Octanine®) quando infundido intravenosamente em camundongos hemofílicos B. O desafio seguinte será a produção em larga escala dessa proteína rFIX utilizando células humanas, o que poderá viabilizar a redução significativa dos custos relacionados a produção do rFIX⁵⁹.

CONCLUSÃO

O advento da tecnologia do DNA recombinante viabilizou a clonagem do gene do fator IX, o que tornou possível a caracterização molecular do mesmo e o desenvolvimento da proteína rFIX como uma alternativa terapêutica. Pesquisas e esforços que estão sendo realizados neste momento evidenciam o comprometimento mundial na busca do aperfeiçoamento profissional relativo aos cuidados terapêuticos de pacientes hemofílicos B em busca de novas alternativas que visem à melhoria na qualidade de vida dos mesmos. Este panorama sugere que novos produtos terapêuticos chegarão à clínica em um futuro próximo e tornarão a terapia profilática para hemofilia B acessível a todos.

FINANCIAMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 1998/14247-6), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP - processo nº 01.07.0652.00) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo nº 314458/2009-3 e 2008/57877-3).

REFERÊNCIAS

1. Bithell TC. Coagulação Sanguínea. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Hematologia Clínica Wintrobe's Volume II. 1º ed. brasileira. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1998. p. 615-68.
2. Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature* 1982; 299(5879):178-80.
3. Peyvandi F, Asselta R, Mannucci PM. Autosomal recessive deficiencies of coagulation factors. *Rev Clin Exp Hematol.* 2001; 5(4):369-88.
4. Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey C, et al. Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J* 1952; 2(4799):1378-82.
5. Roberts HR, Liles DK. The molecular biology of hemophilia B. In: Forbes CD, Aledort LM, Madhok R. Hemophilia. 1 Edition. Chapman: Hall Medical; 1997. p. 35-50.
6. Franco RF. Defeitos Moleculares das Hemofilias A e B. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p. 798-802.
7. High KA. Gene transfer as an approach to treating hemophilia. *Circ Res.* 2001; 88(2):137-44.
8. Lillicrap D. The molecular basis of haemophilia B. *Haemophilia* 1998; 4(4):350-7.
9. Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados (CPNSH) do Ministério da Saúde. Apresenta o registro das coagulopatias hereditárias do Brasil em 2006. [Citado 2006] Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude>.
10. Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79(21):6461-4.
11. Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *EMBO J* 1984; 3(5):1053-60.
12. Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 1985; 24(14):3736-50.
13. Camerino G, Grzeschik KH, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocq JP, Heilig R, Mandel JL. 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* 1984; 81(2):498-502.
14. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002; 55(1):1-18.
15. Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest* 1978; 61(6):1528-38.
16. Taran LD. Factor IX of the blood coagulation system: a review. *Biochemistry (Mosc).* 1997; 62(7):685-93.
17. Schmidt AE, Bajaj SP. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13(1):39-45.
18. Furie BC, Furie B., Biosynthesis of factor IX: implications for gene therapy. *Thromb Haemost* 1995; 74(1):274-7.

19. Kaufman RJ. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function. *Thromb Haemost* 1998; 79(6):1068-79. <http://www.fda.gov/cber/efoi/approve.htm>.
20. White GC 2nd, Beebe A, Nielsen B. Recombinant factor IX. *Thromb Haemost* 1997; 78(1):261-5.
21. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67(1):3-12.
22. Burnier JP, Borowski M, Furie BC, Furie B. Gamma-carboxyglutamic acid. *Mol Cell Biochem.* 1981; 39:191-207.
23. Wolberg AS, Morris DP, Stafford DW. Factor IX activation by factor XIa proceeds without release of a free intermediate. *Biochemistry* 1997; 36(14):4074-9.
24. Gailani D. Activation of factor IX by factor XIa. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10(5):198-204.
25. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* 1964; 145:1310-2.
26. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 1964; 202:498-9.
27. Hoffman, M., Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 2003. 16(1-2):17-20.
28. Roberts HR, Escobar M, Monroe DM. More information on patients with factor XI deficiency. *Anesthesiology.* 2004; 101(5):1253-4.
29. Food and Drug Administration (FDA). Apresenta a empresa licenciada para a produção do Fator IX da coagulação sanguínea humana recombinante. [Citado 1997 Fev 11]. Disponível em:
30. Thompson A. Recombinant factor IX for the treatment of hemophilia B. Introduction. *Semin Hematol* 1998; 35 2 Suppl 2: 1-3.
31. Kaufman RJ, Wasley LC, Furie BC, Furie B, Shoemaker CB. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1986; 261(21):9622-8.
32. Brennan SO, Peach RJ. The processing of human proinsulin and chicken proalbumin by rat hepatic vesicles suggests a convertase specific for X-Y-Arg-Arg or Arg-X-Y-Arg sequences. *J Biol Chem.* 1991; 266(32):21504-8.
33. Wise RJ, Barr PJ, Wong PA, Kiefer MC, Brake AJ, Kaufman RJ. Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(23):9378-82.
34. Wasley LC, Rehemtulla A, Bristol JA, Kaufman RJ. PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J Biol Chem* 1993; 268(12):8458-65.
35. Harrison, S., et al., The manufacturing process for recombinant factor IX. *Semin Hematol* 1998; 35 2 Suppl 2: 4-10.
36. Anson DS, Brownlee GG, Jones IM. Factor IX preparations uncontaminated by plasma components or pox virus. United States Patent 5171569. [Citado 1992 Dez 12]. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com>.

37. United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO). Guidelines on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. *Haemophilia* Jan 2003; 9(1):1-23.
38. Bergman GE. Progress in the treatment of bleeding disorders. *Thromb Res* 2010; doi:10.1016/j.thromres.2010.10.007
39. Bolton-Maggs PH. Optimal haemophilia care versus the reality. *Br J Haematol* 2006; 132(6):671-82.
40. Giangrande P. Haemophilia B: Christmas disease. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6(9):1517-24.
41. Teitel JM, Barnard D, Israels S, Lillicrap D, Poon MC, Sek J. Home management of haemophilia. *Haemophilia* 2004; 10(2):118-33.
42. Zdziarska J, Chojnowski K, Klukowska A, Łetowska M, Mital A, Podolak-Dawidziak M, Windyga J, Zawilska K. Therapeutic properties and safety of recombinant factor VIII and factor IX. *Pol Arch Med Wewn* 2009; 119(6):403-9.
43. Rezende SM, Pimentel BD, Araujo JP. Knocking down the price of factor concentrates in Brazil. *Haemophilia* 2005; 11(3):290-1.
44. Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde: Clipping. Apresenta dados atuais sobre hemofilia no Brasil. [Citado 2010 Mai 17]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_17_05_2010.pdf.
45. Burnouf T. Modern plasma fractionation. *Transfus Med Rev* 2007; 21(2):101-17.
46. Roth DA, Kessler CM, Pasi KJ, Rup B, Courter SG, Tubridy KL. Human recombinant factor IX: safety and efficacy studies in hemophilia B patients previously treated with plasma-derived factor IX concentrates. *Blood* 2001; 98(13):3600-6.
47. Lambert T, Recht M, Valentino LA, Powell JS, Udata C, Sullivan ST, Roth DA. Reformulated BeneFix: efficacy and safety in previously treated patients with moderately severe to severe haemophilia B. *Haemophilia* 2007; 13(3):233-43.
48. Dipaola J, Lillicrap D. Challenges and innovations in the treatment of bleeding disorders. *Thromb Res* 2010; doi:10.1016/j.thromres.2010.10.007
49. Konkle BA, Kessler C, Aledort L, Andersen J, Fogarty P, Kouides P, Quon D, Ragni M, Zakarija A, Ewenstein B. Emerging clinical concerns in the ageing haemophilia patient. *Haemophilia* 2009; 15(6):1197-209.
50. Hay CR. Prophylaxis in adults with haemophilia. *Haemophilia* 2007; 13 Suppl 2:10-5.
51. Bjorkman S, Shapiro AD, Berntorp E. Pharmacokinetics of recombinant factor IX in relation to age of the patient: implications for dosing in prophylaxis. *Haemophilia* 2001; 7(2):133-9.
52. Ewenstein BM, Joist JH, Shapiro AD, Hofstra TC, Leissinger CA, Seremetis SV, Broder M, Mueller-Velten G, Schwartz BA. Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant F IX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B. *Transfusion* 2002; 42(2):190-7.
53. Metzner HJ, Weimer T, Kronthaler U, Lang W, Schulte S. Genetic fusion to

- albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX. *Thromb Haemost* 2009; 102(4):634-44.
54. Schulte S. Half-life extension through albumin fusion technologies. *Thromb Res* 2009; 124 Suppl 2: S6-8.
55. Assessoria de Imprensa da Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ABHH) – RS Press. Em fórum inédito, especialistas traçam propostas pela melhoria da Hemoterapia do País. [Citado 2010 Ago 27]. Disponível em: <http://www.hemofiliabrasil.org.br>.
56. Ministério da Saúde. Lei nº 10.205. Regulamenta o 4º parágrafo do artigo 199 da Constituição da República Federativa do Brasil de 1988; 2001.
57. Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás). Pesquisa e Desenvolvimento. [Citado 2010 Dez 14]. Disponível em: <http://www.hemobras.gov.br/site/contudo/pesquisa.asp>.
58. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2010. Programação Científica. [Citado 2010 Nov 05]. Disponível em: <http://www.hemo2010.org.br/programacao.html>.
59. de Castilho Fernandes A, Fontes A, Gonsales N, Swiech K, Picanco-Castro V, Faca S, Covas D. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. *Biotechnol Appl Biochem*. 2011; 58(4):243-9. doi: 10.1002/bab.32.