Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

Pedro Miguel Rocha Cardoso Nunes da Costa

Análise do perfil proteico de biofluidos em pacientes com hemofilia A

Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

Pedro Miguel Rocha Cardoso Nunes da Costa

Análise do perfil proteico de biofluidos em pacientes com hemofilia A

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Drª Lúcia Maria Ribeiro Borges, Assistente Hospitalar Graduada de Imuno-Hemoterapia e Diretora do Serviço de Imuno-Hemoterapia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro, e da Doutora Maria do Rosario Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi financiado pela FCT, União Europeia, QREN, FEDER e COMPETE (PEst-C/QUI/UI0062/2013)

agradecimentos

Á Drª Lúcia Maria Ribeiro Borges, Diretora do Serviço de Imuno-Hemoterapia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro, pela oportunidade única para realizar o meu trabalho em colaboração com esta instituição, assim como todo o incentivo, disponibilidade, carinho e interesse que revelou por mim e pelo meu trabalho.

Aos restantes profissionais que trabalham no Serviço de Imuno-Hemoterapia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga por toda a disponibilidade que manifestaram, destacando a Drª Elisabeth, a Cristina, o Rui e o Filipe que sempre me acolheram como sendo um deles e nunca hesitaram em me ajudar de forma a tornar o meu trabalho melhor.

À Doutora Maria do Rosário Domingues, agradeço a orientação científica que me proporcionou e principalmente o incentivo, disponibilidade e sorriso sempre presente a cada encontro e que foi uma fonte de motivação para fazer melhor.

À Doutora Rita Ferreira pelo incentivo, disponibilidade e acompanhamento incansáveis e quase sobre-humanos ao longo deste percurso. Agradeço também o exemplo de dedicação e trabalho que me fizeram crescer e evoluir como profissional e sobretudo como pessoa.

Ao Doutor Rui Vitorino, agradeço a orientação científica que me proporcionou e principalmente o incentivo e a insistência em tornar-me um profissional melhor ao longo deste projeto.

Á Rita que foi um apoio incansável e uma amiga espetacular para mim, à qual agradeço toda a disponibilidade que ofereceu por muito ocupada que estivesse e sobretudo o incentivo para me fazer acreditar em mim. À Virgínia, que foi quase uma mãe para mim e nunca me deixou ir abaixo e me ajudou a ultrapassar muitas fases difíceis, quer no laboratório quer fora dele. À Ana Isabel por todo o conhecimento e sabedoria que me transmitiu, quer cientifica quer do quotidiano.

À Telma, minha cara colega de Mestrado e acima de tudo amiga, que tendo o trabalho dela sempre se preocupou comigo e se mostrou sempre disponível para ajudar no possível. Ainda ao Gonçalo e ao Hugo por terem sangrado por este trabalho.

Aos meus amigos pela paciência, incentivo e apoio e por me fazerem acreditar em mim quando nem eu mesmo conseguia.

Aos meus pais e avós por terem sido o meu apoio ao longo de todo este percurso. Sem vocês nunca teria conseguido. E em especial à minha irmã que foi mais que uma mentora para mim, a qual sempre olhei como modelo a seguir e me apoiou do início ao fim. E também ao Charles, que esteve sempre presente.

o júri

presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dr. Mário João da Costa Pires
interno de Medicina Interna do Serviço de Medicina Interna do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro

Drª Lúcia Maria Ribeiro Borges
assistente Hospitalar Graduada de Imuno-Hemoterapia, Diretora do Serviço de Imuno-Hemoterapia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro (orientadora)

Doutora Maria do Rosario Gonçalves dos Reis Marques Domingues
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (coorientadora)

palavras-chave

hemofilia A, fator VIII, fenótipo, soro, plasma, perfil proteico, metaloproteínases de matriz

resumo

A hemofilia A é um distúrbio hemorrágico congénito caracterizado pelo comprometimento da cascata de coagulação devido à ausência ou deficiência da atividade do fator VIII que é provocada por uma mutação presente no respetivo gene. As características clínicas e as complicações que acompanham os pacientes hemofílicos ao longo da sua vida, como hemorragias espontâneas ou artropatia resultante de hemartroses recorrentes, exigem o recurso frequente a serviços de saúde. Contudo, nem sempre se verifica uma correlação entre a severidade da doença, que é inferida a partir do genótipo, e o fenótipo apresentado clinicamente. Considerando que a distinção entre fenótipos tem implicações para a prática clínica, torna-se fundamental o seu estudo do ponto de vista bioquímico.

O presente trabalho teve como objetivo a análise do perfil proteico de soro e plasma de pacientes com hemofilia A severa, acompanhados no Serviço de Imunohemoterapia do Hospital Infante D. Pedro, em Aveiro, para melhor compreender as alterações proteicas no soro/plasma induzidas pela mutação que provoca esta doença. Neste sentido, procedeu-se à análise do perfil de proteínas do soro/plasma por SDS-PAGE e da atividade de proteases, presentes nestes biofluidos, por zimografia em gel. Complementarmente, realizou-se uma análise por imunoblotting de forma a verificar se as alterações na atividade da MMP-9, detetada na análise por zimografia, se deviam a diferenças no teor desta protease. Por último, com vista a integrar a MMP-9 nos processos celulares, recorreu-se à ferramenta bioinformática String para analisar as interações proteína-proteína com a MMP-9.

Os resultados obtidos mostraram que a hemofilia A promove alterações da atividade proteolítica do soro e do plasma, caracterizadas pela diminuição significativa da atividade de MMP-9, apesar de presente em maior quantidade, o que sugere o envolvimento do inibidor TIMP-1 na regulação da sua atividade. Por sua vez, a análise efetuada por String evidenciou a interação desta metaloproteinase com vários fatores da via intrínseca da cascata de coagulação, confirmando, desta forma, o potencial envolvimento da MMP-9 na hemofilia A.

keywords

hemophilia A, factor VIII, phenotype, serum, plasma, protein profile, matrix metalloprotease

abstract

Hemophilia A is a congenital blood disorder, characterised by the impairment of the coagulation cascade due to the absence or deficiency of factor VIII activity, which is caused by a mutation in the factor's gene. The clinical features and the complications that accompany hemophiliacs throughout their lives, such as spontaneous bleeds and arthropathy that results from recurrent hemarthrosis, require the frequent use of health services. However, the correlation between the disease's severity, which is inferred from the genotype, and the phenotype presented clinically is not always found. Considering that the distinction between phenotypes has implications to clinical practice, its study becomes essential from the biochemical point of view.

The present study aimed to analyse the protein profile of serum and plasma from severe hemophilia A patients, who have been accompanied at the Imunohemotherapy Service of Infante D. Pedro Hospital, in Aveiro. This analysis was designed to better understand the protein alterations in serum/plasma induced by the mutation that causes this disease. In this sense, we determined protein profile of serum/plasma by SDS-PAGE and protease activity by in gel zymography. Then, an immunoblotting analysis was performed in order to verify if the alterations in MMP-9 activity, which had been detected by in gel zymography, were due to differences in the quantity of this protease. Finally, we used the bioinformatical tool String to study the protein-protein interactions with MMP-9 with the purpose of integrating this protease in cellular activities.

The results showed that hemophilia A promotes alterations of serum and plasma proteolytic activity, characterised by the significant decreased activity of MMP-9, despite being present in higher levels, which suggests the influence of inhibitor TIMP-1 in the regulation of its activity. Furthermore, the analysis carried with String highlighted the interaction of MMP-9 with several factors of the intrinsic pathway of the coagulation cascade, confirming the potential involvement of this protease in hemophilia A.

Índice

I. INTRODUÇÃO 1

1. Regulação da hemóstase 3

2. Hemofilia: Características Clínicas e Complicações Associadas 11

2.1. Patogénese da Hemofilia A 15

2.1.1. Alterações genéticas descritas para o F8 17

2.2. Diagnóstico da Hemofilia 18

2.2.1. Testes de screening da cascata de coagulação 20

2.2.2. Avaliação do fator de coagulação 20

2.2.3. Testes genéticos 22

3. Abordagens terapêuticas utilizadas na hemofilia: Tratamento profilático 23

4. Relação entre o genótipo e o fenótipo na hemofilia A 24

4.1. Abordagens experimentais para a caracterização do fenótipo em doentes hemofílicos 25

II. OBJETIVOS 27

III. MATERIAL E MÉTODOS 31

1. Caracterização da amostra 33

2. Amostras analisadas 34

2.1. Depleção de Albumina do Soro e do Plasma 34

3. Determinação da concentração de proteína total nas amostras de soro e plasma 35

4. Análise do perfil de proteínas do soro/plasma por SDS-PAGE 35

5. Análise de proteases no soro/plasma por Zimografia em gel 36

6. Análise por imunoblotting de MMP-9 36

7. Análise estatística 37

IV. RESULTADOS 39

1. Caracterização clínica dos doentes em estudo 41

2. Análise do perfil de proteínas do soro/plasma por SDS-PAGE 42

3. Análise da atividade proteolítica do soro/plasma por zimografia 43

V. DISCUSSÃO 51

VI. CONCLUSÕES 57

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

Índice de Figuras

Figura 1 – O modelo clássico da cascata de coagulação.. 4
Figura 2 - Visão geral da cascata de coagulação (modelo atual). Sequência de processos que levam à formação do coágulo de fibrina 7
Figura 3 - Herança recessiva da hemofilia associada ao cromossoma X. 12
Figura 4 - Esquema do cromossoma X evidenciando o gene do fator VIII 16
Figura 5 - Algoritmos para a abordagem do teste genético de um caso index e de um portador de hemofilia A 22
Figura 6 - Imagem representativa do gel obtido na separação de proteínas da amostra de soro depletado SA (A1) e 75 (A2) e de amostras de plasma depletado SA (B1) e o 75 (B2). 42
Figura 7 – Imagem representativa do gel de zimografia obtido na análise de soro (A1) e do plasma (B1), de indivíduos controlo (CONT) e pacientes hemofílicos (HemA). Avaliação do efeito do EDTA 10 mM na atividade proteolítica do soro (A2) e do plasma (B2)..... 44
Figura 8 - Variação da densidade ótica (DO) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 assinaladas na figura 7 para amostras de soro e plasma. 45
Figura 9 – Imagem representativa do gel de zimografia obtido na análise de soro (A) e do plasma (B), de indivíduos controlo (CONT) e pacientes hemofílicos (P1, P2, P3, P4 e P5); (C) Comparação de valores de DO de cada banda com atividade (com correspondência na figura 7) obtido na análise de soro e plasma de cada indivíduo. 46
Figura 10 - Análise dos níveis de MMP-9 por imunoblotting em amostras de soro (A) e de plasma (B) em indivíduos controlo (CONT) e pacientes hemofílicos (HemA). (C) Comparação dos níveis de MMP-9, analisados por imunoblotting (correspondência com A e B) em amostras de soro e de plasma de cada indivíduo 47
Figura 11 – Interação proteína-proteína com a MMP-9 48

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de MMPs conhecidas separadas pelos respetivos grupos e indicação das principais funções. 9
Tabela 2 - Condições clínicas sugestivas de um distúrbio coagulante. 19
Tabela 3 - Classificação da severidade da hemofilia A e sintomas relacionados. 21
Tabela 4 - Aplicações clinicas dos testes de genética molecular da hemofilia A 23
Tabela 5 - Informações gerais dos pacientes hemofílicos incluídos no estudo. 33
Tabela 6 - Dados clínicos e parâmetros de coagulação dos pacientes hemofílicos incluídos no estudo 41

Lista de Abreviaturas:

2-DE – Eletroforese Bidimensional
2-DIGE – Difference Gel Electrophoresis Bidimensional
AHA – Hemofilia A Adquirida
BSA – Albumina de soro bovino
DO – Densidade ótica
ECM – Matrix extracelular
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
F8 – Gene que codifica o fator VIII
F8A - gene associado ao fator VIII A
F8B - gene associado ao fator VIII B
FEIBA - *Factor Eight Inhibitor Bypass Activity*
FIX – Fator IX
FIXa – Fator IX ativo
FVa – Fator V ativo
FVIIa – Fator VII ativo
FVIII – Fator VIII
FVIIIa – Fator VIII ativo
FX – Fator X
FXa – Fator X ativo
HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*
HAMSTeRS - *The Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site*
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta-Performance
Kb – kilobase
kDa – kilodalton
LC – Cromatografia Líquida
MDLC – Cromatografia Líquida Multidimensional
MMP – Metaloprotease da matrix
mRNA – RNA mensageiro
MS – Espectrometria de massa
MTHFR - Metilenotetrahidrofolato Redutase
NGAL - Lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos
PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
Pb – pares de bases
PCR- Polymerase Chain Reaction
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNP – Single-Nucleotide Polymorphism
TF – Fator Tecidual
TP – Tempo de Protrombina
TT – Tempo de Trombina
TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
VHC – Vírus da Hepatite C
VNTR – Variable Number Tandem Repeat
vWD – Doença de von Willebrand
vWF – Fator de von Willebrand

I. INTRODUÇÃO

A hemofilia é uma doença congénita que afeta entre 1 em 5000 e 1 em 10 000 indivíduos do sexo masculino, dependendo se é hemofilia do subtipo A ou B, respetivamente (1-3). As características clínicas e complicações que acompanham os pacientes hemofílicos ao longo da sua vida exigem o frequente recurso a serviços de saúde (4). Contudo nem sempre se verifica uma correlação entre a severidade da doença, que é inferida a partir do genótipo, e o fenótipo apresentado clinicamente (5, 6) e mesmo em doentes com severidade da doença semelhante, a frequência e gravidade dos episódios hemorrágicos varia (6, 7) o que dificulta a assistência médica que é dada aos pacientes hemofílicos. A presença de outras alterações genéticas, não diretamente associadas à hemofilia, pode modificar a sua severidade clínica (6, 7). Por outro lado, o fenótipo clinico tem implicações para a prática clinica, nomeadamente na definição de estratégias profiláticas adequadas ao doente hemofílico pelo que, o seu estudo do ponto de vista bioquímico é fundamental (6).

1. Regulação da hemóstase

A hemóstase é tradicionalmente definida como a resposta fisiológica do organismo a uma lesão de um vaso sanguíneo e consequente hemorragia, envolvendo um processo coordenado entre os vasos sanguíneos (nomeadamente as células endoteliais da parede dos vasos), plaquetas e proteínas procoagulantes (i.e. fatores de coagulação) (8). A hemóstase pode ser dividida em primária e secundária (8). A hemóstase primária tem como objetivo a resposta imediata após a ocorrência de dano endotelial e é caracterizada por vasoconstrição, adesão plaquetária e a formação de um agregado hemostático friável, de modo a conter, inicialmente, a hemorragia (8). Na hemóstase primária as plaquetas desempenham um papel crucial. A adesão das plaquetas ao colagénio subendotelial exposto é mediada pelo vWF (fator de *von Willebrand*) (3). Esta adesão desencadeia três eventos-chave: ativação adicional de plaquetas; agregação de plaquetas mediada pelo vWF ou pelo fibrinogénio; e exposição de plaquetas com fosfolípidos da membrana carregados negativamente, fornecendo então uma superfície para a ligação de fatores procoagulantes (3). A hemóstase primária tem curta duração e a vasoconstrição inicial diminui

rapidamente, permitindo o aumento do fluxo sanguíneo que pode comprometer o agregado hemostático inicial formado. É, então, o principal objetivo da hemóstase secundária, a estabilização deste agregado de modo a facilitar a interrupção da hemorragia (8). A hemóstase secundária atinge este objetivo através da formação do coágulo de fibrina (9) a qual, é levada a cabo pela cascata de coagulação (**Figura 1**), um processo que consiste numa série de reações nas quais precursores enzimáticos inativos (i.e. fatores de coagulação) (10, 11), nomeadamente proteases serínicas (trombina (fator IIa), fator VII, fator IX, fator X (11)) e respetivos co-fatores (as glicoproteínas fator V e fator VIII), que uma vez no estado ativo catalisam a reação seguinte na cascata, culminando na formação de fibrina (12).

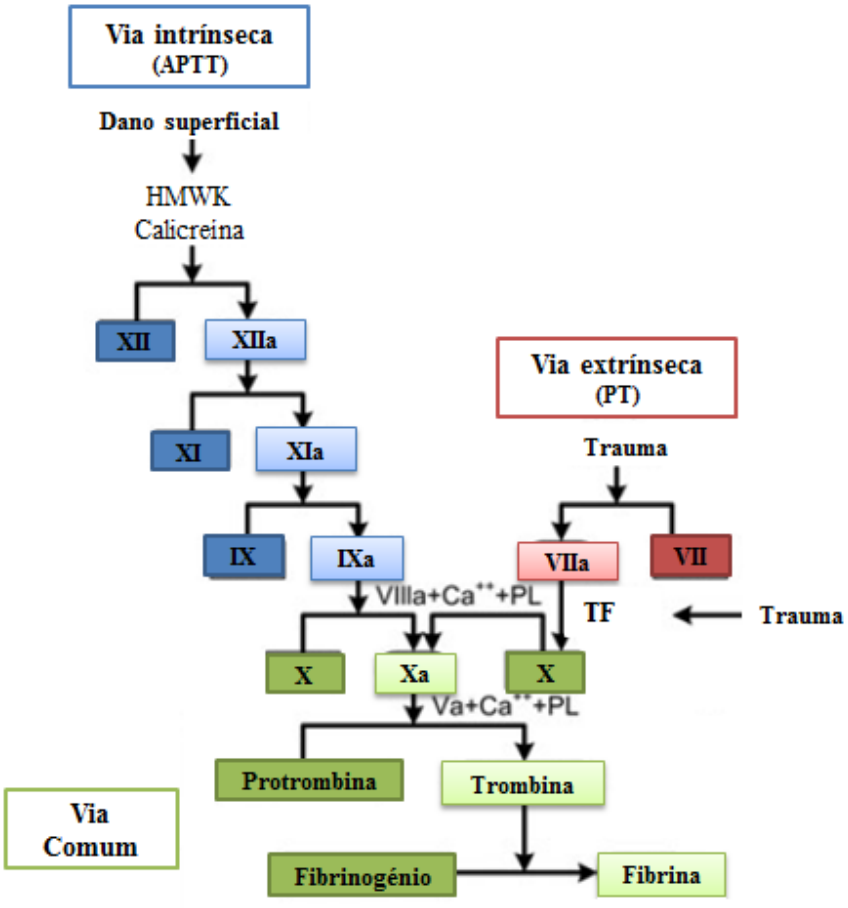

Figura 1 – O modelo clássico da cascata de coagulação. Os fatores que participam na cascata estão representados pela numeração romana que os identifica. O Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) e o tempo de protrombina (PT) são dois parâmetros medidos em laboratório e aqui estão colocados na via na qual se refletem. TF= Fator Tecidual; HMWK = Cininogénio de elevado peso molecular; PL=Fosfolípidos. Adaptada de Adams et. al (11).

Esta organização da cascata de coagulação (**Figura 1)** foi originalmente proposta em 1964 (13). Este modelo era descrito como consistindo numa via intrínseca (dependente da ativação por uma superfície carregada negativamente e envolvendo os fatores de coagulação XII,XI,IX,VIII e V) e numa via extrínseca (dependente da exposição do fator tecidual (TF) à circulação e envolvendo o TF como fator VII) que convergiam numa via comum para ativar o fator X, levando a conversão da protrombina a trombina e culminando na conversão de fibrinogénio em fibrina (11, 14). Dentro deste modelo da cascata de coagulação, a contribuição da hemóstase primária era considerada um mecanismo independente, assim como a forma como as vias extrínseca e intrínseca. Apesar de nunca ter sido concebido como um modelo fisiológico, esta abordagem da hemóstase foi adotada por muitos clínicos (11).

O modelo *in vivo* atualmente aceite, sublinha a importância fulcral do TF como o principal impulsionador da coagulação (11, 15), enquanto destaca ao mesmo tempo, a eficaz amplificação da trombina como um passo essencial no desenvolvimento de um coágulo estável (16), bem como da interdependência dos fatores de coagulação e os elementos celulares (17). Este modelo suplanta o modelo clássico nos seguintes pontos: (i) existe a ativação do fator X e fator IX pelo complexo TF:FVIIa (18, 19), o que permite a ligação entre as vias intrínseca e extrínseca, algo que não estava implícito no modelo anterior onde as vias eram vistas como independentes e redundantes (15); (ii) a ocorrência de um padrão de ativação passo a passo e sobreposto constituído por uma fase inicial, uma fase de amplificação e uma fase de propagação (15, 20, 21); (iii) o envolvimento ativo e necessário de elementos celulares, nomeadamente, plaquetas ativadas, sobretudo nas últimas duas fases referidas (22, 23).

A fase inicial começa com a exposição do TF (11, 24) ao sangue, seja por área lesada ou ativação do endotélio (25). O TF forma um complexo catalítico com o fator VIIa (TF:FVIIa), denominado de tenase do fator extrínseco (o termo "tenase" quer dizer que a ativação do substrato ocorre por clivagem, nomeadamente, proteolítica), na superfície fosfolipídica da membrana celular, e ativa os zimogénios, FIX e FX (26, 27). O FX ativo (FXa) vai então gerar pequenas quantidades de trombina (fator II) (23).

A fase de amplificação consiste no aumento da formação de trombina devido à ativação da via intrínseca. Isto faz com que a produção de trombina derive de ambas as

vias e não apenas da extrínseca (11). Nesta fase, há também a formação de um complexo entre o fator intrínseco fator IXa e o seu cofator ativado, o fator VIIIa (FIXa:FVIIIa) (21). Este complexo é gerado numa superfície membranar, particularmente em plaquetas, na presença de cálcio (11). A criação deste complexo intrínseco é crucial para a amplificação da coagulação, de forma a promover uma hemóstase sustentada. Efetivamente, este complexo induz um aumento da produção de FXa na ordem de 50 a 100 vezes comparativamente à obtida pelo complexo extrínseco (21, 23, 24), aumentando assim a produção de trombina (11). O FIXa:FVIIIa resulta da associação do fator IXa e do fator VIIIa que são ativados por ação da trombina gerada pelo complexo extrínseco por clivagem proteólita, sendo que no caso do FVIII essa clivagem promove a ativação do fator por libertação do mesmo do complexo que forma com o fator de von Willebrand (FVIII:vWF) (11, 15, 21). O fator Xa formado por acção do complexo intrínseco vai por sua vez clivar o fator V, passando este ao estado de co-fator ativo (FVa), formando então o complexo FXa:FVa, também denominado de complexo protrombinase e que vai promover a formação de trombina por clivagem da protrombina (Fator II) (15). Devido à proximidade a que se encontram o complexo intrínseco e o complexo protombinase na membrana fosfolipídica, a eficiência das reações por eles catalisadas, é exacerbada (24, 28). A ativação destes fatores cria um *feedback* positivo cujo resultado final é a formação de trombina, protease central na resposta hemostática, em quantidade suficiente para induzir a formação de um coágulo estável (11, 24). A trombina gerada interage com o recetor plaquetário GPIb, promovendo a agregação plaquetária (29, 30).

As plaquetas envolvidas nestes processos advêm do agregado hemostático inicial e portanto também foram ativadas pelo colagénio presente no local da lesão vascular. Pensa-se, que estas plaquetas (estimuladas por colagénio e trombina), possuem potencial para elevar a formação de trombina, devido a sua capacidade para ligar tanto o complexo tenase intrínseco como o complexo protrombinase (31-33). Esta capacidade das plaquetas, é fundamental para a realização da fase propagação que se destina à contínua formação de trombina para a deposição de fibrina (11). Esta fase está dependente do recrutamento de plaquetas ativadas no local da lesão para fornecer um local apropriado para a ligação dos componentes necessários para a criação ótima de trombina, os quais incluem: o complexo tenase intrínseco, o complexo protrombinase, cálcio e uma camada fosfolipídica capaz de alocar eficazmente todos estes componentes (11, 24). Estas reações, já referidas, dependem

da existência de uma população de plaquetas em número suficiente e com o potencial para se submeter a ativação mediada por trombina. De todos estes processos resulta uma "explosão" na quantidade de trombina criada e que de seguida vai converter o fibrinogénio a fibrina, por clivagem do primeiro, levando a produção de um coágulo estável (11, 24). A trombina ativa ainda o fator XIII a fator XIIIa que vai ser responsável por promover o cross-linking das bandas de fibrina polimerizadas, de modo a formar uma rede estável de fibrina (24, 34) que envolve o local da lesão. Para terminar, a trombina ativa o "inibidor de fibrinólise ativável pela trombina" (TAFI), que vai ser responsável por proteger o coágulo da fibrinólise mediada pela plasmina (35). A **Figura 2** que se segue apresenta um modelo conciso e geral dos processos acima descritos e que culminam na formação do coágulo, sumarizando então a cascata de coagulação.

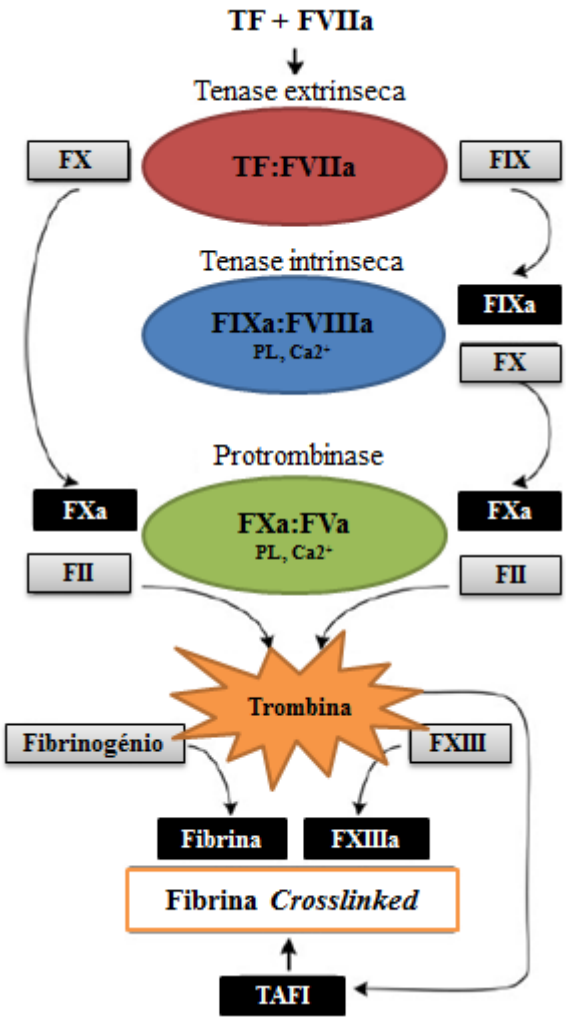

Figura 2 - Visão geral da cascata de coagulação (modelo atual). Sequência de processos que levam à formação do coágulo de fibrina. Adaptado de Adams et. al (11).

Como se constatou, a cascata de coagulação resulta de uma serie de reações passo a passo, nas quais, precursores enzimáticos de proteases serínicas (trombina (FIIa) FVII, FIX e FX) passam ao estado ativo e catalisam os passos seguintes da cascata. Contudo, estes fatores, não são as únicas proteases envolvidas na coagulação. Há exemplos de proteases extra-cascata de coagulação que são capazes de modular a atividade dos seus componentes: (i) a eslastase e a catepsina G são capazes de ativar o fator V (36); (ii) as metaloproteínases da matriz (MMPs) modulam a coagulação por ativação/inibição da agregação plaquetária (37, 38) promovem a clivagem do "inibidor da via do fator tecidual" (TFIP), inativando-o (39). É nesta última classe de proteases que se vai focar o nosso estudo.

De uma forma geral, as MMPs são um grupo de endopeptídases, com um centro catalítico dependente de zinco. Estas MMPs necessitam de cálcio para exercer a sua atividade e há semelhança do que ocorre com os fatores da cascata de coagulação, são bio-sintetizadas na forma de proenzima, requerendo um passo de ativação por clivagem proteolítica (37, 40). As MMPs participam na degradação das macromoléculas presentes na matriz extracelular (ECM – *Extracellular Matrix*) que são essenciais para a criação dos ambientes celulares necessários ao desenvolvimento do organismo e morfogénese (40-42). Em condições fisiológicas adequadas, a atividade das MMPs é rigorosamente regulada desde a transcrição, passando pela ativação dos precursores e interação com os componentes específicos da ECM até à inibição por inibidores endógenos (41, 42). Qualquer perda no controlo das MMPs pode resultar no aparecimento de doença como: artrite, cancro, aterosclerose, aneurismas, nefrites, úlceras teciduais e fibrose (43). No ser humano foram identificadas 23 formas diferentes de MMPs que se encontram divididas em 6 grupos tendo em conta as suas características principais (40, 44) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Tipos de MMPs conhecidas separadas pelos respetivos grupos e indicação das principais funções.

Grupo	Exemplares	Funções Principais	Referências
Colagenases	MMP-1; MMP-8; MMP-13 e MMP-18	Capacidade de clivar o colagénio intersticial (tipo I,II e III) bem como de outras moléculas (pertencentes à ECM e não pertencentes)	(40)
Gelatinases	MMP-2 (Gelatinase A) e MMP-9 (Gelatinase B)	Capacidade de digerir facilmente colagénios desnaturados, ou seja, gelatinas. A MMP-2 consegue ainda digerir colagénios do tipo I,II e III.	(40, 45, 46)
Estromelisinas	MMP-3 (Estromelisina 1); MMP-10 (Estromelisina 2) e MMP-11 (Estromelisina 3*)	Digestão de componentes de ECM; MMP-3 ativa algumas proMMPs e a sua atividade é determinante para a ativação da proMMP-1.	(40, 47)
Matrilisinas	MMP-7 (Matrilisina 1) e MMP-26 (Matrilisina 2)	Também denominadas endometases, são capazes de digerir uma série de componentes da ECM; A MMP-7 ainda processa moléculas da superfície celular como: pro-α-defensina, Fas-	(40, 48, 49)

		ligando, TNF-α e E-caderina.	
MMPs do tipo membranar	6 tipos de MT-MMPs: quatro proteínas transmembranares de tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24) e duas proteínas ancoradas ao GPI (MMP-17 e MMP-25).	Com exceção da MT4-MMP, as MT-MMPs são capazes de ativar a proMMP-2; Conseguem digerir algumas moléculas da ECM e a MT1-MMP tem capacidade de clivar colagénio (tipo I,II e III);	(40, 50)
Outras MMPs	MMP-12 (Metaloelastase), MMP-19, MMP-20 (Enamelisina), MMP-22, MMP-23 e MMP-28 (Epilisina)	Alguns exemplos de funções: - Digestão da elastina e outras proteínas assim como essencial para a migração de macrófagos (MMP-12); - Digestão da amelogenina (MMP-20), proteína relacionada com Amelogenina Imperfecta (distúrbio genético); - Função desconhecida (MMP-22); - Sugere-se que pode actuar na hemóstase e cicatrização de feridas.	(40, 51-58)

*Apesar de ser assim designada, a MMP-11 é normalmente agrupada com as "outras MMPs" pois a sua sequência e especificidade de substrato divergem dos da MMP-3.

Como é possível observar pela análise da **Tabela 1**, as MMPs possuem variadíssimas funções que podem afetar muitos processos biológicos. Sobretudo as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) têm sido extensivamente estudadas pelo seu envolvimento em vários processos fisiológicos, entre os quais se encontra a coagulação, e pela sua relação com certas doenças (59). Até à data o seu perfil já foi analisado para vários tipos de cancro (60-62), doenças cardiovasculares (63-65), inflamatórias (66, 67), neurológicas (68) e em Diabetes Mellitus Tipo 1 (69). Contudo, e apesar da sua influência na coagulação (37-39), ainda não foi analisado o perfil destas proteases em doenças que decorrem do comprometimento do processo de coagulação sanguíneo (geralmente designados de distúrbios hemorrágicos) pelo que seria relevante a realização desse estudo em biofluidos (soro/plasma) de pacientes que sofrem de distúrbios hemorrágicos. Estes distúbios podem ser amplamente classificados como defeitos hemostáticos primários e secundários (3). Os primários consistem em distúrbios plaquetários (congénitos ou adquiridos), tanto quantitativos como qualitativos. O mais comum é a vWD (Doença de *von Willebrand*). Défices de componentes da cascata de coagulação (fatores de coagulação) são considerados distúrbios hemostáticos secundários, dos quais a hemofilia A e a hemofilia B são as melhores caracterizadas (3).

2. Hemofilia: Características Clínicas e Complicações Associadas

A hemofilia compreende um grupo de doenças genéticas hereditárias recessivas que resultam de uma mutação num gene do cromossoma X, com consequente défice de um fator da cascata de coagulação. Dentro deste grupo de distúrbios hemorrágicos encontram-se a hemofilia A, hemofilia B (ou doença de Christmas) e, mais raramente mas também relevante, hemofilia A adquirida (3, 70). Neste grupo de doenças, a hemofilia A, que resulta da deficiência em FVIII da cascata de coagulação (1, 3), é a mais comum, afetando 1 em cada 5000 nados vivos do sexo masculino de todas as etnias, 30% dos quais são casos esporádicos. Os indivíduos do sexo feminino são, tipicamente, portadores assintomáticos (3, 70) embora possam manifestar sintomas quando ocorre diminuição da atividade do FVIII devido a uma inativação aleatória do cromossoma X denominada de Lionização (3, 70, 71). Nestes casos as pacientes podem apresentar uma forma muito leve de hemofilia (3, 71). As mulheres que sofrem de síndrome de Turner (X0), no qual o gene mutante F8 é responsável pela produção anormal de FVIII, apresentam esta doença. Como se pode

constatar da análise da Figura 3, uma mulher portadora de hemofilia terá 50% de hipóteses de ter um filho hemofílico ou uma filha portadora. Um indivíduo hemofílico do sexo masculino não transmite a doença aos filhos do sexo masculino mas as filhas serão portadoras (3).

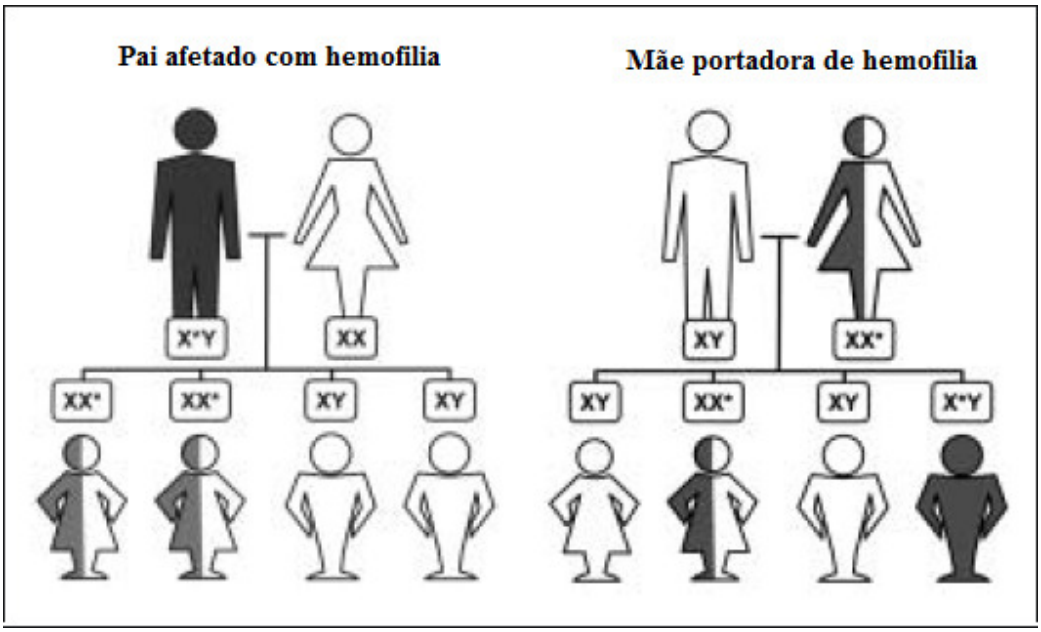

Figura 3 - Herança recessiva da hemofilia associada ao cromossoma X. (*) indica o cromossoma afetado (4).

A hemofilia A adquirida (AHA) caracteriza-se pela formação de anticorpos contra o FVIII e é relativamente rara, com uma incidência de 1-4 por milhão de indivíduos (72). Este tipo de hemofilia está associado a distúrbios inflamatórios crónicos, doenças autoimunes, gravidez, tumores malignos e fármacos (73). No entanto, em muitos casos a origem destes anticorpos que inibem o FVIII é idiopática. Contudo, relatórios clínicos isolados de pacientes com hemofilia adquirida indicam a cirurgia como um possível fator etiológico (74). A hemofilia B é a segunda doença mais comum deste grupo de distúrbios hemorrágicos, afetando 1 em 30,000 nados vivos do sexo masculino de todas as etnias e apresenta uma percentagem de casos esporádicos semelhante à da hemofilia A (3).Esta doença resulta da deficiência do FIX (fator IX) da cascata de coagulação (2).

Clinicamente, a hemofilia pode apresentar-se de diferentes formas e em distintas faixas etárias. Nos bebés, por exemplo, a doença pode ser detetada quando, após circuncisão, estes sofrem de sangramento excessivo (3, 70, 75). Mesmo em casos em que os bebés não passam por este procedimento cirúrgico, a hemofilia pode tornar-se aparente

assim que eles se tornam mais ativos, havendo maior probabilidade de aparecimento de hematomas e escoriações de forma traumática ou espontânea (3, 70). Em casos mais raros de hemofilia menos severa, a doença pode não ser diagnosticada até à idade adulta, altura em que, por exemplo, uma hemorragia pós-operatória poderá levar o médico a suspeitar desta doença e solicitar testes que confirmem a mesma (3).

A frequência e o tipo de sintomas hemorrágicos variam com a severidade da hemofilia (3). Os pacientes com hemofilia severa sofrem de sangramento espontâneo, hematomas musculares e hemartroses dolorosas recorrentes que, se não forem tratadas corretamente, resultam em artropatia destrutiva progressiva e, neste caso, a única abordagem terapêutica possível envolve a substituição da articulação (3, 70). Este problema começou a ser evitado com a introdução de métodos profiláticos, que serão referidos na secção 4.0 desta dissertação. Embora seja raro, podem ocorrer hemorragias intracranianas espontâneas, as quais são uma causa de morte nestes pacientes (70, 76). Os pacientes com hemofilia moderada apresentam episódios de hemorragias espontâneas, no entanto, o mais comum é o sangramento após traumas menores (3) ou hemorragias após traumas severos ou cirurgias (3, 70). Aliadas a estas manifestações, podem ainda ocorrer outras menos comuns, como por exemplo: (i) neuropatia por encarceramento ou necrose isquémica devido a pressão localizada; (ii) sangramentos prolongados após extrações dentárias; (iii) hematúria espontânea; (iv) hemorragia gastrointestinal muitas vezes aliada a obstrução que é causada por sangramento intramucoso. Estas características clinicas permitem traçar um perfil do paciente, levando a um diagnóstico mais preciso e à escolha do tratamento profilático mais adequado (70).

Os pacientes hemofílicos podem ainda sofrer complicações decorrentes do tratamento usado. Inicialmente, os concentrados de fatores derivados do plasma constituíam a abordagem mais utilizada mas que teve como consequência uma elevada incidência de transmissão de vírus, como o da hepatite (77, 78), sobretudo da hepatite C (70), e do HIV (vírus da imunodeficiência humana) (79). No caso da transmissão de hepatite C, muitos dos pacientes foram infetados antes da implementação de métodos de rastreio de VHC (vírus da Hepatite C) nos dadores de sangue e nos próprios produtos sanguíneos. Quanto à transmissão do HIV, nos anos 80 mais de 50% dos hemofílicos tratados nos EUA e na Europa Ocidental foram infetados pelas mesmas razões. A SIDA tornou-se, então, uma causa de morte mais comum dos pacientes com hemofilia severa.

Por outro lado, a infeção por HIV provoca trombocitopenia, uma condição que pode exacerbar os episódios hemorrágicos dos hemofílicos (70).

Devido aos avanços na identificação de agentes patogénicos, do melhoramento dos métodos de purificação e, ainda, do desenvolvimento de concentrados de fatores de coagulação recombinantes, estas complicações tornaram-se menos comuns (3). No entanto, os pacientes com idade igual ou superior a 65 anos e que receberam produtos substitutivos antes da implementação de técnicas de inativação viral, podem encontrar-se infetados por HIV (80). Atualmente tem-se observado em indivíduos com hemofilia A, em resposta à infusão de concentrados de FVIII, o desenvolvimento de anticorpos contra o FVIII (anticorpos inibitórios), uma das complicações mais prevalentes em pacientes com hemofilia severa, sobretudo em crianças. A presença de inibidores de FVIII é detetada em aproximadamente 6% dos hemofílicos, com uma incidência anual de 3.5 por cada 1000 pacientes com hemofilia A severa. Estudos efetuados com o intuito de prever o desenvolvimento de inibidores apontam para uma predisposição genética, associada a inversão no gene F8 ou a grandes deleções em cerca de 30% dos pacientes (3, 70). Apesar de ser uma complicação que ocorre raramente em casos de hemofilia leve (3), foi verificado que o risco destes e de pacientes com hemofilia moderada desenvolverem inibidores aumentava nos indivíduos que eram expostos a uma infusão contínua de concentrados de fator de coagulação (80) e em casos em que ocorriam certas mutações *missense*, como por exemplo Arg531Cys (81).

O desenvolvimento destes inibidores torna o paciente resistente à terapia de substituição de tal modo que é necessário aumentar bastante a dose de concentrados para que se verifique um incremento significativo da atividade do FVIII (70). Verificou-se, ainda, que o risco de os hemofílicos desenvolverem inibidores aumenta com a idade (82), o que dificulta o tratamento dos pacientes com idade avançada (> 50 anos), principalmente os casos de hemofilia severa (80).

A artropatia é uma das complicação mais prevalente nos pacientes com mais de 45 anos que não tiveram acesso regular a terapêutica de substituição, pelo que complicações articulares são uma causa significativa de morbidade em pacientes hemofílicos mais velhos (80). A maioria de indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos e com hemofilia severa tem artropatia em 4-6 das seis articulações mais comummente afetadas por hemorragias (i.e., joelhos, tornozelos e cotovelos) (83, 84). Os pacientes hemofílicos com

idades superiores a 65 anos podem ter ainda um risco acrescido de carcinoma hepatocelular associado ao vírus da Hepatite C e ainda Linfoma Não-Hogkin associado ao HIV, apesar da redução substancial de malignidade associada ao vírus da SIDA com o recurso à terapia antiretroviral HAART (*highly active antiretroviral therapy*) (85, 86). Estas doenças estão associadas à contaminação dos concentrados plasmáticos que eram usados como terapia nos anos 80, como referido anteriormente.

2.1. Patogénese da Hemofilia A

A hemofilia A, forma mais comum de distúrbios hemorrágicos, é causada pela ausência ou deficiência da atividade do FVIII. Níveis reduzidos de FVIII comprometem o funcionamento da cascata de coagulação (87). Como é possível observar na Figura 1, o FVIII atua em conjunto com o FIXa na ativação do FX (fator X) a FXa (3) que culminará na formação do coágulo de fibrina, o qual, é essencial para impedir a hemorragia adicional após uma lesão nos vasos sanguíneos (71). Na hemofilia A, devido à deficiência em FVIII, a formação do coágulo encontra-se comprometida e resulta na formação de um coágulo friável, que, em caso de feridas expostas, pode levar a hemorragia abundante (71). A principal causa molecular para a deficiência do FVIII são as mutações que afetam o gene que codifica para a sua síntese (87).

O gene que codifica o FVIII (F8) localiza-se perto da extremidade do braço maior do cromossoma X, no locus q28 (3, 70) (Figura 3), é composto por 186kb e tem 26 exões (1, 3), 24 dos quais são curtos, entre 69 e 262 pb e 2 longos, o exão 14 (3106 pb) e o exão 26 (958 pb) (3). Os intrões são de grandes dimensões, sendo o intrão 22 o maior com 32 kb e é onde se localiza a mutação mais comum, uma inversão (3).

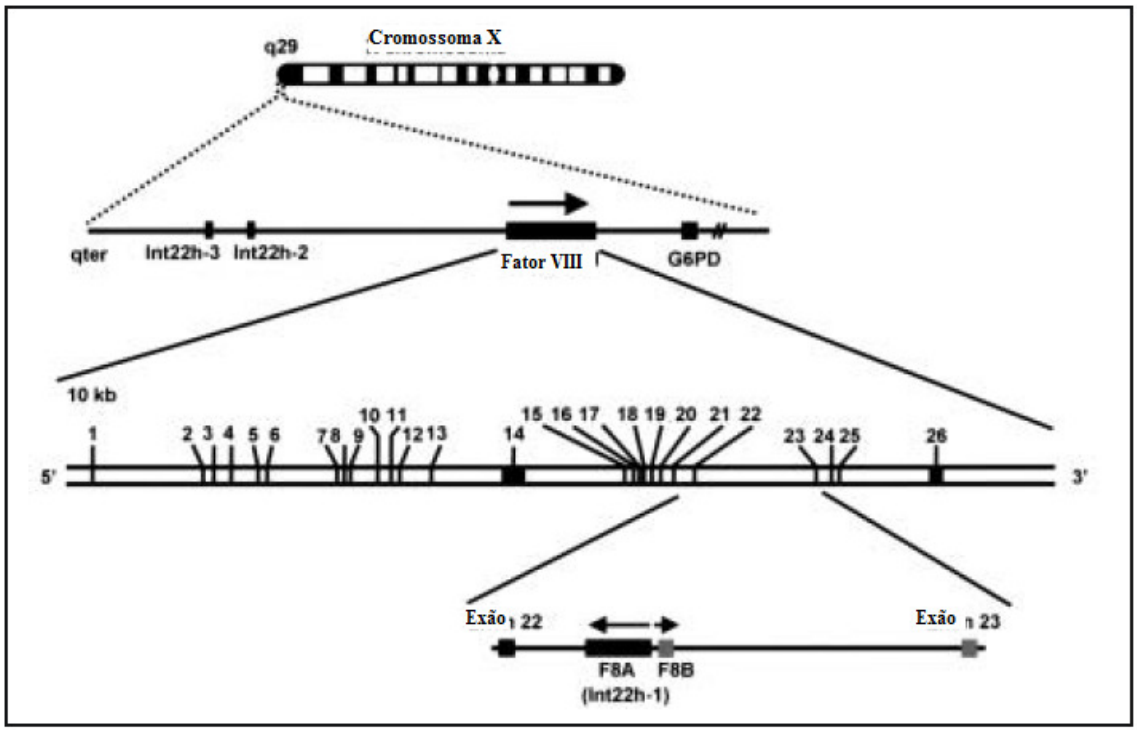

Figura 4 - Esquema do cromossoma X evidenciando o gene do fator VIII. G6PD = Glucose-6-fosfato desidrogenase; kb = kilobase; qter = terminal do braço maior (q) do cromossoma. Adaptada de (4)

No intrão 22 existe uma ilha CpG, que atua como um promotor bidirecional, separa dois genes adicionais: o gene associado ao fator VIII A (F8A ou Int22h-1), que é um gene de aproximadamente 2 kb e que é transcrito na direção oposta do gene F8 e o gene associado ao fator VIII B (F8B), que tem 2.5 kb e é transcrito na mesma direção do gene F8 e que partilha com este os últimos 4 exões (exões 23-26) (3, 87). O gene F8 é expresso sobretudo no fígado (70, 88) mas também no baço (70). A transcrição deste gene dá origem a um mRNA de 9 kb, cuja tradução resulta em uma proteína de 2332 resíduos de aminoácidos (1, 3). Esta proteína apresenta vários domínios, uma região triplicada $A_1A_2A_3$ (com 30% de homologia entre si), uma região homóloga duplicada C_1C_2 e ainda um domínio B glicosilado (3, 70). A ativação do FVIII a FVIIIa ocorre em superfícies fosfolipídicas por clivagem proteolítica do FVIII pela trombina (ou fator IIa) ou pelo fator Xa (3). Os diferentes domínios desempenham um papel crucial na função do FVIII, já que cada um deles contém locais de ligação específicos para diferentes componentes da cascata de coagulação (3, 89), com exceção do domínio B cuja função não é totalmente conhecida, uma vez que este é clivado aquando da ativação proteolítica do fator (3). Algumas mutações podem afetar os locais de interação nos domínios e causar hemofilia A (90). As

mutações patológicas no gene F8 traduzem-se na ausência ou em níveis reduzidos deste fator no plasma (3, 70).

2.1.1. Alterações genéticas descritas para o F8

A sequência do gene F8 foi publicada em 1984 e, desde então, foram identificadas várias mutações que originam a hemofilia A (7). O tipo de mutação que ocorre no gene F8 permite fazer uma previsão da severidade da doença (3). As mutações que promovem uma perturbação significativa na proteína do FVIII ou que alteram um importante domínio funcional dão origem a hemofilia severa, enquanto as mutações que causam alterações em zonas menos fundamentais para a função da proteína resultam em hemofilia leve ou moderada (3). De forma geral, as deleções e inserções que interferem com a estrutura da proteína e as mutações *nonsense* resultam na forma mais severa da doença, assim como algumas mutações *missense* que comprometem a função do FVIII (3).

A mutação mais comum é a inversão do intrão 22, que é encontrada em 20% dos pacientes e resulta em hemofilia severa (1). Esta mutação ocorre em 40 % dos casos de hemofilia severa (1, 7, 91) e caracteriza-se por recombinação homóloga entre o gene F8A (Int22h-1) no intrão 22 e uma das suas duas regiões homólogas, Int22h-2 ou Int22h-3, que se encontram fora do gene F8 perto do telómero do cromossoma X (Figura 3) (3). Pensa-se que a causa mais provável para esta recombinação é a ocorrência de *folding* do cromossoma X a partir da ponta (3), denominada de inversão *flip-tip* (70). Quando se processa o desdobramento do cromossoma após a recombinação, os exões 1-22 são invertidos e posicionados aproximadamente 500 kb acima dos exões 23-26 e orientados na direção oposta (92). Dependendo da repetição com que o F8A emparelha, a inversão pode ser denominada de tipo I (distal) ou tipo II (proximal) (3). Dado que nos indivíduos do sexo masculino a maioria das inversões ocorrem durante a meiose, quase todos os hemofílicos são portadores da mutação que herdaram dentro da linha germinativa do avô materno (3).

A segunda mutação mais comum associada à hemofilia severa é a inversão do intrão 1 (7, 93), que tem uma incidência de 1,8% (94). As hemofilias moderada e leve estão sobretudo associadas a mutações pontuais, pequenas inserções e deleções (as de maiores dimensões são mais raras) (1). O tamanho considerável do gene F8 predispõe a ocorrência de deleções, que correspondem a aproximadamente 5% das mutações

conhecidas (3). Normalmente, as deleções são sinónimas de ocorrência de hemofilia severa com menos de 1% de atividade do FVIII. Contudo, existem deleções específicas que se encontram associadas com a forma moderada da doença (3). Embora a ocorrência seja rara, os pacientes com grandes deleções têm maior suscetibilidade a formar inibidores do FVIII (até 40% dos pacientes com deleções desenvolvem inibidores) em resposta à terapia com concentrados deste fator. No caso de mutações *nonsense,* cerca de 60% podem desenvolver inibidores e naqueles em que a alteração resulta em mutação *missense*, a percentagem é de 15% (3).

O número de mutações diferentes associadas à hemofilia tem aumentado em diferentes grupos étnicos (7). Em setembro de 2009, mais de 1209 mutações na região codificante e mutações *nonsense* foram identificadas e registadas na base de dados internacional HAMSTeRS (*The Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site*) (http://hadb.org.uk/), que compila as mutações que resultam em hemofilia (7).

2.2. Diagnóstico da Hemofilia

O diagnóstico preciso e a determinação da severidade da hemofilia são essenciais para o planeamento de uma estratégia terapêutica adequada a cada paciente (95). Um diagnóstico específico da deficiência em FVIII, por exemplo, não deve ser feito apenas com base nas manifestações clínicas. Contudo, certos sinais clínicos podem dar indicação de um distúrbio da coagulação (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições clínicas sugestivas de um distúrbio da coagulação (5).

- Hemartroses, especialmente com trauma suave ou trauma sem qualquer antecedente
- Hematomas em músculos profundos
- Hemorragia intracraniana na ausência de um trauma severo
- Cefalematoma ou hemorragia intracraniana neonatal
- Sangramento prolongado ou reinício de hemorragia após resolução inicial nas extrações dentárias, lesões da boca ou circuncisão*
- Sangramento prolongado ou reinício de hemorragia após cirurgia ou trauma*
- Sangramento gastrointestinal sem explicação ou hematúria*
- Menorragia, especialmente quando ocorre a primeira menstruação (menarca) *
- Hemorragia nasal prolongada, especialmente recorrentes e bilaterais*
- Excesso de escoriações, especialmente com hematomas subcutâneos e firmes

*Qualquer severidade mas sobretudo em pacientes com doença severa

Para um diagnóstico específico da doença é essencial efetuar testes laboratoriais (96, 97), sendo o procedimento ideal composto por métodos de *screening* e ensaios específicos e sensíveis da atividade do FVIII (95). No entanto, é necessário ter em atenção que: (i) o FVIII é uma proteína lábil, pelo que os ensaios para determinação da sua atividade devem ser realizados em amostras de plasma fresco; se tal não for possível, é recomendado o congelamento a -20ºC das amostra, procedimento este que pode levar à perda de 10 a 20% da atividade; (ii) o vWF é uma proteína transportadora do FVIII, pelo que, aquando de uma redução da atividade do FVIII deve sempre ser solicitada a monitorização de vWF para excluir a possibilidade de vWD; (iii) certos casos de hemofilia A suave com herança autossómica podem refletir a presença de um subtipo específico de vWD, o tipo 2N (Normandy) (3), o qual pode estar associado a mutações no domínio de ligação ao vWF do FVIII (98, 99), comprometendo a ligação entre estes fatores; tipicamente, a atividade do FVIII encontra-se reduzida e os resultados dos ensaios antigénicos e de atividade do vWF apresentam-se normais; (iv) o volume do anticoagulante deve ser ajustado de forma a manter uma concentração de citrato no sangue ótima, de modo a obter uma estimativa precisa da atividade do FVIII, sobretudo em amostras com valores alterados de hematócrito (3).

Os métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico da hemofilia A, os testes de *screening* da cascata de coagulação e os ensaios do fator de coagulação bem como os testes genéticos serão descritos de seguida.

2.2.1. Testes de screening da cascata de coagulação

A avaliação de um indivíduo com suspeita de um distúrbio hemorrágico inclui: contagem de plaquetas e análise de função das mesmas ou tempo de sangramento, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de protrombina (TP) (7). O TTPA serve para avaliar a eficiência da via intrínseca da cascata de coagulação na formação do coágulo de fibrina e o TP serve para avaliar a eficiência da via extrínseca. O tempo de trombina (TT) e/ou concentração de fibrinogénio podem ser uteis para o diagnóstico de distúrbios mais raros (100). Em indivíduos com hemofilia A, os resultados dos testes referidos apresentam-se normais com exceção do TTPA, para os quais se verificam valores elevados (70, 71, 95). Um valor elevado de TTPA sugere comprometimento da via intrínseca da cascata de coagulação, da qual faz parte o fator VIII. Contudo, em casos de hemofilia A leve, o TTPA pode apresentar-se normal (101, 102). Recentemente, foram sugeridos testes alternativos para a avaliação da função da coagulação geral, tais como o teste de formação de trombina, o tromboelastograma (avalia a eficácia da coagulação sanguínea) e a análise *clot waveform* (permite medir níveis reduzidos de FVIII (103)) (76).

2.2.2. Avaliação do fator de coagulação

Os indivíduos com um historial clínico de hemorragias ao longo da vida devem realizar ensaios específicos para o FVIII mesmo que todos os testes de *screening* se encontrem normais (95, 101). Em condições normais, é expectável uma atividade coagulante do FVIII de 50-150% (7). Em casos de hemofilia A, os valores deste parâmetro são normalmente inferiores a 30-40%, verificando-se um nível normal e funcional de vWF (100).

A severidade da hemofilia A é classificada com base na avaliação da atividade coagulante *in vitro,* como indicado na Tabela 2. A prevalência estimada de cada grau de severidade é de 43%, 26% e 31% para hemofilia severa, moderada e leve, respetivamente

(3). Dado que são os pacientes com hemofilia severa que procuram atendimento médico mais frequentemente, a percentagem deste grau de severidade clínica é por vezes sobrestimado (70% dos hemofílicos em alguns estudos) (96).

Tabela 3 - Classificação da severidade da hemofilia A e sintomas relacionados (adaptado de 27, 43).

Severidade	Percentagem do nível de atividade coagulativa do fator (IU/ml*)	Sintomas	Idade (geral) de diagnóstico
Severa	<1% (<0.01)	Hemorragias espontâneas predominantemente em articulações e músculos	1º Ano de vida
Moderada	1-5% (0.01-0.05)	Hemorragias espontâneas ocasionais. Hemorragia severa após trauma ou cirurgia.	Antes dos 5-6 anos de idade
Suave	>5-40% (0.05-0.40)	Hemorragia severa após trauma grave ou cirurgia.	Frequentemente mais tarde na vida do paciente

* 1 IU/ml de fator VIIIC (100%) é considerado normal, como definido pelo atual *World Health Organization International Standard for Plasma Factor VIII:C*.

É importante salientar, relativamente à informação apresentada na Tabela 3, que a severidade clínica da doença nem sempre tem correlação com o resultado do ensaio *in vitro* (7), constituindo uma limitação no diagnóstico da hemofilia A.

2.2.3. Testes genéticos

O recurso a testes genéticos tem como objetivo a confirmação do diagnóstico da hemofilia, através da identificação da mutação que causa a doença (Figura 5), bem como determinar se um indivíduo do sexo feminino é portador (Figura 5) (3). Apesar de a redução da atividade do FVIII nos indivíduos de sexo feminino ser indicativo de que este é portador, valores normais para a atividade do fator não excluem esta possibilidade, sendo necessário a realização de testes genéticos (3). Com exceção dos cerca de 30% de casos de hemofilia A esporádicos (sem historial familiar da doença), as mutações que causam hemofilia A dentro de uma família mantêm-se constantes, desta forma, o conhecimento do genótipo de um individuo do sexo masculino hemofílico numa família facilita a identificação de mulheres portadoras nessa família (3).

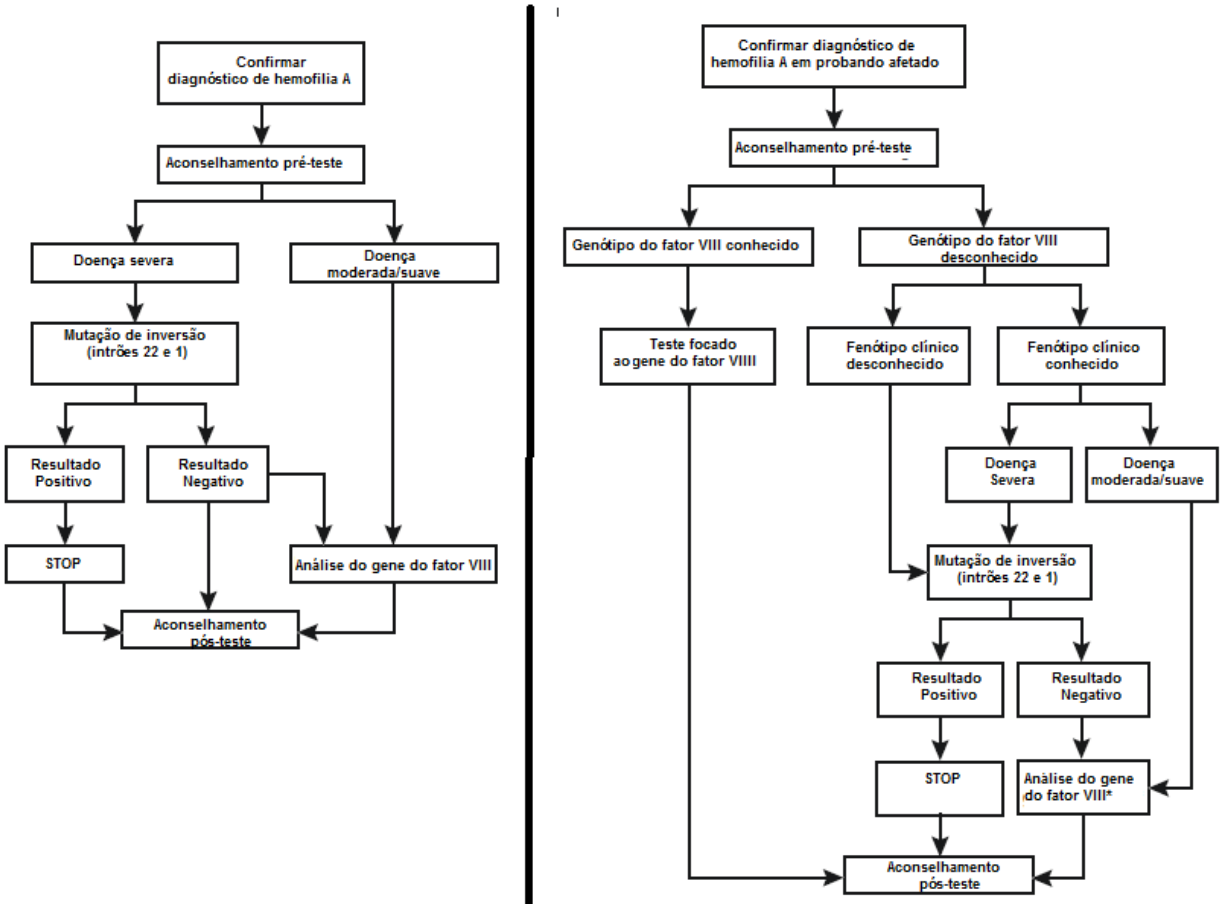

Figura 5 - Algoritmos para a abordagem do teste genético de um caso index e de um portador de hemofilia A (da esquerda para a direita) (4).

A avaliação genética da hemofilia A tem sido realizada com base em duas abordagens distintas (89, 104, 105): (i) análise de marcadores SNP ou microssatélites (VNTR) no gene F8, para determinar o cromossoma X defeituoso numa família, através de *linkage analysis* (1, 3, 90); (ii) identificação da mutação no gene F8 por deteção direta de mutação (90, 105, 106). Associado com a deteção direta da mutação, existem testes de genética molecular para a hemofilia A, como a análise da mutação alvo e *scanning* de mutações ou análise de sequência (7), cujas aplicações clinicas se encontram sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Aplicações clinicas dos testes de genética molecular da hemofilia A (107-109).

- Testes de genética molecular são realizados num caso índex para detetar mutações no gene F8 específicas de uma família de maneira a obter informações para aconselhamento genético de membros familiares em risco.
- São indicados para prognóstico em indivíduos que representam um caso *simplex* (i.e., que são o único indivíduo afetado numa família); a identificação da mutação específica no F8 pode ajudar a prever o fenótipo clinico e avaliar o risco de desenvolver inibidores do FVIII.
- Análise do estatuto de portador em parentes em risco requer uma prévia identificação das mutações que causam a doença na família.
- Os diagnósticos, pré-natal e pré-implantação para casos de gravidez de risco necessitam de identificação prévia das mutações que causam a doença na família.

3. Abordagens terapêuticas utilizadas na hemofilia: Tratamento profilático

A profilaxia e o tratamento de episódios hemorrágicos constituem as abordagens terapêuticas usadas na gestão da hemofilia. No passado, as hemorragias recorrentes resultavam em frequentes visitas ao serviço de urgência e hospitalizações (3). Contudo, estudos realizados sobre programas terapêuticos de auto-infusão que podem ser efetuados em casa evidenciaram claros benefícios com redução dos casos de artropatia e do número de hospitalizações (70, 108). Neste sentido, foram desenvolvidos programas de infusões profiláticas que permitiram reduzir ainda mais a morbilidade e mortalidade associada à

hemofilia (109). Os pacientes severamente afetados pela doença conseguem agora chegar à vida adulta com pouca ou nenhuma artrite isto porque, após a primeira hemorragia espontânea nas articulações a maioria dos jovens com hemofilia severa recebe tratamento profilático duas a três vezes por semana que consiste na infusão de concentrados de fator, com o objetivo de manter os níveis do FVIII plasmático acima de 1% (70). O desenvolvimento de concentrados de fatores de coagulação derivados do plasma, a introdução de programas de infusão no domicílio e a posterior introdução de concentrados de fatores de coagulação recombinantes, marcaram melhoramentos na gestão global de pacientes com distúrbios hemorrágicos (3).

Quando se efetua o diagnóstico inicial de hemofilia A moderada ou leve, é efetuado um teste com desmopressina. A atividade do FVIII é medida antes e uma hora após a infusão intravenosa ou intranasal de desmopressina e dependendo do grau de aumento da atividade do fator, este fármaco pode ser usado na gestão de hemorragias menores (3). No caso de hemorragias de maior gravidade e de cirurgias, a infusão intravenosa ou em bolus de concentrados do FVIII é considerada o tratamento padrão (3). Contudo, o desenvolvimento de inibidores de FVIII pelo paciente complica a gestão da doença e compromete a eficácia do tratamento. No sentido de tentar erradicar estes inibidores têm sido usados regimes imunossupressivos e imuno-tolerantes (70). O recurso ao FVIIa (fator VII ativado) recombinante e a concentrados de complexos de protrombina ativada (FEIBA – *factor VIII inhibitor bypassing activity*) pode ser útil no tratamento de episódios hemorrágicos (70). O FVIIa complexa com o TF exposto na área lesada e desencadeia a hemóstase local. Este processo, como é possível de observar na Figura 1, é independente do FVIII e não é afetado pelos seus inibidores (70). No entanto, é preciso ter em consideração que o FVIIa tem um tempo de semi-vida curto o que implica a necessidade de uma dosagem frequente (70).

4. Relação entre o genótipo e o fenótipo na hemofilia A

Todos os indivíduos do sexo masculinos com hemofilia A e com o mesmo tipo de mutação manifestam a doença com aproximadamente a mesma severidade (7). Contudo, outros fatores genéticos e ambientais podem modelar a severidade clinica da doença (5, 6). Desde há muito tempo que é conhecido que 10-15% dos pacientes que sofrem de hemofilia

"fenotipicamente caracterizada" como severa (atividade coagulante do fator <1%) apresentam uma forma clinicamente mais leve da doença (110-112). Nem todos estes pacientes sofrem de hemorragias espontâneas frequentes e, mesmo aqueles que sofrem destas hemorragias, manifestam dano das articulações de extensão variável (7). Os mecanismos moleculares subjacentes a estas diferenças ainda não estão completamente conhecidos (6, 102, 113). Contudo, sabe-se que a herança simultânea de "genes hemofílicos" e "genes trombofílicos" pode ser uma das causas deste fenómeno (7). Em casos de hemofilia A severa, a heterozigotia de genes trombofílicos pode desempenhar um papel crucial numa manifestação clinica mais leve da doença (6, 114). A associação da co-herança de genes protrombóticos com um fenótipo mais leve de hemofilia, foi descrito e inclui: (i) défices da proteína C, proteína S e anti-trombina; (ii) heterozigotia para o fator V de Leiden, PT20210A e para os polimorfismos do gene C677T da MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase) (114-116). A variância inter-individual na farmacocinética do FVIII como, por exemplo, a associação entre o grupo sanguíneo do paciente, o nível do fator de von Willebrand e o tempo de semi-vida do FVIII (7) é referida como outro modulador do fenótipo de hemofilia A. Foi também sugerido o desempenho da via fibrinolítica na heterogeneidade clínica do fenótipo, através da possível co-estimulação da fibrinólise devido a uma prolongada estimulação de todo o sistema hemostático, quando a resposta hemostática e pacientes hemofílicos a uma situação de trauma se revela inefetiva (117, 118).

4.1. Abordagens experimentais para a caracterização do fenótipo em doentes hemofílicos

A análise do proteoma sérico ou plasmático de pacientes hemofílicos afigura-se como uma estratégia promissora para caracterizar o fenótipo decorrente do défice de fator VIII. Apesar de existirem diversos estudos de proteómica aplicados à análise do soro/plasma (119-121), não existem trabalhos experimentais focados na caracterização do proteoma plasmático/sérico de hemofílicos. Contudo, a análise proteómica do soro/plasma já foi aplicada ao estudo de outras doenças como neoplasias (122-125) e, mais recentemente, na trombofilia (126) que é também um distúrbio da coagulação. De acordo com Cristea *et al* (119), a análise do proteoma tem a vantagem de proporcionar uma visão integrada das proteínas que se encontram alteradas numa dada condição patofisiológica

permitindo uma melhor compreensão da patogénese associada bem como a identificação de potenciais biomarcadores de diagnóstico e monitorização terapêutica.

A maioria das técnicas utilizadas em proteómica assenta na identificação das proteínas por MS/MS e que foram previamente separadas por: (i) cromatografia líquida, como por exemplo MDLC (cromatografia líquida multidimensional) (127, 128); (ii) eletroforese em gel, como por exemplo, 2-DE (eletroforese bidimensional) (119, 127, 129, 130). No entanto, há que ter em consideração as limitações associadas à análise proteómica de amostras como o plasma/soro. O proteoma do plasma é bastante difícil de caracterizar devido a grande proporção de albumina, à gama variada de proteínas que contém e devido à enorme heterogeneidade das glicoproteínas predominantes (130). Por este motivo, é difícil analisar proteínas expressas em níveis mais baixos no plasma (119, 130). Este problema pode ser contornado removendo as proteínas mais abundantes antes de realizar a análise proteómica (131).

No contexto da hemofilia, os poucos estudos de proteómica conhecidos foram realizados para a caracterização de concentrados de FVIII usados na terapia profilática (132, 133). Basilico *et al* (132) analisaram concentrados de FVIII utilizando MudPIT, uma abordagem que incorporou cromatografia líquida (HPLC) capilar bidimensional acoplada à espectrometria de massa *tandem*. Com o mesmo intuito, Monetti *et al* (133), caracterizaram o produto terapêutico recombinante do FVIII por 2-D DIGE, um tipo de eletroforese bidimensional que permite a análise simultânea de diferentes amostras com recurso a marcadores fluorescentes. A utilização de uma destas abordagens experimentais na análise de fluídos biológicos de doentes hemofílicos com graus de severidade da doença diferentes poderá ajudar a compreender melhor os fatores modulares do fenótipo desta doença bem como a relação genótipo-fenótipo.

II. OBJETIVOS

O presente projeto de mestrado teve como objetivo a análise do perfil proteico de soro e plasma de pacientes com hemofilia A severa, acompanhados no Serviço de Imunohemoterapia do Hospital Infante D. Pedro, em Aveiro, para melhor compreender alterações proteicas no soro/plasma induzidas por mutação. Para o efeito procedeu-se à análise do perfil de proteínas do soro/plasma por SDS-PAGE e da atividade proteolítica destes fluídos biológicos por zimografia.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização da amostra

No presente projeto de mestrado foram estudados cinco pacientes diagnosticados com hemofilia A severa e acompanhados pelo Serviço de Imunohemoterapia do Hospital Infante D. Pedro – Aveiro (**Tabela 5**). Estes pacientes foram selecionados com base nos valores de atividade de fator VIII, inferiores a 1% (hemofilia severa) aquando do diagnóstico. Foram ainda incluídos três indivíduos saudáveis com idade compreendida entre os 23 e 28 anos.

Tabela 5 - Informações gerais dos pacientes hemofílicos incluídos no estudo.

Pacientes	Idade (Anos)	Atividade FVIII	Complicações	História familiar	Mutação	Terapêutica
P1	7	0%	Diagnosticado à nascença; Risco hemorrágico	Irmão hemofílico; Mãe e irmã, portadoras	Mutação *splicing – Ex14 – 1 acceptor splice site ag/GTC>at GTC*	Octocog
P2	9	0%	Hemorragias frequentes	Sem história familiar (Progenitora com teste negativo para a mutação apresentada)	Inversão intrão 22 no gene F8	Octocog
P3	19	0%	Hemorragias frequentes.	Sem história familiar	-------	Octocog
P4	25	0%	Aparecimento regular de hematomas aos 2-3 anos de idade	Sem história familiar	-------	Octocog
P5	43	<1%	Hemorragias espontâneas frequentes; Artropatia resultante de hemartroses; Infeção com VHC.	Sem história familiar	-------	Octocog / Moroctocog

Os pacientes incluídos neste estudo tinham idades compreendidas entre os 7 aos 43 anos, seguiam a mesma terapêutica, excerto no caso do paciente P5 cuja terapêutica consistia na administração de Octocog e Moroctocog. Dos pacientes estudados, apenas um (P1) tinha história familiar de hemofilia A, o que levou à pesquisa da mutação subjacente à doença. Para o paciente P2 também foi realizada uma análise genética que evidenciou a presença de uma inversão do Intrão 22, descrita como associada a 40% dos casos de hemofilia A severa (7).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital e seguiu a Declaração de Helsínquia. Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram informados da natureza e finalidade do projeto e assinaram de livre vontade a declaração de consentimento informado

2. Amostras analisadas

A cada indivíduo foram recolhidas amostras de sangue a fim de obter plasma e soro. O sangue venoso foi recolhido para tubos com EDTA 1,6 mg/mL (para obtenção de plasma) e para tubos secos (para obtenção de soro). As amostras foram centrifugadas a 4700 rpm durante 15 minutos e o soro foi separado em alíquotas para *eppendorffs* e armazenado a -80ºC até análise bioquímica; ou foram centrifugadas a 3000 rpm durante 3 minutos e o plasma foi separado em alíquotas sendo também armazenado a -80ºC até análise bioquímica.

2.1. Depleção de Albumina do Soro e do Plasma

Uma das limitações na análise de soro e plasma é a grande quantidade de albumina presente o que dificulta a deteção de outas proteínas que sejam expressas a níveis mais baixos (130) pelo que se procedeu à depleção de albumina destas amostras utilizando um procedimento experimental baseado na separação de proteínas por cromatografia de afinidade (131). Nesse sentido foi utilizada a resina comercial Trisacryl Blue® (Pall). A 500 µL de resina adicionou-se amostra (100 µL de soro/plasma) em 500 µL de Tris-HCl

50 mM pH 8.8. Posteriormente procedeu-se à eluição com 500 µL de NaCl 75 mM seguida de 500 µL de NaCl 3M, ambas as soluções preparadas em Tris-HCl 50 mM pH 8.8. Os eluatos, de cada um dos passos, foram guardados a -80ºC.

3. Determinação da concentração de proteína total nas amostras de soro e plasma

A determinação da concentração de proteína total foi efetuada segundo o método de Bradford (Sigma-Aldrich®). O método baseia-se na interação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com as proteínas em solução formando um complexo. Em resumo, a 5 µL de amostra (soro e plasma) adicionou-se 250 µL de reagente de Bradford e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida mediu-se a absorvência a 595 nm num leitor de placas (MultiSkan Go da Thermo Scientific®). Paralelamente efetuou-se uma curva de calibração com padrões de albumina de soro bovino (BSA) na gama de concentrações entre 0,125 e 1,4 mg/ml.

4. Análise do perfil de proteínas do soro/plasma por SDS-PAGE

No sentido de avaliar o efeito da hemofilia A no perfil de proteínas séricas e plasmáticas, procedeu-se à separação das mesmas por SDS-PAGE. Para isso, preparou-se um gel de 12,5% SDS-PAGE, tendo por base o descrito por Laemmli (134), no qual se aplicou 25 µg de amostra (amostras de soro/plasma depletadas em albumina). Após a conclusão da eletroforese, o gel foi incubado em solução fixadora (40 % metanol e 10% ácido acético) durante 1 hora, à temperatura ambiente e com agitação suave. Seguidamente colocou-se o gel em uma solução de Coomassie Coloidal (0,12% (m/v) Coomassie G250 em 20% metanol) *overnight*, com agitação suave e descorou-se com uma solução constituída por 25% etanol. Para finalizar, digitalizaram-se os géis no Gel Doc XR System (Bio-Rad®).

5. Análise de proteases no soro/plasma por Zimografia em gel

Com o objetivo de determinar a atividade proteolítica dos fluídos em estudo bem como identificar as proteases presentes procedeu-se à análise de soro e plasma por zimografia em gel, tendo por base o procedimento descrito por Padrão *et al*. (135). Assim, preparou-se um gel 10% SDS-PAGE impregnado com 0,1% de gelatina (Sigma®), no qual se aplicou 10 µL de amostra diluída em tampão de carregamento (100 mM Tris pH 6.8, 5% SDS, 20% glicerol, 0,1% azul de bromofenol), na proporção 1:4 (v/v), durante 10 minutos à temperatura ambiente. Uma vez concluída a eletroforese, o gel foi incubado em tampão de renaturação (2,5% Triton X-100) durante 30 minutos, com agitação suave. Seguidamente, incubou-se o gel em tampão de desenvolvimento (50 mM Tris, 5 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 1 µm $ZnCl_2$, 0,02% (v/v) Triton X-100, pH 7.4) durante mais 30 minutos, com agitação suave. Após substituir-se o tampão de desenvolvimento, colou-se o gel a 37ºC durante 5 horas. Para identificação das classes de proteases, paralelamente incubou-se o gel com inibidores específicos adicionados ao tampão de desenvolvimento. Assim, com vista a confirmar a atividade de MMPs, incubou-se o gel em tampão de desenvolvimento com 10mM EDTA. Finalmente corou-se o gel com uma solução de Coomassie Coloidal (0,12% (m/v) Coomassie G250 20% metanol) durante 3 horas com agitação suave e descorou-se com uma solução constituída por 25% etanol. Por fim, digitalizaram-se os géis no Gel Doc XR System (Bio-Rad®).

6. Análise por imunoblotting de MMP-9

As amostras de soro ou plasma foram diluídas 30 vezes em TBS (100 mM Tris, 1,5 mM NaCl, pH 8.0), tendo-se aplicado 100 µL numa membrana de nitrocelulose (Millipore, Irlanda), previamente ativada em solução de metanol 10%, sob vácuo. Para o efeito utilizou-se um sistema de slot blot (Hybri-Slot™, Life Technologies, USA). A membrana foi posteriormente incubada com uma solução de bloqueamento contendo 5% leite em pó magro em TBS-T (TBS com 0,05% Tween 20) durante 1 hora com agitação. Posteriormente, incubou-se a membrana com anticorpo primário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (anti-MMP-9, clone 36020, R&D Systems) durante 1 hora em agitação constante. Após três lavagens de 10 minutos cada com TBS-T, a membrana foi

incubada com anticorpo secundário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (anti-*mouse*, GE Healthcare, UK). Após 1 hora, a membrana foi lavada com TBS-T, ao que se seguiu a deteção das proteínas ligadas aos anticorpos por quimiluminescência com ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, Japão). Após a exposição da membrana a um filme Raio-X (GE Healthcare), procedeu-se à revelação do mesmo. O filme obtido foi digitalizado no Molecular Imager Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) e analisado com o *software* Image Lab (Bio-Rad, versão 3.0). Paralelamente corou-se a membrana com PonceauS para controlo da quantidade de proteína aplicada.

7. Análise estatística

Para a avaliação do efeito da hemofilia A no perfil proteico e na atividade proteolítica nos diferentes fluídos recorreu-se ao programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows e efetuou-se um teste *t* de Student, após se ter verificado uma distribuição normal de todas as variáveis. Consideraram-se diferenças significativas para valores de *p-value*< 0,05. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão dos valores de densidade ótica medidos (da análise dos géis de zimografia e dos blots).

IV. RESULTADOS

1. Caracterização clínica dos doentes em estudo

No presente estudo as amostras de soro e plasma utilizadas foram obtidas a partir do sangue de cinco pacientes diagnosticados com hemofilia A severa. Os pacientes considerados foram selecionados com base nos valores de atividade de fator VIII, inferiores a 1% (hemofilia severa) aquando do diagnóstico. Na Tabela 6 são apresentados os dados clínicos de cada paciente, assim como os valores dos parâmetros de coagulação, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).

Tabela 6 - Dados clínicos e parâmetros de coagulação dos pacientes hemofílicos incluídos no estudo.

Pacientes	Idade (Anos)	Atividade FVIII (%)	Parâmetros de coagulação	
			TP (s) *	TTPA (s) **
P1	7	0	13,70	127,90 (CT – 28,00)
P2	9	0	11,70	72,00 (CT - 30,00)
P3	5	0	12,00	49,30 (CT – 26,00)
P4	25	0	12,50	52,00 (CT – 31,00)
P5	43	<1	12,20	53,10 (CT – 28,6)

* Parâmetros de referência TP - 11.50-15.00s; ** CT - medição controlo.

Os pacientes incluídos neste estudo apresentaram valores de TTPA elevados (medição efetuada antes do início da terapêutica), o que sugere comprometimento da via intrínseca da cascata de coagulação, da qual faz parte o fator VIII. O TP apresenta-se dentro dos níveis de referência para todos os pacientes, indicando um funcionamento normal da via extrínseca.

2. Análise do perfil de proteínas do soro/plasma por SDS-PAGE

No sentido de avaliar o efeito da hemofilia A no perfil de proteínas séricas e plasmáticas, procedeu-se à separação das mesmas por SDS-PAGE (Figuras 6). De forma a minimizar a contribuição de albumina, utilizou-se uma abordagem experimental baseada na remoção desta proteína por cromatografia de afinidade com Trisacryl Blue®. Inicialmente, as amostras de soro/plasma (dissolvidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.8) foram eluídas, sendo o eluato resultante recolhido (soro/plasma SA, obtido na primeira eluição). Seguidamente, adicionou-se uma solução NaCl 75 mM e o eluato recolhido (designado de soro/plasma 75) apresentou uma menor quantidade de albumina, o que se deve ao facto de a concentração salina aumentar a ligação da albumina à resina presente na coluna. As amostras analisadas por SDS-PAGE foram os eluatos soro/plasma SA (Figura 6A1 e B1, respetivamente) e soro/plasma 75 (Figura 6A2 e B2, respetivamente).

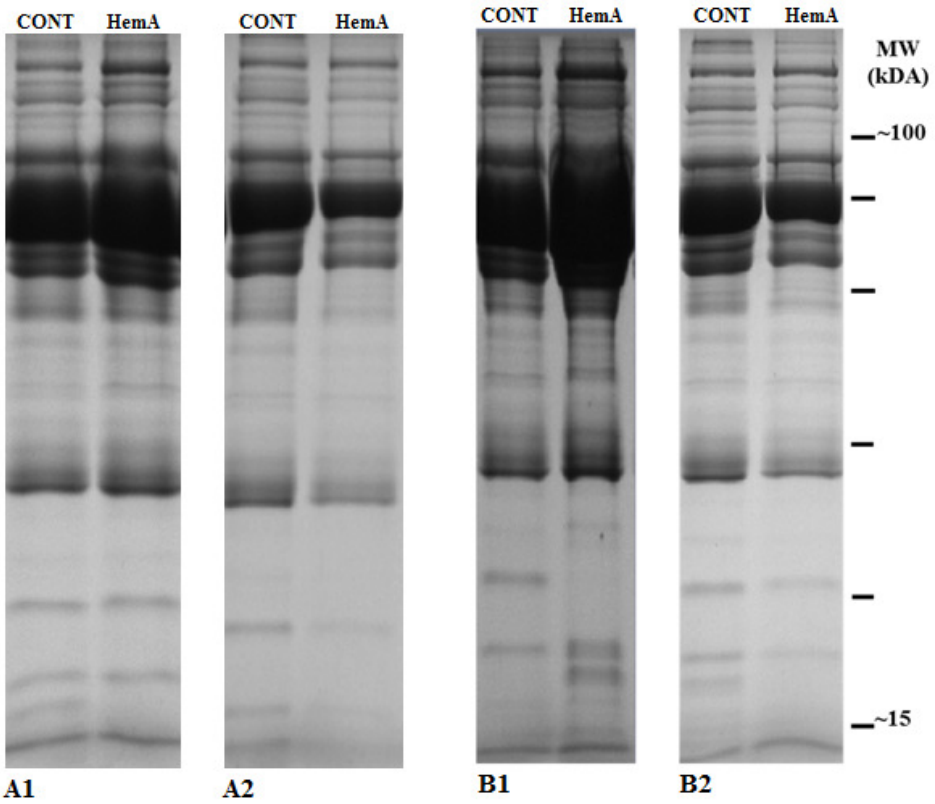

Figura 6 - Imagem representativa do gel obtido na separação de proteínas da amostra de soro depletado SA (A1) e 75 (A2) e de amostras de plasma depletado SA (B1) e o 75 (B2). CONT – Indivíduos controlo; HemA – Pacientes hemofílicos. SA – Solução resultante da eluição da solução amostra; 75 – Solução resultante da eluição de NaCl 75 mM.

Na análise do perfil de bandas obtido na separação das proteínas do soro (A1 e A2) e do plasma (B1 e B2) não se verificaram diferenças significativas entre os indivíduos controlo e os pacientes. Como se pode constatar pela análise da figura 6, apesar de se ter efetuado a depleção de albumina, esta não foi totalmente eficaz atendendo à intensidade da banda observada na gama de peso molecular de 60-70 kDa. Comparativamente à intensidade desta banda nas amostras de soro e plasma não depletadas em albumina, verificou-se uma menor densidade ótica sugestiva de menor concentração de albumina; no entanto, o procedimento implementado para eliminação da proteína mais abundante do plasma e do soro não se revelou totalmente eficaz, o que condiciona a subsequente identificação das proteínas menos abundantes, como, por exemplo, as proteases da cascata de coagulação, pela análise das bandas dos géis de SDS-PAGE por LC-MS/MS.

3. Análise da atividade proteolítica do soro/plasma por zimografia

Com o objetivo de determinar o efeito da hemofilia A na atividade proteolítica dos fluídos em estudo, bem como identificar as proteases presentes procedeu-se à análise de soro e de plasma por zimografia em gel impregnado com gelatina (Figura 7).

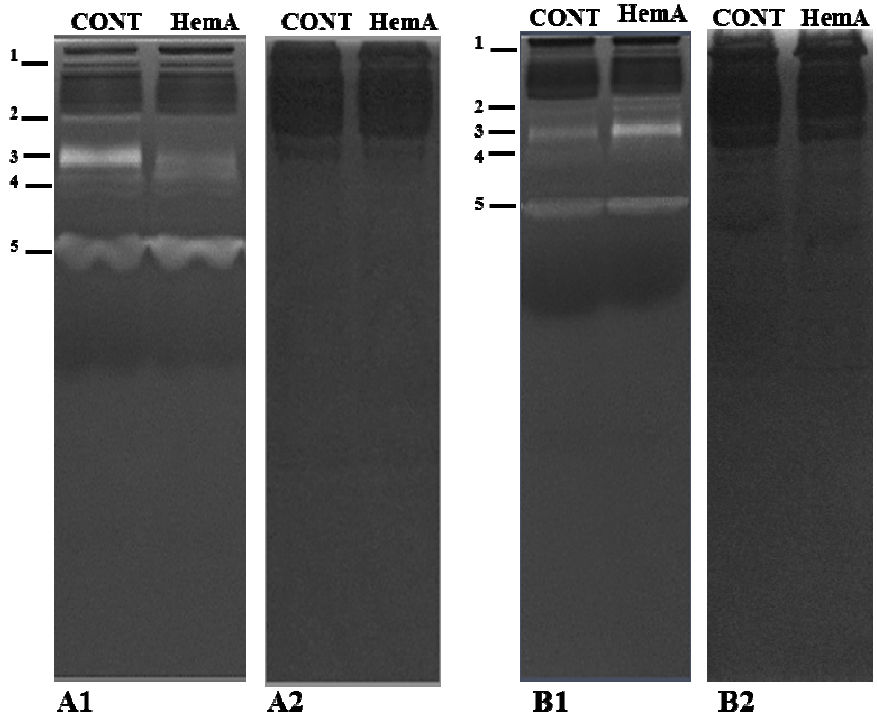

Figura 7 – Imagem representativa do gel de zimografia obtido na análise de soro (A1) e do plasma (B1), de indivíduos controlo (CONT) e pacientes hemofílicos (HemA). Avaliação do efeito do EDTA 10 mM na atividade proteolítica do soro (A2) e do plasma (B2) Pesos moleculares das bandas assinaladas na imagem: 1 – 225 kDa; 2 – 130 kDa; 3 – 92 kDa; 4 – 86 kDa; 5 – 72 kDa(69, 136, 137).

Pela análise da Figura 7, verifica-se que o perfil de atividade proteolítica é semelhante entre as amostras de soro (Figura 7**A1**) e plasma (Figura 7**B1**), tendo-se observado 5 bandas com atividade em todos os indivíduos analisados, tanto no soro como no plasma, embora com atividades diferentes. O efeito inibitório do EDTA na atividade proteolítica observado na zimografia efetuada com géis impregnados com gelatina evidencia a contribuição das MMPs (69). A análise do perfil proteolítico de soro e plasma revelou duas bandas com mais atividade *in-gel*, com aproximadamente 72 e 92 kDa (bandas 5 e 3), e outras 3 bandas com 86, 130 e 225 kDa (bandas 4, 2 e 1), com menor atividade proteolítica. Considerando o peso molecular das bandas, infere-se que a banda 5 corresponde à pro-MMP-2, a banda 4 à MMP-9, a banda 3 à pro-MMP-9, a banda 2 ao heterodímero da pro-MMP-9 que resulta da formação de um complexo da MMP9 com a lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL) e a banda 1 ao homodímero da pro-MMP-9 (69, 137). Na Figura 8 encontram-se representadas as variações da DO para as 5 bandas detetadas nas amostras de soro e plasma.

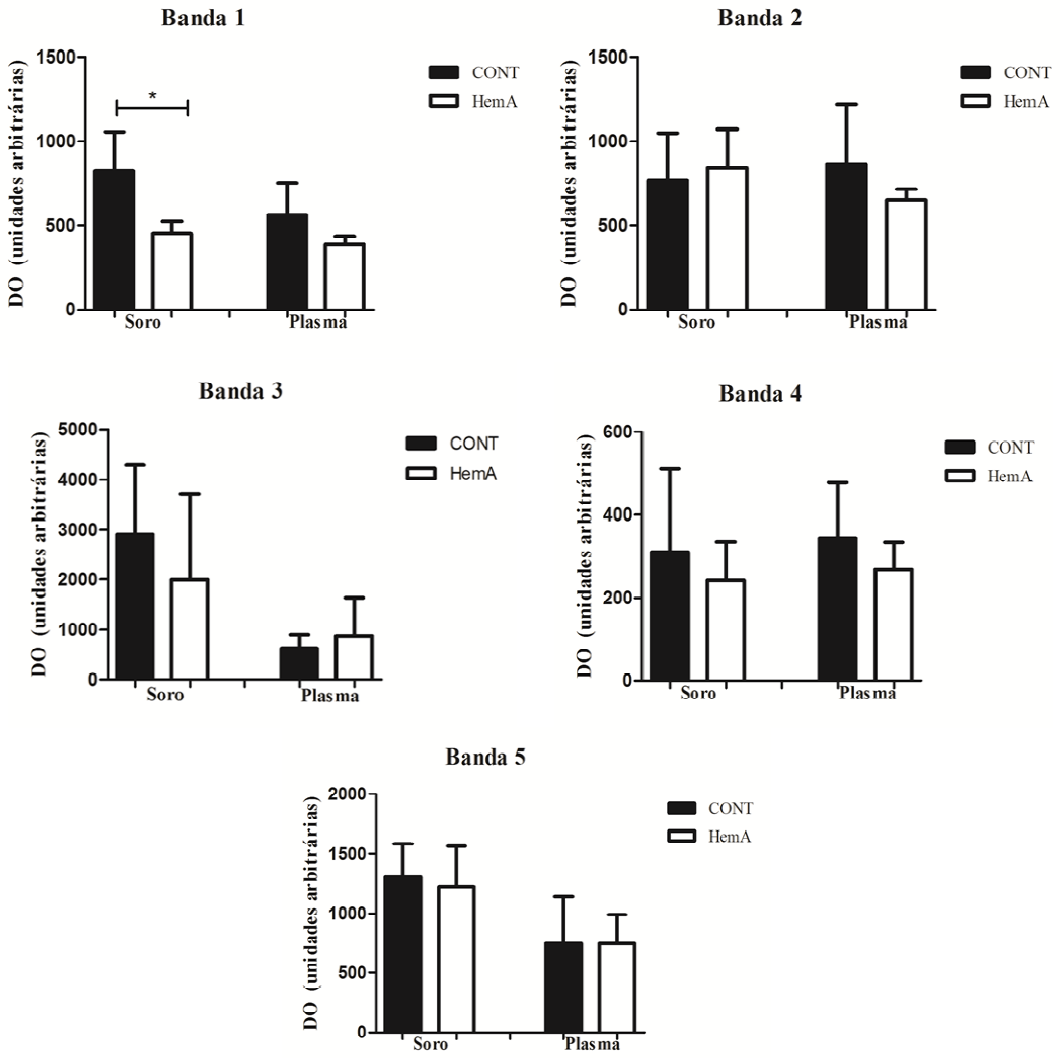

Figura 8 - Variação da densidade ótica (DO) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 assinaladas na figura 7 para amostras de soro e plasma. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão dos valores de densidade ótica medidos para cada grupo (*p <0,05).

Comparando os valores de DO das várias bandas entre os indivíduos em estudo para as amostras de soro e de plasma (Figura 8), verifica-se que os pacientes em estudo apresentam em geral menor atividade proteolítica nestes fluídos do que os indivíduos controlo. No entanto, apenas se verificaram diferenças de atividade estatisticamente significativas para a banda 1 (homodímero da pro-MMP-9) obtida na análise do soro. Para avaliar o potencial efeito de variáveis individuais na atividade das MMPs, compararam-se os valores de DO de cada banda com atividade, em soro e plasma, de cada um dos pacientes com os indivíduos controlo (Figura 9).

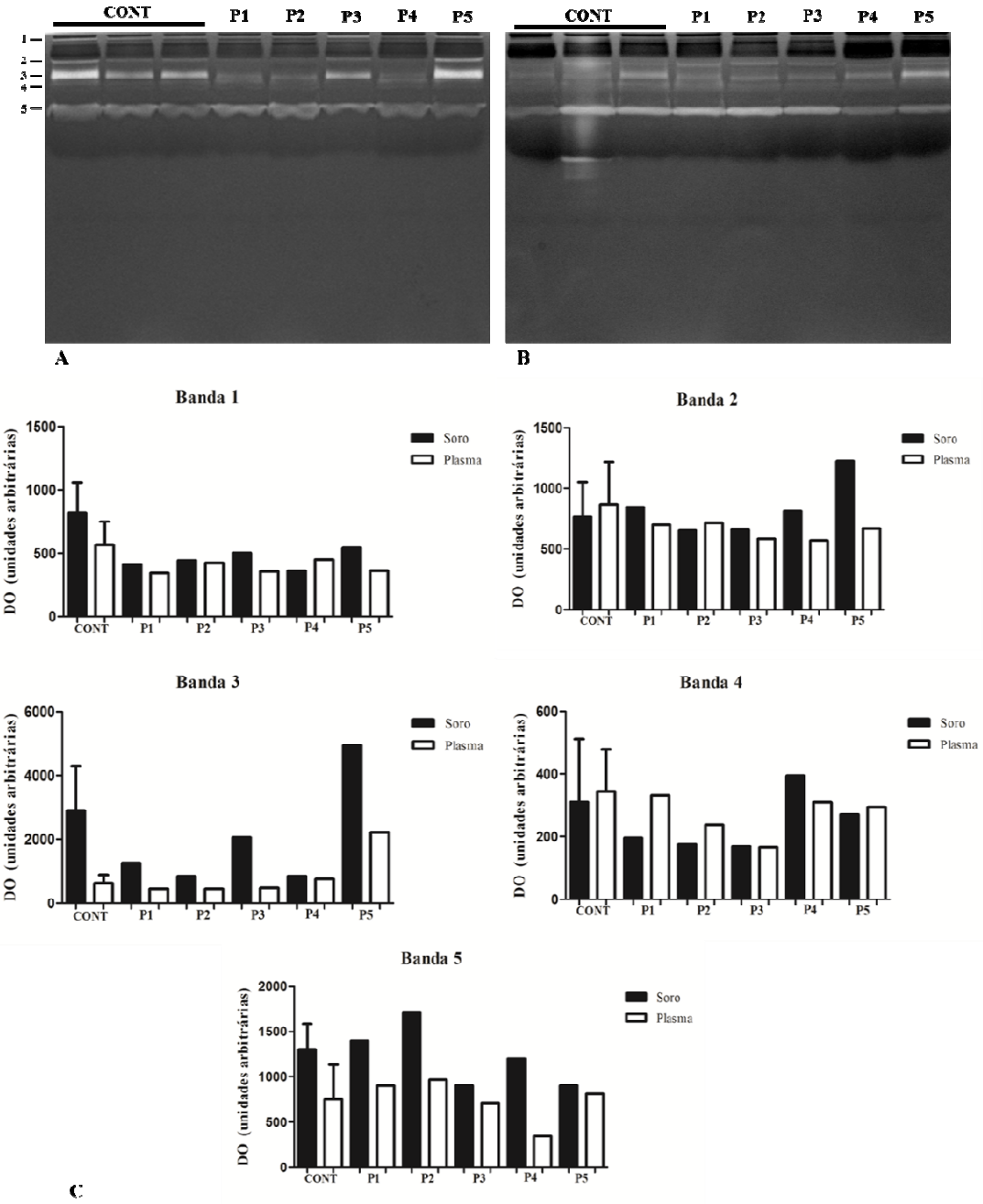

Figura 9 – Imagem representativa do gel de zimografia obtido na análise de soro (A) e do plasma (B), de indivíduos controlo (CONT) e pacientes hemofílicos (P1, P2, P3, P4 e P5); (C) Comparação de valores de DO de cada banda com atividade (com correspondência na figura 7) obtido na análise de soro e plasma de cada indivíduo.

Da análise da Figura 9C verifica-se que a atividade *in-gel* da MMP-9 (bandas 2 e 3) é superior no soro do paciente 5 relativamente a todos os restantes indivíduos analisados. O paciente 4 apresentou uma maior atividade para a banda 4 relativamente aos outros pacientes.

De forma a verificar se estas diferenças de atividade da MMP-9 se relacionam com diferenças do teor desta protease, analisou-se por imunoblotting os níveis desta MMP utilizando um anticorpo específico. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 10.

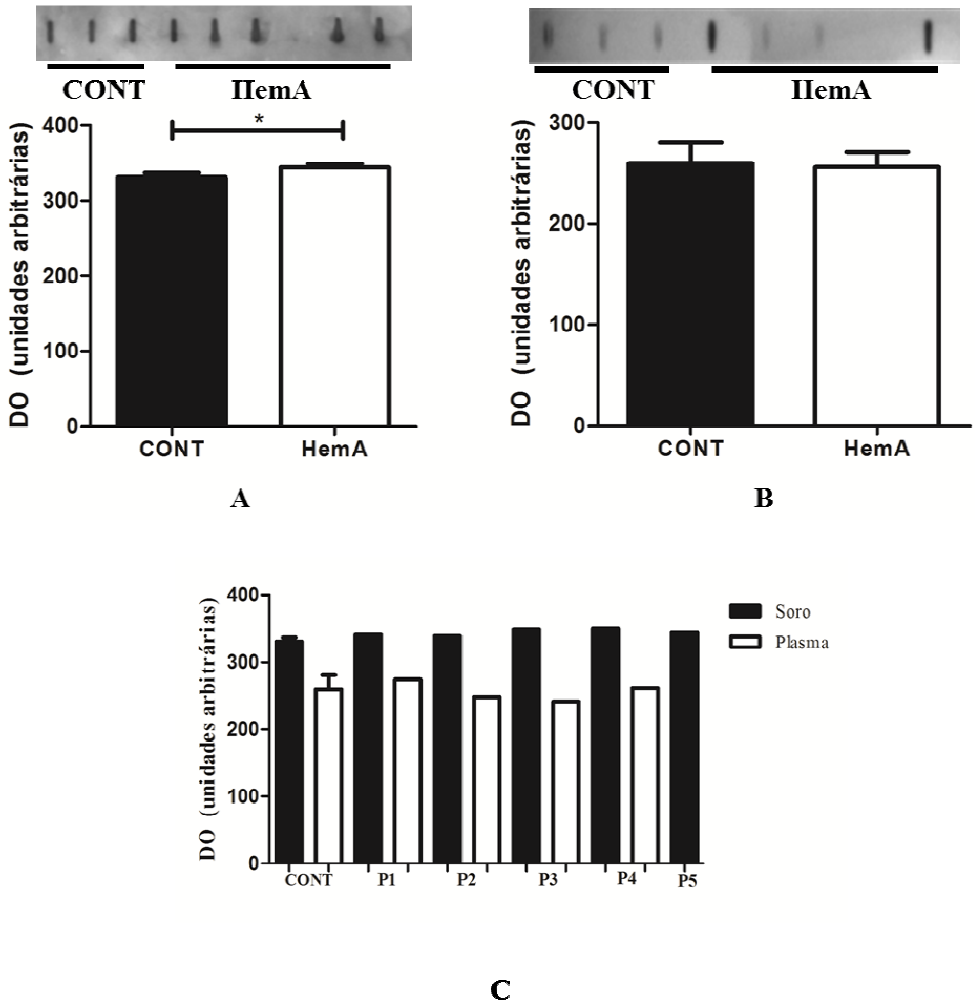

Figura 10 - Análise dos níveis de MMP-9 por imunoblotting em amostras de soro (A) e de plasma (B) em indivíduos controlo (CONT) e pacientes hemofílicos (HemA). (C) Comparação dos níveis de MMP-9, analisados por imunoblotting (correspondência com A e B) em amostras de soro e de plasma de cada indivíduo. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão dos valores de densidade ótica medidos para cada grupo. As imagens representativas dos imunoblots encontram-se em cima dos respetivos histogramas (*p <0.05).

Nas amostras de soro observou-se um aumento significativo dos níveis de MMP-9 nos pacientes hemofílicos (p <0.05, Figura 10A). Nas amostras de plasma não se observaram diferenças significativas dos níveis de MMP-9 entre os indivíduos controlo e os pacientes hemofílicos (Figura 10B). Na análise da Figura 10C, verifica-se que os níveis

séricos de MMP-9 são semelhantes para os indivíduos em estudo. Observa-se, contudo, que no paciente 1 os níveis plasmáticos de MMP-9 são bastante mais elevados do que os observados nos restantes pacientes.

De forma a integrar a MMP-9 nos processos celulares procedeu-se à análise das interações proteína-proteína recorrendo ao String v9.05 (138) (Figura 11).

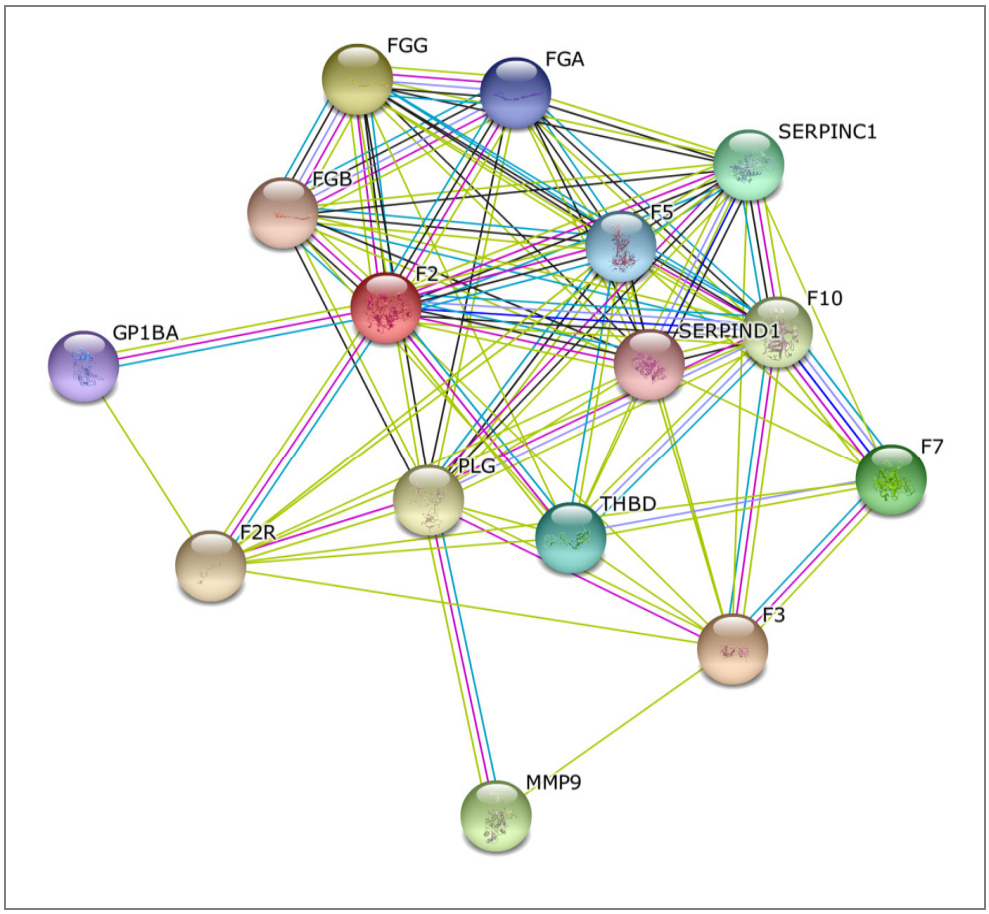

Figura 11 – Interação proteína-proteína com a MMP-9 (String v9.05) (138). GP1BA – Glicoproteína 1b, polipéptido-α; F2 – Fator II; F2R – Recetor do Fator II; F3 – Fator III; F5 – Fator V; F7 – Fator VII; F10 – Fator X; FGA – Fibrinogénio, cadeia-α; FGB – Fibrinogénio, cadeia-β; FGG – Fibrinogénio, cadeia-γ; PLG - Plasminogénio; SERPINC1 – Antitrombina (inibidor de serpina peptidase, clade C membro 1); SERPIND1 – Cofator de Heparina (inibidor de serpina peptidase, clade D membro 1); THBD – Trombomodulina.

Esta análise evidenciou a interação da MMP-9 com 14 proteínas que variam entre precursores de proteases serínicas (F2, F7, F10 e PLG), cofatores (SERPIND1, F5 e THBD), recetores (F2R) e glicoproteínas (FGA, FGB, FGG E GP1BA, SERPINC1) envolvidas na coagulação. As proteínas F2, F7, F10, F5 e o fibrinogénio (representado

pelas cadeias-α, β e γ) são fatores envolvidos na coagulação enquanto o plasminogénio participa na fibrinólise. O F2R é o recetor do Fator IIa (trombina), fator este que forma um complexo com o cofator trombomodulina no sentido de ativar a proteína C. A SERPINC1, também denominada de antitrombina, é um importante inibidor plasmático das proteases serínicas e que, além de inibir a trombina, inibe também os fatores IXa, Xa e XIa. A SERPIND1 atua como cofator da heparina que, quando está presente, substitui a SERPINC1 como o principal inibidor da trombina. A GP1BA é um polipéptido que participa na formação do "rolhão" de plaquetas pela ligação ao domínio A1 do vWF.

Os valores elevados de TTPA observados para os pacientes hemofílicos (Tabela 6) suportam o comprometimento funcional da via intrínseca da cascata de coagulação. Pela análise da interação proteína-proteína com a MMP-9 efetuada com a ferramenta bioinformática String v9.05 (138) (Figura11), verifica-se uma associação entre esta via e a MMP-9. Esta metaloprotease interage com o fator X, o fator II e o fator V. A ativação do fator X está dependente da atividade do complexo intrínseco que é constituído pelo FVIIIa, a forma ativa do fator em défice na hemofilia A, e o fator IX. O fator Xa, por sua vez, associa-se ao fator V, ativando-o na sua forma de co-fator (Fator Va) e formando com ele o complexo de protrombinase que vai promover a formação da trombina (fator IIa) por clivagem da protrombina (Fator II) (15). Assim, o défice de fator VIII, apresentado pelos pacientes com hemofilia A, parece relacionar-se com a menor atividade sérica da MMP-9 mas não com os seus níveis.

V. DISCUSSÃO

A hemofilia é o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum e ainda hoje apresenta uma elevada morbilidade associada. Um diagnóstico preciso, seguido de uma caracterização correta da origem da doença, são cruciais para a definição do melhor plano terapêutico profilático a seguir de modo a garantir qualidade de vida ao doente, com o mínimo de episódios hemorrágicos e complicações associadas possível. Contudo, nem sempre se verifica uma correlação entre a severidade da doença, que é inferida a partir do genótipo, e o fenótipo apresentado clinicamente (5, 6). Mesmo em doentes com severidade da doença semelhante, a frequência e gravidade dos episódios hemorrágicos varia (6, 7), o que dificulta a assistência médica que é dada aos pacientes hemofílicos. A presença de outras alterações genéticas não diretamente associadas à hemofilia, assim como a variabilidade inter-individual na farmacocinética do FVIII, podem modular a severidade clinica desta doença (6, 7). No sentido de melhor compreender os mecanismos moleculares subjacentes à hemofilia, procedeu-se à análise do perfil proteico de amostras de soro/plasma de pacientes hemofílicos.

Em primeiro lugar, analisaram-se os fluídos biológicos em estudo por SDS-PAGE, na tentativa de determinar o efeito da hemofilia A no perfil de proteínas séricas e plasmáticas (Figura 6). De forma a minimizar a contribuição de albumina nas amostras de soro e plasma, utilizou-se uma abordagem experimental para remoção desta proteína baseada na sua afinidade para o Trisacryl Blue®. No entanto, este procedimento não se revelou totalmente eficaz, comprometendo a identificação por LC-MS/MS das proteases da cascata de coagulação. Assim, utilizou-se uma abordagem experimental dirigida para a análise de proteases, a zimografia, uma técnica electroforética em que é impregnado um substrato para as proteases de interesse (59). Com esta abordagem e utilizando a gelatina como substrato, observamos nos géis de zimografia a presença de 5 bandas cuja atividade foi inibida pelo EDTA (Figura 7) sugerindo a presença de MMPs, mais especificamente das MMP-9 e MMP-2 atendendo aos seus pesos moleculares e à literatura (69). Observou-se o homodímero da MMP-9, a 225 kDa, um complexo da MMP9 com a lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos, a 130 kDa, a pro-MMP-9 com 92 kDa de peso molecular, a MMP-9 com 86 kDa e a MMP-2 com 72 kDaP2 (69, 137). Não se verificaram diferenças do perfil proteolítico entre os fluídos em estudo (Figura 7A1 e B1, respetivamente). Este resultado foi o esperado e é apoiado pela literatura, havendo apenas a

discussão da presença das isoformas de maior peso molecular da MMP-9 (130 e 225 kDa) no plasma devido à atividade reduzida que apresentam neste fluido (137, 139).

Os indivíduos hemofílicos evidenciaram menor atividade das MMPs, sendo significativa apenas para a atividade do homodímero da MMP-9 (Figura 8). A MMP-9 é a única das MMPs secretadas que é capaz de formar um homodímero, cuja função específica ainda não foi elucidada (140). A MMP-9 está geralmente envolvida em processos de remodelação da matriz extracelular (40-42), estando a sua atividade geralmente aumentada em certas neoplasias (141, 142), na diabetes mellitus tipo I (69), em complicações vasculares como a aterosclerose (143) e em processos inflamatórios como a artrite reumatoide (144). Da mesma forma, a atividade da MMP-9 aparece aumentada em casos de artropatia resultante de hemorragia intra-articular (hemartrose), sendo umas das causas sugeridas o estímulo da secreção da protease pela hemoglobina (145), podendo justificar os níveis mais elevados de atividade da MMP-9 verificados no paciente 5 (Tabela 5). Outra justificação será o facto do paciente 5 estar infetado com o VHC, uma condição que provoca, entre outras alterações, o aumento nos níveis MMP-9 (146).

Com o intuito de verificar se as alterações na atividade da MMP-9 se deviam a diferenças no seu teor, analisou-se por imunoblotting os níveis desta protease nos fluídos biológicos em estudo (Figura 10). Os resultados obtidos evidenciaram níveis mais elevados de MMP-9 no soro dos pacientes (p <0,05). Apesar da tendência ter sido oposta à observada para a atividade, é de salientar que a análise efetuada por imunobloting permitiu avaliar os níveis totais de MMP-9 e não apenas do seu homodímero. As diferenças de atividade e dos níveis de proteases observadas entre os diferentes fluídos analisados no presente estudo podem ser justificadas, pelo menos em parte, pela forma como as amostras de soro e plasma foram recolhidas. A recolha de plasma implica que, no tubo para o qual é recolhido o sangue, esteja uma quantidade específica de anticoagulante que pode ser heparina ou EDTA. Neste estudo, o plasma foi obtido por recolha do sangue para tubos com EDTA, que é um anticoagulante quelante de cálcio. Alguns autores sugerem que este tipo de anticoagulantes pode alterar a atividade de gelatinases endógenas como é o caso da MMP-9 (147). Assim, o melhor fluído para estudo da atividade das MMPs parece ser o soro (137, 147). A atividade diminuída da MMP-9 no soro dos pacientes hemofílicos, apesar de estar presente em níveis mais elevados, sugere o envolvimento do inibidor desta protease, o TIMP-1. Efetivamente, em estudos anteriores com tendências de atividade vs.

expressão semelhantes às observadas no presente trabalho, detetaram-se níveis elevados deste inibidor (148), pelo que, no futuro, será importante comprovar esta hipótese.

A MMP-9 interage com 14 proteínas diferentes que, de forma direta ou indireta, interferem com o processo de coagulação (Figura 11). Atendendo ao comprometimento da via intrínseca da cascata de coagulação nos pacientes com hemofilia A que se refletiu em valores de TTPA elevados (Tabela 6), a associação da MMP-9 com os fatores X, V e II sugere que a MMP-9 pode encontrar-se alterada neste distúrbio da coagulação. No entanto, não se conhecem estudos que tenham avaliado alterações da atividade e/ou expressão de MMPs, em particular da MMP-9, na Hemofilia A nem em outros distúrbios da coagulação. Chang *et* al (149) verificaram que a trombina (fator IIa) regula a expressão da MMP-9 em monócitos humanos, o que suporta a associação observada entre esta metaloprotease e o fator II pela análise das interações proteína-proteína com a MMP-9. No sentido de melhor explorar esta associação, tentou-se avaliar a atividade proteolítica dos fluídos biológicos em estudo utilizando géis de zimografia impregnados com fibrinogénio. No entanto, a implementação técnica não foi bem-sucedida, embora seja uma análise a considerar num futuro próximo.

VI. CONCLUSÕES

Com o objetivo de melhor compreender a relação genótipo-fenótipo observada em pacientes com hemofilia A severa, acompanhados no Serviço de Imunohemoterapia do Hospital Infante D. Pedro, em Aveiro, no presente projeto de mestrado procedeu-se a uma análise do perfil proteico do soro e do plasma de pacientes hemofílicos e de indivíduos saudáveis cujos resultados permitiram tecer as seguintes conclusões:

i) a hemofilia A promove alterações da atividade proteolítica do soro e do plasma, sendo mais evidentes no soro e caracterizadas pela diminuição significativa da atividade de MMP-9, apesar de presente em níveis mais elevados;

ii) a análise das interações proteína-proteína com a MMP-9 efetuada com a ferramenta bioinformática String evidenciou a interação desta metaloproteinase com vários fatores da via intrínseca da cascata de coagulação, como, por exemplo, o fator II, o que confirma o potencial envolvimento da MMP-9 na hemofilia A;

iii) a diminuição da atividade da MMP-9, apesar de estar presente em maior quantidade no soro dos pacientes hemofílicos, sugere o envolvimento do inibidor TIMP-1 na regulação da sua atividade.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam uma associação entre as proteases do soro, em particular da MMP-9, e a hemofilia A que será importante aprofundar no futuro de forma a melhor compreender a adaptação do proteoma sérico em resposta ao défice de um fator da cascata da coagulação e assim propor novas vias de diagnóstico ou alvos terapêuticos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Practice Guidelines for the Molecular Diagnosis of Hemophilia A, (2011).
2. Practice Guidelines for the Molecular Diagnosis of Hemophilia B (2011).
3. Pruthi RK. Hemophilia: a practical approach to genetic testing. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic. 2005;80(11):1485-99.
4. Soucie JM, Evatt B, Jackson D. Occurrence of hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. American journal of hematology. 1998;59(4):288-94.
5. Konkle BA JN, Nakaya Fletcher SM, et al. Hemophilia A. 2000 Sep 21 [Updated 2011 Sep 22]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1404/.
6. van den Berg HM, De Groot PH, Fischer K. Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007;5 Suppl 1:151-6.
7. Tantawy AAG. Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2010;11(2):105-14.
8. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Favaloro EJ. Inherited disorders of blood coagulation. Annals of medicine. 2012;44(5):405-18.
9. Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. Thrombosis and haemostasis. 1999;82(2):165-74.
10. Kumar VA, Abul K.; Fausto, Nelson; Mitchell, Richard;. Robbins Basic Pathology. 8th ed: Saunders Elsevier 2007. 900 p.
11. Adams RL, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. Nephrology (Carlton). 2009;14(5):462-70.
12. Pallister C.J. WMS. Haematology. 2nd ed: Scion Publishing Ltd.; 2010. 400 p.
13. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. Nature. 1964;202:498-9.
14. Dahlback B. Blood coagulation. Lancet. 2000;355(9215):1627-32.
15. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. Hematology/oncology clinics of North America. 2007;21(1):1-11.
16. Bungay SD. Modelling the effect of amplification pathway factors on thrombin generation: A comparison of hemophilias. Transfusion and apheresis science :

official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis. 2008;38(1):41-7.

17. Perez-Gomez F, Bover R. [The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage]. Revista espanola de cardiologia. 2007;60(12):1217-9.
18. Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation. Blood. 1982;60(6):1353-8.
19. Kalafatis M, Swords NA, Rand MD, Mann KG. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. Biochimica et biophysica acta. 1994;1227(3):113-29.
20. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007;27(8):1687-93.
21. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2006;26(1):41-8.
22. Furie B, Furie BC. In vivo thrombus formation. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007;5 Suppl 1:12-7.
23. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. Biochemistry Biokhimiia. 2002;67(1):3-12.
24. Riewald M, Ruf W. Critical Care. 2003;7(2):123.
25. Greer P. FJ, Lukens JN., Rodgers GM., Paraskevas F.,, B. G. Wintrobe's Clinical Hematology. 11th ed. Health WK, editor. Philadelphia,PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
26. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977;74(12):5260-4.
27. Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. Blood cells, molecules & diseases. 2006;36(2):108-17.
28. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2003;23(1):17-25.

29. Bilodeau ML, Hamm HE. Regulation of protease-activated receptor (PAR) 1 and PAR4 signaling in human platelets by compartmentalized cyclic nucleotide actions. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2007;322(2):778-88.
30. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood reviews. 2007;21(3):157-71.
31. Kempton CL, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005;25(4):861-6.
32. Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. Nature. 2002;415(6868):175-9.
33. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. Blood. 2000;95(5):1694-702.
34. Hoffman R. BE, Shattil S.J., Furie Bruce, Cohen H. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th ed. Elsevier, editor. Philadelphia,PA: Churchill Livingstone; 2005.
35. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis. Pathophysiology of haemostasis and thrombosis. 2003;33(5-6):375-81.
36. Allen DH, Tracy PB. Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. The Journal of biological chemistry. 1995;270(3):1408-15.
37. Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, Sawicki G, Wozniak M, Radomski MW, Davidge ST. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. Thrombosis and haemostasis. 1999;82(6):1730-5.
38. Choi WS, Jeon OH, Kim HH, Kim DS. MMP-2 regulates human platelet activation by interacting with integrin alphaIIbbeta3. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2008;6(3):517-23.
39. Belaaouaj AA, Li A, Wun TC, Welgus HG, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor. Effects on coagulation. The Journal of biological chemistry. 2000;275(35):27123-8.

40. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circulation research. 2003;92(8):827-39.
41. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. The Journal of biological chemistry. 1999;274(31):21491-4.
42. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annual review of cell and developmental biology. 2001;17:463-516.
43. Woessner JF, Jr. The family of matrix metalloproteinases. Annals of the New York Academy of Sciences. 1994;732:11-21.
44. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. BioTechniques. 2005;38(1):73-83.
45. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. The Journal of biological chemistry. 1995;270(11):5872-6.
46. Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. FEBS letters. 2001;503(2-3):158-62.
47. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). Biochemistry. 1990;29(44):10261-70.
48. Uria JA, Lopez-Otin C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. Cancer research. 2000;60(17):4745-51.
49. Park HI, Ni J, Gerkema FE, Liu D, Belozerov VE, Sang QX. Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. The Journal of biological chemistry. 2000;275(27):20540-4.
50. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. The Journal of biological chemistry. 1997;272(4):2446-51.

51. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. The Journal of biological chemistry. 1993;268(32):23824-9.
52. Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(9):3942-6.
53. Pendas AM, Knauper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, Lopez-Otin C. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. The Journal of biological chemistry. 1997;272(7):4281-6.
54. Li W, Gibson CW, Abrams WR, Andrews DW, DenBesten PK. Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2001;19(8):755-60.
55. Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R. The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. Immunology letters. 1997;57(1-3):83-8.
56. Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. Gene. 2001;265(1-2):87-93.
57. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. The Journal of biological chemistry. 2001;276(13):10134-44.
58. Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. The Journal of investigative dermatology. 2002;119(1):14-21.
59. Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. Nature methods. 2013;10(3):211-20.
60. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. Cancer research. 1996;56(1):190-6.

61. Curino A, Patel V, Nielsen BS, Iskander AJ, Ensley JF, Yoo GH, Holsinger FC, Myers JN, El-Nagaar A, Kellman RM, Shillitoe EJ, Molinolo AA, Gutkind JS, Bugge TH. Detection of plasminogen activators in oral cancer by laser capture microdissection combined with zymography. Oral oncology. 2004;40(10):1026-32.
62. Li L, Chen P, Ling Y, Song X, Lu Z, He Q, Li Z, Lu N, Guo Q. Inhibitory effects of GL-V9 on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-2/9. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2011;43(5):393-9.
63. Wang Z, Kong L, Kang J, Vaughn DM, Bush GD, Walding AL, Grigorian AA, Robinson JS, Jr., Nakayama DK. Interleukin-lbeta induces migration of rat arterial smooth muscle cells through a mechanism involving increased matrix metalloproteinase-2 activity. The Journal of surgical research. 2011;169(2):328-36.
64. Fontana V, Silva PS, Belo VA, Antonio RC, Ceron CS, Biagi C, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. Basic & clinical pharmacology & toxicology. 2011;109(2):130-7.
65. Knier B, Cordasic N, Klanke B, Heusinger-Ribeiro J, Daniel C, Veelken R, Hartner A, Hilgers KF. Effect of the plasminogen-plasmin system on hypertensive renal and cardiac damage. Journal of hypertension. 2011;29(8):1602-12.
66. Todorova L, Bjermer L, Westergren-Thorsson G, Miller-Larsson A. TGFbeta-induced matrix production by bronchial fibroblasts in asthma: budesonide and formoterol effects. Respiratory medicine. 2011;105(9):1296-307.
67. Huang CY, Lai KY, Hung LF, Wu WL, Liu FC, Ho LJ. Advanced glycation end products cause collagen II reduction by activating Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in porcine chondrocytes. Rheumatology (Oxford, England). 2011;50(8):1379-89.
68. Paemen L, Olsson T, Söderström M, van Damme J, Opdenakker G. Evaluation of gelatinases and IL-6 in the cerebrospinal fluid of patients with optic neuritis, multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. European Journal of Neurology. 1994;1(1):55-63.

69. Caseiro A, Ferreira R, Quintaneiro C, Pereira A, Marinheiro R, Vitorino R, Amado F. Protease profiling of different biofluids in type 1 diabetes mellitus. Clinical biochemistry. 2012;45(18):1613-9.
70. Hoffbrand AVM, P.A.H.; Pettit, J.E.;. Essential Hematology. 5th ed: Blackwell Publishing Ltd; 2006. 382 p.
71. Kliegman RMB, Richard E.; Jenson, Hal B.; Stanton, Bonita F.;. Nelson Textbook of Pediatrics. 18th ed. Sanunders, editor. 1600 John F. Kennedy Blvd. Ste 1800, Philadelphia, PA 19103-2899: Elsevier; 2007 August 13, 2007.
72. Ma AD, Carrizosa D. Acquired factor VIII inhibitors: pathophysiology and treatment. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2006:432-7.
73. Sallah S, Wan JY. Inhibitors against factor VIII in patients with cancer. Analysis of 41 patients. Cancer. 2001;91(6):1067-74.
74. Hosoya Y, Matsumura M, Madoiwa S, Zuiki T, Matsumoto S, Nunomiya S, Lefor A, Sata N, Yasuda Y. Acquired hemophilia A caused by factor VIII inhibitors: report of a case. Surgery today. 2012.
75. Kulkarni R, Soucie JM, Lusher J, Presley R, Shapiro A, Gill J, Manco-Johnson M, Koerper M, Mathew P, Abshire T, Dimichele D, Hoots K, Janco R, Nugent D, Geraghty S, Evatt B. Sites of initial bleeding episodes, mode of delivery and age of diagnosis in babies with haemophilia diagnosed before the age of 2 years: a report from The Centers for Disease Control and Prevention's (CDC) Universal Data Collection (UDC) project. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2009;15(6):1281-90.
76. Nair SC, Dargaud Y, Chitlur M, Srivastava A. Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2010;16 Suppl 5:85-92.
77. Aledort LM, Levine PH, Hilgartner M, Blatt P, Spero JA, Goldberg JD, Bianchi L, Desmet V, Scheuer P, Popper H. A study of liver biopsies and liver disease among hemophiliacs. Blood. 1985;66(2):367-72.
78. Soucie JM, Symons Jt, Evatt B, Brettler D, Huszti H, Linden J. Home-based factor infusion therapy and hospitalization for bleeding complications among males with

haemophilia. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2001;7(2):198-206.

79. Soucie JM, Nuss R, Evatt B, Abdelhak A, Cowan L, Hill H, Kolakoski M, Wilber N. Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. Blood. 2000;96(2):437-42.
80. Philipp C. The aging patient with hemophilia: complications, comorbidities, and management issues. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2010;2010:191-6.
81. Eckhardt CL, Menke LA, van Ommen CH, van der Lee JH, Geskus RB, Kamphuisen PW, Peters M, Fijnvandraat K. Intensive peri-operative use of factor VIII and the Arg593-->Cys mutation are risk factors for inhibitor development in mild/moderate hemophilia A. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2009;7(6):930-7.
82. Darby SC, Keeling DM, Spooner RJ, Wan Kan S, Giangrande PL, Collins PW, Hill FG, Hay CR. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2004;2(7):1047-54.
83. Siboni SM, Mannucci PM, Gringeri A, Franchini M, Tagliaferri A, Ferretti M, Tradati FC, Santagostino E, von Mackensen S. Health status and quality of life of elderly persons with severe hemophilia born before the advent of modern replacement therapy. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2009;7(5):780-6.
84. Mauser-Bunschoten EP, Fransen Van De Putte DE, Schutgens RE. Co-morbidity in the ageing haemophilia patient: the down side of increased life expectancy. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2009;15(4):853-63.
85. Plug I, Van Der Bom JG, Peters M, Mauser-Bunschoten EP, De Goede-Bolder A, Heijnen L, Smit C, Willemse J, Rosendaal FR. Mortality and causes of death in patients with hemophilia, 1992-2001: a prospective cohort study. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2006;4(3):510-6.
86. Franchini M, Lippi G, Montagnana M, Targher G, Zaffanello M, Salvagno GL, Rivolta GF, Perna CD, Tagliaferri A. Hemophilia and cancer: a new challenge for hemophilia centers. Cancer treatment reviews. 2009;35(4):374-7.

87. Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. International journal of hematology. 2006;83(2):96-102.
88. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. Blood. 1998;92(11):3983-96.
89. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Molecular pathology : MP. 2002;55(2):127-44.
90. Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2005;11(4):387-97.
91. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HH, Jr., Negrier C, Vinciguerra C, Gitschier J, Goossens M, Girodon E, Ghanem N, Plassa F, Lavergne JM, Vidaud M, Costa JM, Laurian Y, Lin SW, Lin SR, Shen MC, Lillicrap D, Taylor SA, Windsor S, Valleix SV, Nafa K, Sultan Y, Delpech M, Vnencak-Jones CL, Phillips JA, 3rd, Ljung RC, Koumbarelis E, Gialeraki A, Mandalaki T, Jenkins PV, Collins PW, Pasi KJ, Goodeve A, Peake I, Preston FE, Schwartz M, Scheibel E, Ingerslev J, Cooper DN, Millar DS, Kakkar VV, Giannelli F, Naylor JA, Tizzano EF, Baiget M, Domenech M, Altisent C, Tusell J, Beneyto M, Lorenzo JI, Gaucher C, Mazurier C, Peerlinck K, Matthijs G, Cassiman JJ, Vermylen J, Mori PG, Acquila M, Caprino D, Inaba H. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. Blood. 1995;86(6):2206-12.
92. Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. Nature genetics. 1993;5(3):236-41.
93. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. Blood. 2002;99(1):168-74.
94. Cumming AM. The factor VIII gene intron 1 inversion mutation: prevalence in severe hemophilia A patients in the UK. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2004;2(1):205-6.

95. Verbruggen B, Meijer P, Novakova I, Van Heerde W. Diagnosis of factor VIII deficiency. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2008;14 Suppl 3:76-82.
96. Hedner U, Ginsburg D, Lusher JM, High KA. Congenital Hemorrhagic Disorders: New Insights into the Pathophysiology and Treatment of Hemophilia. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2000:241-65.
97. Hoyer LW. Hemophilia A. The New England journal of medicine. 1994;330(1):38-47.
98. Mazurier C. von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. Thrombosis and haemostasis. 1992;67(4):391-6.
99. Mazurier C, Meyer D. Factor VIII binding assay of von Willebrand factor and the diagnosis of type 2N von Willebrand disease--results of an international survey. On behalf of the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. Thrombosis and haemostasis. 1996;76(2):270-4.
100. Rodeghiero F, Ruiz-Saez A, Bolton-Maggs PH, Hayward CP, Nair SC, Srivastava A. Laboratory issues in bleeding disorders. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2008;14 Suppl 3:93-103.
101. Franchini M, Favaloro EJ, Lippi G. Mild hemophilia A. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2010;8(3):421-32.
102. Peerlinck K, Jacquemin M. Mild haemophilia: a disease with many faces and many unexpected pitfalls. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2010;16 Suppl 5:100-6.
103. Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, Yoshida K, Tanaka I, Sakurai Y, Giles AR, Yoshioka A. The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2006;4(2):377-84.
104. Habart D. [Molecular diagnosis of haemophilia A in clinical practice]. Casopis lekaru ceskych. 2005;144(12):795-800.
105. Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, Thompson AR, Goodeve A, Garagiola I, Lavoretano S, Menegatti M, Palla R,

Spreafico M, Tagliabue L, Asselta R, Duga S, Mannucci PM. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2006;12 Suppl 3:82-9.

106. Goodeve A. Molecular genetic testing of hemophilia A. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2008;34(6):491-501.
107. Reitter S, Sturn R, Horvath B, Freitag R, Male C, Muntean W, Streif W, Pabinger I, Mannhalter C. Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austria. Thrombosis and haemostasis. 2010;104(1):78-85.
108. Levine PH. Efficacy of self-therapy in hemophilia. A study of 72 patients with hemophilia A and B. The New England journal of medicine. 1974;291(26):1381-4.
109. Mannucci PM, Mendolicchio L, Gringeri A. Use of prophylaxis to prevent complications of hemophilia. Advances in experimental medicine and biology. 2001;489:59-64.
110. Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, Rocino A, Coppola A, Di Minno G, Salvatore F. Haemophilia A: molecular insights. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC. 2007;45(4):450-61.
111. Oldenburg J, Schroder J, Graw J, Ivaskevicius V, Brackmann HH, Schramm W, Muller CR, Seifried E, Schwaab R. [Significance of mutation analysis in patients with haemophilia A]. Hamostaseologie. 2003;23(1):6-12.
112. Franchini M, Montagnana M, Targher G, Veneri D, Zaffanello M, Salvagno GL, Manzato F, Lippi G. Interpatient phenotypic inconsistency in severe congenital hemophilia: a systematic review of the role of inherited thrombophilia. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2009;35(3):307-12.
113. Jayandharan GR, Srivastava A. The phenotypic heterogeneity of severe hemophilia. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2008;34(1):128-41.
114. Franchini M, Mannucci PM. Interactions between genotype and phenotype in bleeding and thrombosis. Haematologica. 2008;93(5):649-52.
115. Ghosh K, Shetty S, Mohanty D. Milder clinical presentation of haemophilia A with severe deficiency of factor VIII as measured by one-stage assay. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2001;7(1):9-12.
116. Franchini M, Lippi G. Factor V Leiden and hemophilia. Thrombosis research. 2010;125(2):119-23.

117. Grunewald M, Siegemund A, Grunewald A, Konegan A, Koksch M, Griesshammer M. Paradoxical hyperfibrinolysis is associated with a more intensely haemorrhagic phenotype in severe congenital haemophilia. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2002;8(6):768-75.
118. Shetty S, Vora S, Kulkarni B, Mota L, Vijapurkar M, Quadros L, Ghosh K. Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. British journal of haematology. 2007;138(4):541-4.
119. Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. Blood. 2004;103(10):3624-34.
120. Stulik J, Tichy M, Kovarova H. Two-dimensional gel electrophoresis of four serum samples from patients with IgD myeloma. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 1993;218(2):149-58.
121. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. Blood. 2001;98(13):3626-34.
122. Zhukov TA, Johanson RA, Cantor AB, Clark RA, Tockman MS. Discovery of distinct protein profiles specific for lung tumors and pre-malignant lung lesions by SELDI mass spectrometry. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands). 2003;40(3):267-79.
123. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, Moore JH, Caprioli RM, Carbone DP. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. Lancet. 2003;362(9382):433-9.
124. Taguchi A, Hanash SM. Unleashing the Power of Proteomics to Develop Blood-Based Cancer Markers. Clinical chemistry. 2012.
125. Li L, Xu Y, Yu CX. Proteomic analysis of serum of women with elevated Ca-125 to differentiate malignant from benign ovarian tumors. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2012;13(7):3265-70.
126. Zhou D, Luo N, Wu Q, You Y, Zhai Z, Mou Z, Wu Y, Hao F. Transcellular distribution heterogeneity of Annexin A5 represents a protective response to lupus-

related thrombophilia: a pilot Proteomics-based study. Biochemical and biophysical research communications. 2012;420(2):357-63.

127. Baggerman G, Vierstraete E, De Loof A, Schoofs L. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. Combinatorial chemistry & high throughput screening. 2005;8(8):669-77.
128. Roepstorff P. Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. Protein & cell. 2012;3(9):641-7.
129. Adkins JN. Toward a Human Blood Serum Proteome: Analysis By Multidimensional Separation Coupled With Mass Spectrometry. Molecular & Cellular Proteomics. 2002;1(12):947-55.
130. Anderson NL. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. Molecular & Cellular Proteomics. 2002;1(11):845-67.
131. Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD. Proteomics approaches to biomarker detection. Briefings in functional genomics & proteomics. 2005;4(1):69-75.
132. Basilico F, Nardini I, Mori F, Brambilla E, Benazzi L, De Palma A, Rosti E, Farina C, Mauri P. Characterization of factor VIII pharmaceutical preparations by means of MudPIT proteomic approach. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2010;53(1):50-7.
133. Monetti C, Rottensteiner H, Gritsch H, Weber A, Scheiflinger F, Turecek PL. Structural analysis of the recombinant therapeutic product rFVIII and its PEGylated variants using 2-D DIGE. Electrophoresis. 2011;32(11):1292-301.
134. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
135. Padrao AI, Carvalho T, Vitorino R, Alves RM, Caseiro A, Duarte JA, Ferreira R, Amado F. Impaired protein quality control system underlies mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. Biochim Biophys Acta. 2012;1822(8):1189-97.
136. Makowski GS, Ramsby ML. Concentrations of circulating matrix metalloproteinase 9 inversely correlate with autoimmune antibodies to double stranded DNA: implications for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus. Molecular pathology : MP. 2003;56(4):244-7.

137. Mannello F. Effects of blood collection methods on gelatin zymography of matrix metalloproteinases. Clinical chemistry. 2003;49(2):339-40.
138. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguez P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. Nucleic acids research. 2011;39(Database issue):D561-8.
139. Wu CY, Wu MS, Chiang EP, Chen YJ, Chen CJ, Chi NH, Shih YT, Chen GH, Lin JT. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is better than serum matrix metalloproteinase-9 level to predict gastric cancer evolution. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007;13(7):2054-60.
140. Dufour A, Zucker S, Sampson NS, Kuscu C, Cao J. Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration: design of inhibitory peptides. The Journal of biological chemistry. 2010;285(46):35944-56.
141. Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society. 2012;50(1):12-9.
142. Radenkovic S, Konjevic G, Jurisic V, Karadzic K, Nikitovic M, Gopcevic K. Values of MMP-2 and MMP-9 in Tumor Tissue of Basal-Like Breast Cancer Patients. Cell biochemistry and biophysics. 2013.
143. Wagsater D, Zhu C, Bjorkegren J, Skogsberg J, Eriksson P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. International journal of molecular medicine. 2011;28(2):247-53.
144. Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR, Arbeit LA. Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. Clinical immunology and immunopathology. 1996;78(2):161-71.
145. Tajima T, Yoshida E, Yamashita A, Ohmura S, Tomitaka Y, Sugiki M, Asada Y, Maruyama M. Hemoglobin stimulates the expression of matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9 by synovial cells: a possible cause of joint damage after intra-

articular hemorrhage. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2005;23(4):891-8.

146. Capone F, Guerriero E, Sorice A, Maio P, Colonna G, Castello G, Costantini S. Characterization of metalloproteinases, oxidative status and inflammation levels in the different stages of fibrosis in HCV patients. Clinical biochemistry. 2012;45(7-8):525-9.
147. Castellazzi M, Tamborino C, Fainardi E, Manfrinato MC, Granieri E, Dallocchio F, Bellini T. Effects of anticoagulants on the activity of gelatinases. Clinical biochemistry. 2007;40(16-17):1272-6.
148. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. American journal of respiratory and critical care medicine. 2000;162(4 Pt 1):1355-60.
149. Chang CJ, Hsu LA, Ko YH, Chen PL, Chuang YT, Lin CY, Liao CH, Pang JH. Thrombin regulates matrix metalloproteinase-9 expression in human monocytes. Biochemical and biophysical research communications. 2009;385(2):241-6.