

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FATOR VIII EM
INDIVÍDUOS NORMAIS CLASSIFICADOS
DE ACORDO COM FAIXA ETÁRIA E
GRUPOS SANGUÍNEOS.**

NADIR FERRARI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
HUMANA NA UFPr.

CURITIBA
1977

Aos doadores voluntários de sangue, cujo despreendimento vai ao ponto de oferecerem um pouco de si para ajudar a desconhecidos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e minha mãe, que deram o primeiro impulso.

Ao prof. Dr. Newton Freire-Maia, que me contagiou com o amor pela pesquisa, assim como orientou e revisou este trabalho.

Ao prof. Dr. Israel Roisenberg, pelo estímulo, pela ajuda incondicional, pela confiança.

Ao prof. Dr. Airton Russo e pessoal do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPr, pelo auxílio e amizade.

Ao prof. Dr. Ricardo Pasquini, pela indicação de bibliografias, pela leitura do trabalho, pelas críticas.

Aos profs. Francisco Antonio Marçallo e Iglénir João Cavalli, pela leitura do trabalho e sugestões.

Aos profs. Juarez Gabardo, Mário Portugal Pederneiras e Armando Antunes Almeida, pelo suporte no setor estatístico.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa, que tornou possível a realização do Curso de Pós-Graduação e, como parte dele, a execução deste trabalho.

Aos demais professores e colegas do Departamento de Genética da UFPr, meus amigos de todas as horas.

PREFÁCIO

A pesquisa científica, ao contrário das atividades artísticas, tem a vantagem de ser aproveitável mesmo quando apresenta repercussões diminutas. Uma pequena informação, obtida em um laboratório, pode ser adicionada a outras, provenientes de outros laboratórios, de tal forma que o conjunto de dados assim reunidos adquire uma importância que suas parcelas nunca teriam. Se bem que este não represente o processo mais importante do desenvolvimento científico, sua ação pode ser verificada em grande número de situações.

A medicina, a genética e a bioquímica desenvolveram-se muito, desde o tempo em que a hemofilia se manifestou na nobreza russa e contribuiu para mudar a história daquele país. Hoje, sabe-se que a hemofilia clássica é uma condição devida à deficiência de uma proteína plasmática, denominada Fator VIII, condicionada por um gene "recessivo" ligado ao cromossomo X e que não é letal em homozigose, ao contrário do que se pensava. Sabe-se, também, que a sugestão da existência de vários alelos no loco da hemofilia clássica explicaria a heterogeneidade da condição. Além disso, a prática da transfusão de plasma concentrado em Fator VIII como terapia anti-hemofílica, o desenvolvimento de técnicas laboratoriais para diagnóstico e o aperfeiçoamento da ortopedia melhoraram sensivelmente o prognóstico dos hemofílicos.

Atualmente, o problema científico central é a base molecular da hemofilia. Pesquisadores de várias partes do mundo dedicam-se ao estudo do Fator VIII, cuja deficiência causa a hemofilia do tipo A, ou hemofilia clássica.

O presente trabalho é uma tentativa de obter informações sobre os níveis de Fator VIII conforme a idade e o grupo sanguíneo, e tem a pretensão de, juntando-se às muitas outras informações já obtidas, ser útil para um melhor entendimento da fisiologia da coagulação.

ÍNDICE

Agradecimentos	2
Índice	3
Prefácio	4
Introdução	5
I.1. Local de Síntese	7
I.2. Purificação	7
I.3. Papel na Coagulação	8
I.4. Causas Genéticas de Variação nos Níveis de Fator VIII	10
I.4.1. Condições Genéticas que alteram os Níveis de Fator VIII	10
I.4.2. Controle Genético da Síntese de Fator VIII	12
I.4.3. Heterozigotas para Hemofilia A	15
Tabela 1. Irmandade de portadoras de hemofilia A, testada por Graham e cols. (1976)	17
I.4.4. Mulheres "Hemofílicas"	18
Tabela 2. Algumas possíveis causas de deficiência de Fator VIII em mulheres (Barrow e Graham, 1974).. ..	19
I.5. Causas Secundárias de Variação nos Níveis de Fator VIII	20
I.5.1. Doenças	20
Tabela 3. Fatores que influem nos níveis de Fator VIII (Kerr e cols., 1966). ...	22
I.5.2. Raça, Idade, Sexo e Grupo Sangüíneo	23
I.6. Dosagem	24
I.6.1. Método de Dois Estágios	24
I.6.2. Método de Um Estágio	25
I.6.3. Outros Métodos: o Imunoensaio e o Radioimunoensaio	25
I.7. Objetivos	26
II. Material e Métodos	27
II.1. Caracterização da Amostra	27
II.2. Provas Laboratoriais	27
II.2.1. Dosagem de Fator VIII	27
II.2.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado – TTP–A	29
Tabela 4. Resultados de dosagem de Fator VIII em um indivíduo	30
III. Resultados e Discussão	31
Tabela 5. Dosagem de Fator VIII (em segundos), idade e grupo sangüíneo	33
Tabela 6. Dosagem de Fator VIII e TTP–A	36
Tabela 7. Análise de Regressão Múltipla de Fator VIII, Idade e Grupo Sangüíneo	39
Tabela 8. Análise de Regressão Linear de Fator VIII e Idade.	40
Tabela 9. Análise de Regressão Linear TTP–A e Idade	41
Sumário e Conclusões	42
Referências Bibliográficas	43

I. INTRODUÇÃO

Hershgold (1974) define o Fator VIII como uma proteína plasmática com atividade pró-coagulante no sangue normal e deficiente nos indivíduos portadores de hemofilia A. É também denominado Fator Antihemofílico (FAH), Globulina Antihemofílica (GAH) e Co-Fator Plaquetário I.

Seu peso molecular, calculado *in vitro*, é da ordem de 4,5 milhões de dáltons (Hershgold, 1974), mas o tamanho da molécula *in vivo* não é conhecido com precisão. Os altos valores encontrados por Hershgold podem ser devidos à tendência de o Fator VIII se agregar em subunidades de tamanho variável, durante o processo de concentração das preparações purificadas para análise (van Mourik e cols., 1974). A concentração plasmática do Fator VIII no homem, em consequência, também é motivo de controvérsias. Michael e Tunnah (1966) estimam em 0,12 µg/ml, enquanto que Vermynen (1975) calcula em 7 mg/l.

A molécula de Fator VIII é dissociável em um pequeno fragmento com atividade pró-coagulante, e uma fração de maior peso molecular (proteína transportadora), com pouca atividade pró-coagulante (Wagner, 1975; Rick e Hoyer, 1975; Bennett, 1974).

Wagner (1975) sugere um modelo no qual o Fator VIII é constituído por um ou mais pequenos fragmentos ativos, unidos por ligações covalentes a uma molécula transportadora (fator de von Willebrand).

A vida média ($t_{1/2}$) biológica do Fator VIII, no plasma de hemofílicos, é de 9 horas, segundo Ingram (1971), e de 12 horas, segundo Green (1974). Em indivíduos normais, os resultados encontrados por diferentes autores são discrepantes. Adelson e cols. (1963) estudaram a sobrevivência do Fator VIII através de infusão, em indivíduos normais, de um aminoácido precursor marcado radioativamente. Após 24 horas da infusão, era retirada uma amostra de sangue que, infundida em receptores normais, permitia seguir a permanência do Fator no plasma do infundido, por um método imunológico. O Fator VIII radioativo era separado, pelo anticorpo específico, das amostras de sangue colhidas do receptor, a intervalos de tempo. Com esse método, eles observaram um $t_{1/2}$ de cerca de 3 dias. No entanto, Pool, Cohen e Greger (1967) observaram um $t_{1/2}$ de 2 horas, quando autotransfundiram dois indivíduos normais com crioprecipitado de Fator VIII preparado de seus próprios plasmas. A técnica usada por Adelson e cols. mede a atividade antigênica do fator, enquanto que a de Pool, Cohen e Greger mede sua atividade pró-coagulante. A discrepância entre os resultados observados deve ser consequência, portanto, das diferenças entre as técnicas empregadas.

A atividade do Fator VIII, medida *in vitro*, no plasma normal, apresenta uma grande variação individual. Na população caucasóide, os valores normais variam de 50 a 200% (Hershgold, 1974; Meyer e cols., 1972).

O Fator VIII humano é uma proteína composta, com 75% de aminoácidos, 11% de carboidratos e 11% de lipídios, sendo estes fosfolipídios e lipídios neutros (Hershgold, 1974).

Através de migração eletroforética, Meyer, Larrieu e Dreyfus (1969) isolaram, a partir de plasma normal, a fração denominada I-O, rica em Fator VIII. Separaram várias frações e notaram que a maior concentração do fator estava localizada nas bandas correspondentes às globulinas α_2 e β .

A instabilidade do Fator VIII torna difícil seu estudo e uso terapêutico. Fatores como temperatura, pH, concentração de íons cálcio, conteúdo de células existentes no plasma e presença de outros fatores de coagulação contribuem para essa instabilidade. Segundo Stibbe, Hemker e Creveld (1972), a atividade do Fator VIII em plasma citratado e estocado a 37°C, a um pH 7,8, decresce a cerca de 50% em 12 horas, permanecendo depois estável por 4 dias. A pH 7,2 e a 4°C, mais de 90% da atividade do fator persiste por 7 dias, enquanto que, a 28 e 37°C, perde 50% em 24 horas (Barrow e Graham, 1974). Em plasma citratado e congelado, o Fator VIII retém a maior parte de sua atividade durante pelo menos 20 meses, segundo Britten e Grove-Rasmussen. (1966). As células existentes no plasma, quando lisadas por congelamento, liberam material trombolítico que também contribui para a inativação do Fator VIII.

Os concentrados liofilizados têm boa estabilidade ao longo de vários meses a 4°C ou mesmo à temperatura ambiente. O Fator VIII é mais estável a um pH de 6,1 a 6,5, quando em plasma citratado, a 4°C (Preston, 1964).

Seegers, Landaburu e Fenichel, em 1957 (apud Hershgold, 1974), demonstraram que glicerol a 50% preserva a atividade do fator VIII em concentrados, em plasmas congelados ou em plasmas estocados a 4°C.

Os anticoagulantes mais usados em estudos de coagulação são os sais sódicos de citrato, de oxalato e de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), todos quelantes do cálcio. Kingdon e Davie, em 1965 (apud Barrow e Graham, 1974), sugeriram que os quelantes agem por bloqueio na ativação do fator IX, na reação dependente da presença de metais divalentes, especialmente Ca^{++} .

A labilidade do Fator VIII varia com o tipo de agente quelante. Sua atividade persiste mais tempo em plasma citratado, e mais ainda se, ao plasma citratado, adicionar-se MnCl_2 (Barrow e Graham, 1974).

O Fator VIII pode ser inativado por enzimas proteolíticas, como a plasmina (Pasquini e Hershgold, 1973; Meyer e cols., 1972) e a trombina (Barrow e Graham, 1974).

1.1. Local de Síntese

O Fator VIII é uma das poucas proteínas plasmáticas acerca das quais não se conhece, ainda, com certeza, o local de síntese. Alguns estudos sugerem que devem ser tecidos amplamente espalhados pelo organismo, como o sistema retículo-endotelial (Meyer e cols., 1972; Hershgold, 1974), o tecido linfóide e o endotélio vascular (Hershgold, 1974).

Hoyer, de los Santos e Hoyer (1973) demonstraram, por radioimunoensaio e imunofluorescência, que as células endoteliais, em cultura, sintetizam e liberam antígeno Fator VIII (Fator de von Willebrand).

Landaburu e Castellanos (1972) admitem, na base de investigações sobre esplenectomia e adrenalectomia em animais, que o sistema retículo-endotelial do baço seja um importante contribuinte na produção de Fator VIII e que a atividade plasmática de Fator VIII está sob controle da adrenal. Os mesmos autores citam os trabalhos de Rizza (em 1961) e Ingram (em 1961), que estudaram os efeitos do exercício físico e da adrenalina nos níveis de Fator VIII. O primeiro encontrou níveis elevados de Fator VIII em pessoas normais após exercício físico intenso. O segundo infundiu adrenalina em indivíduos normais e em hemofílicos grave e moderadamente afetados. Todos os indivíduos normais e cinco dos seis hemofílicos graves (sem Fator VIII biologicamente detectável) mostraram elevação nos níveis de Fator VIII.

Ingram, em 1966 (apud Barrow e Graham, 1974), evidenciou que os bloqueadores β -adrenérgicos impedem o aumento de Fator VIII pós-adrenalina. Uma vez que a adrenalina causa contração esplênica e que o exercício físico libera adrenalina, pode-se especular sobre a participação do baço na liberação de Fator VIII nele estocado.

Webster e cols., em 1967 (apud Hershgold, 1974), consideram o baço como um órgão de estocagem de Fator VIII e que, com outros tecidos, possa aquele órgão responder às condições de demanda do organismo. Após experimentos de transplante de órgãos em cães hemofílicos e normais, eles sugerem que o fígado seja o local de síntese de Fator VIII.

Tuddenham e cols. (1974), estudando a síntese de Fator VIII em culturas de órgãos fetais humanos, obtidos por histerectomia, concluem que o baço – e provavelmente o fígado – fetal seja o responsável pela síntese do fator.

1.2. Purificação

A importância da purificação do Fator VIII está na obtenção de um concentrado terapêutico e no isolamento do fator para se estudar suas propriedades físicas e químicas.

Cohn e cols., em 1946 (apud Barrow e Graham, 1974), desenvolveram uma técnica de purificação do Fator VIII através de fracionamento com etanol. O produto obtido por esse processo, denominado Fração I de Cohn, contém grande atividade de Fator VIII e praticamente todo o fibrinogênio, além de albumina, α_2 -macroglobulinas, β -globulinas, plasminogênio e traços de outras proteínas (Barrow e Graham, 1974). Concentrados de Fator VIII são produzidos, em grande escala, por modificações da técnica de Cohn e cols. (1946), conseguindo-se produtos altamente purificados, com baixo teor de fibrinogênio (Johnson, Aronson e Williams, 1976).

A crioprecipitação é um método bastante simples para se obter Fator VIII com concentrações favoráveis para uso terapêutico (Pool, Hershgold e Pappenhagen, 1964). Esse método pode ser efetuado nos próprios bancos de sangue, com pequena despesa. Consiste no congelamento rápido e no descongelamento lento do plasma. No processo de descongelamento lento, forma-se um precipitado que, separado do restante do plasma e redissolvido em solução salina isotônica, pode ser usado no tratamento de pacientes com deficiência de fibrinogênio, de Fator VIII, fator XIII, ou com doença de von Willebrand (apud Johnson, Aronson e Williams, 1976). O crioprecipitado assim obtido contém cerca de um terço de fibrinogênio e pequenas quantidades das demais proteínas do plasma inicial.

Devido às dificuldades em se obter grandes quantidades de Fator VIII humano, a atenção de vários pesquisadores voltou-se para o estudo de plasmas não-humanos, com o objetivo de estudar a molécula do Fator VIII e de utilizar preparações de origem animal, purificadas, no tratamento de indivíduos hemofílicos. Van Mourik e cols. (1974), por exemplo, estudando plasmas bovino e humano, demonstraram que o Fator VIII pode ser dissociado em duas proteínas distintas, por diálise contra tampões de baixa força iônica. Por outro lado, Michael e Tunnah (1966) usaram preparações porcinas de Fator VIII na terapia de pacientes hemofílicos.

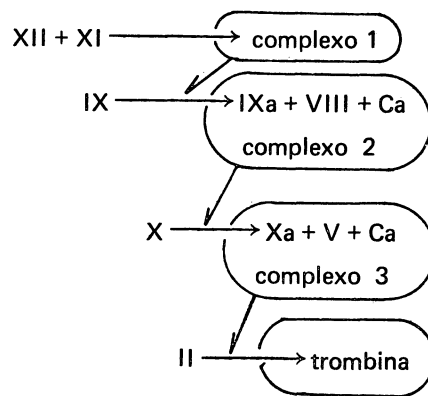
Segundo Johnson, Aronson e Williams (1976), os plasmas bovino e porcino têm cerca de 10 vezes mais atividade de Fator VIII do que o plasma humano, sendo empregados com sucesso no tratamento de hemofílicos, apesar de a tendência a desenvolver anticorpos impedir sua utilização a longo prazo.

I.3. Papel na Coagulação

As teorias sobre coagulação sangüínea são formuladas para descrever e explicar os eventos que ocorrem no plasma e que culminam na formação de um coágulo de fibrina. As reações são em cadeia e podem ser divididas em 3 fases: formação da tromboplastina, formação da trombina e formação da fibrina.

A tromboplastina é uma substância existente nos extratos tissulares, que atua na ativação do fator X. Ela pode ter origem na liberação de sucos celulares por lesão tissular (mecanismo extrínseco da coagulação) ou nos fatores plasmáticos e fator plaquetário 3 (mecanismo intrínseco da coagulação). Os fatores plasmáticos VII e V, bem como o cálcio, participam de ambos os mecanismos de coagulação.

O processo de coagulação via intrínseca, no qual atua o Fator VIII, inicia-se pelo contato com uma superfície estranha ao endotélio vascular, que ativa o fator XII. Este, ativado, age sobre o fator XI, ativando-o. Vários autores concordam em que o fator IX é ativado pelo produto da interação dos fatores XII e XI (Barrow e Graham, 1974). O Fator VIII é então ativado pelo Fator IX e age como um co-fator no complexo formado pelos fatores IX, VIII, fosfolipídio (fator plaquetário 3) e cálcio (Hougie, Denson e Biggs, 1967; Meyer e cols., 1972). O Fator X, ativado por esse complexo, participa de um outro complexo que atua na transformação da protrombina em trombina. O processo finaliza com a transformação do fibrinogênio em fibrina, reação na qual participa a trombina. Esquemáticamente temos:



1.4. Causas Genéticas de Variação nos Níveis de Fator VIII

Várias observações sugerem que a concentração de Fator VIII seja controlada geneticamente. Existe uma diferença marcante entre os níveis observados em pessoas de mesma idade e sexo vivendo sob as mesmas condições ambientais (Kerr e cols., 1966). Os níveis desse fator variam menos entre irmãos e entre pais e filhos, do que na população em geral (Ingram, 1965; Kerr e cols., 1966). Os níveis reduzidos de Fator VIII são determinados por mutações em diferentes locos: no cromossomo X (hemofilia clássica) e em vários autossomos (doença de von Willebrand; deficiência dos fatores V e VIII; deficiência autossômica de Fator VIII; doença de Heckathorn; hemofilia A de herança dominante).

1.4.1. Condições Genéticas que Alteram os Níveis de Fator VIII.

1.4.1.A. Hemofilia A

É uma doença causada por deficiência na atividade pró-coagulante do Fator VIII, devida a um gene "recessivo" (cf. pág. 15), ligado ao cromossomo X. A heterogeneidade da hemofilia A levou a sua classificação em grave (níveis de Fator VIII abaixo de 1% do normal), moderada (níveis entre 1 e 4%) e benigna (níveis entre 5 e 25%), segundo Ramgrem (1962). Em vários casos graves, a atividade do Fator VIII é zero; alguns deles desenvolvem anticorpo contra o Fator VIII infundido, o que sugere não reconhecer, o paciente, a molécula do fator como um seu constituinte normal, por não possuir o antígeno Fator VIII.

Os hemofílicos A são, em sua maioria, deficientes apenas quanto à atividade pró-coagulante do Fator VIII, possuindo quantidades normais da molécula antigenicamente ativa, e são denominados A⁺ ou CRM⁺. Quando o plasma de um hemofílico A não reage com o anticorpo específico para o Fator VIII, é denominado A⁻ ou CRM⁻ (Larrieu e Meyer, 1971; Barrow e Graham, 1974). Essa denominação se deve ao fato de possuírem ou não o antígeno Fator VIII, chamado Material de Reação Cruzada, que reage com o anticorpo anti-fator VIII.

A discrepância observada entre os resultados de dosagem do antígeno e os de atividade pró-coagulante de Fator VIII, nos hemofílicos, sugere que o gene em causa seja estrutural, hipótese reforçada pela observação de diferentes anormalidades estruturais do fator (Ingram, 1971, cf. pág. 16).

1.4.1.B. Doença de von Willebrand

Ao contrário dos hemofílicos clássicos, os doentes de von Willebrand apresentam uma deficiência quanto à atividade pró-coagulante e também quanto à atividade antigênica do Fator VIII. Além disso, a condição apresenta padrão de herança autossômica dominante.

Caracteriza-se por um tempo de sangramento prolongado, adesividade plaquetária deficiente *in vivo* e *in vitro*, e reduzida agregação induzida pela *ristocetina*.

Segundo Ingram (1971), a doença de von Willebrand é causada por mutação em um gene regulador, que resulta na produção deficiente de Fator VIII normal. Entretanto, outros autores sugerem um defeito qualitativo na porção antigênica do Fator VIII nesses pacientes (Zimmerman, Ratnoff e Powell, 1971; Sultan e cols., 1976).

Papayannis, Wood e Israëls (1971) sugerem a existência de um fator, denominado Fator Plasmático de Adesividade Plaquetária, presente no plasma normal e hemofílico, que, infundido nos doentes de von Willebrand, influem na adesividade plaquetária e corrigem o tempo de sangramento alterado desses pacientes. Este fator é também denominado Fator de von Willebrand, e parece estar relacionado com a porção antigênica do Fator VIII (Bennett, 1974). O plasma normal e o hemofílico possuem ainda um outro fator que estimula a síntese de Fator VIII no plasma dos doentes de von Willebrand (Ingram, 1965; Bennett, 1974).

A existência desses dois fatores foi proposta para explicar o fato, constatado por Cornu e cols., em 1961 (apud Pudlak e Deimlová, 1968), de haver uma correção da alteração plasmática dos pacientes de von Willebrand quando transfundidos com plasma normal ou hemofílico.

I.4.1.C. Deficiência dos Fatores V e VIII

Trata-se de uma condição autossômica dominante, descrita por Hensen, Matern e Loeliger, em 1965 (Kerr e cols., 1966).

Os fatores V e VIII têm algumas propriedades físico-químicas muito semelhantes. Ambos são termolábeis, não são adsorvidos por sulfato de bário e são consumidos no processo da coagulação.

Segundo Mcfarlene, em 1965 (apud Kerr e cols., 1966), o sistema de coagulação em mamíferos evoluiu de mecanismos mais simples, como o de animais inferiores, resultando em um sistema mais eficiente, com vantagem seletiva. Ele sugere que o fibrinogênio, o fator V e o Fator VIII tenham evoluído de uma molécula comum. Desta forma, os genes que controlam a síntese do fibrinogênio e do Fator V no plasma humano podem exercer algum efeito sobre o Fator VIII. Assim, podemos pensar que um bloqueio genético na síntese de um precursor comum aos dois fatores pode causar a deficiência dos Fatores V e VIII no mesmo indivíduo.

I.4.1.D. Doença de Heckathorn

Descrita por Ratnoff e Lewis (1975) como uma "forma variante" de hemofilia A, a doença de Heckathorn caracteriza-se por uma deficiência funcional de Fator VIII, que parece condicionada por gene ligado ao cromossomo X. Ao contrário dos pacientes com hemofilia clássica severa, os dois pacientes descritos por Ratnoff e Lewis apresentavam grande variabilidade na concentração de Fator VIII, quando testados em épocas diferentes. O tempo de sangramento nesses indivíduos era normal, assim como a adesividade plaquetária, testada *in vitro* pela retenção de plaquetas em pérolas de vidro. A concentração de antígeno Fator VIII era, comumente, mais alta do que a atividade funcional, como na hemofilia. Também foram testadas quatro mulheres portadoras (considerando herança ligada ao sexo), e três delas apresentavam mais atividade anti-

gênica do Fator VIII do que atividade funcional, detectados no plasma. A outra portadora, com 75 anos de idade, possuía quantidade normal de antígeno e de atividade funcional.

I.4.1.E. Hemofilia A com Herança Dominante

Foi descrita por Graham e cols. (1975) como uma diátese hemorrágica clínica e laboratorialmente indistinguível da hemofilia A, transmitida como um caráter dominante em três gerações de mulheres. A hipótese de uma translocação balanceada entre o cromossomo X e um autossomo, em heterozigotas para hemofilia A, foi excluída pela análise dos cromossomos metafásicos. A condição pode ser devida, segundo os autores, a uma mutação variante no loco da doença de von Willebrand ou a uma mutação dominante no loco da hemofilia A, ou ainda a uma mutação dominante em um quarto loco relacionado à síntese de Fator VIII.

I.4.2. Controle Genético da Síntese de Fator VIII

Graham e cols., em 1964 (*apud* Roisenberg, 1971), propõem ser o Fator VIII um polímero formado, no mínimo, por duas cadeias de polipeptídios, uma das quais tem sua síntese controlada por um gene estrutural localizado no cromossomo X e a outra, por um par de genes estruturais em autossomos homólogos, e que mutações no loco ligado ao sexo ou no loco autossômico produziriam, respectivamente, hemofilia A e doença de von Willebrand.

Mac Lester e Graham (1964) dão três explicações prováveis para a deficiência de Fator VIII na hemofilia A e na doença de von Willebrand:

- a. hipótese do ativador, que admite ser um gene do cromossomo X o responsável pela produção do Fator VIII em sua forma inativa, enquanto que um gene autossômico produz o ativador.
- b. hipótese das subunidades, segundo a qual cada loco seria responsável pela formação de uma subunidade que se combina a outras para formar o Fator VIII.
- c. hipótese do regulador, em que se aplica a teoria de Jacob e Monod para a formação de Fator VIII.

Ingram (1965) usa o modelo de Graham e cols. para explicar a síntese de Fator VIII, de maneira análoga à verificada na síntese de proteínas em outros organismos (fig. 1). A hemofilia pode ser representada, nesse modelo, por um grupo de mutações no operon da hemofilia, no cromossomo X. Algumas mutações geram um produto com atividade reduzida, outras nenhum produto ou um produto biologicamente inativo. A fig. 2, também de Graham e cols. (*apud* Ingram, 1965), mostra a doença de von Willebrand como o resultado da mutação em um gene regulador, em vez de um grupo de genes estruturais. De acordo com esse modelo, a infusão de plasma hemofílico em um paciente com doença de von Willebrand aumentaria a concentração plasmática do efetor, que, por sua vez, bloquearia a ação do repressor do gene da hemofilia e aumentaria a síntese de Fator VIII pelo operon do cromossomo X.

Considerando-se que existe extensa variabilidade estrutural em muitas proteínas plasmáticas, é provável que o Fator VIII também exista em formas mutantes.

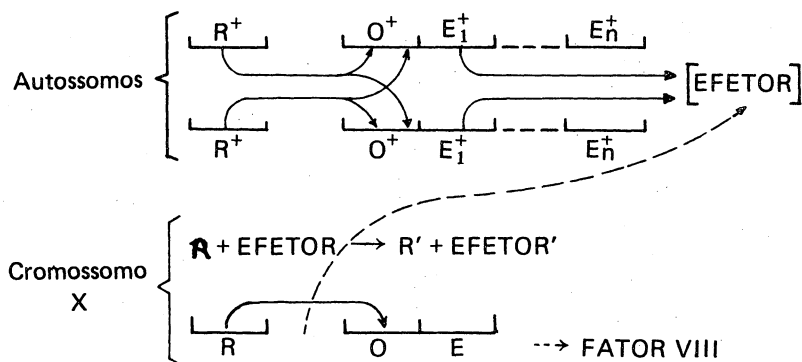


Fig. 1. Modelo regulatório de síntese de Fator VIII, segundo Graham e cols. (apud *Roisenberg, 1971).

Observações: O sinal + indica constituição gênica normal. R, O, E₁... E_n, nos autossomos, são os reguladores e operons relativos à doença de von Willebrand. R, O e E₁, no cromossomo X, são reguladores e operons relativos à hemofilia. Os reguladores atuam por repressão, indiferentemente, em um e outro gene operador. O EFETOR, produzido pelos genes autossômicos, bloqueia a atividade do regulador do cromossomo X pela reação: $R + EFETOR \rightarrow R' + EFETOR'$, e então permite a atividade do operon do cromossomo X e a síntese do Fator VIII.

* apud Ingram, 1965

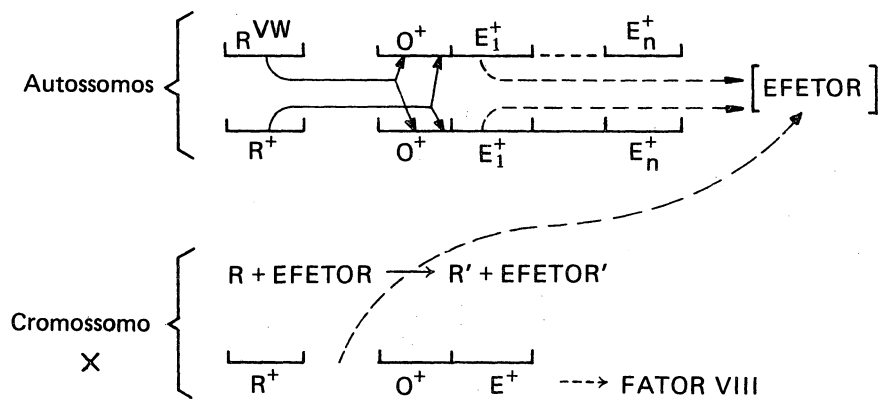


Fig. 2. Modelo regulatório de Graham e cols. (apud Ingram, 1965), aplicado aos doentes (heterozigotos) de von Willebrand.

Observações: A mutação, na doença de von Willebrand, está localizada no regulador (RVW), que atua, então, como um super-repressor, fazendo com que a produção de EFETOR, pelo operon, seja menor que a normal. O operon do cromossomo X fica excessivamente reprimido e é produzida menor quantidade de Fator VIII do que a normal.

Quando a mutação, ou mutações, ocorre(m) em um sítio estratégico, a atividade pode ser influenciada, enquanto permanece a determinação antigênica, e vice-versa (Hershgold, 1974).

Se várias mutações podem ocorrer no gene ligado ao cromossomo X, podemos encontrar casos benignos de hemofilia A, quando o produto gênico retém alguma atividade biológica, e casos em que o produto nem é formado, ou é não-funcional no sistema de coagulação (Ingram, 1965).

Não resta dúvida de que a biossíntese de Fator VIII tenha uma base genética complexa, e tudo indica que vários genes autossômicos interagem com o loco do cromossomo X e com o ambiente, resultando em um nível específico de Fator VIII em cada indivíduo normal.

1.4.3. Heterozigotas para Hemofilia A

Apesar da antiga conceituação de recessividade para o gene da hemofilia, a observação de níveis reduzidos de Fator VIII e mesmo de alguns sintomas hemorrágicos em portadoras do gene (heterozigotas) dá margem a alternativas para explicar o mecanismo genético da síntese de Fator VIII.

Uma das explicações aventadas é a de que o gene não seja completamente recessivo. Esse ponto de vista contraria a definição tradicional de dominância e recessividade. Como, segundo a teoria de Lyon, há, em cada célula, apenas um gene funcional da hemofilia A, não vemos como aceitar o conceito acima, ao mesmo tempo em que aceitamos aquela teoria. Outra explicação seria baseada na própria hipótese de Lyon. Sendo inteiramente ao acaso a inativação de um cromossomo X, em cada célula, no início do desenvolvimento embrionário, é possível que, algumas vezes, o cromossomo X com o gene da hemofilia seja inativado na maioria das células, e as portadoras tenham concentração de Fator VIII mais próxima da normalidade. Outras vezes, pode suceder que o cromossomo X normal seja inativado na maioria das células e, assim, as portadoras tenham níveis mais baixos de Fator VIII. Na maioria dos casos, porém, espera-se haver cerca de 50% de células com o cromossomo normal ativo.

O fato de que as mulheres homozigotas para o gene da hemofilia não são mais afetadas que seus consangüíneos hemizigotos vem reforçar a hipótese de Lyon, como explicação para os níveis de Fator VIII nas mulheres heterozigotas (Kerr, 1966). A observação de um aumento nos níveis de Fator VIII em mulheres XXX, em relação às mulheres XX, sugere, no entanto, que o gene no cromossomo adicional não seja inativado, o que parece contrariar, em parte, a hipótese de Lyon para o loco da hemofilia (Mantle, Pye e Hardisty, 1971). Como existe uma flutuação nos níveis de Fator VIII com o "stress", esses resultados não são conclusivos, uma vez que os controles de sua amostra eram mulheres normais, enquanto que as mulheres XXX residiam em instituições de deficientes mentais.

Uma pequena irmandade, com casos de hemofilia A, descrita por Graham e cols. (1976), ilustra a enorme gama dos fenótipos das heterozigotas, prevista pela hipótese de Lyon. Três irmãs, filhas de um hemofílico A e, portanto, portadoras certas, foram estudadas laboratorialmente através dos seguintes testes: dosagem biológica de Fator VIII, dosagem do antígeno Fator VIII e dosagem do fator de von Willebrand. Os resultados, expressos em unidades por 100 mil de plasma, estão na Tabela 1. A primeira portadora testada apresentava sintomas clínicos evidentes. A outra era clinicamente normal e a terceira, igualmente normal sob o ponto de vista clínico, teve um filho afetado.

As filhas de hemofílicos clássicos são, como acima já referimos, heterozigotas certas, mas as irmãs desses hemofílicos são heterozigotas potenciais, que passam a ser consideradas como heterozigotas certas apenas quando vêm a ter um filho hemofílico. A importância do reconhecimento das heterozigotas potenciais tem motivado muitos pesquisadores a estudar uma maneira de identificá-las, através de testes laboratoriais.

Rapaport, Patch e Moore (1960) obtiveram bons resultados neste sentido, quando testaram a atividade do Fator VIII em 35 heterozigotas certas para hemofilia A e em 30 mulheres normais. As normais tinham, em média, 92% de Fator VIII do plasma de referência, e as portadoras tinham 58%. Segundo os autores, o bioensaio para Fator VIII constata, com acuidade, 75% das portadoras certas, em uma população potencialmente portadora.

A combinação da dosagem do antígeno com a dosagem da atividade de Fator VIII poderia dar melhores resultados na detecção de portadoras (Marx, 1975).

Segundo Zimmerman, Ratnoff e Littell (1971), o plasma dos hemofílicos clássicos contém quantidades normais de Fator VIII, com atividade antigênica íntegra, mas atividade pró-coagulante deficitária. As heterozigotas, por outro lado, possuem um gene normal, que condiciona a produção de uma molécula de Fator VIII com atividade antigênica e pró-coagulante normais, e seu alelo mutante, com atividade antigênica normal mas atividade pró-coagulante deficitária. Logo, é de se esperar que tenham, pelo menos, a mesma quantidade de antígeno Fator VIII que as pessoas normais, mas só parte da atividade pró-coagulante. Essa deficiência relativa de atividade funcional, comparada com a quantidade de antígeno, possibilitou a Zimmerman, Ratnoff e Littell (1971) identificar corretamente 92% das portadoras em uma amostra de 25.

Thomopoulos, Scliros e Lyberatos (1975), usando também a combinação dos dois testes, identificaram corretamente 17 portadoras certas em uma amostra de 18, e 8 portadoras possíveis em uma amostra de 14.

Nos indivíduos (heterozigotos) com a doença de von Willebrand, os níveis de atividade pró-coagulante de Fator VIII podem estar aumentados em relação às concentrações de antígeno (Sultan e cols., 1976; Sultan, Simeon e Caen, 1975), situação similar à das portadoras de hemofilia A. Isto corrobora o fato de que a porção antigênica do Fator VIII e a porção responsável pela atividade pró-coagulante estão sob controle genético independente (Green e Chediak, 1977).

Tabela 1. Irmandade de portadoras de hemofilia A, testada por Graham e cols. (1976).

	Atividade de Fator VIII	Antígeno Fator VIII	Fator de von Willebrand
Portadora 1	9	145	147
Portadora 2	40	83	92
Portadora 3	112	117	100

Obs.: (Convenção: unidades por 100 ml de plasma).

1.4.4. Mulheres "Hemofílicas"

O achado de mulheres com quadro clínico de hemofilia ligada ao cromossomo X, embora não muito freqüente, tem suscitado discussão, uma vez que contradiz a antiga hipótese de homozigose letal e dá margem à formulação de novas hipóteses, além da homozigose, para explicar o fato.

Barrow e Graham (1974) citam alguns mecanismos genéticos capazes de explicar o aparecimento de mulheres com quadro clínico de hemofilia A (Tabela 2). Considerando-se a estimativa da freqüência do alelo da hemofilia A ($5,51 \times 10^{-5}$), segundo Barrow e Graham, (1974), a freqüência esperada de homozigotas seria de cerca de $3,0 \times 10^{-9}$, ou seja, 3 em um bilhão, sob as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na base da estimativa de Roisenberg (10^{-4}), feita em 1971, essa freqüência seria da ordem de 1 em cem milhões. Este simples fato explicaria a extrema raridade da condição. Os casamentos consangüíneos introduzem, no entanto, uma mudança nos cálculos, elevando a incidência das afetadas.

A homozigose para o alelo da hemofilia A, devida a mutação nova, pode ter ocorrido em casos com história do distúrbio nas famílias de um dos pais; a ocorrência de mutação nova em ambas as linhagens germinais deve ser descartada por ser extraordinariamente baixa. A ilegitimidade, relativamente comum em muitas comunidades, e o incesto devem ser investigados antes de se pensar em mutação nova para explicar a homozigose.

Os aspectos citogenéticos considerados por Barrow e Graham (1974) para explicar o aparecimento de mulheres hemofílicas são também interessantes. Um indivíduo 46, XY; hemizigoto para o gene, provavelmente localizado no cromossomo X (Frota-Pessoa e cols., 1971), da feminilização testicular, e com o alelo da hemofilia A, apresentará o fenótipo de uma mulher hemofílica. O caso descrito por Ramgren (1962), de uma garota com hemofilia A e padrão masculino de cromatina sexual, pode ser um exemplo de aberração cromossômica atuando como causa do aparecimento da hemofilia em mulheres.

Sabe-se que algumas mulheres com síndrome de Turner possuem um genótipo em mosaico. Se a não-disjunção ocorre após a primeira divisão do zigoto, poderá haver uma combinação entre 46, XX em algumas células somáticas e 45, X em outras (XX/X). Neste caso, a mulher poderia apresentar níveis reduzidos de Fator VIII, se possuísse também o gene da hemofilia em um dos cromossomos e, por não-disjunção pós-zigótica, perdesse o cromossomo com o alelo normal nas células responsáveis pela síntese de Fator VIII.

A ocorrência de isocromossomos também pode explicar a hemofilia em mulheres. Se essa aberração ocorre em um genótipo XY cujo X possua o gene da hemofilia, o indivíduo XYqi apresentar-se-á como uma mulher hemofílica. Por outro lado, a aberração pode ocorrer em uma mulher XXqi heterozigota para o gene da hemofilia. Se o isocromossomo carrega o alelo normal para síntese de Fator VIII, ela apresentará quadro clínico de hemofilia, visto que um iso-X será invariavelmente inativado (Hsu e Hirshchhorn, 1970; apud Barrow e Graham, 1974). Também pode acontecer que o loco do Fator VIII seja deletado junto com o braço menor do iso-X.

Tabela 2. Algumas possíveis causas de deficiência de Fator VIII em mulheres (Barrow e Graham, 1974)

1. Diagnóstico errado de doença de von Willebrand ou outra forma autossômica de hemofilia.
2. Homozigidade genética para o loco da hemofilia devida a:
 - a) Consangüinidade em uma irmandade de hemofílicos.
 - b) Ilegitimidade incestuosa.
 - c) Mutação na linha germinal de uma pessoa casada com parente de hemofílicos.
 - d) Mutação pós-zigótica.
3. Anormalidade genética em um fenótipo fêmea com um cromossomo X contendo o gene da hemofilia:
 - a) Feminilização testicular (46, XY).
 - b) Síndrome de Turner (45, X).
 - c) Mosaicismo (46, XX/X) afetando a síntese.
 - d) Isocromossomo Y (46, XY qi) em um fenótipo feminino.
 - e) Isocromossomo X (46, XXqi).
4. "Lyonização extrema" em uma heterozigota.
5. Deleções, inversões, translocações etc, envolvendo um cromossomo X.

A hipótese de Lyon prevê que, ocasionalmente, em uma heterozigota para hemofilia, todos ou quase todos os cromossomos X com o alelo normal podem ser inativados e não produzir RNAm, resultando na redução de Fator VIII até zero ("lyonização extrema"). Só ficaria, no entanto, provado que uma mulher com deficiência de Fator VIII é heterozigota se ela tivesse um filho normal, ou se tivesse uma irmã gêmea monozigótica com níveis ligeiramente mais altos de Fator VIII (sendo ao acaso a heterocromatização dos cromossomos X, irmãs geneticamente idênticas podem ter níveis significativamente diferentes do fator).

A irmandade com doença de Christmas descrita por Revesz e cols., em 1972 (apud Barrow e Graham, 1974), é de importância genética geral porque reforça um aspecto da hipótese de Lyon: o de que a inativação do cromossomo X não é geneticamente determinada. Três gerações de mulheres dessa irmandade (Fig. 3) tinham níveis moderadamente reduzidos de fator IX: a avó (44%), a mãe (28%) e uma filha (15%). O pai era normal e uma co-gêmea idêntica dessa filha tinha menos de 1%.

A coincidência de heterozigose para o alelo da hemofilia A e aberrações (deleções, inversões e translocações) afetando o cromossomo X portador do alelo normal, poderia também ser a explicação de alguns casos de mulheres hemofílicas. O estudo cuidadoso dessas mulheres, incluindo múltiplas amostras de sangue e culturas de pele, utilizando novos métodos, é apontado, por Barrow e Graham (1974), como um meio de se conseguir a localização do loco do cromossomo X que controla a síntese de Fator VIII.

1.5. Causas Secundárias de Variação nos Níveis de Fator VIII

1.5.1. Doenças

Em uma revisão sobre o assunto, Hershgold (1974) cita várias doenças que ocasionam elevação nos níveis de Fator VIII, como diabetes mellitus não tratada, doenças coronarianas, nefrite, anemias hemolíticas, mieloma múltiplo, hipergamaglobulinemia e hipertireoidismo. Ele cita também condições relacionadas com diminuição dos níveis de Fator VIII como coagulação intravascular disseminada, estados fibrinolíticos, presença de anticorpos circulantes e hipotireoidismo.

Davidson, Howard e Gresham (1962) verificaram um aumento nos níveis de Fator VIII, em dois lotes de ratos, alimentados por períodos de um mês ou mais, com dieta contendo, respectivamente, óleos insaturados e gorduras, sendo que, nos ratos alimentados com gorduras, o aumento foi maior.

A Tabela 3, de Kerr e cols. (1966), relaciona vários fatores que influem nos níveis de Fator VIII, segundo vários investigadores.

Abildgaard, Simone e Schulman (1967) descreveram um aumento nos níveis de Fator VIII em indivíduos com anemia falciforme, tendo sugerido uma relação com o grau de hemólise.

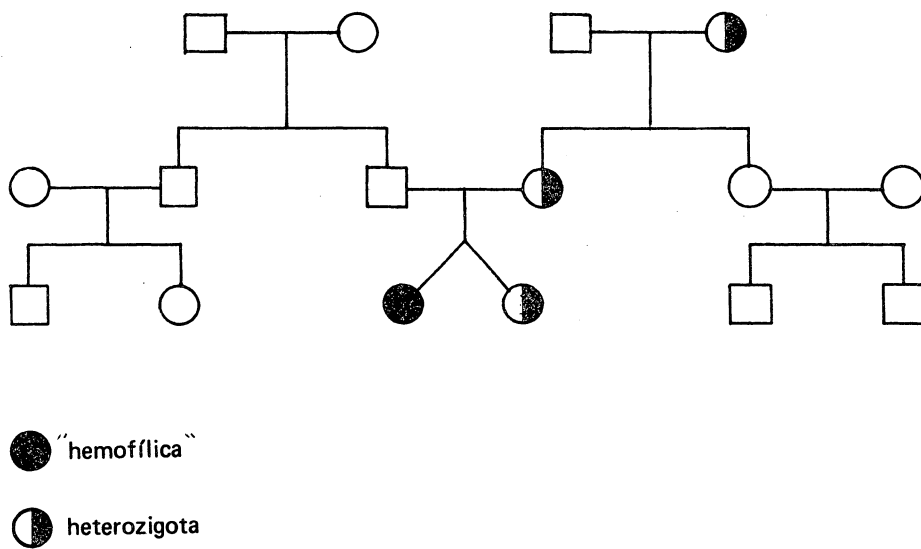


Fig. 3. Irmandade com doença de Christmas, descrita por Revesz e Cols. (1972, apud Barrow e Graham, 1974).

Tabela 3. Fatores que influem nos níveis de Fator VIII (Kerr e cols., 1966)

Referência	Causa de variação	Efeito sobre o Fator VIII
Cooperberg e Teitelbaum (1960)	Aumento de idade	elevação
Cooperberg e Teitelbaum (1960)	Sexo masculino	elevação
Pitney e Elliot (1960)	Hipergamaglobulinemia	elevação
Rizza (1961)	Exercício físico	elevação
Ingram (1961)	Adrenalina	elevação
Egeberg (1962)	Doença coronariana	elevação
	Febre induzida experimentalmente	elevação
	Hipotireoidismo	redução
Davidson e Tomlin (1963)	Pós-operação	elevação
	Trauma	elevação
Strauss e Diamond (1963)	Gravidez	elevação
Preston (1964)	Gravidez	elevação
Egeberg e Owren (1963)	Contraceptivos orais	elevação
Preston e Barr (1964)	Grupo sanguíneo A	elevação

Certos estados fisiológicos podem também causar redução de Fator VIII "in vivo". Ocasionalmente, um paciente com hemofilia desenvolve um anticorpo que afeta especificamente o Fator VIII. Esses anticorpos anti-Fator VIII são geralmente designados "inibidores", sendo observados mais freqüentemente na hemofilia grave. Isto representa um sério problema na terapia dos hemofílicos, pois, desde que surge o anticorpo na circulação, o paciente pode tornar-se refratário ao Fator VIII administrado.

A hemofilia adquirida, isto é, a deficiência de Fator VIII no plasma de pessoas previamente normais, é observada ocasionalmente quando um indivíduo normal desenvolve um inibidor (Barrow e Graham, 1974). As causas de hemofilia adquirida são ainda obscuras, embora vários casos tenham sido descritos, como o de Fox e Tilson (1974), em que ocorre o aparecimento de inibidor em mulheres normais pós-parto. Essas mulheres apresentam os mesmos sintomas da hemofilia clássica e não respondem adequadamente a infusões de Fator VIII concentrado, justamente devido à presença de anticorpos circulantes, que neutralizam o fator infundido.

1.5.2. Raça, Idade, Sexo e Grupo Sangüíneo

Kerr e cols. (1966) verificaram que a distribuição dos níveis de Fator VIII não difere significativamente da curva normal, conforme foi observado em 219 indivíduos cujo nível médio do fator foi de $95 \pm 25\%$, com uma variação de 32 a 200%. A técnica empregada na dosagem de Fator VIII foi a que se baseia no TGT (teste de geração da tromboplastina). Não observaram correlação entre os níveis de Fator VIII e idade, como também não verificaram diferença significativa entre os sexos; observaram, no entanto, níveis mais elevados nas pessoas do grupo sangüíneo A, quando comparadas com as de grupo O.

Cooperberg e Teitelbaum (1960) observaram, numa amostra de 100 indivíduos (64 homens e 36 mulheres), testados pelo método de dois estágios, um aumento nos níveis de Fator VIII com a idade, significativo só na amostra de homens, embora não tenham constatado diferença significativa entre os níveis de homens e mulheres.

Rapaport, Patch e Moore (1960) não encontraram efeito de idade, do ciclo menstrual ou da menopausa, mas Fischer (1975) constatou um aumento nos níveis de Fator VIII, com a menopausa, em sua amostra de 20 heterozigotas.

Pitney e Elliot (1960) verificaram que os aborígenes australianos têm, em geral, concentrações plasmáticas de Fator VIII maiores do que a população branca australiana. O método empregado por eles foi baseado no TGT. A amostra estudada continha 80 brancos e 28 aborígenes, com igual número de homens e mulheres, sendo todos adultos normais.

Preston e Barr (1964) observaram, numa amostra de 232 homens e 178 mulheres, testados pelo método de dois estágios, um efeito do sexo nos níveis de Fator VIII, mas não da idade. A concentração média nos homens foi significativamente maior do que nas mulheres. Também observaram níveis ligeiramente menores nos indivíduos do grupo O do que nos do grupo A, tal como Ingram (1965) e Hershgold (1974). Não encontraram diferença entre os indivíduos Rh^+ e Rh^- . O nível médio do fator, em 29 heterozigotas certas, foi de $48 \pm 22\%$ (variação entre 26 e 126%), enquanto que, nas mulheres de famílias normais, foi de $93 \pm 27\%$.

Chakrabarti e cols. (1975) verificaram um aumento significativo nos níveis de Fator VIII com a idade quando testaram 316 homens, pelo método de dois estágios. O mesmo não aconteceu, no entanto, quando testaram 104 mulheres. Além disto, verificaram que, para os mais jovens, os níveis de Fator VIII eram mais baixos nas mulheres do que nos homens, mas que, para os mais velhos, acontecia o inverso.

Barrow e Graham (1974) apontam uma discrepância metodológica encontrada por Niemetz e Nossel, em 1967, num estudo em que os níveis de Fator VIII, medidos pela técnica de um estágio, foram várias vezes maiores do que quando medidos pela de dois estágios. Os autores concluíram que tanto o precursor como o Fator VIII ativado são medidos com a técnica de um estágio, mas que só o precursor de Fator VIII é medido com o método de dois estágios. O $Al(OH)_3$ adsorve, além de trombina, quantidades variáveis de Fator VIII, o que pode explicar os níveis reduzidos obtidos com o método de dois estágios, quando comparados com os do método de um estágio. Niemetz e Nossel sugeriram que a ativação do Fator VIII em certos estados patológicos é devida à lenta liberação de trombina "in vivo", como acontece na coagulação intravascular disseminada (apud Barrow e Graham, 1974).

1.6. Dosagem

Os métodos quantitativos para dosagem de Fator VIII são utilizados, em clínica médica, para o diagnóstico de pacientes, para o controle da efetividade do tratamento e para a verificação da potência dos concentrados de globulina antihemofílica empregados.

Os métodos mais usados para medir a atividade procoagulante do Fator VIII são: o de dois estágios, baseado no TGT, e o de um estágio, baseado no TTP-A (tempo de tromboplastina parcial ativado). Os resultados podem ser apresentados em percentagem de atividade, em relação a um plasma padrão, ou em unidades. A Unidade Internacional de Atividade de Fator VIII foi definida, em 1970, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como sendo a atividade contida em 14,365 mg de um "plasma pool" considerado Padrão Internacional (Bangham e Brozovic, 1974).

É essencial, na dosagem de Fator VIII, testar mais de uma diluição, tanto do plasma padrão como do plasma teste, para se verificar se o sistema de coagulação está respondendo similarmente a ambos os plasmas, isto é, produzindo linhas paralelas (curvas dose-resposta), quando o tempo de coagulação (resposta) é plotado como Y e a diluição do plasma (dose) como X (Ingram, 1965). Quando as curvas não são paralelas, o plasma teste e o plasma padrão estão diferindo em mais de um fator de coagulação; por exemplo, o Fator VIII e o Fator V (Margolis e Bruce, 1964). Esses autores excluem, obviamente, a possibilidade de falhas técnicas.

1.6.1. Método de Dois Estágios

Consiste em se determinar o tempo mínimo de coagulação no teste de geração da tromboplastina em um sistema no qual a única variável é o Fator VIII. Em princípio, é a realização do teste em várias diluições de um plasma normal, adsorvido com

$Al(OH)_3$, que contém Fator VIII, e em várias diluições do plasma deficiente, também adsorvido.

Os tempos de coagulação obtidos com o plasma normal são considerados proporcionais à quantidade de Fator VIII existente na mistura, e permitem a confecção de uma curva do tempo de coagulação versus a diluição, em papel di-log. Procede-se da mesma maneira com o plasma deficiente e obtêm-se duas curvas paralelas. A comparação entre essas curvas possibilita calcular a quantidade de Fator VIII existente no plasma teste. Os resultados são expressos de forma logarítmica, uma vez que os níveis de fator VIII distribuem-se lognormalmente na população (Chackrabarti e cols., 1973).

1.6.2. Método de um Estágio

Este método é preferível ao primeiro por requerer tempo consideravelmente menor para a preparação de reagentes e realização do teste. Mede a capacidade de um plasma teste encurtar o tempo de tromboplastina parcial ativado de um plasma substrato muito deficiente em Fator VIII. O nível de correção efetuado pelo plasma teste é comparado com os resultados obtidos com várias diluições de um plasma padrão (pool normal).

1.6.3. Outros Métodos: o Imunoensaio e o Radioimunoensaio

O imunoensaio consiste na eletroforese do plasma em agarose que contém o anticorpo específico anti-Fator VIII. No radioimunoensaio, usa-se um anticorpo ligado a isotopo radioativo.

Para aplicar esses testes, é necessário um antisoro suficientemente específico; é muito difícil obter uma amostra pura do antígeno com o qual se prepara o antisoro. Embora o Fator VIII possa ser concentrado várias centenas de vezes, há sempre a possibilidade de que permaneça algum material inerte, mas antigênico, o que confundiria os resultados do experimento (Ingram, 1965).

Além de possuir a característica biológica de especificidade, verificada com o paralelismo das curvas dose-resposta, um teste deve ser suficientemente sensível e discriminante. Por sensibilidade, entende-se a menor concentração de Fator VIII que o teste pode medir; por discriminação, a habilidade do teste em distinguir entre pequenas diferenças de concentração (Ingram, 1965).

Em um teste no qual se emprega plasma hemofílico como diluente, a sensibilidade será total se esse reagente for oriundo de um indivíduo gravemente afetado, sem Fator VIII detectável no plasma. O poder de discriminação depende da acuidade com que as curvas dose-resposta possam ser interpoladas; o erro devido ao efeito de observação é óbvio neste caso.

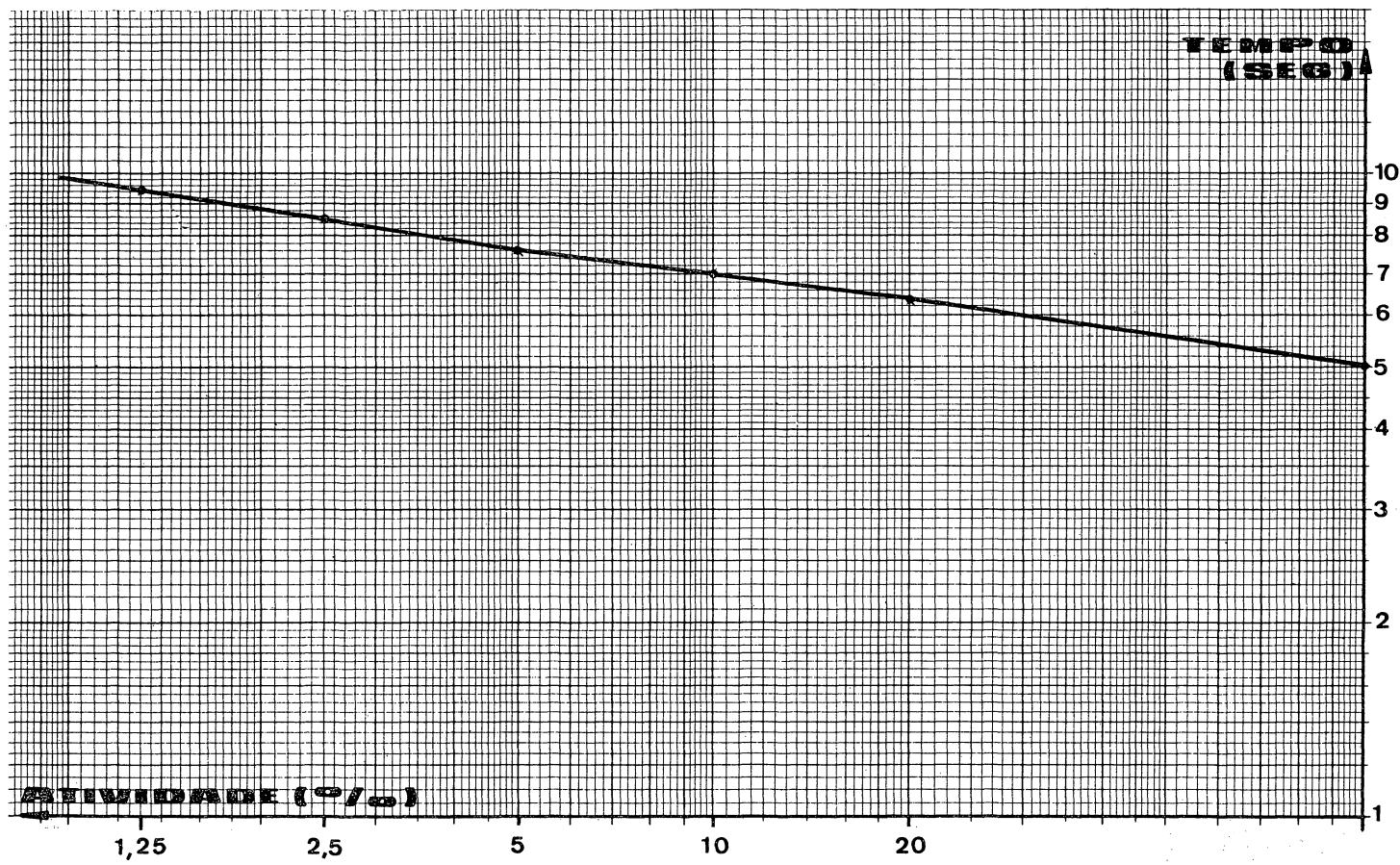
Os erros sistemáticos devem ser eliminados por precauções na escolha de reagentes e métodos. Os erros devidos ao acaso podem ser medidos estatisticamente e expressos sob forma de vários índices que mostram a precisão da estimativa obtida em um dado teste (Ingram, 1965).

I.7. Objetivos

A verificação de um efeito da idade e do grupo sanguíneo nos níveis de Fator VIII seria muito importante no tratamento de pacientes com deficiência do fator. Se ocorre um aumento na concentração de Fator VIII ativo com a idade, e se os indivíduos do grupo A têm níveis mais elevados em relação aos do grupo O, como sugerem alguns trabalhos (Chakrabarti e cols., 1973; Cooperberg e Teitelbaum, 1960; Pitney e cols., 1962), os indivíduos mais velhos e do grupo sanguíneo A seriam obviamente os doadores de sangue indicados para a produção de concentrados de Fator VIII. Por outro lado, se, em indivíduos normais, ocorre elevação nos níveis de Fator VIII com a idade, é de se esperar que isto também aconteça com os portadores da deficiência.

Como o problema permanece ainda controverso a respeito do efeito da idade (Preston e Barr, 1964), esta tese propõe-se a estudar o comportamento dessa variável em relação aos níveis de Fator VIII ativo, subdividindo a amostra em duas sub-amostras: grupo sanguíneo A e grupo sanguíneo O.

Fig. 4 – CURVA DE DOSAGEM DE FATOR VIII



II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Caracterização da Amostra

Foram testados 100 indivíduos normais, caucasóides, do sexo masculino, sendo 50 do grupo sangüíneo A e 50 do grupo O, entre 10 e 56 anos. Essa amostra foi obtida entre doadores voluntários do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e entre escolares do Centro Educacional Guaíra, de Curitiba.

Após entrevista em que se procurava obter dados sobre fatores que intervêm no mecanismo da coagulação, era realizada a determinação do grupo sangüíneo do sistema ABO, pelo método clássico do teste em lâmina, com antisoros A e B, da Johnson & Johnson.

Um volume de 4,5 ml de sangue venoso era coletado de cada indivíduo, com seringa descartável (Plastipak) e agulha BD 25 x 8, ou com equipo para sangria (Rossifil). O sangue coletado era colocado em tubo plástico, de centrifugação, contendo o anticoagulante citrato trissódico 0,129 M, na proporção de 1:9, e centrifugado a 4^o C, a 1120 G, durante 10 minutos.

Os testes, realizados em aparelho automático (Clotek-Hyland), eram iniciados imediatamente após a coleta e centrifugação. Os plasmas eram mantidos permanentemente em banho de gelo.

Com esse material,, realizaram-se a dosagem de Fator VIII pelo método de Langdell e cols. (1953) e o tempo de tromboplastina parcial ativado com caulim, pelo método de Gandolfo (1973). Ambos os métodos foram adaptados ao sistema Clotek para estudos de coagulação, e padronizados pelo Prof. Dr. Israel Roisenberg para serem usados nos vários projetos de pesquisa sobre "Aconselhamento Genético em Hemofilias", dentro do Programa Integrado de Genética (PIG), do qual este trabalho faz parte.

II.2. Provas Laboratoriais

II.2.1. Dosagem de Fator VIII

Os reagentes liofilizados empregados (plasma controle, plasma deficiente em Fator VIII e cefalina) eram fornecidos pelo Dr. Israel Roisenberg e por ele produzidos no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O plasma controle era diluído em série, nas concentrações de 20%, 10%, 2,5% e 1,25%, com solução salina tamponada a pH 7,35.

Para cada diluição do plasma normal, era medido o tempo de coagulação da mistura: 0,1 ml de plasma diluído, 0,1 ml de cefalina e 0,1 ml de caulim, acrescida de 0,1 ml de cálcio a 0,0250 M, após 2 minutos de incubação. Obtinha-se, assim, a curva controle, que mede o poder que o plasma normal tem de corrigir um plasma deficiente em Fator VIII, usado como substrato. Essa curva, traçada em papel di-logarítmico, fornece a relação entre o tempo de coagulação (em segundos) e a atividade do Fator VIII (em percentagem). A Fig. 4 mostra um exemplo da distribuição verificada num certo dia.

Cada plasma teste era diluído a 20%, 10% e 5%, em salina tamponada a pH 7,35 e medido o tempo de coagulação da mesma forma que com o plasma controle. Para cada tempo de coagulação obtido com o plasma-teste, era registrada a atividade correspondente de acordo com a curva controle. O valor da atividade encontrado era multiplicado pelo fator de diluição do plasma testado, obtendo-se, assim, sua atividade de Fator VIII. O resultado final era dado pela média dos resultados obtidos nas três diluições: 20%, 10% e 5%.

Todos os plasmas testes, realizados no mesmo dia, eram plotados na curva controle realizada no mesmo dia. A Tabela 4 mostra, como exemplo, os resultados da dosagem de um indivíduo.

II.2.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado – TTP–A

Pelo método de Gandolfo (1973), eram realizados os testes, em duplicata, usando-se 0,1 ml de plasma, 0,1 ml de cefalina, 0,1 ml de caulim a 1% e 0,1 ml de cloreto de cálcio a 0,025 M.

Tabela 4. Resultados de dosagem de Fator VIII em um indivíduo.

Diluições	Tempos (seg) Curva controle	Tempos (seg) Plasma teste	Atividade (%) Plasma teste	Fator Diluição Plasma teste	Resultado (%)
1/5 (20%)	62,1	66,4	14	5	70
1/10 (10%)	70,4	72,0	7,5	10	75
1/20 (5%)	75,4	82,0	3,5	20	70
1/40 (2,5%)	85,1				
1/80 (1,25%)	94,8				

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 5, apresentamos os resultados das dosagens de Fator VIII, em segundos. As letras (A, B...R) representam os resultados obtidos com as diversas diluições do plasma padrão, em cada dia. Os algarismos arábicos (1, 2...100) designam os resultados obtidos com os plasmas teste.

Na Tabela 6, encontram-se os resultados de Fator VIII, transformados em percentagem de atividade em relação ao plasma padrão, assim como os resultados de TTP-A, em segundos, a idade e o grupo sangüíneo dos indivíduos testados. Cada resultado de TTP-A representa a média entre teste e reteste.

Os dados foram analisados através de regressão múltipla, passo a passo, com programa escrito em Fortran IV (REGR 03), em computador IBM 1130, do Centro de Computação Eletrônica da UFPR; os resultados encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9. O processamento dos dados, com esse programa, é feito de forma que as variáveis sejam computadas em ordem de importância, conforme seu valor de F, e automaticamente eliminadas quando esse valor for muito baixo.

A idade e o grupo sangüíneo são considerados como as variáveis independentes. A variável dependente, nas Tabelas 7 e 8, é o nível de Fator VIII, enquanto que, na Tabela 9, é o TTP-A.

O coeficiente de regressão (b) entre níveis de Fator VIII e idade foi significativo ao nível de 5% e o valor obtido por regressão linear (Tabela 8) foi o mesmo obtido pela regressão múltipla, quando entrou também a variável grupo sangüíneo, cujo valor de b não foi significativamente diferente de zero (Tabela 7). Os valores de F, na análise de variância, foram 4,05 e 2,76, respectivamente, para a regressão simples e múltipla, sendo que só o primeiro valor foi significativo ao nível de 5%.

Quanto o TTP-A entrou como variável dependente, o coeficiente de regressão de idade não foi significativo, e o de grupo sangüíneo foi automaticamente eliminado devido ao baixo valor de F. Por este motivo, só apresentamos a regressão simples (Tabela 9).

A influência da idade sobre os níveis dos fatores de coagulação é um dos assuntos mais importantes, atualmente, na pesquisa em hemofilias e doenças cardiovasculares. Segundo Chackrabarti e cols. (1973), o aumento nos níveis dos fatores V, VII e VIII, com a idade, observado por eles, pode explicar a incidência maior de doenças arteriais nos indivíduos de idade mais avançada. Também a observação de Ikkala (1960), de que os hemofílicos sofrem uma melhora na sintomatologia, entre 20 e 40 anos, sugere um aumento dos níveis dos fatores de coagulação com a idade, embora este fato também possa ser explicado como resultado de os pacientes aprenderem a proteger-se de traumas.

Em nossa amostra, constatamos um aumento significativo nos níveis de atividade de Fator VIII com a idade. Esse aumento pode ser devido tanto a uma síntese aumentada da molécula como a uma ativação maior do produto já existente. A medida da atividade antigênica, aliada à dosagem biológica já realizada, poderia, no nosso entender, acrescentar informações a esse respeito; será realizada numa segunda etapa de nosso trabalho.

Quando testamos a coagulação, de modo global, através do TTP-A, que é uma modificação do tempo de coagulação, não observamos diminuição nos tempos de coagulação, com a idade, e assim não pudemos constatar se o aumento nos níveis de Fator VIII é acompanhado de aumento nos outros fatores de coagulação. Não conseguimos também detectar diferença significativa entre os grupos sanguíneos A e O quanto aos níveis de Fator VIII, ao contrário do que sugerem os autores já referidos.

**Tabela 5. Dosagem de Fator VIII (em segundos), idade e grupo sanguíneo
A, B . . . R = pontos das curvas padrões; 1, 2 . . . 100 = plasmas testes.
Diluições:**

	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
A	62	70	75	85	95
1	58	69	77		
2	66	72	83		
3	61	75	84		
4	63	65	85		
B	64	77	76	97	101
5	66	77	87		
6	71	82	96		
7	59	70	79		
8	66	80	89		
9	69	78	94		
10	67	74			
C	68	79	89	70	106
11	69	79	89		
12	59	79	94		
D	60	71	81	94	101
13	59	63	80		
14	64	74	82		
15	65	74			
16	62	73	80		
17	62	62	81		
E	66	75	67	92	104
18	63	69	80		
19	65	75	88		
20	65	75	85		
21	66	75			
22	66	77	89		
F	67	77	79	98	103
23	63	74	88		
24	75	82	95		
25	70	76	88		
G	72	76	89	93	110
26	64	69	86		
27	69	81	85		
28	65	75	89		
29	68	77	82		
30	62	70	81		

continuação da Tabela 5

	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
H	67	51	88	95	103
31	63	72			
32	69	77			
33	58	71			
34	69	84			
35	63	71			
36	61	69			
37	69	76			
38	62	71			
I	66	72	84	94	102
39	66	73	81		
40	65	70	79		
41	63	70			
42	63	72	82		
43	62	72			
44	65	76			
45	65	76			
46	64	74			
47	72	83			
48	63	70			
49	66	76			
50	65	75			
51	69	77			
52	62	70			
53	62	77			
54	68	75			
55	64	74			
56	64	77			
57	70	80			
58	61	77			
J	61	66	80	88	101
59	56	65			
60	57	69			
61	56	64			
62	63	74			
63	61	68			
64	58	68			
K	63	73	82	92	102
65	57	67			
66	57	67			
67	62	69	85		

continuação da Tabela 5

	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
L	64	69	82	95	103
68	64	75			
69	67	77			
70	60	70	78		
71	68	78			
M	64	76	85	97	104
72	66	72	83		
73	73	80			
74	67	77			
75	68	72			
76	68	80			
77	61	71	79		
N	68	78	87	99	107
78	72	81			
79	70	81			
80	64	71	79		
81	57	67	78		
82	60	71	80		
83	63	70	77		
O	68	78	89	98	107
84	69	78			
85	72	82	92		
86	66	77			
87	55	64	77		
88	69	79			
89	67	76	85		
P	71	82	88	98	109
90	67	78			
91	72	82			
92	77	87			
93	70	81			
94	71	82			
Q	67	78	88	96	105
95	68	78			
96	64	76			
97	66	77			
98	63	73	83		
R	68	80	90	101	110
99	64	71			
100	69	82	89		

Tabela 6. Dosagem de Fator VIII e TTP-A

A, B,R = pontos das curvas padrões; 1, 2,100 = plasmas testes.

Níveis de F. VIII (%)	Idade (anos)	Grupo sanguíneo	TTP-A (seg)
105	27	O	45
73	21	O	50
60	18	A	44
77	18	O	47
72	26	O	41
55	17	A	52
116	18	A	41
53	21	O	49
62	22	O	51
80	34	O	48
83	18	A	44
68	21	O	48
145	48	A	48
87	19	A	50
82	22	A	57
97	42	O	43
97	53	A	55
140	33	A	47
82	22	O	48
92	34	A	46
97	23	O	48
83	38	O	44
105	44	A	43
59	47	O	57
90	40	O	47
191	20	O	44
120	26	A	43
125	29	A	52
141	27	A	48
220	33	A	40
130	51	O	47
77	46	A	53
190	44	A	48
62	21	O	58
132	34	O	44
162	19	O	46
80	24	O	55

continuação da Tabela 6

Níveis de F VIII (%)	Idade (anos)	Grupo Sangüíneo	TTP-A (seg)
140	23	O	42
100	14	A	45
120	55	A	50
132	13	A	49
115	15	O	57
125	13	O	47
92	12	A	53
92	14	O	48
102	15	O	47
55	13	O	54
132	13	O	46
90	12	O	50
97	12	A	45
75	10	O	49
140	10	O	43
110	12	A	48
85	11	A	46
110	16	O	47
97	10	A	50
60	11	A	54
112	11	A	49
155	32	A	41
130	31	A	40
160	35	A	40
80	43	O	48
110	36	A	50
115	33	A	43
162	32	O	43
165	37	O	47
117	42	A	48
92	38	O	46
76	32	A	55
135	36	A	45
71	30	A	46
93	49	O	41
49	38	O	53
75	51	O	49
85	21	O	46
62	22	A	50
113	23	O	41

Níveis de F VIII (%)	Idade (anos)	Grupo Sangüíneo	TTP-A (seg)
61	24	O	57
67	29	O	60
137	40	O	45
175	39	A	38
140	21	A	45
151	19	A	44
87	47	O	44
68	25	A	53
105	45	O	47
240	44	O	35
85	19	O	48
100	23	A	46
130	50	O	49
87	50	A	51
57	20	A	54
97	47	A	46
90	26	A	50
85	20	O	48
112	19	A	45
97	19	A	50
115	35	O	43
150	42	A	43
82	15	A	46

Tabela 7. Análise de Regressão Múltipla de Fator VIII, Idade e Grupo Sangüíneo

$Y = 105,34 \pm 36,79$

$a = 84,34$

x_i	$\bar{x}_i \pm D.P.$	$b_i \pm E.P.$
Idade	27,94 \pm 12,45	0,59* \pm 0,29
Grupo	50,00 \pm 0,50	8,71 \pm 7,23

*Significativo ao nível de 5%.

Análise de Variância

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão	2	7213,5	3606,7	2,76
Resíduo	97	126800,0	1307,2	

Tabela 8. Análise de Regressão Linear de Fator VIII e Idade.

$$\bar{Y} = 105,34 \pm 36,79$$

$$a = 88,89$$

x_i	$\bar{x}_i \pm D.P.$	$b_i \pm E.P.$
Idade	27,94 \pm 12,45	0,59* \pm 0,29

*Significativo ao nível de 5%.

Análise de Variância

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão	1	5317,7	5317,7	4,05*
Resíduo	98	128690,0	1313,2	

*Significativo ao nível de 5%.

Tabela 9. Análise de Regressão Linear TTP–A e Idade

$\bar{Y} = 47,49 \pm 4,66$		$a = 49,13$
xi	$\bar{x}_i \pm D.P.$	$b_i \pm E.P.$
Idade	$27,94 \pm 12,45$	$- 0,06 \pm 0,04$

Análise de Variância

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão	1	53,22	53,22	2,48
Resíduo	98	2101,70	21,44	

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Foram testados 100 indivíduos normais, caucasóides do sexo masculino, sendo 50 do grupo sanguíneo A e 50 do grupo O, entre 10 e 56 anos. A dosagem de Fator VIII pela técnica de um estágio e o tempo de tromboplastina parcial-ativado foram realizados com reagentes liofilizados.

As conclusões do presente trabalho são as seguintes:

- A - Ocorre um aumento significativo nos níveis de atividade de Fator VIII com a idade, em indivíduos normais.
- B - Este aumento pode ser devido a uma produção maior da molécula ou a uma ativação maior do produto já existente.
- C - Não ocorre alteração no tempo de coagulação, quando medido através do TTP-A, com a idade.
- D - Não há diferença significativa dos níveis de Fator VIII, entre os grupos sanguíneos A e O.
- E - Considerando que as conclusões acima foram baseadas no estudo de uma amostra de 100 indivíduos, e considerando a extensa variação metodológica dos testes de coagulação, somos de opinião que o estudo de uma amostra maior, com o emprego de outras técnicas de dosagem de Fator VIII, além da dosagem biológica, seria útil para se obter novas informações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abildgaard, C.F., J.V. Simone e I. Schulman, 1967. Factor VIII (Antihemophilic Factor) activity in Sickle-cell Anaemia. *Brit. J. Haemat.*, 13:19–27.
- Adelson, E.J.J., Rheingold, O., Parker, M., Steiner e J. C. Kirby, 1963. The survival of Factor VIII (Antihemophilic Globulin) and Factor IX (Plasma Thromboplastin Component) in Normal Humans. *J. Clin. Invest.*, 42:1040–1047.
- Bangham, D. R. e Milica Brozovic, 1974. Factor VIII International Units and Reference Materials. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 31:3–11.
- Barrow, Emily M. e J. B. Graham, 1974. Blood Coagulation Factor VIII (Antihemophilic Factor). With comments on von Willebrand's Disease and Christmas Disease. *Physiol. Rev.*, 54:23–74.
- Bennett, B., 1974. Antihemophilic Factor, normal and abnormal. *Brit. J. Haemat.*, 26:1–7.
- Britten, A. e M. Grove-Rasmussen, 1966. Stability of Factor VIII in the frozen state. *Transfusion*, 6:230–133.
- Chakrabarti, R., Milica Brozovic, W. R. S. North, Y. Stirling, e T. W. Meade, 1975. Effects of age on fibrinolytic activity and Factors V, VII and VIII. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 68:267–268
- Cooperberg, A. A. e J. Teitelbaum, 1960. The Concentration of Antihemophilic Globulin (AH6) related to age. *Brit. J. Haemat.*, 6:281–287
- Davidson, E., A. N. Howard e G. A. Gresham, 1962. The nature of the coagulation defect in rats fed diets which produce thrombosis or experimental atherosclerosis. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 43:166–171.
- Fischer, R. R., 1975: *Migração Diferencial em Hemofilias e Detecção de Heterozigotas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 87 pp.
- Fox, G. L. e H. B. Tilson, 1974: Acquired hemophilia due to a circulating anticoagulant. *J. Oral Surgery*, 32:27–30.
- Frota-Pessoa, O., G. Freshe, Ieda Parreiras, C. A. Perez, C. Orteza e M. Russo. 1971. Location of the gene for testicular feminization in the X chromosome in man. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 4:227–233.
- Gandolfo, G. M., 1973: *Enfermedades Hemorrágicas*. Ed. Med. Panamericana S.A., Buenos Aires, 238 pp.
- Graham, J. B., Emily S. Barrow, R. H. Roberts, W. P. Webster, P. M. Blatt, P. Buchanam, A. I. Cederbaum, J. P. Allain, D. A. Barrett e H. R. Gralnik 1975: Dominant inheritance of Hemophilia A in three generations of women. *Blood*, 46:175–178.

- Graham, J. B., Connie H. Miller, H. Miller, H. M. Reisner, R. C. Elston e J. A. Olive 1976. The Phenotypic range of Hemophilia A carriers. *Am. J. Human Genet.*, 28:482–488.
- Green, D., 1974: Hemophilia. *Postgrad. Med.*, 55:129–133.
- Green, D. e J. R. Chediak, 1977. von Willebrand's disease current concepts. *Am. J. Med.*, 62:315–318.
- Hershgold, E. J., 1974. Properties of Factor VIII (Antihemophilic Factor) *Progr. Hem. Thromb.*, 2:99–139.
- Hougie, C., K. W. E. Denson, e Rosemary Biggs, 1967. A study of the reaction product of Factor VIII and Factor IX by gel filtration. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 18:211–222.
- Hoyer, L. W., R. P. de los Santos e J. R. Hoyer, 1973. Antihemophilic Factor activity. *J. Clin. Invest.*, 52:2737–2744.
- Ikkala, E., 1960. Hemophilia. A study of its laboratory, clinical, genetic and social aspects based on known haemophilic in Finland. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12, suppl. 46:03–108.
- Ingram, G. I. C., 1965. Blood-coagulation Factor VIII. Genetics Physiological Control and Bioassay. *Adv. Clin. Chem.*, 8:189–235.
- Ingram, G. I. C., 1971. The genetics of clotting factor VIII. *Med. Lab. Techn.*, 28:76–80.
- Jaffe, E. A., L. W. Hoyer and L. Nachman, 1973. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 52:2757–2764.
- Johnson, A. J., D. L. Aronson, W. J. Willian, 1976. Métodos de fracionamento de Fator VIII. In: Willians W. J. et al *Hematologia*. Ed. Guanabara, pp. 1081–1085.
- Kerr, C. B., 1966. Genetical aspects of carrier detection in hemophilia. *Bibl. Haemat.*, 26:4–9.
- Kerr, C. B., A. E. Preston, A. Barr e Rosemary Biggs, 1966. Further Studies on the inheritance of Factor VIII. *Brit. J. Haematol.*, 12:212–233.
- Landaburu, R. H. e Delicia E. Castellanos, 1972. Neurohumoral control of blood coagulation adrenergic stimulation and spleen in the control of Factor VIII plasma level *New Istambul Contrib. Clin. Sci.*, 10:121–129.
- Langdell, R. D., R. H. Wagner e K. M. Brinkhous, 1953. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. A presumptive assay procedure, *J. Lab. Clin. Med.*, 41:637–647.
- Larrieu, M. J. e D. Meyer, 1971. Heterogeneity of Factor VIII and Factor IX variants. 63:11–16. *Thromb. Diath. Hemorrh.*, 63:11–16.

- Mac Lester, W. D. e J. B. Graham, 1964. Gene expression in heterozigotes and synthesis of plasma antihemophilic factor. *Nature*, 201:1040–1042.
- Mantle, D. J., Carole Pye e R. M. Hardisty, 1971. Plasma Factor VIII concentrations in XXX women. *Lancet*, 7689:58–59.
- Margolis, J. e Sally Bruce, 1964. An experimental approach to the kinetics of blood coagulation. *Brit. J. Haemat.*, 10:513–529.
- Marx, J. L., 1975. Hemophilia. New information about the "Royal Disease". *Science*, 188:41–42.
- Mourik, J. A. van, B. N. Bouma, W. T. Labruyère, S. de Graff e I. A. Mochtar, 1974. Factor VIII. A series of homologous oligomers and a complex of two proteins. *Thromb. Res.*, 4:155–164.
- Meyer, Dominique, Lise Dray, J. P. Allain e Marie José Larrieu, 1972. Le Facteur VIII (Facteur Anti-Hemophilique A). *Path. Biol.*, 20:607–623.
- Meyer, Dominique, Marie-José Larrieu e J. C. Dreyfus, 1969. Migration eletroforétique des facteurs de coagulation sur acétate de cellulose. *Nouv. Rev. Franç. d'Hemat.*, 5:611–626.
- Michael, S. E. e G. W. Tunnhah, 1966. The purification of Factor VIII (Antihemophilic Globulin) II. Further purification and some properties of Factor VIII. *Brit. J. Haemat.*, 12:115–132.
- Papayannis, A. G., J. K. Wood e M. C. G. Israëls, 1971. Factor VIII levels, bleeding-times and platelet adhesiveness in patients with von Willebrand's disease and their relatives. *Lancet*, 7696:418–421.
- Pasquini, R. e E. J. Hershgold, 1973. Effects of plasmin on human Factor VIII (A.H.F.). *Blood*, 41:105–111.
- Pitney, W. R. e Elliot M. H., 1960. Plasma Antihemophilic Factor concentrations in the australian aborigene and in conditions associated with Hypergamaglobulinaemia. *Nature*, 185:397.
- Pitney, W. R., R. L. Kirk, Barbara J. Arnold e N. S. Stenhouse, 1962. Plasma Anti-Haemophilic Factor (Factor VIII) concentrations in normal families *Brit. J. Haemat.*, 8:421–428.
- Pool, Judith G., T. Cohen e W. P. Greger, 1967. Biological half-life of transfused antihemophilic globulin (Factor VIII) in normal man. *Brit. J. Haemat.*, 13:822–828.
- Pool, J. G., E. J. Hershgold e A. R. Pappenhagen, 1964. High potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature*. 203:312.
- Preston A. C., 1964. The plasma concentration of Factor VIII in the normal population. I. Mothers and babies at birth. *Brit. J. Haemat.*, 10:110–114.

- Preston, A. E. e A. Barr, 1964. The plasma concentration of Factor VIII in the normal population. II. The effects of age, sex and blood group. *Brit. J. Haemat.*, 10:238–245.
- Pudlak, P. e Deimlová E., 1968. Transmission of the genetic disorder in Haemophilia A and its proof by laboratory tests. *Rev. Czech. Med.*, 14:225–233.
- Ramgrem, O., 1962. A clinical and medico-social study of Haemophilia in Sweden. *Acta Med. Scand.*, 171, suppl. 379:111–151
- Rapaport, S. I., Mary J. Patch e F. J. Moore, 1960. Antihemophilic Globulin levels in carriers of hemophilia A. *J. Clin. Inv.*, 39:1620–1625.
- Ratnoff, O. D. e Jessica H. Lewis, 1975. Heckathorn's Disease: variable, functional deficiency of Antihemophilic Factor (Factor VIII). *Blood*, 46:161–172.
- Rick, Margaret E. e L. W. Hoyer, 1975. Molecular weight of human Factor VIII procoagulant activity. *Thromb. Res.*, 7:909–916.
- Roberts, D. F., 1971. The genetic basis of variation in factor VIII levels among hemophiliacs. *J. Med. Gen.*, 8:136–139.
- Roisenberg, I., 1971. *Hemofilia e Estados Hemofilióides no Rio Grande do Sul: Freqüência Fisiologia e Herança*. Tese de doutoramento. Faculdade de Filosofia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 124 pp.
- Sultan, Yvete, Jackeline Simeon e J. P. Caen, 1975. Detection of heterozygotes in both parents of homozygous patients with von Willebrand's disease. *J. Clin. Pathol.*, 28:309–316.
- Sultan, Yvete, Jackeline Simeon, P. Maisonneuve e J. P. Caen, 1976. Immunologic studies in von Willebrand's disease. Alterations of Factor VIII/von Willebrand protein after transfusion with Plasma Concentrates in patients with von Willebrand's disease. *Tromb. haemostas.*, 35:110–119.
- Stibbe, J., H. C. Hemker e S. V. van Creveld, 1972. The inactivation of Factor VIII in vitro. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 27:43–58.
- Thomopoulos D., P. Scliros e C. Lyberatos, 1975. Detection of carriers of Haemophilia A. *Acta haemat.*, 54:32–35.
- Tuddenhan, E.G.D., Sonia A.M. Shearn, I.R. Peake, J.C. Giddings e A.L. Bloom, 1974. Tissue localization and synthesis of Factor VIII related antigen in the human foetus. *Brit. J. Haemat.*, 26: 669–677.
- Vermylem, J., 1975. Physical and chemical properties of normal and haemophilic Factor VIII. *Pathol. Biol.*, 23:5–10.
- Wagner, R. H., 1975. Factor VIII, small Active Factor VIII fragments and von Willebrand factor. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 34:604–605.

Zimmerman, T. S., O. D. Ratnoff e A. E. Powell. 1971. Immunologic differentiation of classic hemophilia (Factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease: with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J. Clin. Invest.*, 56:244–254.

Zimmerman, T. S., O. D. Ratnoff e A. S. Littell, 1971. Detection of carriers of classic hemophilia using an immunologic assay for Antihemophilic Factor (Factor VIII). *J. Clin. Invest.*, 50:255–258.