

HEMOFILIA A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, TESTES LABORATORIAIS
EM SEIS FAMÍLIAS E DETECÇÃO DE PORTADORAS.

Eliete Motta e Nadir Ferrari

*Departamento de Biologia, Universidade Federal de
Santa Catarina - Florianópolis, SC - Brasil.*

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram realizar: 1. Uma revisão bibliográfica sobre hemofilia A. 2. O diagnóstico de hemofílicos A através das dosagens de FVIII:C e FVIII:RAg. 3. O estudo genético das famílias de hemofílicos A através da análise de genealogias. 4. A detecção de portadoras de hemofilia A através da análise de genealogias e de testes laboratoriais. Foram testadas 24 pessoas de 6 genealogias, sendo 9 hemofílicos A, 8 portadoras prováveis e 7 portadoras certas. Uma amostra controle de 25 mulheres saudáveis foi também testada, apresentando nível médio de FVIII:C de 97 \pm 26% e de FVIII:RAg de 99 \pm 19%. Os níveis médios de FVIII:C e FVIII:RAg na amostra de portadoras certas foram de 77 \pm 31% e 132 \pm 49% respectivamente. Os métodos utilizados neste trabalho, para detecção de portadoras, não atendem completamente as expectativas das pessoas que procuram o aconselhamento genético, mas são os únicos viáveis de serem realizados em condições brasileiras. Técnicas mais sofisticadas, tais como a análise de DNA, deveriam ser implantadas a médio prazo.

ABSTRACT

The aim of the present paper was to review the literature on hemophilia A, to diagnose hemophiliacs through FVIII:C and FVIII:RAg assays, to study their families and to detect heterozygotes for the

condition. Twenty four persons were tested, from 6 families: 9 hemophiliacs A, 8 probable carriers and 7 definite carriers. Twenty five healthy women were also tested, with mean levels of FVIII:C and FVIII: RAg of $97 \pm 26\%$ respectively. The mean levels of FVIII:C and FVIII: RAg for the definite carriers were $77 \pm 31\%$ and $132 \pm 49\%$ respectively. The methodology used in the present work for carrier detection is not ideal and DNA analysis should be introduced in Brazilian genetic counselling services.

Key words: Hemophilia A, Carrier Detection, Genetic Counselling.

INTRODUÇÃO

A hemofilia A é causada pela deficiência de uma proteína de coagulação chamada FVIII:C (Fator VIII pró-coagulante). Indivíduos afetados sofrem episódios de sangramento e são tratados com concentrados ricos em FVIII:C derivado do plasma humano (Wood *et al.*, 1984).

A caracterização da herança paterna da hemofilia (geralmente são homens são afetados, mas mulheres podem ser portadoras) foi feita pela primeira vez no começo do século XIX (Ingram, 1975; Lawn e Vehar, 1986).

Vários nomes foram usados para descrever esta condição: Hemorragia, Idiossincrasia Hemorrágica, Hematofilia e Doença de Sangramento (Ingram, 1975). Hoje as nomenclaturas utilizadas são as seguintes: Hemofilia A e Deficiência de FVIII:C.

A história da terapêutica transfusional está associada intimamente à evolução do conhecimento sobre hemofilia A. Addis, em 1911, e Howell, em 1914 (Apud Ingram, 1975), foram os primeiros a reconhecer que o defeito do hemofílico A poderia ser corrigido com uma substância existente no sangue normal, mais tarde chamada FVIII:C. Foi na década de 50 que se desenvolveram técnicas de dosagem desta substância que se sabia estava no plasma sanguíneo (Ingram, 1975).

Em 1965 houve um marco na terapêutica da hemofilia A, quando Pool e Shannon descobriram o crioprecipitado (Ingram, 1975), ou seja, a possibilidade de concentrar o FVIII:C através do congelamento rápido e descongelamento lento do plasma.

1.1 - MECANISMO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A coagulação sanguínea, juntamente com a vasoconstrição e a aglutinação plaquetária é o mecanismo utilizado pelo organismo para

Hemofilia A

controlar uma hemorragia. Este mecanismo ocorre pela ativação e interação de proteínas plasmáticas (fatores) presentes no plasma sanguíneo na forma de precursores inativos. A interação destes fatores ocorre de forma sequencial e é indicada quando um vaso sanguíneo é danificado. O processo de coagulação pode ocorrer por dois mecanismos, denominados VIA INTRÍNSECA e VIA EXTRÍNSECA (Fig. 01).

A via de coagulação intrínseca é iniciada quando o fator XII é ativado pelo rompimento de um vaso. Este, ativado, age sobre o fator XI que, subsequentemente, age sobre o fator IX, que por sua vez ativa o fator X. A ativação do fator X requer ions cálcio, fosfolipídeos e fator VIII, que age como cofator. O fator X, ativado por este complexo, age sobre o fator II (protrombina), ativando-o. Esta reação requer ions cálcio, fosfolipídeos e fator V, que age como cofator. O fator II ativado (trombina), age sobre o fator I (fibrinogênio), transformando-o em fibrina.

A via de coagulação extrínseca se inicia quando o tecido lesado libera tromboplastina (fator tecidual) a qual acelera a ativação do fator X pelo fator VII ativado.

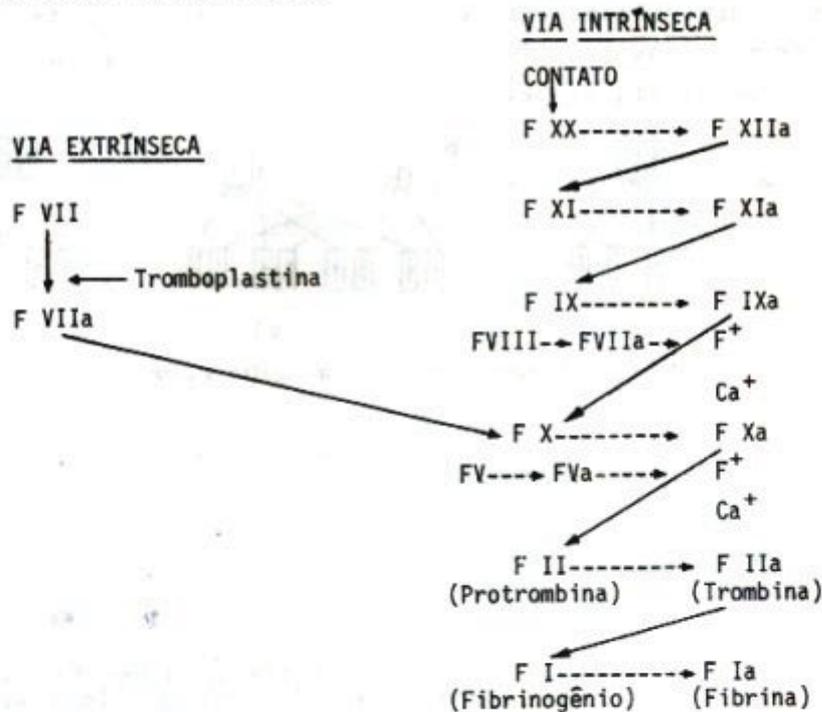


Fig. 1 - Vias Intrínseca e Extrínseca da coagulação. A via intrínseca envolve fatores que estão normalmente na circulação, enquanto a via extrínseca envolve fator tecidual (Tromboplastina). F⁺ = fosfolipídeo - Ca⁺⁺ = ions cálcio.

I.2 - HERANÇA DA HEMOFILIA A

Tanto a hemofilia A quanto a hemofilia B apresentam padrão de herança recessivo e ligado ao sexo. A hemofilia A ocorre com uma frequência de 1:10.000 homens (Lawn e Vehar, 1986; Gitschier *et al.*, 1985; Toole *et al.*, 1984; Roisemberg, 1971; Brownlee e Rizza, 1984) e a hemofilia B com 1:30.000 (Giannelli *et al.*, 1984; Ferrari, 1984; Gitschier *et al.*, 1984).

O gene para a hemofilia A está localizado no cromossomo X e a transmissão desta doença pode ser explicada da seguinte forma: células femininas contêm dois cromossomos X, células masculinas contêm um cromossomo X e um Y. Deste modo, um homem tem somente um gene para o fator VIII herdado de sua mãe; portanto, ele será hemofílico se o gene for defeituoso. As mulheres têm dois genes para o fator VIII, um herdado do pai e outro herdado da mãe e só serão hemofílicas quando ambos os cromossomos X contiverem o gene defeituoso. Em consequência disto, a mulher portadora apresenta fenótipo normal, na maioria dos casos, uma vez que a característica hemofilia é recessiva em relação à condição normal. As probabilidades de casais afetados terem filhos hemofílicos, filhas portadoras e/ou normais estão ilustrados na figura 02.

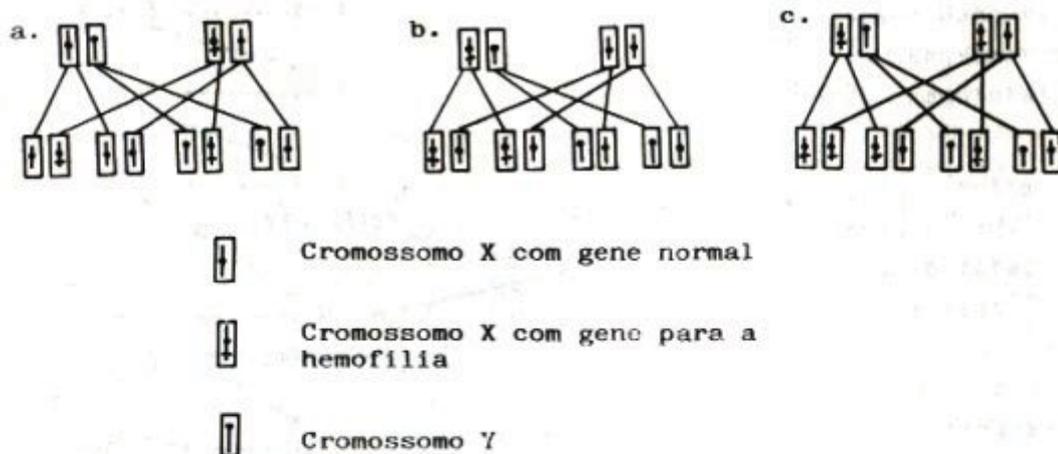
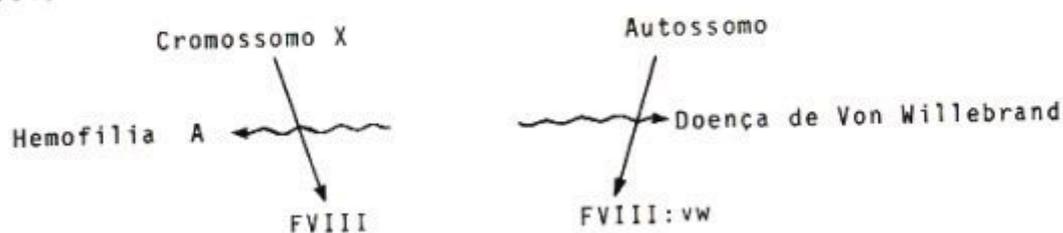


Fig. 2 - Riscos de Recorrência para hemofilia A.
 a. Um homem normal com uma mulher heterozigota têm um risco de 1/4 de terem um filho afetado.
 b. Um homem afetado com uma mulher normal terão filhos normais e filhas heterozigotas.
 c. Um homem afetado com uma mulher heterozigota terão metade dos filhos (homens e mulheres) afetados.

Hemofilia A

I.3 - FATOR VIII - ESTRUTURA

O Fator VIII é uma proteína plasmática complexa, composta basicamente de duas partes: uma que atua no processo de coagulação, chamada FVIII pró-coagulante, sintetizada sob controle de um gene no cromossomo X e outra responsável pela agregação plaquetária, chamada FVIII:vw (Fator VIII Von Willebrand), sintetizada sob controle de um gene autossômico, conforme esquema abaixo, segundo Biggs e Rizza, 1984.



O gene para FVIII:C está localizado na região 28 qter do braço longo do cromossomo X (Lawn e Vehar, 1986 e Gilgenkrantz *et al.*, 1986), ocupando aproximadamente 0,1% deste cromossomo (Brownlee e Rizza, 1984; Lawn, 1985).

A atividade antigênica da molécula FVIII:C é chamada FVIII:CAg e a atividade antigênica da molécula FVIII:vw é chamada FVIII:RAg. Na hemofilia A, ocorre uma deficiência de FVIII:C e FVIII:CAg. Na doença de Von Willebrand ocorre uma deficiência de FVIII:RAg e FVIII:vw.

I.4 - FATOR VIII:C - LOCAL DE SÍNTESE

O local de síntese do FVIII:C tem sido longamente investigado. Vários estudos sugerem o fígado como principal local de síntese (Toole apud Lawn e Vehar, 1986; Wion *et al.*, 1985; Gitschier *et al.*, 1984; Rall *et al.*, 1985; Toole *et al.*, 1984; Zelechowska *et al.*, 1985). Entretanto, fontes extra-hepáticas tem sido evidenciadas, tais como o baço (Lawn e Vehar, 1986; Wion *et al.*, 1985; Rall *et al.*, 1985), pulmão (Wion *et al.*, 1985; Rall *et al.*, 1985; Lawn e Vehar, 1986), rim (Rall *et al.*, 1985; Wion *et al.*, 1985), linfonodos (Toole apud Lawn e Vehar, 1986; Wion *et al.*, 1985; Rall *et al.*, 1985; Toole *et al.*, 1984) e placenta (Rall *et al.*, 1985).

Por outro lado, a síntese de FVIII:RAg ocorre nas células endoteliais e megacariócitos (Rizza *et al.*, 1984; Wion *et al.*, 1985; Zelechowska *et al.*, 1985).

I.5 - PURIFICAÇÃO DE FATOR VIII:C PARA TRATAMENTO DE HEMOFILIA A

A purificação do FVIII:C a partir do plasma normal é dificultada pela sua baixa concentração, pela extrema sensibilidade à degradação, por proteases e pela forte associação com formas poliméricas mais abundantes, como FVIII:vw (Toole *et al.*, 1984).

Um dos métodos de purificação do FVIII:C chama-se crioprecipitação. Este procedimento leva à formação de um precipitado rico em FVIII:C, fibrinogênio, FXII e FVIII:vw o qual, redissolvido em solução salina isotônica, pode ser usado no tratamento de pacientes com deficiência dessas proteínas (Johnson, Afonso e Willians, 1976; Apud Ferrari, 1977).

Este método de obtenção de FVIII:C, apesar de bastante simples, vale ressaltar, não elimina a possibilidade de transmissão de agentes patogênicos, uma vez que é feito de um pool de plasmas provenientes de vários doadores, e que, portanto, os pacientes tratados com este crioprecipitado correm o risco de serem contaminados.

Na tentativa de se produzir FVIII:C puro e homogêneo, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido de se obter um concentrado eficaz e livre de contaminação.

I.6 - APLICAÇÕES DA GENÉTICA MOLECULAR NO ESTUDO DA HEMOFILIA A

I.6.1 - Análise da Estrutura Molecular do FVIII:C

Devido às dificuldades na purificação do FVIII:C, sua estrutura molecular permaneceu desconhecida até recentemente.

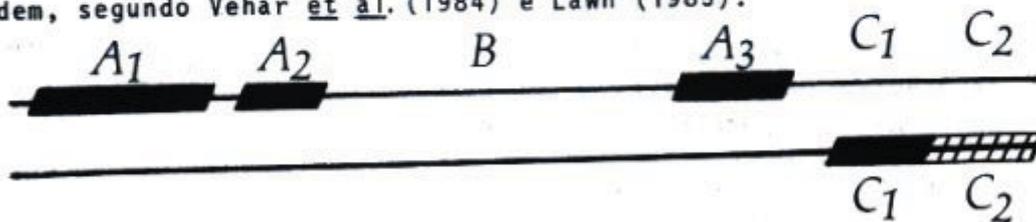
O FVIII:C é uma proteína extremamente lábil, com peso molecular variando entre 100.000 e 360.000 (Toole *et al.*, 1984 e Wood *et al.*, 1984); sua concentração no plasma é muito baixa (200×10^{-9} mg/ml, Wood *et al.*, 1984), não só em relação a outros fatores de coagulação, como também em relação a outras proteínas plasmáticas. Corresponde, por exemplo, a uma milionésima parte da concentração molar da albumina (Wood *et al.*, 1984; Lawn *et al.*, 1986). Assim, para se obter um micrograma de FVIII:C puro, é necessário 1kg de crioprecipitado proveniente de 500 doações.

Estas dificuldades foram finalmente suplantadas em 1980, quando a estrutura da molécula de FVIII:C e a estrutura do gene foram esclarecidas. Segundo vários autores (Gitschier *et al.*, 1986; Lawn e Vehar, 1986; Vehar *et al.*, 1984; Antonarakis *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 1984; Toole *et al.*, 1984) o gene para FVIII:C possui 186 mil bases (186

Hemofilia A

Kilobases). Seus 26 exons e 25 íntrons codificam uma proteína com 2351 aminoácidos e massa molecular de 267.036.

A análise da sequência de aminoácidos da molécula de FVIII:C revelou que esta proteína é formada de segmentos repetitivos similares. Três desses segmentos, com aproximadamente 350 aminoácidos cada, são denominados cadeia A; um único segmento de 980 aminoácidos é chamado cadeia B; e a região da carboxi-terminal, com 150 aminoácidos chama-se cadeia C. Esses segmentos estão arranjados na seguinte ordem, segundo Vehar *et al.* (1984) e Lawn (1985):



I.6.2 - Produção de FVIII:C

No passado, a vida média dos hemofílicos era de menos de 20 anos. Entre 1950 e 1970, entretanto, o tratamento dos hemofílicos evoluiu da transfusão de plasma total para a transfusão de crioprecipitado (Wood *et al.*, 1984) e mais tarde para a injeção dos produtos liofilizados com concentrações maiores de FVIII:C.

Atualmente muitos esforços estão sendo empregados na fabricação de FVIII:C por meio da engenharia genética. A aplicação da biotecnologia na tentativa de se acabar com os riscos dos hemofílicos contraírem doenças virais por transfusão, consiste na utilização de dois tipos de tecnologia: Clonagem de DNA e Uso de Anticorpos Monoclonais.

I.6.2.1 - Clonagem de DNA

Baseia-se na introdução do gene desejado no material genético de uma célula hospedeira, através dos seguintes passos: 1. Purificação e sequenciamento da proteína; 2. Sequenciamento do DNA correspondente; 3. Síntese de um segmento pequeno de DNA, homólogo ao DNA correspondente (DNA sonda); 4. Inserção do DNA sonda em um vetor (plasmídeo ou fago); 5. Inserção do vetor em uma cultura de *E. coli*; 6. Extração de DNA total de células humanas (linfócitos); 7. Geração de fragmentos de DNA com enzimas de restrição; 8. Incorporação desses fragmentos em vetores; 9. Introdução dos vetores num organismo hospedeiro, usualmente a *E. coli*.

Os passos descritos nos itens 6 a 9 levam à obtenção das chama-

das bibliotecas genômicas. O crescimento do vetor hospedeiro em meio de cultura gera clones do organismo e portanto múltiplas cópias dos fragmentos de DNA incorporados nos vetores.

Essa biblioteca genômica é utilizada para a seleção de clones contendo o fragmento de DNA desejado. As enzimas de restrição (endonucleases) são utilizadas para produzir fragmentos de DNA porque clivam o DNA em pontos de sequências específicas.

O fragmento de DNA incorporado no vetor é chamado molécula híbrida ou recombinante. A técnica mais usada para identificar clones com fragmentos de DNA específico é a hidridização *in situ* com o DNA sonda radioativo, obtido através dos passos descritos nos itens 1 a 5, usando o método SOUTHERN Blot (Southern, 1975).

A clonagem do gene para FVIII:C foi realizada por este método, e a expressão desse gene no organismo hospedeiro levará à produção em grande escala da proteína FVIII:C (Lawn *et al.*, 1986).

O FVIII:C obtido através desse processo tem sido utilizado em cães hemofílicos, contudo ainda não foram feitos estudos clínicos, em humanos, capazes de demonstrar a segurança e a eficácia desse produto. (Lawn e Vehar, 1986; Feldman *et al.*, 1986).

1.6.2.2 - Uso de Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais são assim chamados por reagirem com um sítio específico do antígeno (epitope). Nas técnicas utilizadas pela Companhia Farmacêutica Armour (Feldman *et al.*, 1986) um anticorpo anti-FVIII:C monoclonal é quimicamente combinado com uma base matriz de resina. A mistura anticorpo-resina é colocada em uma coluna de cromatografia adequada. O crioprecipitado, que contém FVIII:C e outras proteínas, é exposto ao material desta coluna. Após lavagens com soluções e/ou tampões adequados, o FVIII:C é então extraído da matriz, obtendo-se desta forma grandes quantidades de FVIII:C puro.

Esse concentrado tem sido avaliado em estudos clínicos e tem mostrado uma meia vida e recuperação excelentes, quando administrado em pacientes hemofílicos (Feldman *et al.*, 1986):

1.6.3 - Identificação de Alterações no gene para Fator VIII:C

A maior parte dos casos de hemofilia é causada por uma mutação no segmento de DNA que codifica a porção pró-coagulante da molécula de FVIII.

Segundo Lawn e Vehar (1986) é possível identificar o tipo de

Hemofilia A

mutação que leva à deficiência de FVIII:C, através do isolamento e sequenciamento do gene para FVIII:C dos hemofílicos. O procedimento é baseado na técnica de hibridização in situ chamada Southern Blot' (Southern, 1975). Dois tipos de alterações podem ser detectadas por esse método: deleção de parte do gene para FVIII:C e alteração em uma única base de DNA (mutação de ponto) (Rivo Fischer; comunicação pessoal).

I.6.4 - Deteção de Portadoras e Diagnóstico Pré-Natal

O conhecimento da estrutura do gene para FVIII:C e o desenvolvimento de técnicas de análise de DNA levaram ao aperfeiçoamento do diagnóstico pré-natal de hemofilia A e da detecção de portadoras para essa condição.

Segundo Graham et al. (1985), considerável esforço tem sido dispendido nos últimos 20 anos no sentido de melhorar os métodos de diagnóstico das hemofilias. Especial atenção tem sido dada ao diagnóstico pré e pós natal de hemofilia A e à detecção de portadoras. Segundo ele, a limitação básica dos métodos tradicionais é que eles examinam o fenótipo (sangue) ao invés do genótipo (DNA).

Polimorfismos de DNA podem ser utilizados na identificação de portadores de hemofilia A (Lawn, 1985).

I.7 - FATOR VIII:C - HOMOLOGIAS COM OUTRAS PROTEINAS PLASMÁTICAS

Fass et al. (1985), verificaram que o fator VIII:C e o FV apresentavam similaridades com respeito as suas posições na cascata de coagulação.

Os fatores V e VIII são ambos ativados proteoliticamente pela enzima trombina: são inativados por uma protease dependente de vitamina K; parecem requerer um cation divalente para exercer sua função e são assimétricos.

Vehar et al. (1984) e Fass et al. (1985), observaram que os fatores VIII e V são ambas proteínas de massa relativa maior que 300.000 e que são altamente similares em sua estrutura, padrão de clivagem da trombina e presumivelmente função.

Após a descoberta da estrutura molecular dos fatores que participam do processo de coagulação verificou-se que a sequência de aminoácidos do fator VIII apresenta notável homologia com a sequência da ceruloplasmina e do fator V. O resultado desses estudos levou Fass et al. (1985), Vehar et al. (1984), Toole et al. (1984), a sugerir-

rem que, evolutivamente os genes para estas três proteínas plasmáticas tenham se originado de um único gene ancestral.

I.8 - HEMOFILIA A EM MULHERES

Casos de hemofilia A em mulheres são raros. Estatisticamente, a frequência esperada de homozigotas é de cerca de $3,0 \times 10^{-9}$, ou seja, 3 em um bilhão, sob as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Barrow e Graham, 1974).

Para Sié et al. (1975), as causas da hemofilia FVIII:C em mulheres têm sido muito pouco estudadas. Alguns casos de hemofilia A foram observados em filhas de homens hemofílicos com mulheres portadoras (estes casos podem ser devidos à homozigose do gene para a hemofilia A) e em mulheres portadoras, clinicamente hemofílicas devido a lyonização extrema (Lyon, 1962).

A hemofilia A em mulheres também pode ocorrer em casos de aberrações cromossômicas: 45,X (Bithell et al., 1970), mosaico 46,XX/45,X (Gilchrist et al., 1965, apud Gilgenkrantz, 1986) e deleção parcial de um cromossomo X (Gilgenkrantz, 1986). Neste último caso a afetada era portadora de um cromossomo X em anel, e, através do estudo polimórfico do DNA, verificou-se que este cromossomo em anel era de origem paterna, e que a região do gene para a produção do FVIII:C estava ausente. O estado homozigoto permitiu a expressão do gene da hemofilia A, presente no outro cromossomo X herdado de sua mãe portadora.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados 24 pacientes provenientes de 6 genealogias representadas no apêndice, dentre os quais, 9 hemofílicos A, 8 portadoras prováveis e 7 portadoras certas. Foram testadas também 25 mulheres saudáveis entre 20 e 45 anos (estudantes, funcionárias e professoras da Universidade Federal de Santa Catarina).

Os reagentes liofilizados empregados foram fornecidos pelo CNPq através do laboratório do prof. Dr. Israel Roisenberg.

O sangue coletado era colocado em tubos de centrífuga de polietileno devidamente etiquetados contendo 0,5ml de citrato de sódio 3,8% na proporção de 1/10.

Hemofilia A

O sangue era centrifugado por 20 minutos a 4.000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante (plasma) era lentamente retirado com pipeta automática e ponteiros descartáveis e colocado em tubo de ensaio de polietileno. Imediatamente eram iniciados os testes de triagem e de dosagem de FVIII:C baseados no método de Austen e Rhymes (1975).

Ao término dos testes, os plasmas eram armazenados a -20°C para posterior dosagem da atividade antigênica do FVIII:C, baseada no método de Laurel (1972).

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão dispostos nas tabelas de números I a IV

Na tabela I pode-se observar os resultados das dosagens de FVIII:C e FVIII:RAg obtidos para as 25 mulheres saudáveis testadas. A média obtida para FVIII:C foi de $97 \pm 26\%$ e para FVIII:RAg $99 \pm 19\%$.

A tabela II mostra os resultados da atividade de FVIII:C e FVIII:RAg entre os 09 hemofílicos A testados.

Na tabela III estão os níveis plasmáticos de FVIII:C e FVIII:RAg entre as 07 portadoras certas testadas. A média obtida para FVIII:C e FVIII:RAg foi respectivamente $77 \pm 31\%$ e $132 \pm 49\%$.

A tabela IV mostra a atividade de FVIII:C e FVIII:RAg entre as 8 portadoras prováveis testadas, com valores médios de $102 \pm 38\%$ e $98 \pm 33\%$ respectivamente.

E. Motta e N. Ferrari

TABELA I - Níveis plasmáticos de FVIII:C e FVIII:RAg em mulheres saudáveis.

<u>Nº de</u> <u>Indivíduos</u>	<u>FVIII:C (%)</u>	<u>FVIII:RAg (%)</u>
01	112	112
02	100	108
03	121	123
04	87	67
05	100	116
06	98	74
07	88	84
08	82	105
09	93	89
10	109	93
11	122	135
12	95	93
13	90	99
14	146	97
15	128	99
16	88	83
17	142	86
18	150	96
19	98	71
20	104	113
21	75	107
22	93	92
23	119	150
24	60	77
25	74	122
<u>X</u>	<u>97</u>	<u>99</u>

TABELA II - Níveis plasmáticos de FVIII:C e FVIII:RAg em hemofílicos A

<u>Nº</u>	<u>Genealogia</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>FVIII:C(%)</u>	<u>FVIII:RAg (%)</u>
01	01	IV.5	2	84
02	01	IV.4	5	100
03	01	IV.3	2	105
04	01	IV.6	5	120
05	02	II.5	7	123
06	03	III.1	11	103
07	04	III.6	5	197
08	05	III.3	8	130
09	06	III.10	1	130

Hemofilia A

TABELA III - Níveis plasmáticos de FVIII:C e FVIII:RAg em portadoras certas

Nº	Genealogia	Indivíduo	FVIII:C(%)	FVIII:RAg(%)
01	01	III.2	92	98
02	02	I.2	54	125
03	02	III.7	65	160
04	03	II.3	37	72
05	04	II.6	80	90
06	05	II.4	73	103
07	06	II.4	143	280
\bar{x}			77	132

TABELA IV - Níveis plasmáticos de FVIII:C e FVIII:RAg em portadoras prováveis.

Nº	Genealogia	Indivíduo	FVIII:C(%)	FVIII:RAg(%)
01	02	II.7	45	87
02	03	III.4	81	110
03	04	I.5	97	70
04	04	II.2	164	113
05	04	II.4	122	63
06	04	III.7	65	82
07	05	III.2	97	87
08	06	III.6	152	176
\bar{x}			102	98

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A prática do aconselhamento genético aos afetados e parentes dos afetados com hemofilia A tem se tornado muito frequente nos centros de hemofilia e nos hospitais. O objetivo do aconselhamento genético é o esclarecimento às pessoas interessadas sobre a hereditariedade da hemofilia, o que muitas vezes evita sentimentos de culpa por parte de casais com filhos afetados. A detecção de portadoras de hemofilia A e a orientação sobre as probabilidades dessas virem a ter filhos afetados são um instrumento importante no aconselhamento genético.

A sobrevida e a qualidade de vida dos afetados está relacionada ao nível sócio-econômico de seu país. Desta forma, em países desenvolvidos a vida média dos hemofílicos equivale à da população normal

(Rizza e Spooner, 1983), o que não ocorre em países subdesenvolvidos onde o grau de informação e o atendimento no setor de saúde está muito aquém do ideal, principalmente para indivíduos geneticamente afetados.

Entre as portadoras certas testadas observou-se que o nível de FVIII:C foi mais alto que o esperado, que seria de 50%. Esta observação corrobora a hipótese de Lyon, segundo a qual, no início do período embrionário, ocorre a inativação, ao acaso, de um dos cromossomos X em células de fêmeas de mamíferos. O cromossomo X inativado pode ser de origem paterna ou materna e, uma vez ocorrida a inativação de um dos cromossomos X, será este que permanecerá inativo em todas as células descendentes. Portanto, espera-se que algumas mulheres, como a de nº II. 4 da genealogia 06, tenham nível alto de FVIII:C (143%), mesmo sendo portadoras certas, devido à inativação do cromossomo X com o gene alterado na maioria de suas células. O indivíduo II.3 da genealogia 03, ao contrário, apresentou 37% de atividade de FVIII:C, provavelmente porque teve o cromossomo X com o gene normal inativado em mais de 50% de suas células.

Os hemofílicos mostram também certa variabilidade nos valores obtidos para atividade de FVIII:C. O indivíduo III.10 da genealogia 06, por exemplo, é classificado como hemofílico grave assim como o indivíduo IV.5 e IV.3 da genealogia 01, por apresentarem baixos níveis de FVIII:C. Indivíduos como o III.1 da genealogia 03, III.3 da genealogia 05 e II.5 da genealogia 02, são considerados como hemofílicos moderados. Observou-se que o nível de FVIII: RAg é normal para todos os indivíduos testados. Isto mostra que a atividade antigênica do FVIII:vw é normal entre os hemofílicos, assim como entre as portadoras certas e prováveis, quando comparadas com aquela da população normal.

Nas portadoras prováveis, pode-se sugerir que uma mulher como a de nº III.6 da genealogia 06 tem uma chance muito pequena de ser considerada portadora e portanto baixa probabilidade de gerar um filho hemofílico, considerando o fenômeno de lyonização. A mulher II.7 da genealogia 02, ao contrário, que possui 45% de atividade de FVIII:C - um nível baixo quando comparado com aquele da população normal, apresenta uma grande probabilidade de ser portadora.

Com os métodos atualmente utilizados para a detecção de portadoras, o geneticista não pode fornecer uma resposta do tipo sim ou não,

Hemofilia A

mas apenas uma probabilidade da mulher ser ou não portadora, obtida por meio de análise estatística, baseada num grande número de casos estudados. Na maioria dos casos, entretanto, o desejo destas mulheres é saber se são ou não portadoras e não a probabilidade delas o serem. Os métodos utilizados neste trabalho não são os mais indicados, uma vez que se estuda o fenótipo (sangue) do indivíduo, ao invés do genótipo (DNA). A detecção de portadoras pela análise de DNA é capaz de fornecer uma resposta do tipo sim ou não às mulheres que se submetem a este teste. Esta técnica tem sido realizada com sucesso nos países desenvolvidos que dispõem de tecnologia e equipamentos laboratoriais sofisticados.

Em países subdesenvolvidos, dependentes de tecnologias importadas, a utilização de análise de DNA para a detecção de portadoras parece não ser prioritária quando comparada com outras medidas importantes no setor de saúde. Entretanto, mais verbas devem ser aplicadas em pesquisa básica como meio de se conseguir um avanço científico mais significativo, que sem dúvida pode contribuir para melhorar as condições de saúde da população. Outro fator que contribuiu para que os resultados obtidos não fossem os esperados foi o pequeno número de indivíduos testados. As dificuldades em se conseguir uma amostra mais significativa estão relacionadas com a qualidade de vida dos afetados e parentes de afetados. Isto impossibilita-os de irem ao hospital sem que estejam sofrendo de hemorragias na ocasião.

Contudo, mesmo enfrentando todas as dificuldades apresentadas, as técnicas de dosagem de FVIII:C e de FVIII:RAg permitem a identificação de um número razoável de portadoras que se submetem ao teste, tornando esta uma das técnicas mais utilizadas no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo suporte financeiro e à Dra. Zelita da Silva Souza, pela permissão de estudarmos seus pacientes e utilizarmos as instalações do Setor de Hematologia do Hospital Universitário da UFSC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonarakis, S.E.; Waber, P.G.; Kittur, S.D.; Patel, A.S.; Kazazian, H.H.; Mellis, M.A.; Counts, R.B.; Stamatoyannopoulos, G.; Bowie, W.; Fass, D.N.; Pittman, D.D.; Mozney, J.M. e Toole, J.J. (1985). Detection of Molecular and of Carriers by DNA Analysis. The New England Journal of Medicine, 313(14):842-48.
- Austen, D.E.G. and Rhymes, I.L. (1975). A Laboratory Manual of Blood Coagulation. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Barrow, E.M. e Graham, J.B. (1974). Blood Coagulation Factor VIII (Antihemophilic Factor). With Comments on Von Willebrand Disease and Christmas Disease. Physiol.Rev., 54:23-74.
- Biggs, R. and Rizza, C.R. (1984). Human Blood Coagulation, Haemostases and Thrombosis. Blackwell Scientific Publications, 3ª edição, Oxford, pp.59.
- Bithel, T.C.; Pizarro, A. and McDiarmid, W.D. (1970). Variant of factor IX deficiency in female with 45,X Turner's syndrome. Blood, 36:169-179.
- Brownlee, G.G. and Rizza, C. (1984). Clotting factor VIII cloned. Nature, 312:307.
- Fass, D.N.; Hewick, R.M.; Knutson, G.J.; Nesheim, M.E. (1985). Internal duplication and sequence homology in factors V and VIII. Biochemistry, 82:1688-91.
- Feldman, F.; Rodell, N.B. (1986). O uso de Anticorpo Monoclonal na Purificação e Produção de Fator Anti-Hemofílico (Humano) Fator VIII:C. Armour Pharmaceutical Company Blue Bell, Pennsylvania. A Hemofilia no Mundo, 3(3):6-8.
- Ferrari, N. (1977). Níveis Plasmáticos de Fator VIII em indivíduos Normais Classificados de Acordo com Faixa Etária e Grupos Sanguíneos. Tese de Mestrado - Curitiba - Pr.
- Ferrari, N. (1984). Studies on Factor IX in families with Christmas Disease, Tese de Doutorado, Oxford, Inglaterra.
- Giannelli, F.; Choo, K.H.; Winship, P.R.; Rizza, C.R.; Amson, D.S.; Rees, D.J.G.; Ferrari, N.; Brownlee, G.G. (1984). Characterization and use for an Intragenic Polymorphic Marker for Detection of Carriers of Haemophilia B (Factor IX deficiency). The Lancet, 837(1): 239-241.
- Gilgenkrantz, S.; Briquel, M.E.; Mandel, J.L.; Oberle, L. (1986). A Case of female hemophilia with a 46,XXr Karyotype studied with X-chromosome DNA probes. Human Genetics, 72(2):157-59.
- Gitschier, J.; Wood, W.I.; Goralka, T.M.; Wion, K.L. (1984). Characterization of the Human factor VIII gene. Nature, 312:326-30.
- Gitschier, J.; Drayna, D.; Tuddenham, E.G.D.; White, R.L.; Lawn, R. M. (1985). Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene. Nature, 314 (6013):738-40.

Hemofilia A

- Gitschier, J.; Wood, W.I.; Schuman, M.A.; Lawn, R.M. (1986). Identification of a missense Mutation in the Factor VIII Gene of a Mild Hemophilic. Science, 232:1415-16.
- Grahan, J.B.; Green, P.P.; R.A. and Davis, L.M. (1985). Application of Molecular Genetics to Prenatal Diagnosis and Carrier Detection in the Hemophilias: Some Limitations, Blood, 66(4):759-64.
- Ingram, G.I.C. (1975). The History of Haemophilia, Printed in England By Eyre and Spottiswoode Ltd, Thanet Press, Margate.
- Laurel, C.B. (1972). Electroimmunoassay. Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 124:21.37.
- Lawn, R.M. (1985). The Molecular Genetics of Hemophilia. Blood Clotting factors VIII a IX. Cell, 42:405-06.
- Lawn, R.M. and Vehar, G.A. (1986). The Molecular Genetics of Hemophilia. Scientific American, 254(3):40.
- Lyon, M.F. (1962). Sex Chromatin and Gene action in the Mammalian X-chromosome. American Journal of Human Genetics, 14:135-148.
- Rall, L.B.; Bell, G.I.; Caput, D.; Truett, M.A.; Masiarz, F.R.; Najarian, R.C.; Valenzuela, P. (1985). Factor VIII:C Synthesis in the Kidney. The Lancet, 5(1):44.
- Roisenberg, I. (1971). Hemofilia e Estados Hemofílicos no Rio Grande do Sul: Frequência, Fisiologia e Herança. Tese de Doutorado-Faculdade de Filosofia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Rizza, C.R. and Spooner, R.J.D. (1983). Treatment of Haemophilia and Related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: a report on behalf of the directors of Haemophilia Centres in the United Kingdom. British Medical Journal, 286:929-33.
- Siĕ, P.; Caranobe, C.; Benaliova, M.; Boneu, B. (1985). Homozygous Hemophilia A in a Female. Thrombosis and Haemostasis, 54(3):728.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific Sequence among DNA fragments se separated by gel electrophoresis. J. of Molec. Biol. 98: 503-17.
- Toole, J.J.; Knopf, J.L.; Wozney, J.M.; Sultzman, L.A.; Buecker, J. L.; Pittman, D.D.; Kaufman, R.J.; Brown, E.; Schoemaker, C.; Orr, E.C.; Amphlett, G.W.; Foster, W.B.; Coe, M.L.; Knutson, G.J.; Fass, D.N. and Hewick, R.M. (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. Nature, 312:342-47.
- Vehar, G.A.; Keyt, B.; Eaton, D.; Rodrigues, H.; O'Brien, D.P.; Rotblat, F.; Oppermann, H.; Keck, R.; Wood, W.I.; Harkins, R.N.; Tuddenham, E.G.D.; Lawn, R.M. and Capon, D.J. (1984). Structure of Human factor VIII. Nature, 312:337-42.
- Wion, K.R.; Kelly, D.; Summerfield, J.A.; Tuddenham, E.G.D.; Lawn, R.M. (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. Nature, 317(6039):726-28.
- Wood, W.I.; Capon, D.J.; Simonsen, C.C.; Eaton, D.L.; Gitschier, J.; Keyt, B.; Seeburg, P.H.; Smith, D.H.; Hollongshead, P.; Wion, K. L.; Delwart, E.; Tuddenham, E.G.D.; Vehar, G.A. and Lawn, R.M. (1984).

E. Motta e N. Ferrari

Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. Nature, 312:330-36.

Zelechowska, M.G.; Mourik, J.A.V.; Brodniewicz-Proba, T. (1985). Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. Nature, 317:729.

Hemofilia A

APENDICE

As simbologias empregadas nas genealogias são:

Homem hemofílico



Mulher portadora



Falecido



Falecida



Aborto



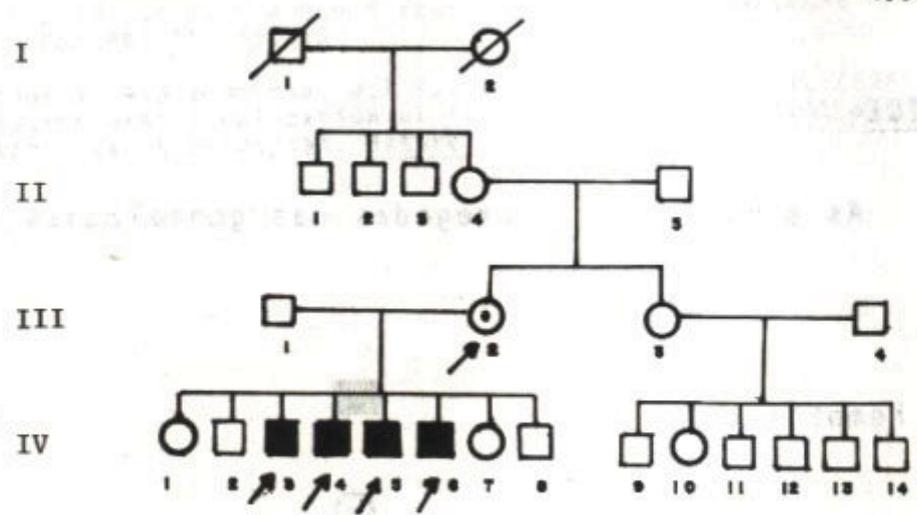
Gêmeos monozigóticos



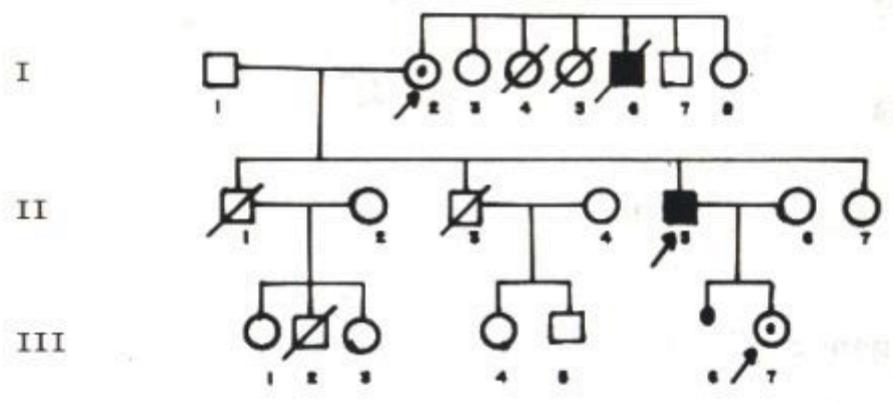
Sem filhos



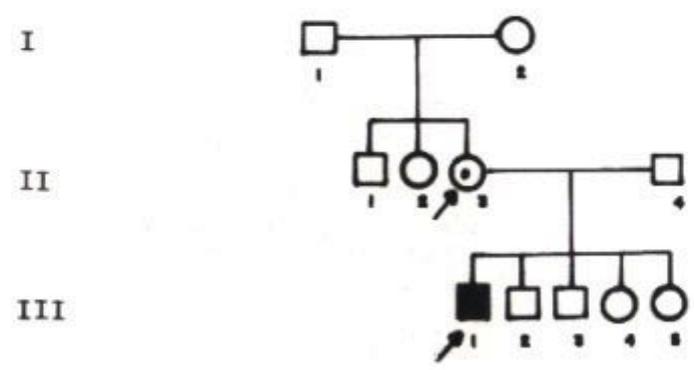
6.01



6.02

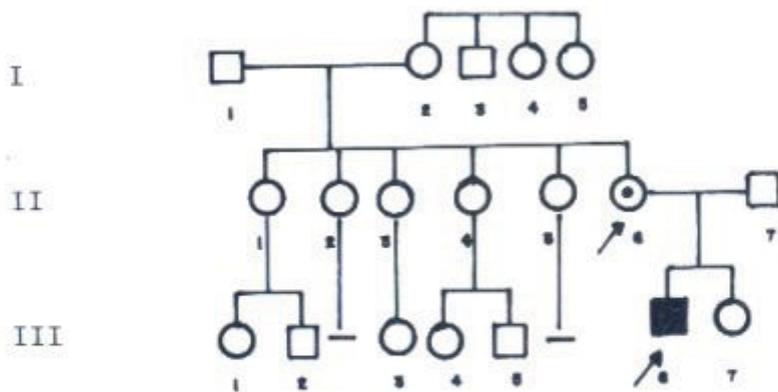


6.03

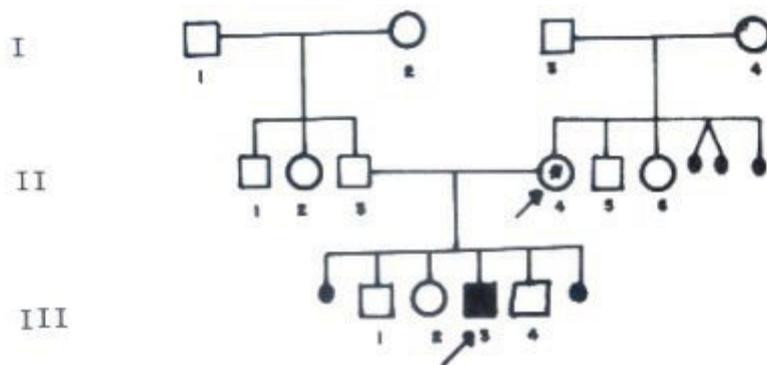


Hemofilia A

6.04



6.05



6.06

