

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Departamento de Ciências Morfológicas
Disciplina de Genética

Hemofilia A

Giselle Martins Pinto
Nelson Gianni de Lima
Rafael Domingos Grandó
Lisiane Machado
Luciana Mendes Johan

Porto Alegre, 07 de novembro de 2001.

Resumo

A hemofilia A é um distúrbio hereditário da coagulação caracterizado por um aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), fácil aparecimento de hematomas e hemorragias dentro de articulações e músculos. Sua incidência no sexo masculino é de aproximadamente 1 para cada 5000 indivíduos. Por ser uma doença de herança recessiva ligada ao X (gene localizado em Xq28), mulheres raramente são afetadas e, quando carreadoras, dificilmente apresentam evidências clínicas da doença. Aproximadamente 30% dos casos surgem de mutação nova. A etiologia básica desta patologia é a deficiência de fator VIII da coagulação, sendo o tratamento baseado na reposição deste através de derivados plasmáticos ou fator VIII recombinante.

Palavras-chave: hemofilia A, fator VIII, derivados plasmáticos, fator VIII recombinante.

Abstract

Hemophilia A is an hereditary disorder of the coagulation cascade , characterized by prolonged activated partial-thromboplastin time, hematomas and bleeding into joints and muscles. Its incidence approaches 1 to 5000 males. Because it is an inherited X-linked recessive disorder (gen layed at Xq28), women are seldom affected and, when carriers, rarely present any symptoms. About 30 percent of cases arise from a spontaneous mutation. The basis etiology of this disease is the coagulation factor VIII deficiency, and its treatment is based on reposition therapy with plasma-derived factors or recombinant factor VIII.

Keywords: hemophilia A, factor VIII, plasma-derived factors, recombinant factor VIII.

Introdução

As hemorragias dramáticas, os efeitos da doença na história pela sua presença nos descendentes da rainha Victoria e o papel devastador dos concentrados terapêuticos na transmissão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) têm feito da hemofilia A objeto de grande interesse médico, científico e público. É um dos distúrbios hereditários da coagulação mais comumente observados e uma doença sem limites étnicos ou geográficos. Sua incidência é de aproximadamente 1 (um) para cada 5.000 nascimentos do sexo masculino,^{1,2} apresentando-se com padrão hereditário.

Entretanto, a doença é resultado de uma nova mutação genética em aproximadamente um terço dos pacientes, logo, pode não haver história familiar de distúrbios de sangramento.

Hoje se sabe que a hemofilia A é causada pela ausência, deficiência severa ou defeitos na função do fator VIII da coagulação (fator anti-hemofílico), presente no plasma. A história da hemofilia A, também chamada de “hemofilia clássica”, se estende desde nosso mais antigo conhecimento sobre hemostasia e coagulação até os recentes avanços da biologia molecular.^{3,4}

Apesar de clinicamente indistinguível da hemofilia A e de também ser transmitida pela herança ligada ao cromossomo X, a hemofilia B (doença de Christmas) é diferente da hemofilia A, uma vez que nesses casos o fator IX da coagulação é que é o deficiente.⁵ O tratamento dessas duas condições é completamente diferente, logo, o diagnóstico diferencial entre essas duas doenças é fundamental e deve ser realizado por medida dos fatores de coagulação.

Dados Históricos

Relatos antigos presentes no Talmude e outros escritos hebraicos mostraram que o padrão de herança ligado ao cromossomo X da hemofilia A foi primeiramente reconhecido há aproximadamente 2.000 anos. O Talmude postulava que se uma mulher submetesse seus dois primeiros filhos a circuncisão e eles morressem devido a sangramentos, ela não precisaria circuncisar seu terceiro filho. Além disso, dizia também que se duas irmãs circuncisassem seus filhos e ambos morressem por sangramento, a terceira irmã não precisaria submeter seu filho à circuncisão. A explicação oferecida era baseada em fatos reais ocorridos em que um menino, sobrinho de duas mulheres que perderam seus filhos na circuncisão, foi liberado de realizá-la.³

Segundo os escritos, membros de algumas famílias tinham “perda de sangue”, enquanto que em indivíduos normais havia “retenção de sangue” (isto é, coagulação). A discussão da doença nas escrituras do Talmude e nos escritos de rabinos revela o notável conhecimento daquele povo sobre este distúrbio de sangramento hereditário.

Mais tarde, em 1803, John Conrad Otto descreveu padrão de herança da hemofilia como uma doença ligada ao cromossomo X, observando indivíduos afetados numa família de New Hampshire: “somente o sexo masculino é afetado, mas as mulheres, mesmo sem a doença, podem transmiti-la para seus descendentes do sexo masculino”.⁶

A hemofilia ficou mais conhecida por seu efeito nas famílias reais da Europa, devido a seu aparecimento súbito entre os filhos da Rainha Victoria, da Grã-Bretanha. Ela tornou-se conhecida como a “doença Real”, porque se disseminou às famílias reais européias da Rússia, Prússia e Espanha através dos descendentes da Rainha Victoria.

Ela sempre tinha se preocupado com a qualidade do sangue da família real Britânica e temia profundamente que ocorresse alguma imperfeição nos descendentes da família Real.

Victoria era uma portadora clinicamente normal e retratada como a fonte da mutação ou herdeira de uma mutação ocorrida nas células germinativas de seu pai, Edward Augustus, o Duke de Kent. Victoria teve um filho, Leopold, que apresentou hemofilia, e duas filhas, Alice e Beatrice, que eram portadoras e transmitiram a doença para as famílias reais da Rússia, Prússia e Espanha, devido aos casamentos arranjados entre membros das famílias reais para consolidar alianças políticas. Leopold, o oitavo filho de Victoria e único afetado, teve uma vida curta e sofreu várias hemorragias severas. Sempre tinha sido descrito como um menino muito delicado. Apesar de todos os cuidados de que era cercado, faleceu aos trinta e um anos devido a uma pequena queda.

Conta a história que Alix, uma das filhas de Alice (e neta de Victoria) também era portadora e casou-se com Nikolas II, da família imperial Russa, tendo quatro filhas antes do tão esperado herdeiro do trono russo, Alexis, que apresentou hemorragias e hematomas em braços e pernas após pequenos traumas, além de hemartroses e dor. Seu pai e sua mãe, vendo seu sofrimento, recorreram ao monge Rasputin, no qual depositaram total confiança por acreditarem ser a única pessoa capaz de aliviar o sofrimento de seu filho. Alguns sugerem que Rasputin utilizava técnicas de hipnose para tranquilizar o menino e colocá-lo para dormir. Com a grande preocupação dos pais com a saúde do filho, a situação do Estado Russo se deteriorava, culminando posteriormente com a Revolução Russa.

Uma vez que tanto a hemofilia A quanto a B são clinicamente indistinguíveis e nenhum dos descendentes afetados da Rainha Vitória estão vivos (o último, Waldemar, bisneto de Victoria, morreu em 1945 aos 4 anos de idade), nós poderemos nunca saber exatamente qual o tipo de hemofilia que eles apresentaram.⁸

Definição e Epidemiologia

A hemofilia A é uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossomo X que ocorre devido à deficiência do fator VIII da coagulação ou a defeitos estruturais em suas moléculas.⁹

Inicialmente, é importante enfatizar que a hemofilia A é um distúrbio clinicamente heterogêneo, o que pode ser esperado devido à quantidade de defeitos diferentes no gene do fator VIII. É uma doença que não respeita limites étnicos ou geográficos, ocorrendo em todo o mundo. A hemofilia A pode ocorrer nas formas leve, moderada e severa, correspondendo a níveis de fator VIII plasmáticos de 6 a 30% do normal, 2 a 5% do normal e 1% ou menos do normal, respectivamente.⁸ No estudo de *Soucle et al (1998)* para freqüência das formas da hemofilia A em seis estados americanos foram feitos 2.156 diagnósticos de pacientes com a doença. Desse, 43% (1.140) apresentaram a forma severa; 26% (684) apresentaram a forma moderada e 31% (848) apresentaram a forma leve da hemofilia A.

Essa distinção entre doença severa e não-severa é fundamental, uma vez que as formas leves ou moderadas da doença são raramente complicadas por episódios de sangramentos espontâneos em articulações. De fato, a forma leve de hemofilia pode ser detectada em adultos após trauma ou cirurgia, e pode não haver história de sangramentos.⁹

A hemofilia A é a principal doença causadora de sangramentos severos e a segunda principal causa de todos os distúrbios congênitos que causam sangramentos, ficando atrás somente da doença de von Willebrand (uma doença autossômica dominante). Aproximadamente 1 (uma) em cada 5.000 crianças do sexo masculino (levando-

se em conta a população geral, sua incidência é de aproximadamente 1 para cada 10.000 nascimentos) é afetada pela hemofilia A, ao passo que a incidência da doença de von Willebrand é de 1 para cada 1.000 nascimentos, afetando ambos os sexos¹⁶. A incidência da hemofilia A em mulheres é extremamente rara, devido à necessidade de homozigose para expressão do fenótipo, aparecendo numa frequência de 1 em cada 25.000.000.⁷ Já na hemofilia B – mais rara – aproximadamente 1 (uma) em cada 30.000 crianças do sexo masculino é afetada (levando-se em conta a população geral, sua incidência é de aproximadamente 1 para cada 60.000 nascimentos).⁸

Apesar de pacientes com hemofilia leve apresentarem sangramentos excessivos somente após trauma ou cirurgia, os portadores da forma severa têm uma média anual de 20 a 30 episódios de sangramento após pequenos traumas, particularmente em articulações e músculos. Em alguns desses pacientes os episódios podem ser até mais frequentes. Estes sintomas diferem substancialmente dos gerados por defeitos plaquetários ou da doença de von Willebrand, nos quais predominam os sangramentos das mucosas.⁹

Antes da efetiva terapia de reposição ser introduzida no fim dos anos 60, a hemofilia causava morte e distúrbios severos numa idade precoce. Na Suécia, um registro nacional para causas de morte estabelecido no século XVIII tornou possível a documentação das mudanças na expectativa de vida dos pacientes portadores de hemofilia. A expectativa de vida média de pacientes portadores de hemofilia severa aumentou para 11,4 anos de 1831 a 1920; para 20 anos de 1921 a 1960 e para 56,8 anos de 1961 a 1980.¹¹ Durante este mesmo período, a expectativa de vida da população masculina geral também aumentou, mas somente de 61,7 para 75,6 anos. Infelizmente, a epidemia de AIDS mudou novamente o prognóstico dos pacientes portadores da hemofilia A. Dados de 289 famílias de um grande centro americano de hemofilia mostraram um declínio na expectativa média de vida de 68 anos (de 1971 a 1980) para somente 49 anos (de 1981 a 1990).¹²

Milhares de pacientes com hemofilia A e sem outros fatores de risco para HIV apresentaram diagnóstico de AIDS, sendo que muitos desses pacientes morreram. Apesar do número de novos casos em pacientes hemofílicos estar diminuindo, existem

ainda muitos pacientes HIV positivos hemofílicos com risco de desenvolver AIDS,^{13,14,15} mas que ainda não manifestaram sinais e sintomas da doença.

Padrão de Herança

A herança de fenótipos recessivos ligados ao X segue um padrão bem definido e facilmente reconhecido. Uma mutação recessiva ligada ao X expressa-se fenotipicamente em todos os homens que a recebem, mas apenas nas mulheres que são homozigóticas para a mutação. Em consequência, os distúrbios ligados ao X geralmente se restringem aos homens e, à exceção dos raros heterozigotos manifestos, quase não são vistos nas mulheres. Uma outra característica desse padrão é que o gene responsável pela afecção é transmitido de um homem afetado para todas as suas filhas. Os filhos do sexo masculino de qualquer uma dessas filhas têm uma chance de 50% de herdá-lo. O gene jamais se transmite diretamente do pai para o filho, mas sim de um homem afetado para todas as suas filhas. Outra característica é que o gene pode transmitir-se ao longo de uma série de mulheres portadoras e, os homens afetados numa família são aparentados através das mulheres. Finalmente, as mulheres heterozigóticas geralmente não são afetadas, mas algumas expressam a afecção com intensidade variável.

Nos raros casos em que a mulher é afetada, ela deve ser filha de pai afetado e mãe carreadora. A hemofilia A também pode ocorrer em mulheres com hemizigose para mutação do fator VIII, como resultado de um defeito na lyonização (inativação) do cromossomo X. Alguns casos de hemofilia A têm sido relatados em pacientes com anormalidades no cromossomo X como Síndrome de Turner e mosaicismo do X.⁹ Se uma mulher carreadora tiver seu cromossomo X normal inativado, ela apresentará as manifestações clínicas típicas desta patologia.

Deve-se ressaltar, no entanto, que aproximadamente 30% dos casos de hemo-filia A surgem de novas mutações, não havendo história familiar deste distúrbio.

Etiologia e Patogênese

A hemofilia A é um distúrbio heterogêneo resultante de defeitos no gene que codifica o fator VIII da coagulação, o que leva a uma redução dos seus níveis circulantes funcionalmente ativos. A redução na atividade pode ser devida a uma diminuição na quantidade do fator VIII (proteína), à presença de um fator VIII funcionalmente anormal ou a uma combinação de ambos. Para que o fator VIII seja um cofator efetivo do fator IX, ele precisa ser clivado pela trombina, numa reação que resulta na formação de um heterodímero composto pelos domínios A1A2 e A3C1C2 em um complexo com cálcio (ver anexo 1). Os fatores VIII e IX ativados associam-se na superfície das plaquetas ativadas para formar um complexo de ativação do fator X, dando seqüência à cascata da coagulação. Na presença do fator VIII ativado, a taxa de ativação do fator X pelo fator IX é extremamente aumentada. Não é surpresa que a hemofilia A e hemofilia B apresentem manifestações clínicas similares, uma vez que tanto o fator VIII quanto o IX (ativados) são necessários para formar o complexo de ativação do fator X. Em pacientes com hemofilia A, a formação do coágulo é retardada porque a geração de trombina está marcadamente diminuída. Além disso, o coágulo que é formado é friável e facilmente desalojado, levando a sangramento excessivo e cicatrização deficitária.⁹ A fisiopatogenia da hemofilia A será melhor discutida ao longo do trabalho.

Apresentação Clínica

A hemofilia clássica é caracterizada por sangramentos excessivos em várias partes do corpo. Hematomas em tecidos moles e hemartroses são altamente característicos da hemofilia. Essa doença tem sido largamente classificada em leve, moderada e severa, mesmo havendo alguma sobreposição entre essas categorias.

Tabela 1 – Manifestações clínicas da hemofilia.

Classificação	Nível de fator VIII (ativo)	Achados Clínicos
Severa	Até 1% do normal	Hemorragias e hemartroses espontâneas, requerindo reposição de fator VIII.
Moderada	De 2% a 5% do normal	Hemorragias secundárias a traumas ou cirurgias.
Leve	De 6 a 30% do normal	Hemorragias secundárias a traumas ou cirurgias, raras hemorragias espontâneas.

Muitos pacientes com hemofilia severa podem apresentar sangramentos sem ter sofrido trauma conhecido além dos associados com sua atividade diária. As hemartroses tornam-se freqüentes a partir do momento em que o paciente começa a caminhar. Sem um tratamento efetivo, as hemartroses recorrentes podem ocorrer em paci-

entes jovens e são altamente sugestivas de hemofilia severa. Nesses casos resultam na artropatia crônica do paciente hemofílico. Os pacientes severamente afetados também estão sujeitos a sérias hemorragias que podem dissecar os tecidos planos, podendo levar ao comprometimento de órgãos vitais. Entretanto, os episódios de sangramentos são intermitentes e alguns pacientes podem passar semanas ou meses sem apresentar hemorragias. Exceto por hemorragias intracraniais, a morte súbita devido a hemorragias é extremamente rara.

Os pacientes hemofílicos moderadamente afetados podem apresentar hematomas ocasionais e hemartroses, normalmente associados a um trauma conhecido. Esses pacientes geralmente apresentam 2 a 5% de atividade do fator VIII. Apesar das hemartroses ocorrerem em pacientes moderadamente afetados, a artropatia associada é menos debilitante do que a presente em pacientes severamente afetados.⁹

Os pacientes com a forma leve da hemofilia A (6 a 30% de atividade do fator VIII) apresentam episódios de sangramento infreqüentes e a doença pode não ser diagnosticada por anos. Ela pode ser descoberta devido a sangramento excessivo no pós-operatório, após trauma e em pacientes que praticam esportes de contato (por movimentos bruscos, quedas, etc).

A maioria dos portadores que apresentam níveis de 50% na atividade do fator VIII geralmente não apresenta hemorragias, mesmo em procedimentos cirúrgicos. Entretanto, portadores com nível de fator VIII abaixo de 50% de atividade podem apresentar sangramentos excessivos após trauma (partos, cirurgias, etc) e por essa razão é necessária a mensuração do fator VIII nas pacientes portadoras do gene para hemofilia A.

Hematomas

Os hematomas são característicos da deficiência de fatores da coagulação. As hemorragias no tecido conjuntivo subcutâneo ou em músculos podem ser vistas com ou sem traumas conhecidos. Uma vez formados, os hematomas podem se estabilizar e ser absorvidos lentamente sem tratamento. Entretanto, em hemofílicos moderados ou severos, os hematomas têm tendência a estenderem-se progressivamente, dissecando á-

reas contíguas. Os hematomas retroperitoneais podem dissecar o diafragma em direção ao peito; e os tecidos moles do pescoço, podendo resultar em comprometimento das vias aéreas. Eles podem também comprometer a função renal quando obstruírem os ureteres.

As hemorragias ocorrem em músculos seguindo uma ordem de freqüência: panturrilhas, coxas, glúteos e antebraços são as regiões que apresentam os músculos mais comumente afetados. Hematomas nessas áreas podem levar a contraturas musculares, paralisias nervosas e atrofia muscular. Sangramentos na língua ou em seu frênu-lo são particularmente freqüentes em crianças jovens e comumente resultam de traumas.

Hemartroses

Os sangramentos em articulações respondem por aproximadamente 75% dos sangramentos de hemofílicos. Qualquer junta pode ser envolvida, mas freqüentemente há uma “articulação alvo”, que é a articulação propensa a sangramentos repetidos. As juntas mais comumente afetadas são os joelhos, cotovelos, tornozelos, ombros, punhos e quadris, respectivamente. Algumas vezes as hemartroses são precedidas por leve desconforto articular, que num período de minutos a horas, torna-se progressivamente doloroso. A junta afetada pode aumentar de volume, tornar-se aquecida e exibir limitação aos movimentos. A hemartrose do joelho é mais facilmente detectada pelo exame físico do que os sangramentos no cotovelo ou ombro.

Entretanto, hemorragias repetidas numa articulação podem resultar em destruição extensa da cartilagem articular, hiperplasia sinovial e outras alterações reacionais no osso e tecidos adjacentes. Uma das maiores complicações de hemartroses repetidas é a deformidade articular, complicada por atrofia muscular e contraturas dos tecidos moles. Osteoporose e cistos ósseos subcondrais podem se desenvolver, ocorrendo progressiva redução do espaço articular, que pode ser observada nos radiogramas. A instituição de terapia apropriada precoce, inclusive ortopédica, pode reduzir e até mesmo prevenir estas alterações.

Pseudotumores

As lesões pseudotumorais são raras, porém complicações perigosas da hemofilia.⁹ A maioria dos pseudotumores não está associada com dor a menos que haja crescimento rápido ou compressão nervosa. Quando o volume do cisto aumenta, ele pode comprimir e destruir os músculos adjacentes, nervos e osso. Alguns crescem tanto e envolvem tantas estruturas que se tornam inoperáveis. Os pseudotumores desenvolvem-se primariamente no fêmur, pelve e tíbia, mas podem ocorrer em qualquer local, inclusive o osso temporal. Os pequenos ossos das mãos e dos pés são mais frequentemente afetados em pacientes jovens. Às vezes pode ser difícil diferenciar pseudotumores de tumores malignos. Biópsias com agulha devem ser evitadas pelo risco de infecção e hemorragia. O único tratamento efetivo é a remoção completa da massa. Se o pseudotumor não for completamente removido, ele pode recidivar.

Hematúria

Virtualmente todos os hemofílicos severamente afetados podem apresentar episódios de hematúria. A urina pode apresentar coloração marrom ou avermelhada, dependendo do nível do sangramento. Muitos desses sangramentos originam-se da pelve renal, alguns se originam do rim e, apenas ocasionalmente ocorrem nos dois lugares. Apesar de alguns considerarem uma lesão estrutural como causa da hematúria, a pielografia intravenosa e ecografias do trato gênito-urinário geralmente não mostram lesões, exceto presença de coágulos. Se a coloração da urina clareia durante a micção, deve-se suspeitar de sangramento do trato gênito-urinário baixo.

As cólicas renais severas podem ocorrer quando os coágulos obstruem os ureteres. Se a hematúria for mínima, sem dor e a história do paciente não refere patologias do trato gênito-urinário, o médico está autorizado a aguardar alguns poucos dias que o sangramento cesse. No entanto, se ele continuar, o tratamento com fator VIII pode ser necessário.

Complicações neurológicas

As hemorragias intracranianas são o evento mais perigoso nos pacientes hemofílicos. As hemorragias no SNC podem ser espontâneas, mas geralmente são precedidas por traumas, mesmo que leves. Os sintomas geralmente ocorrem logo após o trauma, mas em algumas situações, eles podem aparecer após dias ou semanas. Os pacientes hemofílicos com dores de cabeça incomuns, especialmente se forem intensas, devem ser sempre investigados quanto à presença de hemorragias intracranianas e hematomas subdurais. Quando se suspeita de sangramentos intracranianos, o paciente deve ser imediatamente tratado com fator VIII.

As compressões de nervos periféricos são complicações freqüentes de hematomas musculares, particularmente nas extremidades. A compressão do nervo femoral por um hematoma no iliopsoas pode resultar em perda sensitiva da parte ântero-lateral da coxa, fraqueza e atrofia do quadríceps e perda do reflexo patelar. O ulnar é o segundo nervo periférico mais afetado. Os sangramentos nos músculos da panturrilha podem levar a contraturas do tendão de Aquiles. Em resumo, os sangramentos podem ocorrer em qualquer músculo e podem ser seguidos por permanentes defeitos neuromusculares.

Hemorragia em mucosas

Os sangramentos das membranas mucosas são comuns em hemofilia. Epistaxe e hemoptise freqüentemente resultam de infecções ou traumas e sugerem lesão de estruturas locais envolvendo o trato respiratório. As úlceras pépticas ocorrem com uma freqüência cinco vezes maior em hemofílicos adultos do que na população geral.⁹ O uso de antiinflamatórios para aliviar os sintomas da artropatia do hemofílico é uma causa freqüente das hemorragias gastrointestinais. Por essa razão, a ingestão de antiinflamatórios (como aspirina) deve ser cuidadosamente verificada na investigação da etiologia de cada sangramento.

Sangramentos pós-cirúrgicos

As cirurgias geralmente resultam em sangramentos excessivos no local da ferida operatória. Os sangramentos podem se arrastar por horas e até mesmo por dias. As cirurgias nesses pacientes são caracterizadas por uma cicatrização deficiente devido a pobre formação de coágulos. Com uma terapia de reposição de fator VIII apropriada, hemorragias intra e pós-operatórias podem ser prevenidas.

As extrações dentárias são os procedimentos cirúrgicos mais freqüentes nos hemofílicos. A retirada dos “dentes-de-leite” oferece pouco risco, mas as extrações dos dentes permanentes podem resultar em sangramentos excessivos que podem persistir por muitos dias até que o tratamento seja administrado.

Papel do Fator VIII na Coagulação Sangüínea

A manutenção da hemostasia após uma lesão ou rompimento vascular é alcançada basicamente por 4 mecanismos. O primeiro deles é o espasmo vascular, que instantaneamente reduz o fluxo de sangue a partir do vaso rompido. O segundo é a formação do tampão plaquetário, que, em muitas vezes, é o suficiente para manter a hemostasia, não necessitando, portanto, da formação de coágulo sangüíneo. O terceiro mecanismo é a formação do coágulo sangüíneo, no qual agem os fatores da coagulação. O quarto e último mecanismo da hemostasia inicia após a formação do coágulo, podendo seguir dois caminhos distintos: o da organização fibrosa ou simplesmente o da dissolução da crase sangüínea.²⁷

Para o melhor entendimento da fisiopatologia da hemofilia A nos deteremos especificamente no fator VIII, uma proteína ausente ou presente em pequenas quantidades no sangue destes pacientes, agindo como cofator na via intrínseca da coagulação, considerada a principal via de ativação da coagulação na maioria das circunstâncias.⁷

A via intrínseca começa com uma alteração no sangue ou exposição deste ao colágeno do vaso traumatizado. Esta alteração sangüínea causa ativação do fator XII ou de Hageman (XII → XIIa) e liberação de fosfolipídeos plaquetários que contêm a lipoproteína chamada de fator 3. O fator XIIa ativa enzimaticamente o fator XI ou antecedente plasmático da tromboplastina (PTA), na presença de cininogênio HMW (alto peso molecular), reação esta acelerada pela pré-caliceína. O fator XIa ativa o fator IX ou fator Christmas que, quando ativado, atua em conjunto com o fator VIIIa, fosfolipídios pla-

quetários e com o fator 3 das plaquetas traumatizadas, ativando o fator X. (ver anexo 1)

Apesar da fundamental participação do fator VIII nesse processo, mesmo quando presente em concentrações relativamente baixas no plasma, o organismo conseguirá assegurar uma adequada função de pró-coagulação. Somente uma redução substancial deste fator (maior que 70%) é capaz de levar a distúrbios sangüíneos típicos da hemofilia A. É importante salientar que os fatores IXa e Xa são proteases do tipo serina que têm a capacidade de formarem complexos ligadores de membrana com cofatores específicos, que são proteínas não enzimáticas: fator VIII no caso do fator IXa e fator V no caso do fator Xa. O complexo fator VIIIa/IXa é conhecido como complexo X-ase, que cliva o fator X, ativando-o. O fator Xa age com o fator Va formando o complexo protrombinase ou ativador da protrombina.⁷ A função destes cofatores é acelerar a velocidade das reações em milhares de vezes.

O fator VIII circula no plasma como um grande complexo glicoprotéico não-covalente com o fator de von Willebrand (FvW), uma proteína multimérica, acentuando a síntese de fator VIII, protegendo-o contra a proteólise e aumentando sua concentração no sítio da lesão vascular. Durante muito tempo, esta interação causou muita confusão, sendo que somente na década de 70 é que se conseguiu fazer a distinção entre esses dois fatores.¹

No entanto, o fator VIII só poderá fazer parte do complexo X-ase quando ele conseguir se separar do FvW, visto que esta ligação impede sua ação sobre as superfícies fosfolipídicas de células danificadas e plaquetas aderidas. Esta separação requer a clivagem da cadeia leve do fator VIII pela trombina ou pelo fator Xa.¹

A atividade da via intrínseca é medida pelo TTPA. Observou-se que pacientes com deficiência do fator XII ou do cininogênio HMW (com TTPA prolongado) não apresentavam episódios de sangramento, demonstrando, portanto, que esses fatores não são importantes para a ativação fisiológica da cascata da coagulação. No entanto, a deficiência do fator XI está claramente relacionada a sintomas de sangramento. Este aparente paradoxo parece ser explicado pela recente demonstração da ativação do fator XI pela trombina e sua auto-ativação pelo fator XIa.⁷

Estrutura do Fator VIII

O gene do fator VIII está localizado no topo do braço longo do cromossomo X (Xq28). Trata-se de um gene de grande tamanho com 186 kilobases (kb), representando 0,1% da constituição total do cromossomo X.^{29,30} Este gene é constituído por 26 éxons, correspondendo a um RNA mensageiro (RNAm) de 9 kb. Dos 26 éxons, 24 variam em comprimento de 69 a 262 pares de bases. Os éxons 14 e 26 contêm 3106 e 1958 pares de bases, respectivamente, constituindo os maiores éxons. Em relação aos íntrons, seis deles são maiores que 14 kb. Incomumente, o íntron que separa os éxons 22 e 23 contém a ilha CpG associada com duas transcrições adicionais chamadas F8A e F8B. O F8B é transcrito na mesma direção que o gene do fator VIII, usando um éxon próprio mais os éxons 23 a 26 do fator VIII. Já o F8A não contém íntrons e é transcrito na direção oposta ao gene do fator VIII. Além disso, duas cópias de F8A estão implicadas em quase metade dos casos de hemofilia A severa via mecanismo de inversão parcial.²⁸

O RNAm do fator VIII codifica um polipeptídeo de 2351 aminoácidos, do qual um peptídeo hidrofóbico de 19 aminoácidos é removido durante a secreção,¹ formando conseqüentemente o fator VIII como uma proteína plasmática de 2332 aminoácidos que circula ligado ao FvW, que age como carreador do fator VIII na circulação.

O fator VIII é constituído por uma estrutura com seqüências repetidas, onde encontramos três domínios A (A1, A2 e A3), dois domínios C (C1 e C2) e um grande domínio B central. Este domínio B, codificado pelo éxon 14, não tem sua função claramente esclarecida, contudo parece exercer a função de conexão. Visto que fatores VIII recombinantes, cujo domínio B estava ausente, mantinham sua função relativamente

normal, mostrando, portanto, que pode ser dispensável.¹ É importante salientar que os Fatores V e VIII apresentam estruturas semelhantes, além de exercerem a função de cofator na cascata da coagulação.

Durante a ativação do fator VIII, o domínio B é clivado, resultando em duas cadeias que juntas representam 70% da massa molecular. A cadeia pesada é constituída pelos domínios A1 e A2, já a cadeia leve pelos domínios A3, C1 e C2. Entre o domínio A2 e A3 está o domínio B. (ver anexo 2)

Embora o fator VIII seja sintetizado como um polipeptídeo de cadeia simples, uma protease ainda indefinida cliva a proteína imediatamente após a sua síntese, tornando o fator VIII plasmático um heterodímero, cuja cadeia leve de 80 kDa é divalente e a cadeia pesada é um complexo cálcio-dependente que contém quantidades variáveis do domínio B. No entanto, posteriormente ocorre a clivagem do fator VIII plasmático pela trombina ou fator Xa nos sítios 372 e 1689 da arginina, essencial para a liberação do fator VIII ligado ao FvW, permitindo que o fator VIII se ligue à superfície fosfolipídica e interaja com o fator IXa.

Além dessas clivagens citadas acima, há ainda uma outra clivagem não essencial no sítio 740 da arginina pela ação da trombina ou fator Xa, convertendo a cadeia pesada em um fragmento de 92 kDa.¹

A clivagem no sítio 372 da arginina, citada anteriormente, converte a cadeia pesada em dois fragmentos, um de 54 kDa e outro de 44 kDa,^{31,32,33,34} ambos essenciais para a atividade pró-coagulante. Ao mesmo tempo, um pequeno fragmento da cadeia leve é clivado para separar o fator VIII do FvW. Esta clivagem leva à ativação do fator VIII, o qual é composto pelos fragmentos 54 kDa e 44 kDa da cadeia pesada e pelo fragmento 72 kDa da cadeia leve. Estudos demonstraram que a etapa limitante na ativação do fator VIII é a clivagem da cadeia pesada no sítio 372 da arginina. O mesmo estudo demonstrou que a associação do fator VIII com o FvW causa um aumento de oito vezes na eficiência de catalização da trombina na clivagem da cadeia leve, o mesmo não ocorrendo na clivagem dos resíduos 372 e 740.

É importante salientar que a clivagem inicial e a ativação do fator VIII podem ser devido a uma pequena quantidade de fator Xa formado pelo complexo catalítico do fator tecidual e do fator VIIa. Contudo, a formação do fator Xa por este mecanismo é

rapidamente reprimida por uma via de inibição do fator tecidual. Conseqüentemente, o fator X passa a ser clivado pelo fator IXa, sendo este mecanismo acelerado por feedback positivo gerado pela trombina que ativa o fator VIII.

A função de cofator exercida pelo fator VIII é prontamente perdida, não pela ação de proteólise pela trombina ou fator Xa, mas sim pela própria instabilidade molecular deste fator que resulta da dissociação de suas subunidades. A proteína C ativada também exerce papel importante na inativação, clivando-o nos sítios 336 e 562 da arginina.^{35,36,37}

Genética Molecular

Existe um amplo espectro de defeitos genéticos que atingem o gene do fator VIII. A caracterização das mutações tem sido feita de maneira lenta, devido ao grande tamanho do gene, que permite que haja vários pontos de mutações que não afetam sítios da enzima de restrição, microdeleções que estão abaixo dos limites de resolução do Southern blotting e mutações dentro de íntrons. Recentemente, algumas limitações puderam ser solucionadas com o uso da técnica de eletroforese por gel com gradiente de desnaturação, permitindo a detecção de alterações em um único nucleotídeo, e da técnica que se baseia no uso da transcrição reversa do RNA mensageiro por PCR (RT-PCR).

Aproximadamente um terço dos pontos de mutações que ocorrem no fator VIII estão localizadas no dinucleotídeo CpG, considerado um “ponto quente” para mutação no genoma humano.²⁸ Youssoufian et al. (1987) chegou a esta conclusão ao observar que citosina metilada pode espontaneamente desaminar a tiamina, resultando numa transição C para T no DNA.³⁸ Além deste ponto, um grande número de mutações de um único par de base tem ocorrido no sítio da endonuclease de restrição Taq1. A Taq1 reconhece a seqüência TCGA, e mutações neste sítio podem ser diretamente detectadas pela perda deste sítio de clivagem.²⁸

Os diversos defeitos genéticos que atingem o gene do fator VIII podem ser agrupados em várias categorias: rearranjos, substituição de uma única base de DNA levando tanto a uma substituição de aminoácidos (missense) ou a um término prematuro na cadeia peptídica (nonsense ou mutação em parada), deleções na seqüência genéti-

ca variando de um único par de base a todo gene, ou ainda, inserção de DNA de tamanho variável.

Rearranjos Gênicos

Consistem basicamente em uma única inversão responsável por mais de 40% de todos os casos de hemofilia A severa.

Durante muito tempo tentou-se descobrir a causa de mutações em pacientes severos por amplificação por PCR de todos os 26 éxons. No entanto, somente em 50% dos casos estas mutações foram encontradas. No restante dos pacientes, todas as seqüências dos éxons foram normais, sugerindo que alguns casos de hemofilia A eram devido a mutações fora da região codificadora do fator VIII. Contudo, com a utilização do RT-PCR do RNAm neste pacientes, verificou-se que não era possível a amplificação entre os éxons 22 e 23. Hoje é sabido que em todos esses pacientes há uma grande inversão e translocação dos éxons 1 a 22, juntamente com os íntrons, com os éxons 23 a 26, cujo mecanismo é uma recombinação homóloga entre o gene F8A no íntron 22, cuja função é ainda desconhecida, e uma cópia F8A extragênica de 400 Kb 5' do gene do fator VIII. Ou seja, há uma mutação no íntron 22 devido à presença de duas áreas no topo do cromossomo X (2 cópias de gene A) com seqüências homólogas a uma única cópia dentro do íntron 22 do gene do fator VIII. Assim, a inversão ocorre devido a uma recombinação homóloga entre o pequeno gene A dentro do íntron 22 e uma das duas cópias adicionais do gene A localizadas distantes do fator VIII, resultando na inversão do segmento do gene do fator VIII que inclui os éxons 1-22. Isto leva a uma remoção da terminação C da proteína codificada pelos éxons 23-26, ocasionando uma perda completa da função deste fator. Com esta descoberta, por meio da análise feita por Southern blotting, que detecta esta inversão com o uso da enzima de restrição *BclI* e o gene A como probe, agora pode-se identificar o defeito em aproximadamente 45% dos casos de Hemofilia A severa.²⁸

Sabe-se que um único erro no crossing-over durante a meiose espermatogênica pode levar à fragmentação do gene, com subsequente formação de gametas mutados. Esta descoberta traz implicações clínicas importantes, visto que as mulheres geradas

destes gametas podem ser carreadoras da mutação, mesmo na ausência de uma história familiar. Na verdade, estudos familiares demonstraram que a origem para tal inversão é quase que exclusivamente de um gameta de um homem normal. Recentemente, determinou-se que os dois tipos mais comuns de inversões são a cópia distal de F8A, responsável por 35% dos casos de hemofilia A severa, enquanto que o crossing-over com a cópia proximal é responsável por aproximadamente 7% dos casos.²⁸

Substituição de Única Base

Há aproximadamente 309 tipos diferentes de substituições de base única descritos. Destas, 85% levam à alteração de um único aminoácido – mutação missense; 14% levam à criação de um códon de parada – mutação nonsense, enquanto que em casos esporádicos, o *splicing* do RNAm do fator VIII pode estar alterado ou ausente.

O códon do aminoácido arginina (CGA, CGC, CGG) é freqüentemente afetado por mutações nos “pontos quentes”. Dependendo de qual segmento do DNA é afetado, poderemos observar tanto códon de parada (TGA) como um códon para o glutamato (CAA), cistina (TGC) ou glicina (GGC).

Mutações missense podem interferir na ativação ou função do fator VIII, resultando em vários tipos de fenótipos que variam de moderado a severo, dependendo do tipo específico do aminoácido substituído. Por exemplo, algumas substituições de diferentes aminoácidos têm sido observadas substituindo a arginina do códon 372, sítio no qual a trombina age para ativar o fator VIII.²⁸

Mutações nonsense resultam, quase que invariavelmente, em hemofilia A severa, devido à formação de uma molécula de fator VIII truncada.

Deleções

As deleções presentes no gene do fator VIII contribuem para 5% dos casos de hemofilia A,^{1,9} sendo freqüentemente associadas à doença severa. Estas deleções podem ocorrer nas células germinativas tanto masculinas como femininas. Foram dividi-

das arbitrariamente em grandes deleções e pequenas deleções, cujo limite é de 100 pares de bases.

Grandes Deleções

Neste grupo, há deleções desde menos que 1 kb até mais que 210 kb, deletando praticamente todo o gene. O mecanismo mais provável das grandes deleções é a recombinação não-homóloga., sendo responsável por aproximadamente 5% dos casos severos de hemofilia A. Estas grandes deleções quase que invariavelmente levam à doença severa, cuja atividade plasmática do fator VIII não pode ser medida e antígenos não detectados.

Há apenas 3 relatos de casos de doença moderada envolvendo grandes deleções dos éxons 22 e éxons 23-24 associados. Estas deleções podem ser resultado do *splicing* do RNAm que deleta o éxon 22 ou ambos éxons 23 e 24, com subsequente secreção de fator VIII hipoativo pela perda dos aminoácidos 52 ou 98 respectivamente.³⁸

É importante salientar que estes pacientes têm um grande risco (38%) de desenvolverem inibidores do fator VIII, ou seja, anticorpos anti-fator VIII, embora ainda não haja correlação óbvia entre o tamanho da deleção e a tendência a desenvolver estes inibidores.²⁸

Pequenas Deleções

Neste grupo há deleções desde 1 até 86 pares de bases, que estão distribuídas através dos éxons e quase todas associadas à doença severa. Há relatos, porém, em que pequenas deleções que não alteram a matriz de leitura do gene resultam em doença moderada.⁹ No entanto, se compararmos estes pacientes com os de grandes deleções, veremos que o risco de desenvolverem inibidores para o fator VIII é menor (9,6%).²⁸

A maioria destas deleções produz mutações do tipo *frameshift* (mudança de matriz de leitura) e conseqüentemente abolição da expressão do fator VIII. Há um “pon-

to quente” de uma deleção A simples num segmento de 9 bases A nos códonos 1191-1194, onde uma única inserção também foi vista.²⁸

Inserções

As inserções relatadas até então variam em tamanho de 1 par de bases a 2,1 kb, todas elas associadas à doença severa. A inserção L1 (LINE-1) é caracterizada por elementos genéticos encontrados no genoma humano que carregam similaridade ao DNA da transcriptase reversa retroviral.³⁸ No entanto, o nível de antígeno do fator VIII não é conhecido, conseqüentemente, não se sabe se esta proteína variante é inativa ou expressada em grau inferior ao normal.

Diagnóstico

Diagnóstico Clínico

Em pacientes hemofílicos, a tendência ao sangramento é diretamente relacionada à deficiência de fator VIII da coagulação presente no plasma. Os sangramentos podem ocorrer em qualquer local. Entretanto, os sítios mais comumente afetados são as articulações (joelhos, tornozelos e cotovelos), os músculos e o trato gastrointestinal. Hemartroses espontâneas são tão características da hemofilia que podem ser consideradas virtualmente como diagnósticas para a doença.

Pacientes com a forma leve de hemofilia sangram somente após grandes traumas ou cirurgias; aqueles com hemofilia moderada sangram após traumas médios ou cirurgias; e aqueles com hemofilia severa podem sangrar espontaneamente.

Muitos hemofílicos são atualmente infectados pelo HIV devido à transmissão pela infusão de concentrados do fator VIII no passado, sendo que muitos têm desenvolvido a AIDS. A trombocitopenia imune associada à infecção pelo HIV pode agravar a tendência a sangramentos.

Diagnóstico Laboratorial

Na hemofilia A, o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) está prolongado. Entretanto, as outras medidas da coagulação, incluindo contagem de plaquetas, tempo de pró-trombina (TP), tempo de sangramento e nível de fibrinogênio são normais. Níveis plasmáticos ativos do fator VIII da coagulação encontram-se reduzidos, mas as medidas do fator de von Willebrand são normais.

Se misturarmos uma amostra de plasma de um paciente hemofílico com plasma normal, o TTPA da mistura será normal. Falhas na normalização dos valores do TTPA após a mistura indica que o plasma do paciente hemofílico apresenta anticorpos inibidores do fator VIII.

Cabe ressaltar também que o achado de plaquetopenia em pacientes hemofílicos nos indica a possibilidade de haver trombocitopenia imune, causada pela associação com infecção pelo HIV¹⁶.

Diagnóstico Genético

A introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação específica *in vitro* de curtos segmentos de DNA tem revolucionado a análise das mutações no DNA. O DNA genômico pode ser retirado de um paciente hemofílico, por exemplo, pela coleta e separação de glóbulos brancos sanguíneos. Após, todo o segmento, inclusive as zonas de junção (*splicing*) entre éxons podem ser amplificadas pelo uso de um primer específico para a determinada seqüência de DNA: os segmentos amplificados podem então ser diretamente seqüenciados para indicar a presença de qualquer um dos defeitos possíveis causadores de hemofilia A. Há, entretanto, dois problemas com esta abordagem da análise do gene do fator VIII: 1) o grande tamanho da região codificadora – 26 éxons com mais de 9 Kb de seqüências codificadoras a serem estudados; e 2) essa estratégia pode não detectar rearranjos gênicos (inversões) onde a seqüência de éxons esteja inalterada. Estas e outras considerações devem ser analisadas para adoção de outras estratégias que, dependentes do PCR, trazem facilidade e rapidez na identificação desses defeitos, como o RT-PCR. Para a detecção de mutações *missense*, uma variedade de métodos baseados em gel tem sido usados para avaliar um éxon em particular por seqüenciamento (*Michaelides et al 1994*), ao passo que rearranjos não-delecionais podem ser detectados pelo método de Southern blotting usando um probe correspondente à região F8A do íntron 22 (*Lakich et al 1993*).

Diagnóstico Diferencial

Inicialmente, a hemofilia A deve ser distinguida de outras patologias que causem um tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) prolongado. Através de exames laboratoriais (dosagem dos fatores da coagulação) este diagnóstico diferencial é facilmente feito quando encontramos níveis de fator VIII reduzidos.¹⁶

Tabela 2 – Diagnóstico diferencial das causas de TTPA prolongado.

Causas que podem gerar um TTPA prolongado:

- Deficiências congênitas de fatores
 - Fatores de contato
 - Fator XII
 - Fator XI
 - Fator IX (hemofilia B)
 - Fator VIII (hemofilia A e doença de von Willebrand)
 - Anticoagulantes
 - Anticorpo anti-fator VIII
 - Lúpicos
 - Heparina
-

Clinicamente, a hemofilia A é indistinguível da B (deficiência de fator IX), e apenas estudos laboratoriais podem distinguir estas duas patologias.

Nos casos de hemofilia A leve a moderada, é necessária uma diferenciação da doença de von Willebrand. Como o fator de von Willebrand liga-se ao fator VIII na circulação e o estabiliza, a deficiência grave do fator de von Willebrand acompanha-se de redução dos níveis de fator VIII. Isso porque há uma diminuição na meia-vida do fator VIII, pois o fator de von Willebrand (seu carreador) encontra-se diminuído ou ausente. Todavia, ao contrário da hemofilia, a doença de von Willebrand é herdada como caráter autossômico dominante, e o paciente pode apresentar uma história de sangramento do tipo vascular¹⁶. Na triagem, o tempo de sangramento deve estar visivelmente prolongado na doença de von Willebrand, ao passo que encontra-se dentro do limite na hemofilia. A investigação adicional deve demonstrar a presença de deficiência ou anormalidade do fator de von Willebrand, com agregação deficiente das plaquetas mediada pelo

antibiótico ristocetina na doença de von Willebrand, mas não na hemofilia.^{18,19} Se persistir qualquer dúvida quanto ao diagnóstico, pode ser útil efetuar exames laboratoriais nos membros da família, a fim de determinar o padrão da herança da deficiência.

Uma outra investigação importante das famílias de pacientes hemofílicos é identificar quais as mulheres que são portadoras do gene para hemofilia A. Elas podem ser identificadas pela presença de baixa atividade coagulante do fator VIII, mas com níveis normais de antígenos do fator VIII.

Diagnóstico Pré-Natal e Aconselhamento Genético

Embora os avanços no tratamento tenham melhorado significativamente o prognóstico de pacientes com hemofilia severa, as complicações do tratamento, incluindo doenças virais e formação de inibidores (anticorpos contra o fator VIII exógeno), alto custo, e necessidade freqüente de hospitalização, geram um ônus físico, psicológico e financeiro para os pacientes, familiares e sistema de saúde. Por estas razões, muitas mulheres parentes de pacientes hemofílicos desejam saber suas reais chances de transmitir a doença. Embora algumas possam ser identificadas como carreadoras baseando-se apenas na história familiar (filhas de pais hemofílicos), mulheres cujos irmãos ou parentes mais distantes são afetados desejam mais do que apenas uma probabilidade estatística.¹ A combinação de análises laboratoriais pode determinar o status de carreadora ou não carreadora com mais de 95% de sensibilidade em aproximadamente 80% das mulheres avaliadas.^{39,40,41}

Mais recentemente, a análise do DNA, através do método de PCR (*polymerase chain reaction*), tem sido utilizada para determinação de mulheres carreadoras.⁴² Dada a habilidade de amplificar e seqüenciar cada éxon, numerosas mutações no gene do fator VIII foram identificadas. Logo se tornou evidente que 40 a 50% das mutações causadoras de hemofilia severa eram indetectáveis pelos antigos métodos de clonagem gênica por resultarem de uma inversão das seqüências de DNA dentro do íntron 22, que é excisado do gene do fator VIII. Estas mutações somente foram detectadas a partir da introdução do método de RT-PCR.⁴³ Mutações específicas são atualmente utilizadas para a identificação direta de genes com finalidade de diagnóstico pré-natal e análise de pacientes carreadoras.

A análise das mutações também pode ser usada no estudo da predisposição de cada paciente ao desenvolvimento de anticorpos que inativem o fator VIII.⁸ Dependendo do tipo de mutação do gene do fator VIII, o portador terá diferentes chances de desenvolvimento de inibidores.

Até a amniocentese se tornar disponível na década de 1970, muitas mulheres que eram carreadoras ou potencialmente carreadoras eram aconselhadas a evitar a gravidez. Quando a determinação do sexo por análise citogenética se tornou disponível, algumas gestantes carreadoras escolhiam interromper gestações envolvendo fetos masculinos em países cujo aborto era permitido, mesmo sabendo que a chance do filho ser hemofílico era de 50%. Em 1979, a fetoscopia assistida por ultrassonografia tornou possível a obtenção de amostras de sangue fetal entre a 18^a e 20^a semana de gravidez através de cordocentese, e o diagnóstico de hemofilia se tornou mais acessível com o advento de imunoenaios sensíveis ao fator VIII.¹ Desde 1985, o diagnóstico pré-natal se tornou possível durante a 8^a e 10^a semana de gestação através da análise do DNA de amniócitos (amniocentese) ou material das vilosidades coriônicas.⁴⁴

Tratamento

O tratamento básico da hemofilia A consiste na restituição da atividade deficiente do fator VIII, mas não se limita a isso. O manejo clínico destes pacientes vai muito além da reposição do fator deficiente. Eles devem ser avaliados rotineiramente em centros especializados por equipes multidisciplinares. Embora a avaliação geral do paciente dependa de sua condição física, ela deve incluir uma anamnese completa e uma avaliação do sistema musculoesquelético, com recomendações para programas de exercícios e conselhos para uma boa higiene oral.

Para a reposição do fator VIII deficiente, devemos optar entre a utilização de derivados plasmáticos ou de fator VIII recombinante. Segurança, custo e disponibilidade são os principais fatores a serem levados em conta na hora de decidirmos o tratamento para cada paciente. Devido à disponibilidade reduzida de fatores recombinantes, os fatores derivados do plasma, atualmente muito mais seguros que no passado, constituem a terapia mais utilizada.¹ Os maiores problemas da utilização destes derivados são sua capacidade de transmitir agentes infecciosos e de induzir a formação de inibidores do fator VIII. Na metade da década de 1980, 60 a 70% dos pacientes com hemofilia severa na Europa Ocidental e nos Estados Unidos tornaram-se infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), adquirido através de concentrados plasmáticos.⁸ Os derivados plasmáticos aceitos no momento são o crioprecipitado e o plasma fresco, não sendo utilizado sangue total.

A segurança dos fatores derivados do plasma depende da carga viral do concentrado plasmático e do grau de inativação destes vírus. Os procedimentos atualmente utilizados para a inativação de vírus incluem aquecimento do concentrado a altas

temperaturas (80°C ou mais), aquecimento do concentrado até 60°C em solução com vapor, e a adição de uma mistura de um solvente orgânico e um detergente ao concentrado.^{45,46} A mistura solvente-detergente é amplamente usada devido a sua alta efetividade em inativar os vírus da hepatite B e C e o HIV, entretanto esta mistura não inativa vírus sem envelope lipídico. Esta falha levou a surtos de hepatite A em pacientes hemofílicos.⁴⁶ Como resultado, hoje são utilizados pelo menos dois procedimentos de inativação viral.

Duas preparações de fator VIII recombinante foram liberadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) no início da década de 1990. Estudos clínicos demonstraram sua excelente eficácia e a alta correlação entre a dose administrada e os níveis de fator VIII alcançados no plasma.^{47,48,49,50} Nenhum anticorpo foi formado contra as proteínas animais utilizadas na produção dos fatores recombinantes e nenhuma transmissão viral foi verificada. Em pacientes hemofílicos previamente tratados com derivados plasmáticos, o fator VIII recombinante freqüentemente desencadeou a formação de novos inibidores, limitando sua utilização neste grupo de hemofílicos. Já entre os pacientes previamente não tratados, 25 a 30% desenvolveram inibidores nas primeiras 10 a 20 infusões. Entretanto, em um terço a um meio destes pacientes, os inibidores rapidamente desapareceram ou permaneceram em títulos muito baixos; assim sendo, a incidência de inibidores permanentes em altos títulos não foi maior do que os esperados 10 a 15% encontrados nos pacientes tratados com derivados plasmáticos,^{51,52} levando a crer que os fatores recombinantes não são mais imunogênicos do que os fatores derivados do plasma.

A escolha do produto adequado para a reposição de fator VIII deve levar em conta três fatores: os fatores derivados do plasma estão se tornando mais seguros, os fatores recombinantes custam duas a três vezes mais que os derivados, e a capacidade de produzir fatores recombinantes ainda é limitada, podendo gerar períodos de escassez desses fatores. Levando-se em consideração que os fatores recombinantes são considerados tão seguros quanto os derivados do plasma, quase todos os pacientes com hemofilia na maioria dos países recebem derivados plasmáticos. Nos Estados Unidos, 60% dos pacientes com hemofilia severa recebem fatores recombinantes. A Itália e a Inglaterra dão prioridade para o uso de fatores recombinantes em pacientes recente-

mente diagnosticados, previamente não tratados e em pacientes que ainda não desenvolveram infecções contagiosas pelo tratamento com derivados plasmáticos.⁸

Como curiosidade, em 1985 Lewis et al. publicaram o caso de um paciente hemofílico com cirrose por hepatite crônica viral, adquirida com a terapia de reposição de fatores plasmáticos, submetido a um transplante hepático de um doador normal. No período pós-operatório foram detectados níveis quase normais do fator VIII no sangue do paciente.⁵³ Ressaltamos, entretanto, que o transplante hepático não deve ser considerado uma modalidade terapêutica, pois seu alto custo e complicações impedem sua larga utilização.

Um dos problemas de maior dificuldade no manejo clínico da hemofilia é o desenvolvimento de anticorpos contra o fator VIII em alguns pacientes. O fator VIII é uma proteína estranha em muitos pacientes com hemofilia severa, e 10 a 20% destes pacientes desenvolvem formas de inibidores do fator VIII.¹ Pacientes cuja hemofilia é devido a grandes deleções ou mutações nonsense são mais suscetíveis a formar inibidores, embora a deficiência de fator VIII por outras mutações possa também causar aparecimento de inibidores.

Em um amplo estudo de coorte com pacientes com hemofilia A, dos quais um quarto possuía inibidores, aqueles portadores de mutações missense e pequenas deleções tiveram baixa incidência de inibidores (4 e 7%, respectivamente), ao passo que naqueles com inversões envolvendo o íntron 22, grandes deleções, e mutações nonsense tiveram uma incidência muito maior (34%, 36% e 38%, respectivamente).⁵⁴ Estudos familiares sugerem que as características da resposta imune herdada afetam a formação de inibidores, entretanto estudos de histocompatibilidade ainda não identificaram um padrão que seja consistentemente ligado a qualquer predisposição ou resistência à formação de inibidores.

Anticorpos anti-fator VIII usualmente levam a distúrbios severos da crase, com sangramentos importantes. O TTPA é prolongado, mas os níveis de fibrinogênio, TP (tempo de protrombina) e contagem de plaquetas não são afetados. A presença de anticorpos deve ser suspeitada em qualquer sangramento severo associado a um TTP prolongado. O diagnóstico é confirmado por testes combinados e *in vivo* pela incapacidade de elevar os níveis de fator VIII através de concentrados de fator VIII. O tratamen-

to de escolha é ciclofosfamida, usualmente combinada com prednisona. Plasmaferese para reduzir os níveis de inibidores também pode ser útil.¹⁶

Em pacientes com hemofilia A leve ou moderada, assim como naqueles com doença de von Willebrand, pode ser usado desmopressina (1-deamino-8-D-vasopressina, ou DDAVP), um análogo sintético da vasopressina que aumenta a liberação e, por conseguinte, os níveis de fator VIII e do fator de von Willebrand.^{55,56} Uma vantagem óbvia da desmopressina é a ausência de transmissão de doenças e formação de inibidores. Embora haja grande variação entre os pacientes, uma dose intravenosa de 0,3 µg por quilograma geralmente aumenta os níveis de fator VIII e fator de von Willebrand três a cinco vezes em relação aos valores basais pré desmopressina em pacientes com deficiência de fator VIII leve ou moderada.

Apesar de todos estes avanços no tratamento da hemofilia A, ainda permanece como um desafio para a sociedade o fato de que quatro quintos dos pacientes hemofílicos, principalmente em países subdesenvolvidos, não recebem qualquer tipo de tratamento.⁵⁷ A alternativa atual que surge é a produção e purificação em larga escala do fator VIII extraído do leite de animais transgênicos, sendo um tipo mais barato de terapia de reposição do fator VIII em países mais pobres.

Doenças Secundárias em Pacientes Hemofílicos

Antes do advento dos procedimentos de inativação viral, a maioria dos pacientes hemofílicos que foram submetidos ao tratamento com fatores plasmáticos tornou-se cronicamente infectada pelos vírus da hepatite B, hepatite C e HIV. Estes vírus podem ter sérias conseqüências a médio e longo prazo além da cirrose hepática e da síndrome da imunodeficiência adquirida: nessas pessoas também é comum o desenvolvimento de certos tipos de tumores.

Um estudo de coorte em pacientes hemofílicos infectados pelo HIV mostrou que a freqüência de sarcoma de Kaposi foi duzentas vezes maior do que a apresentada pela população geral²⁰. Este mesmo estudo encontrou uma freqüência de linfoma não Hodgkin aproximadamente vinte e nove vezes maior do que a presente na população geral.²⁰

A cirrose hepática, que se estabelece em dez a vinte por cento dos pacientes hemofílicos cronicamente infectados pelos vírus da hepatite B ou C, aumenta o risco para aparecimento de carcinoma hepatocelular. Estudos mostraram que em pacientes hemofílicos o risco para desenvolvimento deste carcinoma é trinta vezes maior que o da população geral.²¹

A introdução de terapias anti-retrovirais altamente ativas tem reduzido a morbidade e a mortalidade de pacientes hemofílicos infectados pelo HIV.^{22,23} Entretanto, combinações terapêuticas que incluem inibidores da protease parecem aumentar a suscetibilidade desses pacientes a sangramentos espontâneos, particularmente em locais incomuns, tais como os dedos e articulações do punho.^{24,25} A possibilidade de que

terapias anti-retrovirais possam aumentar o risco de doenças cardiovasculares precoces em pacientes hemofílicos²⁶ ainda é tema de discussão.

Terapia Gênica

De todas as doenças genéticas, as hemofilias (especialmente a A), apresentam a combinação de fatores que lhes tornam provavelmente as candidatas mais favoráveis à terapia de reposição gênica. As manifestações clínicas destas doenças são atribuíveis a falta de um único produto gênico (fator VIII ou IX) que circula no plasma em pequenas quantidades.⁸ Não é necessário um controle muito rigoroso da expressão gênica, visto que um pequeno aumento nos níveis dessa proteína (fator VIII) melhora substancialmente os sintomas nos casos severos. O tratamento atualmente disponível consiste na reposição periódica de produtos plasmáticos humanos ou proteínas recombinantes que são sintetizadas em tecidos de cultura. A terapêutica ideal seria aquela que proporcionasse produção endógena contínua destes fatores, protegendo o paciente de sangramentos e agentes infecciosos que possam estar presentes nas terapias de reposição. Teoricamente, este objetivo pode ser alcançado com a terapia gênica.⁵⁸

Alguns estudos vêm analisando a viabilidade de uma terapia gênica baseada na liberação de fatores virais, os quais seriam responsáveis pela expressão do fator VIII. Dois obstáculos são encontrados nos estudos em animais. Os vetores baseados nos vírus da leucemia murina de Moloney inicialmente produziram apenas pequenas quantidades de fator VIII devido à instabilidade do RNA mensageiro deste fator. Este problema foi corrigido através de manipulação dos vetores e uso de DNA complementar (cDNA). Estas mudanças aumentaram grandemente (de 100 a 1000 vezes) os títulos de vetores virais, mas a transferência gênica inadequada (transdução) *in vivo* permanece um problema, visto que os vetores necessitam divisão celular do hospedeiro para uma integração eficiente.⁵⁹

Atualmente, está em andamento um estudo em pacientes com hemofilia A severa, no qual a terapia é baseada na injeção intravenosa de vetores de retrovírus da leucemia murina contendo cDNA para o fator VIII que não possui o domínio B. Os resultados deste estudo ainda não foram publicados.⁵⁸

Em junho de 2001, Roth et al. publicaram os resultados de um estudo em pacientes submetidos a um tipo diferente de terapia gênica, sem vetores virais. A técnica se baseia na introdução do gene do fator VIII em fibroblastos da pele *ex vivo* por eletroforese seguida de implantação destas células na cavidade peritoneal dos pacientes.⁶⁰ Os autores encontraram níveis detectáveis de fator VIII em quatro dos seis pacientes que receberam estas células; dois pacientes obtiveram níveis superiores a 1,0% do normal, considerado o limiar terapêutico. Nenhum dos pacientes desenvolveu inibidores contra o fator VIII. O uso de fator VIII recombinante pôde ser diminuído em três pacientes com os maiores níveis de atividade do fator, e o número de episódios de sangramento espontâneo diminuiu substancialmente. Entretanto, os níveis de fator VIII foram progressivamente diminuindo e se tornaram indetectáveis 10 meses após a administração dos fibroblastos modificados em três dos quatro pacientes. O declínio dos níveis de fator VIII pode ser atribuído ao silenciamento do gene, *clearance* imunológico dos fibroblastos, ou senescência dos fibroblastos primários após extensivo crescimento *ex vivo*.

A escolha da via intraperitoneal para a administração das células, embora tecnicamente simples, é problemática por diversas razões. Primeiro, a incapacidade de recuperação destas células para análise deixa muitas questões sem resposta. Uma delas é o mecanismo do declínio da expressão gênica; entretanto, há outras potenciais complicações deste procedimento. Por exemplo, estes pacientes formam adesões como resultado de um processo inflamatório no peritônio tentando eliminar as células ectópicas? E o que acontece com os fibroblastos submetidos às suas capacidades quase máximas de divisão? A transformação maligna é plausível sob estas circunstâncias?⁵⁸

Afora estas questões, os resultados apresentados por Roth et al. são promissores. Níveis detectáveis de fator VIII no plasma ainda não tinham sido alcançados por terapia gênica antes deste estudo. A afirmação de que níveis de fator VIII acima de 1,0% são terapêuticos ainda é discutível. Mesmo assim, é inegável que o futuro da he-

mofofilia passa por estes estudos gênicos que investiguem a real capacidade de fazer com que o paciente hemofílico produza seu próprio fator VIII.

Referências Bibliográficas

1. Hoyer LW. Hemophilia A. *N Engl J Med* 1994;330:38-47.
2. Levine PH. Clinical manifestations and therapy of hemophilias A and B. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1987:97-111.
3. Ingram GIC. The history of haemophilia. *J Clin Pathol* 1976;29:469-79.
4. White GC II, Shoemaker CB. Factor VIII gene and hemophilia A. *Blood* 1989;73:1-12.
5. Bloom AL. Inherited disorders of blood coagulation. In: Bloom AL, Thomas DP, eds. *Haemostasis and thrombosis*. 2nd ed. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone, 1987:393-436.
6. Otto JC. An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. *Med Repos* 1803;6:1-4.
7. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 3th edition, 1996:1651-60.
8. Mannucci PM, Tuddenham EGD. The Hemophilias – From Royal Genes to Gene Therapy. *N Engl J Med*, Vol. 344, No. 23, June 7, 2001.
9. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. *Williams Hematology*. 5th edition, 1995:1413-23.
10. Kitchens CS. Occult hemophilia. *Johns Hopkins Med J* 1980;146:255-9.

11. Larsson SA. Life expectancy of Swedish haemophiliacs, 1831-1980. *Br J Haematol* 1985;59:593-602.
12. Smit C, Rosendaal FR, Verekamp I, et al. Physical condition, longevity, and social performance of Dutch haemophiliacs, 1972-85. *BMJ* 1989;298:235-8.
13. Goedert JJ, Kessler CM, Aledort LM, et al. A prospective study of human immunodeficiency virus type I infection and the development of AIDS in subjects with hemophilia. *N Engl J Med* 1989;321:1141-8
14. Holman RC, Rhodes PH, Chorba TL, Evatt BL. Survival of hemophilic males with acquired immunodeficiency syndrome with and without risk factors for AIDS other than hemophilia. *Am J Hematol* 1992;39:275-82.
15. Jackson JB, Sannerud KJ, Hopsicker JS, et al. Hemophiliacs with HIV antibody are actively infected. *JAMA* 1988;260:2236-9.
16. Tierney LM, Mcphee SJ, Papadakis MA. *Current Medical Diagnosis & Treatment* 2001, 40th edition (548-549).
17. Hoyer LW. Immunochemical properties of factor VIII and factor IX inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991;2:11-5.
18. Tuddenham EG. von Willebrand factor and its disorders: an overview of recent molecular studies. *Blood Rev* 1989;3:251-62.
19. Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor: relationship to von Willebrand's disease. *Mayo Clin Proc* 1991;66:847-61.
20. Rabkin CS, Hilgartner MW, Hedberg KW, et al. Incidence of lymphomas and other cancers in HIV-infected and HIV-uninfected patients with hemophilia. *JAMA* 1992;267:1090-4.
21. Colombo M, Mannucci PM, Brettler DB, et al. Hepatocellular carcinoma in hemophilia. *Am J Hematol* 1991;37:243-6.

22. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998;338:853-60.
23. Domingo P, Guardiola JM, Ris J, Nolla J. The impact of new antiretroviral regimes on HIV-associated hospital admissions and deaths. *AIDS* 1998;12:529-30.
24. Racoosin JA, Kessler CM. Bleeding episodes in HIV-positive patients taking HIV protease inhibitors: a case series. *Haemophilia* 1999;5:266-9.
25. Wilde JT, Lee CA, Collins P, Giangrande PL, Winter M, Shiach CR. Increased bleeding associated with protease inhibitor therapy in HIV-positive patients with bleeding disorders. *Br J Haematol* 1999;107:556-9.
26. Soucie JM, Nuss R, Evatt B, et al. Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. *Blood* 2000;96:437-42.
27. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9^a ed. Guanabara Koogan, 1997:421-9.
28. The Molecular Pathology of Haemophilia A. Review Article. <http://europe.cfc.mrc.ac.uk>.
29. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984;312:326-30.
30. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 1984;312:342-7.
31. Lollar P, Parker CG. Subunit structure of thrombin-activated porcine factor VIII. *Biochemistry* 1989;28:666-74.
32. Pittman DD, Millenson M, Marquette K, Bauer K, Kaufman RJ. A2 domain of human recombinant-derived factor VIII is required for procoagulant activity but not for thrombin cleavage. *Blood* 1992;79:389-97.

33. Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure: reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *J Biol Chem* 1991;266:8957-62.
34. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII: correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 1986;25:505-12.
35. Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* 1984;63:486-9.
36. Walker FJ, Fay PJ. Regulation of blood coagulation by the protein C system. *FASEB J* 1992;6:2561-7.
37. Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa: identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem* 1991;266:20139-45.
38. Youssoufian H, Kazazian HH Jr, Phillips DG, et al. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* 1986;324:380-2.
39. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Littell AS. Detection of carriers of classic hemophilia using an immunologic assay for antihemophilic factor (factor VIII). *J Clin Invest* 1971;50:255-8.
40. Klein HG, Aledort LM, Bouma BN, Hoyer LW, Zimmerman TS, DeMets DL. A cooperative study for the detection of the carrier state of classic hemophilia. *N Engl J Med* 1977;296:959-62.
41. Varekamp I, Suurmeijer TPBM, Brocker-Vriends AHJT, et al. Carrier testing and prenatal diagnosis for hemophilia: experiences and attitudes of 549 potential and obligate carriers. *Am J Med Genet* 1990;37:147-54.
42. Lalloz MRA, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EGD. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991;338:207-11.

43. Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitshier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe hemophilia A. *Nat Genet* 1993;5:236-41.
44. Gitschier J, Lawn RM, Rotblat F, Goldman E, Tuddenham EGD. Antenatal diagnosis and carrier detection of haemophilia A using factor VIII gene probe. *Lancet* 1985;1:1093-4.
45. Mannucci PM. The choice of plasma-derived clotting factor concentrates. *Baillieres Clin Haematol* 1996;9:273-90.
46. Mannucci PM, Gdovin S, Gringeri A, et al. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactive viruses. *Ann Intern Med* 1994;120:1-7.
47. Scharz RS, Abildgaard CF, Aledort LM, et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. *N Engl J Med* 1990;323:1800-5.
48. Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Kogenate Previously Untreated Patient Study Group. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A: safety, efficacy, and development of inhibitors. *N Engl J Med* 1993;328:453-9.
49. Bray GL, Gomperts ED, Courter S, et al. A multicenter study of recombinant factor VIII (Recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. *Blood* 1994;84:2428-35.
50. White GC II, Courter S, Bray GL, Lee M, Gomperts ED. A multicenter study of recombinant factor VIII (Recombinate) in previously treated patients with hemophilia A. *Thromb Haemost* 1997;77:660-7.
51. Luscher JM. Factor VIII inhibitors: etiology, characterization, natural history, and management. *Ann N Y Acad Sci* 1987;509:89-102.
52. McMillan CW, Shapiro SS, Whiteshurst D, Hoyer LW, Rao AV, Lazerson J. The natural history of factor VIII:C inhibitors in patients with hemophilia A: a national cooperative study. II. Observations on the initial development of factor VIII:C inhibitors. *Blood* 1988;71:344-8.
53. Lewis JH, Bontempo FA, Spero JA, Ragni, MV, Starzl, TE. Liver transplantation in a hemophiliac. *New Eng. J. Med* 1985;312: 1189-1190.

54. Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 1995;74:1402-6.
55. de la Fuente B, Casper CK, Rickles FR, Hoyer LW. Response of patients with mild and moderate hemophilia A and von Willebrand's disease to treatment with desmopressin. *Ann Intern Med* 1985;103:6-14.
56. Mannucci PM. Desmopressin: a nontransfusional hemostatic agent. *Annu Rev Med* 1990;41:55-64.
57. Bird A, Isarangkura P, Almagro D, Gonzaga A, Srivastava A. Factor concentrates for hemophilia in the developing world. *Haemophilia* 1998;4:481-5.
58. Miller DG, Stamatoyannopoulos G. Gene therapy for hemophilia. *N Engl J Med* 2001;344:1782-4.
59. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replacing at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1990;10:4239-42.
60. Roth DA, Tawa NE Jr, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2001;344:1735-42.