

Flávia Yankous Rabelo

**DETERMINAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA
DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FATOR VII DA
COAGULAÇÃO**

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2011

Flávia Yankous Rabelo

**DETERMINAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA
DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FATOR VII DA
COAGULAÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Minas
Gerais para obtenção do título de Mestre em
Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Prof^a. Suely Meireles Rezende

Belo Horizonte
2011

Rabelo, Flávia Yankous.
R114d Determinação das bases moleculares da deficiência hereditária de fator VII da coagulação [manuscrito]. / Flávia Yankous Rabelo . - - Belo Horizonte: 2011.
89f.: il.
Orientadora: Suely Meireles Rezende.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Fator VII. 2. Deficiência do Fator VII. 3. Genes. 4. Mutação. 5. Hemorragia. 6. Polimorfismo Genético. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Rezende, Suely Meireles. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WH 310

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora

Prof^ª. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

Prof^ª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof^ª. Anelise Impelziere Nogueira

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof^ª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof^ª. Valéria Maria de Azevedo Passos

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto

Prof^ª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof^ª. Valéria Maria de Azevedo Passos

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof^ª. Suely Meireles Rezende

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Marcos Vinícius Melo de Andrade

Representantes discentes

William Pedrosa de Lima (Titular)

Pollyanna Barros Batista (Suplente)

À Deus por ter iluminado meu caminho
para que eu pudesse concretizar
este meu objetivo.

Aos meus pais, Eduardo e Júnia, que me ensinaram os valores da vida.

À minha irmã Fernanda pelo incentivo e ajuda.

À minha avó Marília pelo incentivo.

À Simone pelo apoio e condução dos experimentos,
que foram essenciais.

AGRADECIMENTOS

À Magguinha, minha companheira, de todos os momentos.

À Renata do PROCAP HC da UFMG pela força e incentivo.

À coordenação do Laboratório Central HC da UFMG.

À coordenação e aos colegas do setor de Biologia Molecular HC da UFMG pela atenção e incentivo.

À coordenação e aos colegas do setor de Sorologia HC da UFMG pela paciência e compreensão.

Às meninas do Laboratório de Genética Molecular Faculdade de Medicina da UFMG.

À orientadora, Prof^a. Suely Meireles Rezende, que esteve na condução deste projeto.

Aos financiadores deste projeto: Projeto Pesquisador Mineiro (PPM 2007) FAPEMIG, Fundo Nacional de Saúde e Fundação HEMOMINAS.

Aos pacientes participantes deste projeto.

À todos meus amigos que acreditaram no meu sucesso e estiveram ao meu lado nessa caminhada, em especial a Fatinha, que juntas vencemos esse desafio.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito."

Chico Xavier

RESUMO

Introdução: A deficiência hereditária do fator VII (FVII) da coagulação é a mais comum dentre as coagulopatias raras, com prevalência estimada de 1:500.000 habitantes. É transmitida como herança autossômica recessiva, devido à mutações no gene que codifica o FVII (*F7*). Apresenta manifestações clínicas variáveis, desde formas assintomáticas até sangramentos graves. Estudos moleculares são raros em populações não caucasianas. Diante disso, estudamos, em nível molecular, uma coorte de pacientes com deficiência de FVII, registrados no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH).

Métodos: Todos os pacientes diagnosticados como deficientes em FVII registrados no HBH, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, foram convidados a participar do estudo através de carta convite. A coleta de informações clínicas e material biológico ocorreram de Novembro de 2003 a Fevereiro de 2004. Dos 38 pacientes registrados, 31 (82%) aceitaram participar, destes, 26 pacientes (84%) apresentavam atividade coagulante de FVII (FVII:C) inferior a 50% e quatro pacientes (13%) apresentavam FVII:C discretamente superior a 50%. Estes foram incluídos por apresentarem manifestação hemorrágica. Em um paciente (3%) não foi dosada a FVII:C. Os pacientes foram avaliados clinicamente e submetidos a exames laboratoriais, dentre estes, tempo de protrombina e FVII:C, com diferentes tromboplastinas. Todos os éxons e regiões limítrofes entre íntrons e éxons de *F7* foram amplificados e sequenciados.

Resultados: No total, 13 variantes gênicas foram identificadas. Dentre elas, seis (46%) são variações genéticas conhecidas (Arg304Gln; Thr324Met, c.-323_-313insCCTATATCCT; Glu95Glu; His175His e Arg353Gln) e sete (54%) são novas (Arg43Lys, Phe84Phe; Gln116Gln; Arg139Arg, Glu142Glu, c.745_747delGTG e Gln281Gln).

Conclusão: A maioria dos pacientes com deficiência de FVII moderada a leve são portadores de polimorfismos ou variações genéticas em homozigose. Não houve associação entre fenótipo e genótipo nos pacientes estudados, o que corrobora os dados da literatura.

Palavras-chave: fator VII, gene, mutação, hemorragia, sangramento, polimorfismo, Brasil.

ABSTRACT

Introduction: The inherited deficiency of coagulation factor VII (FVII) is the most frequent among rare coagulopathies, with an estimated prevalence of 1: 500,000 inhabitants. It is transmitted as an autosomal recessive inheritance, due to mutations in the gene coding FVII (*F7*). It presents variable clinical manifestations, from asymptomatic forms to severe bleedings. Molecular studies are rare in non-Caucasian populations. Thus, we studied, at molecular level, a cohort of patients with FVII deficiency, registered at “Hemocentro de Belo Horizonte” (HBH), Belo Horizonte, Brazil.

Methods: All patients diagnosed with FVII deficiency were invited to participate in the study through an invitation letter. We collected clinical data and blood samples between November 2003 and February 2004. Thirty-one (82%) out of 38 patients accepted the invitation; 26 of them (84%) had FVII activity (FVII:C) lower than 50% and 4 patients (13%) had FVII:C slightly over than 50% (included as they presented a hemorrhagic manifestation). FVII:C was not assessed in 1 patient (3%). Patients were clinically evaluated and submitted to laboratory tests, among these, prothrombin time and FVII:C, with different thromboplastins. All exons and intron/exon borders of *F7* were amplified and sequenced.

Results: Thirteen gene variants were identified. Six (46%) are known genetic variants (Arg304Gln; Thr324Met, c.-323_-313insCCTATATCCT; Glu95Glu; His175His and Arg353Gln) and seven (54%) are new ones (Arg43Lys, Phe84Phe; Gln116Gln; Arg139Arg, Glu142Glu, c.745_747delGTG and Gln281Gln).

Conclusion: Most patients with moderate to mild FVII deficiency have polymorphisms or genetic alterations in homozygosis. No association was seen between phenotype and genotype of the patients studied, which corroborates data from the literature.

Keywords: factor VII, gene, mutation, hemorrhage, bleeding, polymorphism, Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	grupo carboxila
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
<i>EGF</i>	fator de crescimento epidérmico
ELISA	ensaio imunoenzimático
FL	fosfolípidos
FT	fator tecidual
FII	fator II
FV	fator V
FVII	fator VII
FVIII	fator VIII
FIX	fator IX
FX	fator X
FVIIa	fator VII ativado
FXa	fator X ativado
FIXa	fator IX ativado
FVII:C	atividade de fator VII
FVII:Ag	antígeno de fator VII
<i>F7</i>	gene do fator VII
FL	fosfolípidos
GLA	ácido γ -carboxiglutâmico
HBH	Hemocentro de Belo Horizonte
HGMD	<i>The Human Gene Mutation Database</i>
IRF7	<i>International Registry on Factor VII Deficiency</i>
IRMA	ensaio imunorradiométrico

ISTH	<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i>
L	litro
M	molar
mM	milimolar
N	grupo amino
ng	nanograma
nm	nanômetro
pb	pares de bases
PC	proteína C
PEG	polietileno glicol
PROCAP	programa de capacitação profissional
rFVII	fator FVII ativado recombinante
rpm	rotações por minuto
TFPI	inibidor da via do fator tecidual
TP/RNI	tempo de protrombina/relação normatizada internacional
TTPA	tempo de tromboplastina parcial ativada
U	unidade
μL	microlitro
μM	micromolar

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Representação esquemática do papel do FVII na coagulação sanguínea17
- FIGURA 2** - Representação esquemática da organização estrutural-funcional do *F7*.....20
- FIGURA 3** - Representação esquemática da estrutura do FVII.....22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Éxons e Íntrons do FVII, número de nucleotídeos, nucleotídeo inicial e nucleotídeo final	19
TABELA 2 - Polimorfismos encontrados no <i>F7</i>	25
TABELA 3 - Categorias de mutações associadas à deficiência de FVII por localização no gene	26
TABELA 4 - Valores de referência	41
TABELA 5 - Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento do <i>F7</i>	42
TABELA 6 - Condições usadas para amplificação dos fragmentos de <i>F7</i> e concentração de MgCl ₂	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Fator VII – Papel na coagulação sanguínea	16
1.2 Fator VII – Gene	18
1.3 Fator VII – Proteína	21
1.4 Polimorfismos e mutações no gene do fator VII.....	24
1.5 Deficiência do fator VII	27
1.5.1 Epidemiologia da deficiência do fator VII	27
1.5.2 Quadro clínico	27
1.5.3 Quadro laboratorial	30
1.5.4 Aconselhamento genético.....	31
1.5.5 Tratamento	32
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Geral.....	37
3.2 Específicos.....	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 Pacientes.....	39
4.1.1 Critérios de inclusão.....	39
4.1.2 Critérios de exclusão.....	40
4.2 Métodos.....	40
4.2.1 Coleta de sangue	40
4.2.2 Testes laboratoriais de coagulação	40
4.2.2.1 Tempo de protrombina	40
4.2.2.2 Dosagem de atividade do fator VII	41
4.2.3 Análise das mutações no gene do fator VII	41
4.2.3.1 Extração de DNA	41
4.2.3.2 Amplificação de fragmentos do gene do fator VII pela técnica de PCR	42
4.2.3.3 Eletroforese em gel de agarose.....	43
4.2.3.4 Purificação dos fragmentos amplificados	44
4.2.3.5 Sequenciamento direto	44
4.2.3.6 Análise das sequências.....	45

5 RESULTADOS - ARTIGO: DETERMINAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FATOR VII DA COAGULAÇÃO	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES.....	82
Apêndice A - Carta-convite	83
Apêndice B - Termo de Consentimento livre e Esclarecido.....	84
Apêndice C - Questionário – Avaliação clínica	85
ANEXOS.....	89
Anexo A - Parecer Fundação Hemominas	90
Anexo B - Parecer COEP-UFMG	91
Anexo C - Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado.....	92
Anexo D - Declaração de Defesa de Dissertação de Mestrado	93

1 INTRODUÇÃO

O sistema hemostático é composto por vários elementos dentre os quais os vasos sanguíneos, endotélio, plaquetas, proteínas da coagulação, anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise (FRANCO, 2004; MORELLI, 2004). O objetivo da hemostasia é interromper sangramentos provenientes de lesão vascular, assim como manter o sangue fluído dentro dos vasos, através do equilíbrio entre os componentes que participam desse sistema (MORELLI, 2004). Alterações desse equilíbrio podem desencadear quadro clínico caracterizado por sangramento ou trombose (TUDDENHAM *et al.*, 1995).

A resposta primária da hemostasia engloba componentes do endotélio vascular e plaquetas, resultando na formação do trombo plaquetário, cujo efeito hemostático é transitório. Esse trombo primário é reforçado pela hemostasia secundária, composta principalmente pelas proteínas da coagulação, cuja interação resulta na formação de fibrina e do trombo (coágulo) estável. Finalmente, o sistema fibrinolítico dissolverá o trombo gradualmente, a fim de restaurar o fluxo sanguíneo normal (MORELLI, 2004).

O endotélio vascular é uma estrutura metabolicamente ativa, que permite o intercâmbio entre os constituintes do sangue e dos componentes extra vasculares. Possui propriedades anticoagulantes, atuando na manutenção da fluidez do sangue através do controle da coagulação e agregação plaquetária e promovendo a fibrinólise (MORELLI, 2004).

Apesar da aparência morfológica simples na microscopia óptica, as plaquetas possuem estrutura funcional complexa, permitindo-lhes rápido reconhecimento da lesão vascular, a fim de dar início à formação do tampão hemostático (MORELLI, 2004). As plaquetas participam da hemostasia através da adesão e agregação plaquetária em locais de exposição do subendotélio, onde os fatores da coagulação - zimogênios de serino-proteases e fatores dependentes da vitamina K (fatores II, VII, IX e X) - são convertidos em enzimas ativas. Estas atuam convertendo seus substratos em fatores da coagulação, os quais localizam as proteases sobre as superfícies celulares contendo fosfolípidos (presentes principalmente nas plaquetas, cuja superfície desenvolve essas reações). A natureza sequencial das reações, na qual os produtos da reação anterior funcionam como a próxima enzima ativa a atuar no próximo substrato, em combinação com co-fatores, resulta na amplificação da

velocidade da reação. O evento final é a formação do coágulo de fibrina estável. Participam ainda da hemostasia, várias proteínas anticoagulantes naturais, que controlam o processo da coagulação (FRANCO, 2004; TUDDENHAM *et al.*, 1995).

Em 1964, Macfarlen, Davie e Ratnoff propuseram o modelo da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação sanguínea. Ela ocorre através da ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então converte fibrinogênio em fibrina (coágulo) (FRANCO, 2004). Esse processo foi dividido, didaticamente, em uma via extrínseca (envolvendo componentes do sangue, mas também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular). Apesar de, esquematicamente, a coagulação sanguínea dividir-se em via extrínseca e intrínseca, esta separação não ocorre *in vivo* (FRANCO, 2004).

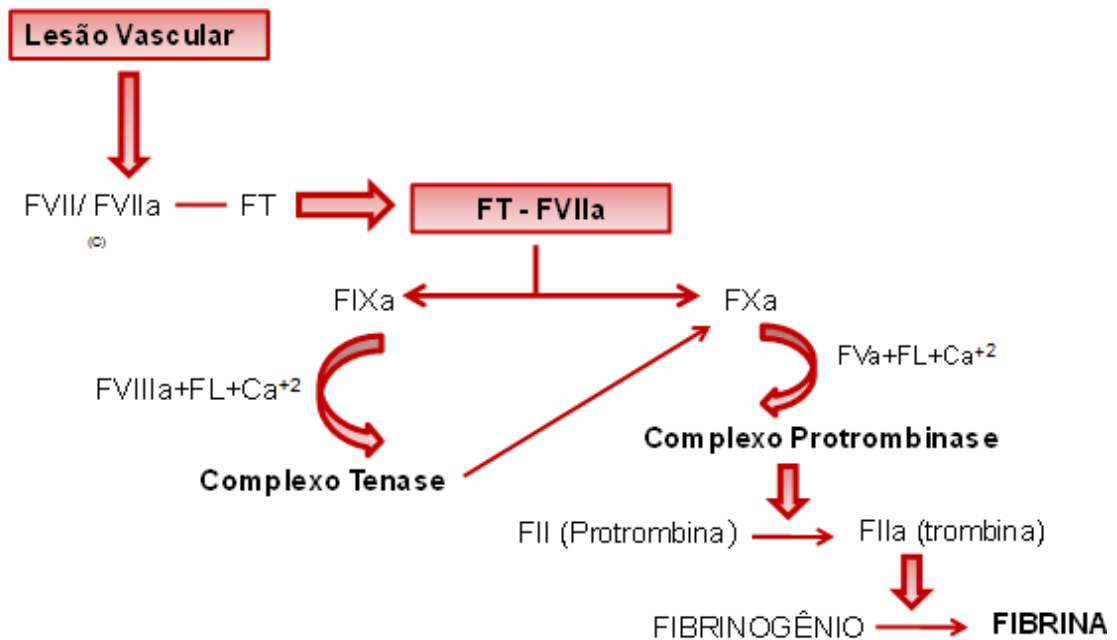
O processo de coagulação tem sido caracterizado como sendo essencialmente dependente de níveis adequados das proteínas da coagulação, anti-coagulação e fibrinólise. Esse conceito foi baseado na relação clara entre a tendência ao sangramento e níveis de fator VIII (FVIII) e fator IX (FIX) em pacientes com hemofilia A e B, respectivamente. O campo está evoluindo em direção à conceituação da coagulação como sendo ativamente regulada pelos componentes celulares especializados pelo processo. Ao invés de conceber coagulação apenas como "cascata" de reações proteolíticas, as reações de coagulação ocorrem em sobreposição de etapas na superfície das células. Componentes das velhas vias “extrínsecas” e “intrínsecas” participam na iniciação e propagação das reações de coagulação, respectivamente. Nessa concepção, essas vias não se tornam redundantes, tal como são retratadas no modelo em cascata, mas desempenham papéis distintos e complementares (MONROE; HOFFMAN, 2006).

1.1 Fator VII – Papel na coagulação sanguínea

A coagulação é desencadeada pela exposição do sangue a componentes que normalmente não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (lesão vascular) ou alterações bioquímicas (liberações de citocinas). Qualquer que seja o evento desencadeante, o início da coagulação ocorre mediante

exposição do componente de iniciação, o fator tecidual (FT) (FRANCO, 2004; PERRY, 2002).

Em condições fisiológicas, o fator crítico para o início da coagulação parece requerer a exposição do FT, que é um receptor de membrana celular para o fator VII (FVII) e fator VII ativado (FVIIa). O FT liga-se com alta afinidade, tanto ao FVII como ao FVIIa, formando o complexo FT-FVIIa na superfície celular, que participa da coagulação do sangue ativando os fatores X (FX) e/ou fator IX (FIX), na presença de FT e cálcio (HAGEN et al., 1986; MARIANI; BERNARDI, 2009; O'HARA *et al.*, 1987). Contudo, é importante salientar que o FVII ligado ao FT apresenta uma autoativação. O FT é o único fator da coagulação que não requer proteólise para se tornar ativado (FRANCO, 2004; PERRY, 2002). O FVIIa, no entanto, não exerce sua função na ausência de FT (McVEY *et al.*, 2001). A FIG.1 demonstra o papel do FVII na coagulação sanguínea.



FL: Fosfolípidos

FIGURA 1 - Representação esquemática do papel do FVII na coagulação sanguínea

A apresentação tradicional do processo da coagulação do sangue como uma cascata de amplificação enzimática, iniciada por contato com superfícies de carga negativa ou pela exposição ao FT, foi substituída pelo conceito de uma rede

complexa de interações reguladas por alças de retroalimentação positivas e negativas. A ativação do FVII em FVIIa e a formação do complexo FT-FVIIa com consequente ativação proteolítica do FIX e FX, gera pequenas quantidades de **trombina (fase de iniciação)** da coagulação). Embora estas quantidades iniciais de trombina sejam insuficientes para formar fibrina, estes vestígios de trombina gerados no “início” desta fase de coagulação são capazes de ativar (retroalimentação positiva) os co-fatores, fator V (FV) e fator VIII (FVIII) (**fase de amplificação** da coagulação). A partir daí, pode-se gerar quantidades maiores de trombina, suficientes para formação do **coágulo (fase de propagação)** da coagulação). Este processo de "propagação" ocorre independentemente do complexo FT-FVIIa, que é, rapidamente, inativado pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI), impedindo nova geração de FIXa e FXa (McVEY *et al.*, 2001; MONROE; HOFFMAN, 2006).

Finalmente, vale mencionar que, no que se refere ao sistema de coagulação, o uso dos termos “intrínseco” e “extrínseco” pode ser útil na interpretação de dois exames laboratoriais utilizados na avaliação da hemostasia: o Tempo de Protrombina/Relação Normatizada Internacional (TP/RNI) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), que são de particular importância no diagnóstico de coagulopatias e na monitorização terapêutica de anticoagulantes anti- vitamina K. Na execução destes testes *in vitro*, criam-se condições para ativação preferencial das vias ditas extrínseca (avaliada pelo TP) ou intrínseca (avaliada pelo TTPA) (FRANCO, 2004).

1.2 Fator VII – Gene

O gene que codifica o FVII (*F7*) possui 12,8 Kb de extensão e é constituído por nove éxons e oito íntrons (O`HARA *et al.* 1987). Está localizado no cromossomo 13, na posição 13 q 3 4, próximo ao gene que codifica o *FX*, outra proteína da coagulação (HAGEN *et al.*, 1986).

O *splicing* alternativo do mRNA (RNA mensageiro) do FVII origina transcritos que codificam sequências pré-pró-líder, que compreendem os éxons 1A (99 pb) e 1B (66 pb). A diferença no comprimento da sequência pré-pró-líder surge do *splicing* alternativo dos éxons 1A/1B. Éxon 1B estava ausente do clone de cDNA sequenciado por Hagen *et al.* (1986). O éxon 2 (161 pb) codifica o pró-peptídeo e o domínio GLA. O éxon 3 (25 pb) codifica o domínio rico em aromáticos hidrofóbicos.

Os éxons 4 (114 pb) e 5 (141 pb) codificam os dois domínios *EGF-like* (semelhante ao fator de crescimento epidérmico). Os éxons 6 (110 pb) e 7 (124 pb) codificam o domínio de ativação, e o éxon 8 (2269 pb) codifica o domínio catalítico e 1026 nucleotídeos da sequência não codificadora 3', incluindo a cauda poli (A) (PERRY, 2002; PEYVANDI *et al.*, 2000). Resumindo, os éxons 1A e 1B e parte do éxon 2 codificam sequência pré-pró-líder, que é removida durante o processamento, não sendo incorporada à proteína madura. O restante do éxon 2 e éxons 3-8 codificam os 406 aminoácidos da proteína madura que circula no sangue (O'HARA *et al.*, 1987). A TAB. 1 apresenta os éxons e íntrons do FVII e número de nucleotídeos em cada éxon, com nucleotídeo inicial e nucleotídeo final. A FIG. 2 demonstra a representação esquemática do *F7* e de sua organização estrutural – funcional.

TABELA 1

Éxons e Íntrons do FVII, número de nucleotídeos, nucleotídeo inicial e nucleotídeo final

Éxons Íntrons	Número de nucleotídeos	Nucleotídeo Inicial *	Nucleotídeo final *
Éxon 1A	99	1256127	1256225
Íntron 1A	939	1256226	1257164
Éxon 1B	66	1257165	1257230
Íntron 1B	3.779	1257231	1261009
Éxon 2	161	1261010	1261170
Íntron 2	2.901	1261171	1264071
Éxon 3	25	1264072	1264096
Íntron 3	70	1264097	1264166
Éxon 4	114	1264167	1264280
Íntron 4	1.699	1264281	1265979
Éxon 5	141	1265980	1266120
Íntron 5	965	1266121	1267085
Éxon 6	110	1267086	1267195
Íntron 6	597	1267196	1267792
Éxon 7	124	1267793	1267916
Íntron 7	816	1267917	1268732
Éxon 8	2.269	1268733	1271001

* Seq. Ref. NT_027140.6

Fonte -Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core:g=ENSG0000057593;r=13:113760105-113774995;t=ENST00000375581>. Acesso em: 01 Jan. 2011.

Abreviações: Seq., sequência; Ref., referência

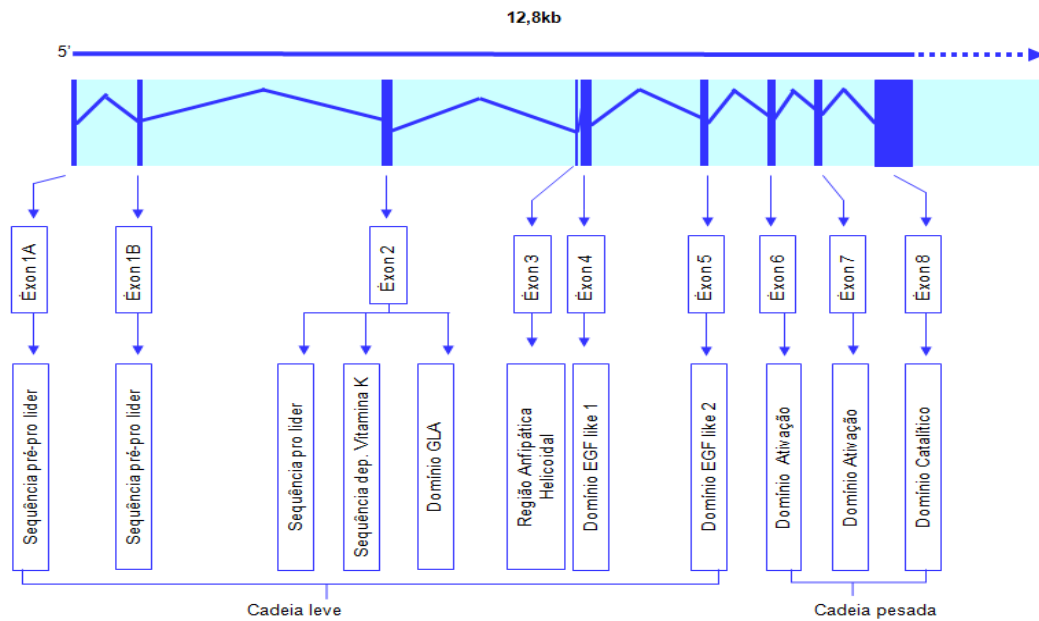


FIGURA 2 - Representação esquemática da organização estrutural-funcional do *F7*

Fonte: Adaptado. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;q=ENSG00000057593;r=13:113760105-113774995;t=ENST0000375581>. Acesso em: 22 Dez. 2010

Nota: Os blocos em azul escuro representam os éxons e as linhas entre os blocos representam os íntrons.

Peptídeo sinal é uma sequência que possui entre 15 e 60 aminoácidos geralmente localizada na região N-terminal de proteínas (ALBERTS *et al.*, 2008). Muitas das proteínas sintetizadas nos compartimentos celulares não desempenham seus papéis biológicos necessariamente nos locais onde são geradas, necessitando ser exportadas para a região específica onde exercerão suas funções. A sequência do peptídeo sinal tem por função “marcar” as proteínas que serão exportadas para determinados locais, como por exemplo, o ambiente extracelular. Estas proteínas são reconhecidas por meio do peptídeo sinal, o qual, após a exportação, é removido da proteína por meio da ação de proteases. Peptídeos sinais também podem ser compostos por sequências localizadas internamente em proteínas, não sendo posteriormente removidos, mantendo-se como parte integrante da proteína (ALBERTS *et al.*, 2008; CLARK, 2005).

A região codificadora do *F7* compreende 1398 pb que resultarão em um peptídeo sinal de 60 aminoácidos, seguidos por 406 aminoácidos da proteína madura. As regiões não codificadoras 5' e 3' possuem 35 pb e 1026 pb, respectivamente. A ausência de 65 nucleotídeos de um dos clones de cDNA foi

interpretado como sítios alternativos de transcrição do RNA. Isso resulta na remoção dos aminoácidos -18 a -39 e de um peptídeo sinalizador de 38 aminoácidos, ao invés de 60 aminoácidos, como encontrado no fator II (FII), proteína C (PC), e FIX (BERKNER *et al.*, 1986).

1.3 Fator VII – Proteína

A primeira sequência do FVII humano foi inferida a partir de um clone não completo de cDNA. O sequenciamento deste clone permitiu a determinação da sequência de nucleotídeos do FVII (HAGEN *et al.*, 1986). Dois clones sobrepostos contendo sequências de codificação genômica do FVII humano foram isolados e caracterizados (O'HARA *et al.*, 1987). O isolamento de um cDNA que codifica toda a sequência do FVII possibilitou expressá-lo através de um sistema de expressão em células mamíferas (HAGEN *et al.*, 1986).

O FVII da coagulação é uma glicoproteína de síntese hepática (O'HARA *et al.*, 1987) dependente de vitamina K, essencial para o processo de iniciação da coagulação sanguínea (BOLTIN *et al.*, 2008; FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; HAGEN *et al.*, 1986; MARIANI; BERNARDI, 2009; McVEY *et al.*, 2001; O'HARA *et al.*, 1987; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000). O FVII possui meia vida plasmática curta, de aproximadamente cinco horas (BOLTIN *et al.*, 2008; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; PERRY, 2003). A maior parte do FVII circula no plasma sob forma de zimogênio inativo de uma serino-protease (O'HARA *et al.*, 1987), em uma concentração de aproximadamente 10 nmol/L (0,5 µg/mL). Em sua forma ativa (FVIIa), circula em uma quantidade ainda menor (~10-110 pmol/L) (BOLTIN *et al.*, 2008; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000). Assim, para exercer sua atividade enzimática, é necessário que o FVII sofra uma ativação proteolítica, para sua forma ativa, o FVIIa. A conversão do FVII em FVIIa ocorre pela clivagem da ligação peptídica Arg152-Ile153 (HAGEN *et al.*, 1986; O'HARA *et al.*, 1987; PERRY, 2003). O FVII circulante e o FVIIa se ligam ao FT, iniciando o processo de coagulação (GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; MARIANI; BERNARDI, 2009; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000; POLLAK *et al.*, 2006; RAO; RAPAPORT, 1988).

Em sua forma inativa, a molécula é constituída por uma cadeia única polipeptídica de 406 aminoácidos, com peso molecular de 50 KDa. A forma ativa é constituída por duas cadeias, uma leve, formada por 152 resíduos e uma pesada, formada por 254 resíduos de aminoácidos, unidas por uma ponte dissulfídica (BOLTIN *et al.*, 2008; FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; HAGEN *et al.*, 1986; MARIANI; BERNARDI, 2009; McVEY *et al.*, 2001; O'HARA *et al.*, 1987; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000). A cadeia leve contém um domínio de ácido γ -carboxiglutâmico (GLA) e dois domínios similares ao fator de crescimento epidérmico (*EGF-like*), enquanto a cadeia pesada contém o domínio catalítico da molécula (HAGEN *et al.*, 1986; MARIANI; BERNARDI, 2009). A porção N-terminal da molécula está contida dentro da cadeia leve, enquanto a cadeia pesada (a extremidade C-terminal) contém a tríade de aminoácidos (serina 344, aspartato 242 e histidina 193), que funciona como a tríade catalítica, centro catalítico do FVIIa (HAGEN *et al.*, 1986; O'HARA *et al.*, 1987; PERRY, 2002 e 2003). A FIG. 3 demonstra a representação esquemática da estrutura do FVII.

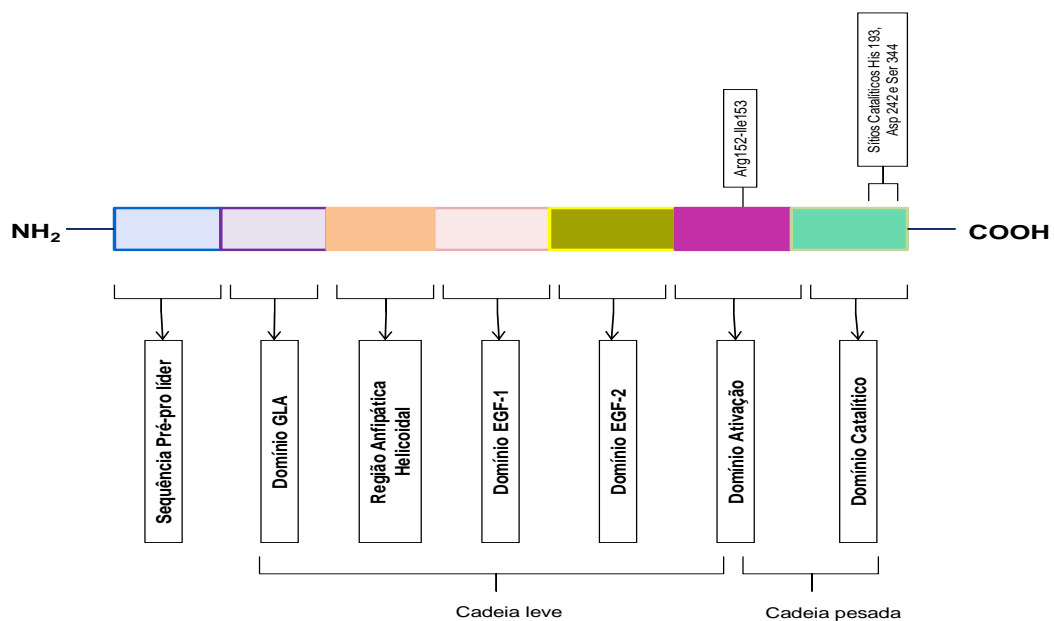


FIGURA 3 - Representação esquemática da estrutura do FVII

O FVII é sintetizado como uma sequência pré-pró-líder de 38 ou 60 aminoácidos contendo uma sequência de peptídeo sinal (resíduos de -36 a -24), seguida por uma sequência altamente conservada encontrada em outras proteínas,

dependentes da vitamina K (resíduos de -17 a -1). Essa sequência, denominada domínio GLA, é essencial para a modificação pós-traducional de γ -carboxilação do ácido glutâmico para ácido γ -carboxiglutâmico. A porção N-terminal do domínio GLA do FVII contém 10 resíduos de ácido glutâmico carboxilados (HAGEN *et al.*, 1986; McVEY *et al.*, 2001; O'HARA *et al.*, 1987; PERRY, 2002 e 2003). A concentração de resíduos de carga negativa, resultante desta modificação, permite que o FVII se ligue aos íons cálcio com alta afinidade. Esta ligação leva a uma mudança conformacional na proteína que é fundamental para sua ligação aos fosfolípidos de membrana (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004).

O FVII é estrutural e funcionalmente semelhante aos FIX, FX, protrombina e PC (O'HARA *et al.*, 1987; PEYVANDI *et al.*, 2000). Estas proteínas são membros de uma família de serino proteases, pertencentes à superfamília da tripsina (HAGEN *et al.*, 1986; McVEY *et al.*, 2001; O'HARA *et al.*, 1987; PERRY, 2002 e 2003).

Fatores genéticos e ambientais, tais como idade, obesidade e hábitos alimentares, bem como o uso de contraceptivos orais e o início da menopausa nas mulheres, influenciam os níveis plasmáticos de FVII (BALLEISEN *et al.*, 1985; McVEY *et al.*, 2001; MEADE *et al.*, 1986; PERRY, 2002 e 2003; SCARABIN *et al.*, 1996; SHANKER *et al.*, 2009). Níveis de atividade de FVII (FVII:C) e de FVIIa aumentam com o avanço da idade em ambos os sexos, mas a taxa de aumento é significativamente maior nas mulheres que nos homens (SCARABIN *et al.*, 1996). Mulheres após a menopausa apresentam níveis médios significativamente maiores de FVII:C e de FVIIa que as mulheres antes da menopausa. A terapia de reposição hormonal leva a um aumento de FVII:C nas mulheres pós-menopausa e a uma tendência semelhante nos níveis de FVIIa (SCARABIN *et al.*, 1996). O estudo de Scarabin *et al.* (1996) relacionou o uso de contraceptivo oral com altos níveis de FVII:C e esse efeito foi devido, principalmente, a um aumento do FVII:Ag, que está relacionado com a dose de etinilestradiol presente no contraceptivo oral. Entretanto, Scarabin *et al.* (1996) não conseguiram detectar uma diferença significativa nos níveis de FVIIa entre usuários e não usuários de contraceptivos orais.

1.4 Polimorfismos e mutações no gene do fator VII

As variantes gênicas, que incluem vários polimorfismos no *F7*, são responsáveis por aproximadamente 30% da variação dos níveis circulantes de FVII (MARIANI; BERNARDI, 2009; PERRY, 2003). O primeiro polimorfismo a ser descrito foi decorrente de uma substituição G→A no nucleotídeo 10976 do éxon 8, resultando em Arg353Gln (GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; RODRIGUES *et al.*, 2003; SHANKER *et al.*, 2009). O polimorfismo Arg353Gln é comumente encontrado em associação com outros polimorfismos, sendo a inserção de um decanucleotídeo na posição -323 da região 5' e a troca de G→T na posição -401 e G→A na posição -402 (PERRY, 2002). Esses polimorfismos estão associados a 20% a 30% da variação plasmática de FVII:C e dos níveis de FVII:Ag (BERNARDI *et al.* 1996; McVEY, *et al.*, 2001).

Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo Arg353Gln apresentam uma redução de aproximadamente 25% nos níveis de FVII:C. Já os indivíduos homozigotos apresentam uma redução de aproximadamente 50% nestes níveis (PERRY, 2002 e 2003).

Perry (2003) relatou, em seu estudo, uma associação entre a presença de diversos polimorfismos do FVII e o risco reduzido de desenvolver doença arterial e trombose, o que poderia ser explicado pela redução nos níveis de FVII associada aos polimorfismos. No entanto, os resultados dos estudos que analisaram polimorfismos em pacientes com doenças arteriais são variáveis e, às vezes, até mesmo contraditórios (McVEY *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2003). A TAB. 2 apresenta os polimorfismos encontrados no *F7*.

TABELA 2

Polimorfismos encontrados no *F7*

Resíduo	Tipo Variação	Alelo	Códons Alternativos
36	Sinônimo	G/A	CCG, CCA
73	Não Sinônimo	T/A	CTG, CAG
95	Sinônimo	G/A	GAG, GAA
175	Sinônimo	C/T	CAC, CAT
183	Sinônimo	C/T	GAC, GAT
284	Não Sinônimo	G/A	CGG, CAG
295	Não Sinônimo	T/A	GTC, GAG
298	Sinônimo	C/T	ACC, ACT
352	Não Sinônimo	G/A	GCC, ACC
354	Não Sinônimo	C/T	GCC, GTC
390	Sinônimo	C/T	GCC, GCT
413	Não Sinônimo	G/T/A/C	CGG, CTG, CAG, CCG
445	Não Sinônimo	G/A	GAG, AAG

Fonte: Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;q=ENSG0000057593;r=13:113760105-113774995;t=ENST00000375581>. Acesso em: 22 Dez. 2010.

Existem aproximadamente 200 mutações no *F7* descritas na literatura (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; HOOD; EBY, 2008; MANDHYAN *et al.*, 2010; MARIANI *et al.*, 2000; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003). Essas mutações são publicadas em bancos de dados, tais como *The Human Gene Mutation Database (HGMD)*, disponível em: <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F7>> e *International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)*, disponível em <[http://www.isth.org/default/index.cfm/publications/registries-databases/mutations-rare-bleeding-disorders/factor-vii/?keywords=Factor VII](http://www.isth.org/default/index.cfm/publications/registries-databases/mutations-rare-bleeding-disorders/factor-vii/?keywords=Factor%20VII)>. O banco de dados do HGMD é atualizado regularmente, com última atualização em junho de 2010. A grande maioria das mutações descritas no *F7* afeta o domínio catalítico, ressaltando a importância funcional dessa região, que é codificada pelos éxons 6, 7 e 8. No entanto, as mutações associadas à deficiência de FVII estão localizadas em todo o gene, sugerindo que todos os domínios são importantes na manutenção da estrutura e função da proteína (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; PERRY, 2002). As mutações de sentido trocado com substituição de um único nucleotídeo são as mais comuns (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; HOOD; EBY, 2008; MARIANI; BERNARDI, 2009; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000). Ainda, análises moleculares dos pacientes com deficiência de FVII revelam uma alta prevalência da mutação Arg304Gln, conhecida como **FVII Pádua** (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004;

McVEY *et al.*, 200; O'BRIEN *et al.*, 1991; POLLAK *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2003; TUDDENHAM *et al.*, 1995).

As consequências fenotípicas das alterações genéticas no *F7* são altamente variáveis, dependendo das características, localização e grau de conservação do aminoácido substituído (GIANSILY-BLAIZOT, 2004). Frequentemente, a deficiência grave está relacionada a mutações que afetam os sítios de processamento (*splicing*) ou mutações decorrentes de inserção ou deleção de nucleotídeos, com consequente mudança na matriz de leitura (McVEY *et al.*, 2001). A lista de mutações associadas à deficiência de FVII encontra-se na TAB. 3.

TABELA 3

Categorias de mutações associadas à deficiência de fator VII por localização no gene

CATEGORIA DE MUTAÇÃO									
Região	Troca sentido/ Sem sentido	Sítio Processamento	Região Promotora	Pequenas Deleções	Pequenas Inserções	Pequenas Inserção/ Deleção	Grandes Deleções	Rearranjos Complexos	Varição em <i>Tandem</i>
Número Mutações	162 Mutações	39 Mutações	19 Mutações	23 Mutações	5 Mutações	2 Mutações	2 Mutações	5 Mutações	1 Mutações
Promotora			19					1	
Éxon 1A	5	4		2					
Éxon 1B	2	2							
Éxon 2	17	8		4	1	1			
Éxon 3	1	6							
Éxon 4	14	3		1					
Éxon 5	20	4		1					
Éxon 6	10	4		1					
Éxon 7	12	8		4					
Éxon 8	81			10	2	1		1	
Intrônica					2			1	1
Éxon/Intrônica								1	
Dupla Alteração								1	
Complexas							2 (1) (2)		

Fonte - Disponível em: < <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F7> >. Acesso em: 03 set. 2010.

Legenda - (1) Mutação compreendendo a deleção de todo o gene *F7* e *F10*.
(2) Mutação compreendendo a deleção em todo gene do *F7*.

1.5 Deficiência de fator VII

1.5.1 Epidemiologia da deficiência de fator VII

A deficiência hereditária de FVII foi reconhecida pela primeira vez por Alexander *et al.* (1951) e apresenta prevalência estimada de 1:500.000 indivíduos (HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000; POLLAK *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2003). A ausência completa de FVII:C no plasma geralmente é incompatível com a vida, levando à morte logo após o nascimento devido à hemorragia grave (JAYANDHARAN *et al.*, 2007; MARIANI; BERNARDI, 2009; MARIANI *et al.*, 2000; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2003).

No Brasil os estudos relacionados à deficiência de FVII são escassos. Somente um estudo explorou as bases moleculares em indivíduos com deficiência de FVII (RODRIGUES *et al.*, 2003). Nesse estudo, Rodrigues *et al.* (2003) descreveram a prevalência da deficiência de FVII em pacientes do ambulatório de doenças hemorrágicas do Hemocentro da UNICAMP. A prevalência da deficiência de FVII entre 267 pacientes atendidos com sangramento naquela instituição foi estimada em 4,1%. Nesse grupo foi relatado um paciente com hemorragia significativa, cinco com sangramento leve e cinco assintomáticos, tendo sido realizada análise de mutações em somente seis pacientes (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Os pacientes registrados no *International Registry on Factor VII Deficiency (IRF7)* são quase exclusivamente de origem européia caucasiana. De acordo com Mariani *et al.* (2000), o comitê diretivo do *IRF7* reconhece claramente a necessidade de uma expansão do estudo dessa deficiência, uma vez que a maioria dos centros tem pouca experiência em tratar pacientes com deficiência de FVII, devido à raridade da doença (McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2003).

1.5.2 Quadro clínico

A deficiência do FVII é uma doença hemorrágica rara causada pela diminuição ou ausência de FVII da coagulação, devido a alterações genéticas no *F7* (BOLTIN *et al.*, 2008; FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT, 2004;

GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; HOOD; EBY, 2008; MARIANI; BERNARDI, 2009; MARIANI *et al.*, 2000; MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000). Sua prevalência é significativamente maior nos países que praticam o casamento consanguíneo, o que é provavelmente devido à maior prevalência da herança autossômica recessiva nessas populações (BOLTIN *et al.*, 2008; FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; MARIANI; BERNARDI, 2009; MARIANI *et al.*, 2000; MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000).

A deficiência de FVII pode ser de causa adquirida ou hereditária. Como causas adquiridas, destacam-se doença hepática, deficiência de vitamina K, dieta rica em gordura, altos níveis de triglicérides plasmáticos, idade, obesidade, diabetes e uso de hormônios femininos (PERRY, 2002 e 2003). Estudos sobre a deficiência adquirida de FVII são raros, sendo, em sua maioria, associados à malignidade, sepse e/ou transplante de medula óssea (HOOD; EBY, 2008).

A maioria dos indivíduos com mutações no *F7*, no entanto, é assintomática (MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001). A deficiência é identificada, na maioria das vezes, através de triagem pré-operatória ou mediante realização de exames de rotina (HOOD; EBY, 2008; McVEY *et al.*, 2001). Nesta situação, a deficiência é suspeitada devido a prolongamento persistente do tempo de protrombina (TP) (sem alteração do tempo de tromboplastina parcial ativada), que leva a dosagem de FVII:C. Na maioria das vezes, estes pacientes apresentam níveis de FVII:C superiores a 20% e, quando estudados a nível molecular, são caracterizados como heterozigotos para mutações no *F7* ou portadores de polimorfismos (GIANSILY-BLAIZOT, 2004). Os pacientes com deficiência moderada, caracterizada por níveis de FVII:C entre 2% a 20% podem ser homozigotos ou heterozigotos compostos (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; MARIANI; BERNARDI, 2009). A deficiência grave, por sua vez, caracteriza-se por níveis de FVII:C muito reduzidos ou não detectáveis, sendo observada em indivíduos homozigotos ou heterozigotos compostos (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; HOOD; EBY, 2008; MARIANI; BERNARDI, 2009; MATSUHISA *et al.*, 2010). O quadro de sangramento em pacientes

heterozigotos compostos e homozigotos é semelhante, podendo ser grave (HERRMANN *et al.*, 2009).

Pacientes com deficiência moderada de FVII (níveis de FVII:C entre 2%-20%) apresentam, tipicamente, sangramento de mucosas, tais como menorragia, epistaxe, gengivorragia, sangramento pós-trauma ou pós-cirúrgico (extração dentária) (BOLTIN *et al.*, 2008; GIANZILY-BLAIZOT, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; PERRY, 2002 e 2003). Menorragia e deficiência de ferro crônica são comuns em mulheres com deficiência de FVII. Esses padrões de sangramento da mucosa são semelhantes aos observados em pacientes com plaquetopatias hereditárias (MARIANI; BERNARDI, 2009; PERRY, 2002). No caso de deficiência grave de FVII (níveis de FVII:C inferiores a 2%) podem ocorrer hemartroses, assim como hematomas musculares, sangramento no coto umbilical e hemorragias no sistema nervoso central e trato gastrointestinal. Tais casos ocorrem logo após o nascimento e se associam com uma alta morbidade e mortalidade (BOLTIN *et al.*, 2008; GIANZILY-BLAIZOT, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; MARIANI; BERNARDI, 2009; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003). Nesses casos, os pacientes com deficiência de FVII exibem as mesmas manifestações observadas em pacientes com hemofilia, com possível evolução para a artropatia crônica e degeneração articular grave. Ao contrário da hemofilia, hematomas musculares são relativamente raros na deficiência de FVII (GIANZILY-BLAIZOT, 2004).

Na ausência de uma história hemorrágica grave, a maioria dos pacientes deficientes em FVII apresenta risco de complicações hemorrágicas somente após grande cirurgia ou trauma. Cada caso exige uma avaliação individual, devido à baixa correlação entre as mutações, a FVII:C e o fenótipo. De todos os fatores preditivos de risco hemorrágico avaliados, a história clínica após desafios hemostáticos em pacientes com deficiência hereditária de FVII é o mais importante (BOLTIN *et al.*, 2008; MANDHYAN *et al.*, 2010; POLLAK *et al.*, 2006).

Nem todo indivíduo com deficiência de FVII apresenta risco de sangramento, sendo a associação entre hemorragia e a deficiência de FVII considerada somente nas deficiências de nível moderado a grave (BOLTIN *et al.*, 2008).

Uma proporção considerável de indivíduos com quadro de sangramento leve e moderado tem níveis semelhantes de FVII:C por ensaio *in vitro*, isto é, a correlação entre os níveis de FVII e o risco de hemorragia é fraca (HOOD; EBY,

2008; McVEY *et al.*, 2001). Dessa forma, eventualmente, pacientes com quadro hemorrágico de leve intensidade apresentam níveis muito baixos de FVII. Por outro lado, quadros hemorrágicos de intensidade moderada a grave podem se associar a níveis mais elevados de FVII (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003).

Os principais diagnósticos diferenciais da deficiência de FVII são a deficiência de vitamina K e as hepatopatias, que também cursam com prolongamento do TP e com baixos níveis de FVII (PERRY, 2002).

Em pacientes com doença hepática crônica os níveis de FVII são muitas vezes desproporcionalmente menores do que outros fatores dependentes da vitamina K, por exemplo, protrombina e FX. Outros distúrbios hepáticos, como Síndrome de Dubin Johnson, Síndrome Rotor e Síndrome de Gilbert podem se associar a níveis de FVII baixos (PERRY, 2002).

1.5.3 Quadro laboratorial

É característico da deficiência de FVII o prolongamento do TP e a normalidade do TTPA (BOLTIN *et al.*, 2008; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; HOOD; EBY, 2008; MANDHYAN *et al.*, 2010; MARIANI; BERNARDI, 2009; PERRY, 2002; POLLAK *et al.*, 2006). Dessa forma, o TP é utilizado como teste de triagem para o diagnóstico de deficiência de FVII.

A dosagem de FVII:C é o principal teste para o diagnóstico da deficiência. Ela pode ser medida usando um ensaio funcional do TP. Estudos familiares podem ser de valor para confirmação do diagnóstico da deficiência de FVII (PERRY, 2002).

É interessante citar que alguns pacientes com deficiência de FVII apresentam uma discrepância entre os níveis de FVII:C, utilizando tromboplastina de coelho em comparação com outras tromboplastinas. Foi verificado que quando a dosagem de FVII foi realizada com tromboplastina recombinante humana os níveis de FVII:C aumentaram aproximadamente 30% (HOOD; EBY, 2008; McVEY *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2003). Este fenômeno foi particularmente demonstrado com a variante **FVII Pádua (Arg304Gln)**, caracterizada por um TP prolongado, usando tromboplastina de cérebro de coelho e um TP pouco alterado, usando

tromboplastina recombinante humana (PERRY, 2002). Dessa forma, a fonte da tromboplastina pode afetar significativamente os ensaios funcionais de FVII, enfatizando a importância da utilização de uma série de diferentes tromboplastinas ao se investigar os pacientes com suspeita de deficiência de FVII. Para fins de diagnóstico de deficiência de FVII, deve-se dar preferência à tromboplastina recombinante humana (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; MARIANI; BERNARDI, 2009; PERRY, 2002 e 2003).

A deficiência hereditária do FVII é classificada como tipo I ou II, dependendo da quantidade de FVII:Ag no plasma (MANDHYAN *et al.*, 2010). No tipo I, quantitativo, há redução proporcional de FVII:Ag e FVII:C. No tipo II, qualitativo, ocorre uma redução de FVII:C sem, entretanto, haver redução de FVII:Ag, indicando a presença de uma proteína disfuncional (HERRMANN *et al.*, 2009; PERRY, 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000).

Testes imunológicos podem ser usados para mensurar os níveis do antígeno do FVII (FVII:Ag). Os ensaios mais frequentemente utilizados para este fim são o imunoenzimático (ELISA) e imunorradiométrico (IRMA). Entretanto, estes testes não são realizados rotineiramente para o diagnóstico da deficiência de FVII, tendo sua principal indicação na diferenciação entre os tipos I e II de deficiência (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; MARIANI; BERNARDI, 2009; PERRY, 2002 e 2003).

1.5.4 Aconselhamento genético

Devido à grande heterogeneidade do fenótipo e genótipo observado na deficiência hereditária de FVII, o aconselhamento genético dependerá das repercussões clínicas da doença na família que está sendo considerada. A existência de um primeiro filho com graves manifestações, por exemplo, hemorragia intracraniana ou hemartrose de repetição, pode levar a equipe médica a propor diagnóstico pré-natal no momento de uma subsequente gravidez, em países onde essa medida é permitida. Por outro lado, a descoberta isolada de deficiência de FVII devido a defeito genético em ambos os parceiros de um casal sem filhos pode gerar inúmeras questões. Atualmente, não é possível prever com certeza a consequência fenotípica de uma ou outra mutação no *F7* e, menos ainda, as repercussões do quadro clínico de um heterozigoto composto (GIANSILY-BLAIZOT, 2004).

1.5.5 Tratamento

História de sangramento, a situação clínica atual e um ensaio de FVII:C realizado com tromboplastina recombinante humana devem orientar o manejo inicial da deficiência de FVII (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; MARIANI; BERNARDI, 2009; POLLAK *et al.*, 2006).

Dois princípios gerais devem ser considerados no tratamento da deficiência de FVII: a reduzida meia-vida plasmática do FVII *in vivo* e os níveis de FVII suficientes para a hemostasia adequada, mesmo durante uma cirurgia (PERRY, 2003). Geralmente estes níveis são de 10-15 U/dL de FVII no plasma.

As opções atuais de tratamento para a deficiência de FVII são o uso de inibidores fibrinolíticos, plasma fresco congelado, concentrados de complexo protrombínico e concentrado de FVIIa recombinante (rFVIIa) (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; HOOD; EBY, 2008; MANDHYAN *et al.*, 2010; MARIANI; BERNARDI, 2009; MATSUHISA *et al.*, 2010; PERRY, 2002 e 2003; POLLAK *et al.*, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que pacientes com deficiência de FVII podem ser tratados com segurança usando rFVIIa (MARIANI; BERNARDI, 2009; PERRY, 2002 e 2003). O rFVIIa é um potente gerador de trombina que foi desenvolvido, principalmente, para uso em pacientes com hemofilia hereditária ou adquirida com inibidor contra o FVIII ou FIX. O rFVIIa é estruturalmente semelhante ao FVII de origem humana. Ele se liga ao FT no local da lesão e esse complexo, por sua vez, ativa o FIX e FX, dando início ao processo da coagulação (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; MANDHYAN *et al.*, 2010; MARIANI; BERNARDI, 2009).

Embora o plasma fresco congelado tenha sido utilizado no passado para o tratamento de hemorragias na deficiência de FVII, existe pouca informação disponível sobre a eficácia do mesmo. Quando este for utilizado, deve-se administrar 15-20 mL/kg a cada quatro horas. Devido à sobrecarga de volume, o uso prolongado de plasma fresco congelado é considerado inadequado para o tratamento de pacientes com deficiência de FVII (GIANSILY-BLAIZOT, 2004; MARIANI; BERNARDI, 2009; PERRY, 2002 e 2003).

Outra questão não resolvida é a estratégia terapêutica para a reposição pré-operatória de FVII em pacientes com menos de 5% de FVII:C, mas até então assintomáticos. Atualmente, um teste para predizer o risco hemorrágico não existe e

a falta de consenso torna as opções terapêuticas não uniformizadas (GIANSILY-BLAIZOT, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A deficiência do FVII é uma doença hemorrágica de caráter autossômico recessivo, sendo a mais comum das coagulopatias hereditárias raras. No Brasil estudos sobre a deficiência de FVII são escassos e somente o estudo de Rodrigues *et al.* (2003) investigou seis pacientes com deficiência de FVII a nível molecular. A literatura médica tem reportado várias mutações no *F7*. Entretanto, a quase totalidade de pacientes estudados é de origem caucasiana. Assim, é fundamental a ampliação do estudo molecular da doença em outras populações.

A caracterização molecular da deficiência de FVII permitirá conhecer os defeitos genéticos na população estudada, além de proporcionar a determinação da relação fenótipo-genótipo da doença. Ainda, possibilitará confirmar ou afastar a condição genética de indivíduos que possuem níveis leves a moderados de FVII:C, assim como identificar a presença dessas mutações em familiares desses pacientes que não apresentam sintomas da doença.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

3.1 Geral

- Caracterizar as bases moleculares da deficiência de FVII na população estudada em um grupo de pacientes do estado de Minas Gerais atendidos no HBH.

3.2 Específicos

- Conhecer as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes estudados;
- Determinar os níveis de FVII:C nos pacientes estudados, comparando diferentes tromboplastinas;
- Determinar a condição genética para a deficiência de FVII nos pacientes estudados;
- Relacionar as variantes gênicas com o quadro clínico e laboratorial.

4 METODOLOGIA

4.1 Pacientes

Todos os 38 pacientes diagnosticados como deficientes em FVII registrados no HBH, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, foram convidados a participar do estudo através de carta convite (APÊNDICE A). Dos 31 pacientes (82%) que aceitaram participar, 26 (84%) apresentavam FVII:C inferior a 50% e quatro pacientes (13%) apresentavam FVII:C discretamente superior a 50%. Estes foram incluídos por apresentarem manifestação hemorrágica. Em um paciente (3%) não foi dosada a FVII:C. Após o aceite foi agendada uma consulta médica no ambulatório de coagulopatias do HBH. No início da consulta foi feita uma explanação verbal sobre o projeto de pesquisa. Após a concordância em participar os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B). A pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética da Fundação HEMOMINAS (ANEXO A) e do COEP UFMG (ANEXO B).

Os pacientes foram submetidos a um exame clínico detalhado (anamnese clínica seguida de exame físico geral), com a finalidade de se avaliar as manifestações clínicas, assim como gravidade, sequelas e complicações da doença e do seu tratamento. Além disso, foi afastada a hipótese da existência de doenças hepáticas e outras doenças/condições adquiridas que pudessem afetar os níveis plasmáticos de FVII, tais como obesidade, uso de anticoncepcionais orais e dislipidemias. A coleta de dados foi baseada em um questionário específico (APÊNDICE C). A coleta de dados clínicos e amostra biológica ocorreram entre Novembro de 2003 e Fevereiro de 2004.

Os pacientes foram considerados potenciais deficientes de FVII da coagulação quando tiveram mais de um teste de TP prolongado, com os demais testes de triagem de coagulação normais (TTPA, tempo de trombina, contagem de plaquetas, dosagem de fibrinogênio). Esses pacientes foram, então, submetidos à dosagem de FVII:C.

4.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes registrados no ambulatório de coagulopatias do HBH com diagnóstico de deficiência de FVII, que concordaram em participar do estudo.

4.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes com deficiência de FVII que não concordaram em participar do estudo.

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta de sangue

Para a realização dos testes de coagulação foram coletados 5 ml de sangue periférico em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante. O plasma foi imediatamente obtido através de centrifugação a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 15 minutos, sendo a seguir aliquotado, acondicionado em microtubo e estocado a -80°C , até o momento da análise. Para a realização dos métodos moleculares foram coletados 10 mL de sangue periférico em tubos contendo citrato de sódio ou EDTA.

4.2.2 Testes laboratoriais de coagulação

4.2.2.1 Tempo de protrombina

O plasma de todos os 31 pacientes foram submetidos à realização do TP, que foi realizada no Laboratório de Hematologia do HBH.

O TP foi realizado no aparelho COAG-A-MATE MTX (Organon Teknika, Dublin, Irlanda). O princípio do teste reflete a ativação da via extrínseca (da qual participa o FVII), quando ao plasma anticoagulado é adicionada a Tromboplastina (Fator Tecidual), na presença de cálcio. Por conseguinte, a trombina é gerada, resultando na formação da fibrina (coágulo). O tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina é medido como o Tempo de protrombina, em segundos. O método utilizado pelo aparelho é o coagulométrico, cujo princípio de detecção é baseado no monitoramento eletromagnético da formação do coágulo, pelo movimento da esfera metálica.

4.2.2.2 Dosagem de atividade do fator VII

A FVII:C foi realizada em Março de 2004 em 30 pacientes com deficiência de FVII, visando detectar a atividade funcional do FVII no plasma.

A dosagem de FVII:C foi realizada em duplicata no aparelho COAG-A-MATE MTX (Organon Teknika, Dublin, Irlanda). Esse teste se baseia no mesmo princípio da determinação do TP. Entretanto, utiliza plasma deficiente em FVII, cálcio e tromboplastina para seu processamento. Foram utilizados dois tipos de tromboplastina, a derivada de cérebro de coelho (Thromboplastin S; Biopool Internacional, Ventura, EUA) e a tromboplastina humana (Recombiplastin, Instrumentation Laboratory Company, Lexington, EUA).

A TAB. 4 lista os valores de referência para tempo/atividade de protrombina e FVII:C.

TABELA 4

Valores de referência

Analito	Valores Normais Referência
Tempo / Atividade de protrombina	10 a 14 segundos / 70% a 100%
Atividade de Fator VII	50% a 150%

4.2.3 Análise das mutações no gene do fator VII

4.2.3.1 Extração de DNA

Para lise e separação do *pellet* leucocitário foi utilizada a técnica baseada em Bowen e Keeney (2003). Foram adicionados 500 µL de sangue venoso a 500 µL de tampão de lise celular (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 11% w/v sucrose; 5 mM MgC₂, 1% v/v Triton X-100), misturados e submetidos à centrifugação por dois minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, a seguir, 500 µL do mesmo tampão foram adicionados ao sedimento, repetindo-se o procedimento anterior. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de tampão de lise nuclear (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM/L EDTA; 10 mM citrato de sódio; 1% w/v SDS). Após homogeneização, foram adicionados 120 µL NaCl 5 M (Sigma, St. Louis, EUA) e 500 µL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, EUA), seguido de centrifugação por cinco minutos a 2.000 rpm. A

fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo adicionados dois volumes de etanol 100% (Sigma, St. Louis, EUA), homogeneizada e centrifugada por cinco minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tubo, contendo o precipitado de DNA, foi deixado à temperatura ambiente para permitir evaporação do excesso de etanol. Depois de seco o DNA foi ressuspenso em água bidestilada e deixado por 24 horas a 4⁰C para dissolução. A concentração de DNA foi estimada em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o equipamento *Nanodrop* (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Wilmington, EUA). As amostras foram armazenadas a -20⁰ C, até análise.

4.2.3.2 Amplificação de fragmentos do gene do fator VII pela técnica de PCR

Os nove fragmentos do *F7* foram amplificados usando nove pares de oligonucleotídeos (Alpha DNA, Quebec, Canadá) (TAB. 4). Em geral, cada par de nucleotídeos (senso e antisenso) foi empregado para amplificar um único éxon, exceções feitas aos éxons 3 e 4, que devido à sua pequena extensão foram amplificados conjuntamente, e ao éxon 8, que devido à sua grande extensão foi amplificado em dois fragmentos. A TAB. 5 apresenta os oligonucleotídeos usados na amplificação e sequenciamento do *F7*.

TABELA 5

Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento do *F7*

Fragmento	Sequência	Posição Seq. Ref. NT_027140.6	Tamanho (pb)
1A	CTGGCCTGGTCTGGAGGCTC CGGGCTGGCTCCTGGATTTGC	1255708 a 1255727 1256273 a 1256293	586
1B	CAGTGCCTGGGATGTGGCTGC GCTGGCTCTTTGCCATGGGAG	1257091 a 1257110 1257295 a 1257315	225
2	CGGTCTCCGAGGCACTGGGC CACGCGGCCTGGTTCACCGC	1260949 a 1260968 1261216 a 1261235	287
3-4	CAGTTCATGGTGTGTCCAGTGC CACCAGTTGTTGCACCCTGC	1263990 a 1264011 1264356 a 1264375	386
5	ATCCACGCCTTGTCCCTTTGGATCA TGTCATCTGGGACTGGGACATGAA	1265795 a 1265818 1266131 a 1266154	360
6	GCCTCAAGGCCTCTCAGAGG CAGAGCTGTTGTTACATTC	1266986 a 1267005 1267250 a 1267269	284
7	GCGACATTTGTATTCTTGGGCCGT TGTCTGTGGAAGTGACAGCACGAA	1267563 a 1267586 1268166 a 1268189	627
8A	CTGCAGACCTAGAAATGGCC CACGTTGAGGACCATGAGCTC	1268638 a 1268657 1268993 a 1269013	376
8B	CGCTTCTCATTGGTCAGCGGC GATTTGGTGCCAGGACAGTTTCG	1268936 a 1268956 1269370 a 1269391	456

Abreviação: Seq., sequência; Ref., referência; pb, pares de base

A amplificação do DNA genômico dos nove éxons foi realizada utilizando o termociclador Eppendorf (*Mastercycler[®] Gradient*, Hamburg, Alemanha). Foram utilizados 200 ng de DNA, 20 pmoles de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso), 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Fermentas, Lituânia, União Européia), 5,0 μ L de tampão (Tris-HCl 100 mM, pH 8, 8; KCl 500 mM, 0,8% v/v) (Fermentas, Lituânia, União Européia), e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas, Lituânia, União Européia), para um volume final de 50 μ L de reação de amplificação. A concentração de MgCl₂ (Fermentas, Lituânia, União Européia) foi variada de 1.0 a 2.0 mM (TAB. 6). Para os éxons 1B e 2 foi utilizado tampão de DMSO 10% (EMD Biosciences, San Diego, EUA).

A TAB. 6 apresenta descrição sobre as condições de amplificação dos fragmentos de PCR e as concentrações de MgCl₂ utilizadas.

TABELA 6

Condições usadas para amplificação dos fragmentos de *F7* e concentração de MgCl₂

Éxon	Mg Cl ₂ (mM)	Temperatura de Anelamento/Tempo	Temperatura de Extensão/Tempo
1A	2.0	69,9 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
1B	1.0	60 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
2	2.0	69,9 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
3-4	2.0	60 °C/45 segundos	72 °C/1 minuto
5	2.0	68,1 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
6	2.0	57,8 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
7	2.0	68,1 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
8A	1.5	70 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
8B	2.0	69,9 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos

Nota - A temperatura de desnaturação foi de 94°C por 30 segundos para todos os fragmentos. Um total de 35 ciclos foi realizado para cada amplificação.

Abreviações - MgCl₂, cloreto de magnésio

4.2.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, a presença e o tamanho dos fragmentos amplificados foram conferidos através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR Safe DNA a 5% (Invitrogen, Oregon, EUA).

O gel foi imerso em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) (Tris - Base 40 mM, Ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1mM). Foram aplicadas 10 µL de cada amostra, misturados com 2 µL de tampão de corrida 5X (*Loading Buffer*) (50% glicerol, 0.125% azul de bromofenol, 0.125 xileno cianol, TE pH 8.0 q.s.p.) nas canaletas e a corrida eletroforética foi realizada durante 90 minutos, 80 volts (V) e 150 amperes (A). O gel foi visualizado sob luz UV e a imagem captada pelo sistema de imagem científica EDAS 290 (KODAK, New Haven, EUA).

4.2.3.4 Purificação dos fragmentos amplificados

A purificação dos produtos de PCR amplificados foi realizada por um único passo de precipitação usando solução de PEG (polietileno glicol) 8000, contendo 26,2% de PEG 8000, 6,6 mM de MgCl₂ e 0,6 M de acetato de sódio pH 5,2, segundo protocolo estabelecido por Rosenthal *et al.* (1993) com modificações. Os produtos de PCR foram adicionados a igual volume de solução de PEG, cuidadosamente homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e os produtos de PCR sedimentados foram lavados com etanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, em seguida, etanol 85%. A seguir, o sobrenadante foi diluído em água bidestilada e deixado por 24 horas a 4^oC para dissolução. Sua concentração foi estimada através da mensuração utilizando o *Nanodrop* (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Wilmington, EUA), em comprimento de onda de 260 nm. As amostras foram armazenadas a -20^oC, até análise.

4.2.3.5 Sequenciamento direto

O sequenciamento direto do DNA amplificado foi utilizado para identificar a presença de alterações genéticas associadas à deficiência hereditária de FVII que, em quase sua totalidade, são devidas a mutações pontuais.

Para o seqüenciamento foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação listados na TAB. 5.

Para cada amplificação foram utilizados 0,3 µL do reagente *BigDye*[®] *Terminator v3. 1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 10-20 ng do produto de PCR purificado, 1,6 pmoles de oligonucleotídeo (senso ou antisenso),

1,7 µL de tampão (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA), para um volume final de 10 µL de reação. Em seguida, as reações foram amplificadas em termociclador (*Mastercycler® Gradient*, Hamburg, Alemanha) sob as seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação de 96 °C por dois minutos, seguidos de 44 ciclos de 96 °C por 30 segundos, 55 °C por 15 segundos e 60 °C por quatro minutos.

Os produtos finais foram purificados por precipitação com isopropanol (Casa da Química Indústria e Comércio, Diadema, Brasil). As etapas de precipitação incluíram inicialmente a adição de quatro volumes de isopropanol 65% em cada amostra, seguida de incubação das reações à temperatura ambiente por 15 minutos, protegidas da luz. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 3750 rpm por 55 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram adicionados 10 volumes de etanol 70% (Isofar, Duque de Caxias, Brasil), seguido de centrifugação a 3750 rpm por 15 minutos e do descarte do sobrenadante. Os produtos purificados foram incubados a 37 °C e protegidos da luz durante 30 minutos para a completa eliminação do etanol. Em seguida, as reações foram eluídas em 10 µL de formamida ultra-pura, pré-aquecidas a 95 °C por cinco minutos e então submetidas à eletroforese por capilaridade, usando o sequenciador automático *3130 Genetic analyzer* (*Applied Biosystem*, Foster City, EUA).

4.2.3.6 Análise das sequências

Os eletroesferogramas foram analisados pelo programa DNA Baser (Pitesti, Romênia) e as sequências dos pacientes foram comparadas com a sequência de referência cDNA NM_000131.3, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000131.3>). A nomenclatura foi realizada segundo orientações HGVS, disponível em: <<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>>), tendo como base que mutações se referem a diferenças na sequência do DNA de um indivíduo que são raras. Os polimorfismos são diferenças na sequência do DNA que são encontradas em vários indivíduos, em uma determinada frequência (geralmente em mais de 1% da população).

5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigo:

ARTIGO: DETERMINAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FATOR VII DA COAGULAÇÃO

Resumo

Introdução: A deficiência hereditária do fator VII (FVII) da coagulação é a mais comum dentre as coagulopatias raras, com prevalência estimada de 1:500.000 habitantes. É transmitida como herança autossômica recessiva, devido à mutações no gene que codifica o FVII (*F7*). Apresenta manifestações clínicas variáveis, desde formas assintomáticas até sangramentos graves. Estudos moleculares são raros em populações não caucasianas. Diante disso, estudamos, em nível molecular, uma coorte de pacientes com deficiência de FVII, registrados no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH).

Métodos: Todos os pacientes diagnosticados como deficientes em FVII registrados no HBH, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, foram convidados a participar do estudo através de carta convite. A coleta de informações clínicas e material biológico ocorreram de Novembro de 2003 a Fevereiro de 2004. Dos 38 pacientes registrados, 31 (82%) aceitaram participar, destes, 26 pacientes (84%) apresentavam atividade coagulante de FVII (FVII:C) inferior a 50% e quatro pacientes (13%) apresentavam FVII:C discretamente superior a 50%. Estes foram incluídos por apresentarem manifestação hemorrágica. Em um paciente (3%) não foi dosada a FVII:C. Os pacientes foram avaliados clinicamente e submetidos a exames laboratoriais, dentre estes, tempo de protrombina e FVII:C, com diferentes tromboplastinas. Todos os éxons e regiões limítrofes entre íntrons e éxons de *F7* foram amplificados e sequenciados.

Resultados: No total, 13 variantes gênicas foram identificadas. Dentre elas, seis (46%) são variações genéticas conhecidas (Arg304Gln; Thr324Met, c.-323_-313insCCTATATCCT; Glu95Glu; His175His e Arg353Gln) e sete (54%) são novas (Arg43Lys, Phe84Phe; Gln116Gln; Arg139Arg, Glu142Glu, c.745_747delGTG e Gln281Gln).

Conclusão: A maioria dos pacientes com deficiência de FVII moderada a leve são portadores de polimorfismos ou variações genéticas em homozigose. Não houve associação entre fenótipo e genótipo nos pacientes estudados, o que corrobora os dados da literatura.

Palavras-chave: fator VII, gene, mutação, hemorragia, sangramento, polimorfismo, Brasil.

ABSTRACT

Introduction: The inherited deficiency of coagulation factor VII (FVII) is the most frequent among rare coagulopathies, with an estimated prevalence of 1: 500,000 inhabitants. It is transmitted as an autosomal recessive inheritance, due to mutations in the gene coding FVII (*F7*). It presents variable clinical manifestations, from asymptomatic forms to severe bleedings. Molecular studies are rare in non-Caucasian populations. Thus, we studied, at molecular level, a cohort of patients with FVII deficiency, registered at “Hemocentro de Belo Horizonte” (HBH), Belo Horizonte, Brazil.

Methods: All patients diagnosed with FVII deficiency were invited to participate in the study through an invitation letter. We collected clinical data and blood samples between November 2003 and February 2004. Thirty-one (82%) out of 38 patients accepted the invitation; 26 of them (84%) had FVII activity (FVII:C) lower than 50% and 4 patients (13%) had FVII:C slightly over than 50% (included as they presented a hemorrhagic manifestation). FVII:C was not assessed in 1 patient (3%). Patients were clinically evaluated and submitted to laboratory tests, among these, prothrombin time and FVII:C, with different thromboplastins. All exons and intron/exon borders of *F7* were amplified and sequenced.

Results: Thirteen gene variants were identified. Six (46%) are known genetic variants (Arg304Gln; Thr324Met, c.-323_-313insCCTATATCCT; Glu95Glu; His175His and Arg353Gln) and seven (54%) are new ones (Arg43Lys, Phe84Phe; Gln116Gln; Arg139Arg, Glu142Glu, c.745_747delGTG and Gln281Gln).

Conclusion: Most patients with moderate to mild FVII deficiency have polymorphisms or genetic alterations in homozygosis. No association was seen between phenotype and genotype of the patients studied, which corroborates data from the literature.

Keywords: factor VII, gene, mutation, hemorrhage, bleeding, polymorphism, Brazil.

Introdução

A deficiência hereditária de fator VII (FVII) é uma doença hemorrágica rara (BOLTIN *et al.*, 2008; FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; HOOD & EBY, 2008; MARIANI; BERNARDI, 2009; MARIANI *et al.*, 2000; MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000), decorrente da redução de FVII da coagulação, devido a alterações

genéticas no gene que codifica o *F7*. Sua prevalência é significativamente maior nos países que praticam o casamento consanguíneo, o que é provavelmente devido à maior prevalência da doença decorrente de herança autossômica recessiva nestas populações (BOLTIN *et al.*, 2008; FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; MARIANI; BERNARDI, 2009; MARIANI *et al.*, 2000; MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000). A deficiência do FVII apresenta uma prevalência estimada de 1: 500.000 indivíduos (HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; PEYVANDI *et al.*, 2000; POLLAK *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2003).

O *F7* possui 12,8 Kb de extensão e é constituído por nove éxons e oito íntrons (O'HARA *et al.*, 1987). Está localizado no cromossomo 13, na posição 13 q 3 4, próximo ao gene que codifica o fator X (*FX*), outra proteína da coagulação (HAGEN *et al.*, 1986).

O FVII é uma glicoproteína de síntese hepática dependente da vitamina K. Sua função na hemostasia se relaciona principalmente com o processo de iniciação da coagulação sanguínea (BOLTIN *et al.*, 2008; FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; HAGEN *et al.*, 1986; McVEY *et al.*, 2001; O'HARA *et al.*, 1987; PERRY, 2002 e 2003; RODRIGUES *et al.*, 2003).

O FVII circula no plasma principalmente na sua forma inativa, em uma concentração de aproximadamente 10 nmol/L (0,5 µg/mL). Em sua forma ativa (FVIIa) circula em uma quantidade ainda menor (~10-110 pmol/L) (BOLTIN *et al.*, 2008; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; RODRIGUES *et al.*, 2003). Ambas as formas se ligam ao FT (fator tecidual), presente no subendotélio, evento que inicia o processo da coagulação (GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2003; POLLAK *et al.*, 2006; RAO & RAPAPORT, 1988; RODRIGUES *et al.*, 2003).

A maioria dos indivíduos com mutações no *F7* é assintomática (MATSUHISA *et al.*, 2010; McVEY *et al.*, 2001), sendo na maioria das vezes identificados através de triagem pré-operatória ou mediante realização de exames de rotina (HOOD & EBY, 2008; McVEY *et al.*, 2001). Pacientes com deficiência moderada a grave de FVII (níveis de FVII:C < 20%) podem apresentar sangramento de mucosas, tais como menorragia, epistaxe, gengivorragia, sangramento pós-trauma ou pós-

cirúrgico (BOLTIN *et al.*, 2008; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; PERRY, 2002 e 2003). Hemartroses, hematomas musculares, sangramento no coto umbilical e hemorragias de sistema nervoso central e gastrointestinal podem ocorrer nos casos de maior gravidade. Essas manifestações podem ocorrer logo após o nascimento e se associam a alta morbidade e mortalidade (BOLTIN *et al.*, 2008; GIANSILY-BLAIZOT, 2004; HERRMANN *et al.*, 2009; JAYANDHARAN *et al.*, 2007; MARIANI; BERNARDI, 2009; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003).

Na deficiência de FVII, a correlação entre os níveis de FVII:C e as manifestações hemorrágicas são fracas, de forma que casos com sangramento leve se associam a níveis baixos FVII:C ou, de forma oposta, casos com sangramento mais grave se relacionam a níveis quase normais de FVII:C (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2004; HOOD & EBY, 2008; JAYANDHARAN *et al.*, 2007, McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; RODRIGUES *et al.*, 2003).

Existem aproximadamente 200 mutações no *F7* descritas na literatura (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; HOOD & EBY, 2008; MANDHYAN *et al.*, 2010; MARIANI *et al.*, 2000; McVEY *et al.*, 2001; PERRY, 2002 e 2003; RODRIGUES *et al.*, 2003). Essas mutações se encontram listadas em banco de dados, tais como *The Human Gene Mutation Database (HGMD)*, disponível em: <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F7> >) e *International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)*, disponível em: <<http://www.isth.org/default/index.cfm/publications/registries-databases/mutations-rare-bleeding-disorders/factor-vii/?keywords=F7> >).

O presente estudo teve como objetivo principal caracterizar as bases moleculares da deficiência de FVII em 31 pacientes atendidos em um único centro. Foram identificadas 13 variantes gênicas, das quais seis são variantes gênicas conhecidas e sete são novas.

Pacientes, Materiais e Métodos

Pacientes

Todos os 38 pacientes diagnosticados como deficientes em FVII registrados no HBH, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, foram convidados a participar do estudo através de carta convite. Dos 31 pacientes que aceitaram participar, 26

(84%) apresentavam FVII:C inferior a 50% e, quatro pacientes (13%) apresentavam FVII:C discretamente superior a 50%. Estes foram incluídos por apresentarem manifestação hemorrágica. Em um paciente (3%) o FVII:C não foi dosado. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica (anamnese e exame físico), com a finalidade de se avaliar as manifestações clínicas, assim como gravidade, sequelas e complicações da doença e do seu tratamento. Doenças hepáticas e outras doenças/condições adquiridas que pudessem afetar os níveis plasmáticos de FVII:C, tais como obesidade, uso de anticoncepcionais orais e dislipidemias foram afastadas. Após a concordância em participar da pesquisa os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa obteve aprovação dos comitês de ética institucionais. Os dados clínicos e amostra de sangue foram coletados entre Novembro de 2003 e Fevereiro de 2004.

Os pacientes foram considerados potenciais deficientes em FVII da coagulação quando tiveram mais de um teste de TP prolongado, com os demais testes de triagem de coagulação normais (TTPA, tempo de trombina, contagem de plaquetas, dosagem de fibrinogênio). Estes pacientes foram, então, submetidos à dosagem de FVII.

Coleta de Sangue

Para a realização dos testes de coagulação foram coletados 5 ml de sangue periférico em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante. O plasma foi imediatamente obtido através de centrifugação a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 15 minutos, sendo a seguir aliquotado, acondicionado em microtubo e estocado a -80° C, até o momento da análise. Para a realização dos métodos moleculares foram coletados 10 mL de sangue periférico em tubos contendo citrato de sódio ou EDTA.

Testes laboratoriais de coagulação

Tempo de protrombina

Todos os 31 pacientes foram submetidos à realização do tempo de protrombina (TP), que foi realizada no Laboratório de Hematologia do HBH.

O TP foi realizado no aparelho COAG-A-MATE MTX (Organon Teknika, Dublin, República Irlanda), usando métodos estabelecidos no laboratório. O valor de referência para a atividade de protrombina foi de 70%-100%.

Dosagem de atividade do fator VII

A atividade do FVII coagulante (FVII:C) foi realizada em Março de 2004 em 30 pacientes com deficiência de FVII, visando detectar a atividade funcional do FVII no plasma.

A dosagem de FVII:C foi realizada em duplicata no aparelho COAG-A-MATE MTX (Organon Teknika, Dublin, República Irlanda) disponível no Laboratório de Hematologia do HBH. Foram utilizados dois tipos de tromboplastina diferentes, derivada de cérebro de coelho (Thromboplastin S; Biopool Internacional, Ventura, EUA) e tromboplastina humana (Recombiplastin, Instrumentation Laboratory Company, Lexington, EUA). O valor de referência da dosagem do FVII:C foi de 50%-150%.

Métodos Moleculares

Extração DNA

Para lise e separação do *pellet* leucocitário foi utilizada a técnica baseada em Bowen e Keeney (2003). Foram adicionados 500 µL de sangue venoso a 500 µL de tampão de lise celular (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 11% w/v sucrose; 5 mM MgCl₂, 1% v/v Triton X-100), misturados e submetidos à centrifugação por dois minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, a seguir, 500 µL do mesmo tampão foram adicionados ao sedimento, repetindo-se o procedimento anterior. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de tampão de lise nuclear (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM/L EDTA; 10 mM citrato de sódio; 1% w/v SDS). Após homogeneização, foram adicionados 120 µL NaCl 5 M (Sigma, St. Louis, EUA) e 500 µL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, EUA), seguido de centrifugação por cinco minutos a 2.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo adicionados dois volumes de etanol 100% (Sigma, St. Louis, EUA), homogeneizada e centrifugada por cinco minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tubo, contendo o precipitado de DNA, foi deixado à temperatura ambiente para permitir evaporação do excesso de etanol. Depois de seco o DNA foi ressuspensão em água bidestilada e deixado por 24 horas a 4^oC para dissolução. A concentração de DNA foi estimada em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o equipamento *Nanodrop* (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Wilmington, EUA). As amostras foram armazenadas a -20^o C, até análise.

Amplificação do F7 pela técnica de reação de cadeia da polimerase

Os nove éxons do *F7* foram amplificados usando nove pares de oligonucleotídeos (Alpha DNA, Quebec, Canadá) (TAB. 1). Em geral, cada par de nucleotídeos (senso e antisenso) foi empregado para amplificar um único éxon, exceções feitas aos éxons 3 e 4, que devido à sua pequena extensão foram amplificados conjuntamente, e ao éxon 8, que devido à sua grande extensão foi amplificado em dois fragmentos. A TAB. 1 apresenta os oligonucleotídeos usados na amplificação e sequenciamento do *F7*.

A amplificação do DNA genômico dos nove éxons foi realizada utilizando o termociclador Eppendorf (*Mastercycler® Gradient*, Hamburg, Alemanha). Foram utilizados 200 ng de DNA, 20 pmoles de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso), 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Fermentas, Lituânia, União Européia), 5,0 µL de tampão (Tris-HCl 100 mM, pH 8, 8; KCl 500 mM, 0,8% v/v) (Fermentas, Lituânia, União Européia), e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas, Lituânia, União Européia), para um volume final de 50 µL de reação de amplificação. A concentração de MgCl₂ (Fermentas, Lituânia, União Européia) foi variada de 1.0 a 2.0 mM (TAB. 6). Para os éxons 1B e 2, foi utilizado tampão de DMSO 10% (EMD Biosciences, San Diego, EUA).

A TAB. 2 apresenta descrição sobre as condições de amplificação dos fragmentos de PCR e as concentrações de MgCl₂ utilizadas.

Eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, a presença e o tamanho dos fragmentos amplificados foram conferidos através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR Safe DNA a 5% (Invitrogen, Oregon, EUA).

O gel foi imerso em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) (Tris - Base 40 mM, Ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1mM), foram aplicadas 10 µL de cada amostra, misturados com 2 µL de tampão de corrida 5X (*Loading Buffer*) (50% glicerol, 0.125% azul de bromofenol, 0.125 xileno cianol, TE pH 8.0 q.s.p.) nas canaletas e a corrida eletroforética foi realizada durante 90 minutos, 80 volts (V) e 150 amperes (A). O gel foi visualizado sob luz UV e a imagem captada pelo sistema de imagem científica EDAS 290 (KODAK, New Haven, EUA).

Purificação dos fragmentos amplificados

A purificação dos produtos de PCR amplificados foi realizada por um único passo de precipitação usando solução de PEG (polietileno glicol) 8000, contendo 26,2% de PEG 8000, 6,6 mM de $MgCl_2$ e 0,6 M de acetato de sódio pH 5,2 segundo protocolo estabelecido por ROSENTHAL *et al.* (1993) com modificações. Os produtos de PCR foram adicionados a igual volume de solução de PEG, cuidadosamente homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e os produtos de PCR sedimentados foram lavados com etanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, em seguida, etanol 85%. A seguir, o sobrenadante foi diluído em água bidestilada e deixado por 24 horas a 4^o C para dissolução. Sua concentração foi estimada através da mensuração utilizando o Nanodrop (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Wilmington, EUA), em comprimento de onda de 260 nm. As amostras foram armazenadas a -20^o C, até análise.

Sequenciamento direto

O sequenciamento direto do DNA amplificado foi utilizado para identificar a presença de alterações genéticas associadas à deficiência hereditária de FVII que, em quase sua totalidade, são devidas a mutações pontuais.

Para o sequenciamento foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação listados na TAB. 1.

Para cada amplificação foram utilizados 0,3 μ L do reagente *BigDye[®] Terminator v3. 1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 10-20 ng do produto de PCR purificado, 1,6 pmoles de oligonucleotídeo (senso ou antisenso), 1,7 μ L de tampão (Applied Biosystems, Foster City, EUA), para um volume final de 10 μ L de reação. Em seguida, as reações foram amplificadas em termociclador (*Mastercycler[®] Gradient*, Hamburg, Alemanha) sob as seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação de 96 °C por dois minutos, seguidos de 44 ciclos de 96 °C por 30 segundos, 55 °C por 15 segundos e 60 °C por quatro minutos.

Os produtos finais foram purificados por precipitação com isopropanol (Casa da Química Indústria e Comércio, Diadema, Brasil). As etapas de precipitação incluíram inicialmente a adição de quatro volumes de isopropanol 65% em cada amostra, seguida de incubação das reações à temperatura ambiente por 15 minutos, protegidas da luz. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 3750 rpm por 55

minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram adicionados 10 volumes de etanol 70% (Isotar, Duque de Caxias, Brasil), seguido de centrifugação a 3750 rpm por 15 minutos e do descarte do sobrenadante. Os produtos purificados foram incubados a 37 °C e protegidos da luz durante 30 minutos para a completa eliminação do etanol. Em seguida, as reações foram eluídas em 10 µL de formamida ultra-pura, pré-aquecidas a 95 °C por cinco minutos e então submetidas à eletroforese por capilaridade, usando o sequenciador automático 3130 *Genetic analyzer* (Applied Biosystem, Foster City, EUA).

Análise das sequências

Os eletroesferogramas foram analisados pelo programa DNA Baser (Pitesti, Romênia) e as sequências dos pacientes foram comparadas com a sequência de referência cDNA NM_000131.3 (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000131.3>). A nomenclatura foi realizada segundo orientações HGVS (Disponível em: <<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>>), tendo como base que mutações se referem a diferenças na sequência do DNA de um indivíduo que são raras. Os polimorfismos são diferenças na sequência do DNA que são encontradas em vários indivíduos, em uma determinada frequência (geralmente em mais de 1% da população).

Resultados

Pacientes

Dos 31 pacientes, 18 pacientes (58%) eram do sexo feminino e 13 pacientes (42%) eram do sexo masculino (TAB. 3). Com relação à faixa etária, quatro pacientes (13%) tinham menos de 10 anos, 13 pacientes (42%) tinham entre 11-40 anos e 14 pacientes (45%) tinham mais de 41 anos (TAB. 3). A TAB. 3 mostra os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes avaliados.

Manifestações clínicas

De acordo com as manifestações clínicas (TAB. 3), os 31 pacientes foram classificados em três grupos clínicos distintos: (i) grupo 1, que compreendeu os pacientes assintomáticos (n = 17, 55%), sem história de sangramento; (ii) grupo 2, pacientes com sangramento de intensidade leve a moderada (n = 10, 32%) que

apresentaram sangramento de mucosas, tais como menorragia, epistaxe, gengivorragia e sangramento pós-trauma ou pós-cirúrgico (extração dentária); e (iii) grupo 3, pacientes com sangramento grave (n = 4, 13%), caracterizado por história de hemartroses, hematomas musculares, sangramento no coto umbilical, hemorragias no sistema nervoso central e trato gastrointestinal.

Com relação ao motivo da primeira consulta, 48% dos pacientes foram encaminhados devido a resultado alterado no exame pré-operatório, 14% devido a alteração em exame de rotina e 38% devido a história de sangramento.

Dosagem da atividade de FVII:C

A dosagem de FVII:C foi realizada em 30 dos 31 pacientes, exceção feita ao paciente 28 (GRÁFICO 1 e TAB. 3). Os resultados mostraram que houve similaridade nos resultados da dosagem de FVII:C, utilizando tromboplastina de cérebro de coelho (T.C.C.) e tromboplastina humana (T.H.), com exceção dos pacientes 8, 9, 18, 19 e 20 (GRÁFICO 1).

De acordo com as dosagens de FVII:C, utilizando tromboplastina humana, os pacientes foram agrupados em dois diferentes grupos, a saber: (i) pacientes que apresentaram deficiência grave ou dosagens de FVII:C inferior a 2% (n = 2; 6%) e (ii) pacientes que apresentaram deficiência leve a moderada, ou seja, que obtiveram dosagem de FVII:C entre 2% e 49% (n = 23; 74%).

Análise do gene do FVII

A análise molecular foi realizada em 31 pacientes, pertencentes a 23 famílias não relacionadas. Foram identificadas 13 variantes gênicas, das quais seis (46%) são variantes gênicas já publicadas em banco de dados de domínio público (TAB. 4) e sete (54%) são novas (TAB. 5).

Dentre as variantes gênicas já publicadas, foram identificadas as mutações sentido trocado (i) Arg304Gln em homozigose (paciente 3); e (ii) Thr324Met também em homozigose (paciente 20). Além dessas, foram encontrados os polimorfismos (i) c.-323_-313insCCTATATCCT em 16 pacientes, estando cinco em estado de homozigose (pacientes 01, 11, 13, 22 e 28) e 11 em heterozigose (pacientes 05, 06, 07, 10, 12, 16, 19, 23, 26, 30 e 31); (ii) polimorfismo sinônimo Glu95Glu em heterozigose em 21 pacientes (pacientes 02, 03, 04, 07, 08, 09, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 31); (iii) polimorfismo sinônimo His175His em homozigose em um paciente (paciente 22) e em heterozigose em seis pacientes

(pacientes 06, 07, 10, 11, 15 e 29); e (iv) polimorfismo não sinônimo Arg353Gln em homozigose em dois pacientes (pacientes 03 e 22) (TAB. 4).

Dentre as variantes gênicas não publicadas foram identificadas: (i) variante gênica Arg43Lys em heterozigose em 17 pacientes (pacientes 01, 03, 05, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 25, 26, 30 e 31); (ii) polimorfismo sinônimo Phe84Phe em heterozigose em um paciente (paciente 31); (iii) polimorfismo sinônimo Gln116Gln em heterozigose em 27 pacientes (pacientes 01, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31); (iv) polimorfismo sinônimo Arg139Arg em heterozigose em dois pacientes (pacientes 28 e 29); (v) polimorfismo sinônimo Glu142Glu em heterozigose em 20 pacientes (pacientes 01, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 23, 24, 25, 26, 30 e 31); (vi) deleção c.745_747delGTG em heterozigose em um paciente (19); e (vii) polimorfismo sinônimo Gln281Gln em heterozigose em três pacientes (8, 9 e 10) (TAB.5).

A TAB. 6 mostra todas as alterações genéticas encontradas em *F7* em cada um dos 31 pacientes estudados.

Relação fenótipo – genótipo

Dentre os pacientes com deficiência leve a moderada (FVII:C 2% – 49%), 15 eram assintomáticos (pacientes 4, 7, 8, 14, 16, 18, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 30 e 31), oito pacientes apresentavam manifestação leve (pacientes 2, 6, 9, 10, 11, 17, 21 e 28) e um paciente apresentava manifestação grave (paciente 5). Para completar os 31 pacientes, cinco pacientes (12, 13, 15, 19 e 24) apresentavam FVII:C > 49% e em um paciente (paciente 28) não foi dosada a FVII:C. Dentre os pacientes com deficiência leve a moderada foram identificadas duas mutações sentido trocado em homozigose, Arg304Gln (paciente 8) e Thr324Met (paciente 20) e 10 variantes gênicas: c.-323_-313insCCTATATCCT em homozigose em cinco pacientes (01, 11, 13, 22 e 28) e em heterozigose em nove pacientes (5, 6, 7, 10, 16, 23, 26, 30 e 31), polimorfismo sinônimo Glu95Glu em heterozigose em 16 pacientes (2, 4, 7, 8, 9, 10, 14, 16, 17, 18, 25, 26, 27, 28, 29 e 31), polimorfismo sinônimo His175His em homozigose em um paciente (22) e em heterozigose em cinco pacientes (6, 7, 10, 11 e 29) e polimorfismo não sinônimo Arg353Gln em heterozigose em um paciente (paciente 22), todos esses já publicados. Nesses pacientes encontramos uma variante gênica Arg43Lys em heterozigose em 11 pacientes (5, 8, 9, 10, 11, 14, 18,

25, 26, 30 e 31); polimorfismo sinônimo Phe84Phe em heterozigose em um paciente (31); polimorfismo sinônimo Gln116Gln em homozigose em 21 pacientes (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31); polimorfismo sinônimo Glu142Glu em heterozigose em 14 pacientes (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 17, 14, 16, 25, 26, 30 e 31); polimorfismo sinônimo Gln281Gln em heterozigose em três pacientes (8, 9 e 10) e polimorfismo sinônimo Arg139Arg em heterozigose em um paciente (29) (TAB. 7).

Dos dois pacientes com deficiência grave (pacientes 1 e 3 ; FVII:C \leq 2%), o paciente 1 era assintomático e o paciente 3 apresentava manifestações de deficiência moderada (epistaxes frequentes, gengivorragia e sangramento aumentado pós-trauma). Os pacientes 1 e 3 são aparentados. No paciente 1 foram identificados três polimorfismos e uma variante gênica, sendo o c.-323_-313insCCTATATCCT em homozigose (sabidamente associado a uma redução de aproximadamente 50% nos níveis de FVII:C); uma variante gênica Arg43Lys em heterozigose; e dois polimorfismos sinônimos Gln116Gln e Glu142Glu em heterozigose. No paciente 3 foram identificados uma variante gênica Arg43Lys em heterozigose e dois polimorfismos, sendo Arg353Gln não sinônimo em homozigose e Glu95Glu sinônimo em heterozigose (TAB. 8).

Discussão

O presente estudo avaliou 26 pacientes que apresentavam FVII:C inferior a 50%, quatro pacientes (12, 15, 19 e 24) apresentavam FVII:C discretamente superior a 50% (os quais foram incluídos por apresentarem manifestação hemorrágica) e um paciente (28) que não foi dosada a FVII:C. Foram encontradas 13 variantes gênicas conhecidas e novas, caracterizadas por polimorfismos sinônimos e não sinônimos e mutações.

A mutação Arg304Gln, também conhecida como FVII Pádua foi encontrada, neste estudo, no paciente 8, em homozigose. Essa mutação já foi descrita em pacientes de várias origens e nacionalidades (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; O'BRIEN *et al.*, 1991; PEYVANDI *et al.*, 2000), dentre as quais Itália, Inglaterra, Brasil e Ásia (POLLAK *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2003; TUDDENHAM *et al.*, 1995). Embora assintomático, esse paciente apresentou uma dosagem de FVII:C bastante discrepante, quando o teste foi realizado com tromboplastina de cérebro de coelho (3%), em comparação com a tromboplastina humana (40%). Esse resultado

está em concordância com vários relatos da literatura, que identificaram uma grande discrepância na dosagem de FVII:C, utilizando as tromboplastinas descritas em pacientes com essa mutação (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; MARCHETTI *et al.*, 1992; McVEY *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 1991; PEYVANDI *et al.*, 2000; POLLAK *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2003; TUDDENHAM *et al.*, 1995). Esta discrepância subestima os níveis de FVII:C quando utiliza tromboplastina de cérebro de coelho (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; McVEY *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 1991). A explicação para esse fenômeno refere-se ao fato de que a troca do aminoácido arginina por glutamina na posição 304 prejudica a formação do complexo FT-FVIIa e, por conseguinte, a ativação dos fatores IX e X (FROMOVICH-AMIT *et al.*, 2004; O'BRIEN *et al.*, 1991). Acredita-se que isso esteja relacionado com a redução da função catalítica, devido à remoção de carga positiva desse resíduo (MARCHETTI *et al.*, 1992). Rodrigues *et al.* (2003) estudaram pacientes com deficiência de FVII em uma população de Campinas, sudeste do Brasil, e relatou a presença do FVII Pádua em 50% da população estudada (n = 6; três pacientes com a mutação). No presente estudo, essa mutação foi encontrada somente em um paciente (3,2%). Os motivos para tal discrepância podem se dever ao pequeno número de casos estudados por Rodrigues *et al.*, assim como a presença de uma maior proporção de pacientes de origem italiana na região de Campinas, em comparação com a região de Belo Horizonte.

A mutação sentido trocado Thr324Met foi encontrada no paciente 20 em homozigose. Embora assintomático, a dosagem de FVII:C nesse paciente foi bastante reduzida com tromboplastina de cérebro de coelho (6%), quando comparada com a tromboplastina humana (29%), assemelhando-se, assim, ao fenômeno descrito para o FVII Pádua. Essa mutação foi identificada em dois estudos anteriores (HERRMANN *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2009). No estudo de Herrmann *et al.* (2009), não há menção a resultado de dosagem de FVII:C. No estudo de Mota *et al.* (2009), esta mutação foi encontrada em dois pacientes, um deles também assintomático e o outro com sangramento leve, cuja dosagem de FVII:C revelou níveis de 13% e 4%, respectivamente. Entretanto, os autores não mencionaram o tipo de tromboplastina utilizado. Até onde temos conhecimento, não houve nenhum relato na literatura sobre a ocorrência deste fenômeno com outra variante gênica no *F7*, além do FVII Pádua. De fato, ambas as mutações estão localizadas no éxon 8, que codifica o domínio catalítico do FVII. Assim, tal como o FVII Pádua, essa

mutação pode estar relacionada a uma reduzida ativação do complexo FT-FVIIa. Entretanto, os pacientes 18 e 19 apresentaram o mesmo fenômeno (de dosagem de FVII:C discrepante conforme a tromboplastina de coelho ou recombinante), mas não possuem a alteração Thr324Met. Assim, não podemos concluir que esta alteração seja responsável pelo fenômeno descrito.

Polimorfismos no *F7* influenciam a atividade plasmática do FVII, embora haja uma diferença considerável em relação à extensão da sua influência sobre o fenótipo (SHANKER *et al.*, 2009). Os polimorfismos mais conhecidos no *F7* são a Arg353Gln e a inserção do decanucleotídeo na posição -323 (c.-323_-313insCCTATATCCT). Ambos os polimorfismos estão relacionados à diminuição dos níveis de FVII:C (GIANSILY-BLAIZOT *et al.*, 2002; McVEY *et al.*, 2001), sugerindo que o nível de FVII:C no plasma seja, em grande extensão, determinado por influências genéticas. Entretanto, é ainda provável que alguns desses polimorfismos estejam em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos ou mutações no *F7* (VAN 'T HOOFT *et al.*, 1999).

Indivíduos heterozigotos para Arg353Gln têm uma redução de aproximadamente 20%-25% dos níveis de FVII:C, enquanto indivíduos homozigotos têm uma redução de cerca de 50% (MOTA *et al.*, 2009). No nosso estudo, Arg353Gln foi encontrado, em homozigose, em dois pacientes relacionados (pacientes 03 e 22), sendo que o paciente 22 era assintomático, enquanto o paciente 03 apresentou manifestações hemorrágicas moderadas, tais como epistaxe e gengivorragia. A dosagem de FVII:C com tromboplastina humana do paciente 03 foi 1,4% e do paciente 22 foi de 5%. Esses níveis são bastante inferiores aos relatados por Mota *et al.* (2009). É possível que, assim como outros polimorfismos, a Arg353Gln possa estar em desequilíbrio de ligação com outra mutação deletéria ainda não encontrada nesses pacientes. Ainda, no paciente 03 foi também encontrada a variante gênica Arg43Lys e no paciente 22 o polimorfismo c.-323_-313insCCTATATCCT em homozigose, que sabidamente cursa com níveis reduzidos de FVII:C (McVEY *et al.*, 2001; MTIRAOU *et al.*, 2005; POLLAK *et al.*, 1996).

O polimorfismo c.-323_-313insCCTATATCCT foi encontrado em 16 pacientes (52%) deste estudo, dos quais cinco em homozigose e 11 em heterozigose. Os pacientes 01 e 22, que são aparentados, apresentaram o polimorfismo em homozigose e tiveram o nível de FVII:C bastante reduzido, 2% e 5%, respectivamente. Entretanto, dois outros pacientes (pacientes 11 e 13)

apresentaram níveis altos de FVII:C, 45% e 49%, respectivamente. Isto sugere que esse polimorfismo, ainda que em homozigose, não explica os baixos níveis de FVII:C presente nos pacientes 01 e 22. É possível que esse, tal como outros polimorfismos, esteja em desequilíbrio de ligação com outras mutações deletérias. Esse resultado corrobora as informações de literatura de que esse polimorfismo interfere na atividade promotora do gene, determinando níveis reduzidos de FVII:C (DI CASTELNUOVO *et al.*, 2000; MTIRAOU *et al.*, 2005). Já nos pacientes que apresentaram o polimorfismo c.-323_-313insCCTATATCCT em heterozigose, os níveis de FVII:C foram sempre superiores a 20%.

Dentre as variantes gênicas não publicadas, 17 pacientes (55%) apresentaram a variante gênica Arg43Lys; um paciente apresentou o polimorfismo sinônimo Phe84Phe em heterozigose; 27 pacientes apresentaram o polimorfismo sinônimo Gln116Gln em heterozigose; dois pacientes apresentaram o polimorfismo sinônimo Arg139Arg em heterozigose; 20 pacientes apresentaram o polimorfismo sinônimo Glu142Glu em heterozigose; um paciente apresentou a deleção c.745_747delGTG em heterozigose; e três pacientes apresentaram o polimorfismo Gln281Gln em heterozigose.

Tal como descrito em vários outros estudos (BERNARDI, *et al.*, 2004; GIANILY-BLAIZOT, 2004; MARIANI; BERNARDI, 2009), o presente estudo não demonstrou associação clara entre fenótipo e genótipo. As explicações para tal ocorrência na deficiência de FVII não são claras, mas podem envolver a participação de outros fatores genéticos e ambientais capazes de modular a expressão clínica da deficiência (BERNARDI, *et al.*, 2004).

Algumas particularidades deste estudo merecem comentários. Primeiramente, a técnica de *Southern blotting* não foi realizada para identificação de grandes defeitos genéticos. Assim, não se pode afastar a ocorrência desses defeitos na população estudada. Entretanto, o banco de dados *HGMD* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F7>; último acesso em 03 de setembro de 2010) lista somente seis grandes defeitos genéticos, os quais são eventos raros na deficiência de FVII. Ainda, 77% da nossa população de estudo foi constituída por pacientes que apresentaram valores de FVII:C superiores a 20%, sugerindo baixa probabilidade de ocorrência de grandes alterações genéticas. Por fim, uma vez que não foi realizada a dosagem do antígeno do FVII, não foi possível classificar os pacientes quanto à deficiência, se do tipo I ou II.

Concluindo, este estudo avaliou, a nível molecular, uma coorte de 31 pacientes registrados em um único centro com deficiência de FVII. Foram observados polimorfismos ou mutações em homozigose na maioria dos pacientes com deficiência de FVII moderada a leve. Não houve associação entre fenótipo e genótipo nos pacientes estudados. Este é o primeiro estudo brasileiro que se presta a estudar, a nível molecular, uma coorte de pacientes com deficiência de FVII.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FAPEMIG, Fundação HEMOMINAS e Fundo Nacional de Saúde

Referências

ARBINI, A. A. *et al.* Molecular analysis of Polish patients with factor VII deficiency. *Blood*, New York, v. 84, n. 7, p. 2214-20, Oct 1 1994.

BERNARDI, F. *et al.* How to evaluate phenotype-genotype relationship in rare coagulation haemorrhagic disorders: examples from FVII deficiency. *Haemophilia*. England, 2004. p. 177-9.

BOLTIN, D. *et al.* Primary factor VII deficiency. *Isr Med Assoc J*, Israel, v. 10, n. 6, p. 475-6, Jun 2008.

BOWEN, D. J.; KEENEY, S. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia. *A Thromb Haemost.* Germany, 2003. p. 201-2.

DI CASTELNUOVO, A. *et al.* The decanucleotide insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the coagulation factor VII gene and the risk of familial myocardial infarction. *Thromb Res.* United States, 2000. p. 9-17.

FROMOVICH-AMIT, Y. *et al.* Characterization of mutations causing factor VII deficiency in 61 unrelated Israeli patients. *J Thromb Haemost*, Oxford, v. 2, n. 10, p. 1774-81, Oct 2004.

GIANSILY-BLAIZOT, M. Inherited factor VII deficiency. In: TCHERNIA, G. (Ed.). *Orphanet Encyclopedia*, Jun 2004. Disponível em: <<http://www.orpha.net/data/patho/Pro/en/FactorVIIDeficiency-FRenPro916.pdf>>. Acesso em 18 Nov. 2010.

GIANSILY-BLAIZOT, M. *et al.* Genotypic heterogeneity may explain phenotypic variations in inherited factor VII deficiency. *Haematologica*, Pavia, v. 87, n. 3, p. 328-9, Mar. 2002.

GIANSILY-BLAIZOT, M. *et al.* Analysis of biological phenotypes from 42 patients with inherited factor VII deficiency: can biological tests predict the bleeding risk? *Haematologica*, Pavia, v. 89, n. 6, p. 704-9, Jun 2004.

HAGEN, F. *et al.* Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 83, n. 8, p. 2412-6, Apr 1986.

HERRMANN, F. H. *et al.* Factor VII deficiency: clinical manifestation of 717 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor 7 gene. *Haemophilia*, Londres, v. 15, n. 1, p. 267-80, Jan 2009.

HOOD, J.; EBY, C. Evaluation of a prolonged prothrombin time. *Clin Chem*, New York, v. 54, n. 4, p. 765-8; discussion 768-9, Apr 2008.

JAYANDHARAN, G. *et al.* Molecular basis of hereditary factor VII deficiency in India: five novel mutations including a double missense mutation (Ala191Glu; Trp364Cys) in 11 unrelated patients. *Haematologica*, Pavia, v. 92, n. 7, p. 1002-3, Jul 2007.

MANDHYAN, R. *et al.* Congenital factor VII deficiency. *Br J Anaesth*, Altrincham, v. 104, n. 2, p. 267-8, Feb 2010.

MARCHETTI, G. *et al.* Detection of two missense mutations and characterization of a repeat polymorphism in the factor VII gene (F7). *Hum Genet*, Berlin, v. 89, n. 5, p. 497-502, Jul 1992.

MARIANI, G.; BERNARDI, F. Factor VII Deficiency. *Semin Thromb Hemost*, New York, v. 35, n. 4, p. 400-6, Jun 2009.

MARIANI, G. *et al.* Clinical manifestations, management, and molecular genetics in congenital factor VII deficiency: the International Registry on Congenital Factor VII Deficiency (IRF7). *Blood*, New York, v. 96, n. 1, p. 374, Jul 1 2000.

MATSUHISA, H. *et al.* Open-heart surgery in an infant with heterozygous factor VII deficiency. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 1037-8, Jun 2010.

McVEY, J. *et al.* Factor VII deficiency and the FVII mutation database. *Hum Mutat*, London, v. 17, n. 1, p. 3-17, 2001.

MOTA, L. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of Factor VII deficiency patients from Western India. *Clin Chim Acta*, Amsterdam, v. 409, n. 1-2, p. 106-11, Nov 2009.

MTIRAOU, N. *et al.* Reduction in coagulation factor VII plasma levels by R353Q but not the -323P0/10 promoter polymorphism in healthy Tunisians. *Am J Hematol*, New York, v. 79, n. 1, p. 11-6, May 2005.

O'HARA, P. J. *et al.* Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 84, n. 15, p. 5158-62, Aug 1987.

PERRY, D. Factor VII Deficiency. *Br J Haematol*, Oxford, v. 118, n. 3, p. 689-700, Sep 2002.

PERRY, D. J. Factor VII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Oxford, v. 14 Suppl 1, p. S47-54, Jun 2003.

PEYVANDI, F. *et al.* Molecular characterisation and three-dimensional structural analysis of mutations in 21 unrelated families with inherited factor VII deficiency. *Thromb Haemost*, Stuttgart, v. 84, n. 2, p. 250-7, Aug 2000.

POLLAK, E. *et al.* Asymptomatic factor VII deficiency in African Americans. *Am J Clin Pathol*, Baltimore, v. 126, n. 1, p. 128-32, Jul 2006.

RAO, L.; RAPAPORT, S. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 85, n. 18, p. 6687-91, Sep 1988.

RODRIGUES, D. N. *et al.* Prevalence of factor VII deficiency and molecular characterization of the F7 gene in Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Oxford, v. 14, n. 3, p. 289-92, Apr 2003.

ROSENTHAL, A. *et al.* Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res*, London, v. 21, n. 1, p. 173-4, Jan 1993.

VAN 'T HOOFT, F. M. *et al.* Two common functional polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. *Blood*, New York, v. 93, n. 10, p. 3432-41, May 15 1999.

Tabelas e Gráficos

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para amplificação e seqüenciamento do *F7*

Éxon	Seqüência	Posição Seq. Ref. NT_027140.6	Tamanho (Pb)
1A	CTGGCCTGGTCTGGAGGCTC CGGGCTGGCTCCTGGATTTGC	1255708 a 1255727 1256273 a 1256293	586
1B	CAGTGCCTGGGATGTGGCTGC GCTGGCTCTTTGCCATGGGAG	1257091 a 1257110 1257295 a 1257315	225
2	CGGTCTCCGAGGCACTGGGC CACGCGGCCTGGTTCACCGC	1260949 a 1260968 1261216 a 1261235	287
3-4	CAGTTCATGGTGTGTCCAGTGC CACCAGTTGTTGCACCCTGC	1263990 a 1264011 1264356 a 1264375	386
5	ATCCACGCCTTGTCCCTTTGGATCA TGTCATCTGGGACTGGGACATGAA	1265795 a 1265818 1266131 a 1266154	360
6	GCCTCAAGGCCTCTCAGAGG CAGAGCTGTTGTTACATTC	1266986 a 1267005 1267250 a 1267269	284
7	GCAATGCCAGAGGTTTCCTTG GTCTGTCTGTCTGTGGAAGTG	1267697 a 1267716 1268176 a 1268196	500
8A	CTGCAGACCTAGAAATGGCC CACGTTGAGGACCATGAGCTC	1268638 a 1268657 1268993 a 1269013	376
8B	CGCTTCTCATTGGTCAGCGGC GATTTGGTGCCAGGACAGTTTCG	1268936 a 1268956 1269370 a 1269391	456

Abreviação: Seq., seqüência; Ref., referência; pb, pares de base

Tabela 2 - Condições usadas para amplificação dos fragmentos de *F7* e concentração de $MgCl_2$

Éxon	Mg Cl ₂ (mM)	Temperatura de Anelamento/Tempo	Temperatura de Extensão/Tempo
1A	2.0	69,9 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
1B	1.0	60 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
2	2.0	69,9 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
3-4	2.0	60 °C/45 segundos	72 °C/1 minuto
5	2.0	68,1 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
6	2.0	57,8 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
7	2.0	68,1 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
8A	1.5	70 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos
8B	2.0	69,9 °C/30 segundos	72 °C/30 segundos

A temperatura de desnaturação foi de 94°C por 30 segundos para todos os fragmentos. Um total de 35 ciclos foi realizado para cada amplificação.

Abreviações: MgCl₂, cloreto de magnésio

Tabela 3 - Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com deficiência de FVII

Pacientes	Sexo/Idade	TP(s)*	TP(%)*	FVII:C(%) T.C.C.	FVII:C (%) T.H.	Manifestação Hemorrágica / Outras Características	Parentesco
1	M/42	21	33	7,75	1,95	Assintomático; HIV+, Sífilis +.	Irmão pacientes 3 e 22.
2	F/57	17	55	25,41	15,94	Epistaxe freqüentes; pré-operatório.	
3	M/47	21	33	6,78	1,4	Epistaxes freqüentes, gengivorragia, sangramento aumentado pós-trauma nariz.	Irmão pacientes 1 e 22.
4	M/69	17	64	36,2	32,7	Assintomático; pré-operatório.	
5	M/13	17	61	41,18	44,79	Sangramento grave no coto-umbilical, sangramento aumentado pós-trauma, epistaxes freqüentes; pré-operatório.	Irmão paciente 6.
6	M/15	17	57	47,59	47,66	Equimoses.	Irmão paciente 5.
7	F/40	-	60	23,76	23,91	Assintomático; exame rotina.	
8§	F/73	37	23	3,32	40,03	Assintomático.	Irmão paciente 9.
9§	F/68	40	18	3,17	29,94	Metrorragia.	Irmã paciente 8.
10	M/37	17	61	39,98	47,06	Epistaxe; pré-operatório desvio septo nasal.	Pai paciente 15.
11	M/26	15	50	39,03	45,4	Epistaxes frequentes, gengivorragia; exame rotina.	
12	F/12	14	72	62,9	50,77	Epistaxes frequentes, enterorragias, gengivorragia, metrorragia, equimose.	
13	F/10	15	73	53,12	49,53	Sangramento grave coto-umbilical, equimose.	
14	F/54	17	52	19,8	34,76	Assintomático; exame pré-operatório.	
15	M/8	16	61	55,15	51,96	Assintomático; pré-operatório adenoidectomia.	Filho paciente 10.
16	M/65	15	62	34,04	47,16	Assintomático; doença arterial coronariana.	
17	M/8	16	70	42,87	40,63	Sangramento após uso AAS, gengivorragia; exame pré-operatório.	
18§	F/60	25	32	3,46	21,66	Assintomático.	

Pacientes	Sexo/ Idade	TP(s)*	TP(%)*	FVII:C (%) T.C.C	FVII:C (%) T.H.	Manifestação Hemorrágica / Outras Características	Parentesco
19§	F/45	20	44	15,06	54,06	Sangramento grave pós-cirúrgico, epistaxe, equimose, gengivorragia; exame rotina	
20§	F/49	23	41	6,39	29,47	Assintomático.	
21	F/42	17	51	29,93	33,1	Sangramento grave pós drenagem abscesso e pós extração dentária, menorragia, metrorragia, gengivorragia.	
22	M/58	20	33	10,98	5,43	Assintomático; pré-operatório, hernioplastia.	Irmão pacientes 1 e 3.
23	F/21	14	62	35,63	37,74	Assintomático.	
24	F/17	15	73	53,41	54,31	Epistaxe, equimoses freqüentes, metrorragia, gengivorragia.	
25	F/13	20	44	21,4	19,17	Assintomático.	Irmã paciente 26; filha paciente 27.
26	F/11	SI	56	29,06	24,15	Assintomático; pré-operatório amigdalectomia.	Irmã paciente 25; filha paciente 27.
27	F/36	18	57	29,93	21,99	Assintomático.	Mãe pacientes 25 e 26.
28	M/15	14	65	ND	ND	Epistaxes freqüentes.	
29	F/6	24	32	6,42	2,08	Assintomático; pré-operatório adenoidectomia.	
30	F/45	18	53	52,98	45,72	Assintomático.	
31	M/21	SI	SI	34,96	37,62	Assintomático.	

Legenda:

Refere-se a média de duas ou mais dosagens; os pacientes: 11, 14, 17, 19, 25, 27 e 29 tiveram somente uma dosagem.

§ pacientes que apresentaram grande variação entre as duas dosagens de FVII usando diferentes tromboplastinas

Abreviações: ND, Não Dosado; TCC, Tromboplastina Cérebro de Coelho; TH, Tromboplastina Humana; FVII:C, atividade de FVII; s, segundos; F, feminino; M, masculino; SI, Sem informação.

Tabela 4 – Variantes gênicas encontradas neste estudo publicadas em banco de dados**

Número de pacientes*	Troca de aminoácido	Variante gênica	Comentário
1	Arg304Gln	c.1142G>A	Mutação sentido trocado homo.
1	Thr324Met	c.1202C>T	Mutação sentido trocado homo.
16	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	Polimorfismo homo. / Polimorfismo heter.
21	Glu95Glu	c.336G>A	Polimorfismo sinônimo heter.
7	His175His	c.576C>T	Polimorfismo sinônimo homo. / heter.
2	Arg353Gln	c.1289G>A	Polimorfismo não sinônimo homo.

* Número de pacientes nos quais a referida variante gênica foi identificada.

**Variantes gênicas descritas nos bancos de dados: *ENSEMBL*

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core:g=ENSG00000057593;r=13:113760105-113774995;t=ENST00000375581) e *HGMD* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F7>).

Abreviações: Heter., heterozigose; Homo., Homozigose

Tabela 5 – Variantes gênicas novas encontradas neste estudo e não publicadas em banco de dados**

Número de pacientes*	Troca de aminoácido	Variante gênica	Comentário
17	Arg43Lys	c.179G>A	Variante gênica heter.
1	Phe84Phe	c.303C>T	Polimorfismo sinônimo heter.
27	Gln116Gln	c.399G>A	Polimorfismo sinônimo heter.
2	Arg139Arg	c.468G>A	Polimorfismo sinônimo heter.
20	Glu142Glu	c.477G>A	Polimorfismo sinônimo heter.
1	N/A	c.745_747delGTG	Deleção heter.
3	Gln281Gln	c.894G>A	Polimorfismo sinônimo heter

*Número de pacientes nos quais a referida variante gênica foi identificada.

**Variantes gênicas descritas nos bancos de dados: *ENSEMBL*

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core:g=ENSG00000057593;r=13:113760105-113774995;t=ENST00000375581) e *HGMD*

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F7>).

Abreviações: Heter., heterozigose; Homo., Homozigose.

Tabela 6 - Variantes gênicas encontradas no gene do FVII de 31 pacientes com FVII:C

Pacientes	Troca nucleotídeo	Troca aminoácido	Nomenclatura da variante	Éxon	Domínio	Comentários
01	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo homo.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A*	Arg353Gln	c.1289G>A	8	Catalítico	Polimorfismo não sinônimo homo.
02	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
03	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A*	Arg353Gln	c.1289G>A	8	Catalítico	Polimorfismo não sinônimo homo.
04	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
05	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
06	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	C>T*	His175His	c.576C>T	5	EGF 2	Polimorfismo sinônimo heter.
07	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	C>T*	His175His	c.576C>T	5	EGF 2	Polimorfismo sinônimo heter.

Pacientes	Troca nucleotídeo	Troca aminoácido	Nomenclatura da variante	Éxon	Domínio	Comentários
08	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter
	G>A	Gln281Gln	c.894G>A	8	Catalítico	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A*	Arg304Gln	c.1142G>A	8	Catalítico	Mutação sentido trocado homo.
09	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln281Gln	c.894G>A	8	Catalítico	Polimorfismo sinônimo heter.
10	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	C>T*	His175His	c.576C>T	5	EGF 2	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln281Gln	c.894G>A	8	Catalítico	Polimorfismo sinônimo heter.
11	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo homo.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	C>T*	His175His	c.576C>T	5	EGF 2	Polimorfismo sinônimo heter.

Pacientes	Troca nucleotídeo	Troca aminoácido	Nomenclatura da variante	Éxon	Domínio	Comentários
12	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
13	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo homo.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
14	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
15	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	C>T*	His175His	c.576C>T	5	EGF 2	Polimorfismo sinônimo heter.
16	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
17	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF1	Polimorfismo sinônimo heter.
18	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.

Pacientes	Troca nucleotídeo	Troca aminoácido	Nomenclatura da variante	Éxon	Domínio	Comentários
19	N/A* G>A G>A N/A	N/A Arg43Lys Gln116Gln N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT c.179G>A c.399G>A c.745_747delGTG	N/A 1B 4 7	Reg. Promotora Seq. Pré-pro-líder EGF 1 Ativação	Polimorfismo heter. Variante gênica heter. Polimorfismo sinônimo heter. Deleção heter.
20	C>T*	Thr324Met	c.1202C>T	8	Catalítico	Mutação sentido trocado homo.
21	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
22	N/A* G>A C>T* G>A*	N/A Gln116Gln His175His Arg353Gln	c.-323_-313insCCTATATCCT c.399G>A c.576C>T c.1289G>A	N/A 4 5 8	Reg. Promotora EGF 1 EGF 2 Catalítico	Polimorfismo homo. Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo homo. Polimorfismo não sinônimo homo.
23	N/A* G>A G>A	N/A Gln116Gln Glu142Glu	c.-323_-313insCCTATATCCT c.399G>A c.477G>A	N/A 4 4	Reg. Promotora c.399G>A EGF 1	Polimorfismo heter. Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo heter.
24	G>A* G>A G>A	Glu95Glu Gln116Gln Glu142Glu	c.336G>A c.399G>A c.477G>A	2 4 4	GLA c.399G>A EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo heter.
25	G>A G>A* G>A G>A	Arg43Lys Glu95Glu Gln116Gln Glu142Glu	c.179G>A c.336G>A c.399G>A c.477G>A	1B 2 4 4	Seq. Pré-pro-líder GLA EGF 1 EGF 1	Variante gênica heter. Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo heter.
26	N/A* G>A G>A* G>A G>A	N/A Arg43Lys Glu95Glu Gln116Gln Glu142Glu	c.-323_-313insCCTATATCCT c.179G>A c.336G>A c.399G>A c.477G>A	N/A 1B 2 4 4	Reg. Promotora Seq. Pré-pro-líder GLA EGF 1 EGF 1	Polimorfismo heter. Variante gênica heter. Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo heter. Polimorfismo sinônimo heter.

Pacientes	Troca nucleotídeo	Troca aminoácido	Nomenclatura da variante	Éxon	Domínio	Comentários
27	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
28	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo homo.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Arg139Arg	c.468G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
29	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Arg139Arg	c.468G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	C>T*	His175His	c.576C>T	5	EGF 2	Polimorfismo sinônimo heter.
30	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
31	N/A*	N/A	c.-323_-313insCCTATATCCT	N/A	Reg. Promotora	Polimorfismo heter.
	G>A	Arg43Lys	c.179G>A	1B	Seq. Pré-pro-líder	Variante gênica heter.
	C>T	Phe84Phe	c.303C>T	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A*	Glu95Glu	c.336G>A	2	GLA	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Gln116Gln	c.399G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.
	G>A	Glu142Glu	c.477G>A	4	EGF 1	Polimorfismo sinônimo heter.

c. Seq. cDNA NM_000131.3/ Seq. Ref. F7 NT_027140.6

* Variantes gênicas descritas nos bancos de dados: **ENSEMBL** (Disponível em;

<http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000057593;r=13:113760105-113774995;t=ENST00000375581>) e **HGMD** (Disponível em;

<<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F7>>).

Abreviações: Seq., sequência; Ref., referência; Heter., heterozigose; Homo., Homozigose; N/A, não se aplica; Reg., região

Tabela 7 - Relação Fenótipo-Genótipo em Pacientes FVII:C 2-49%

Variantes Gênicas	
Polimorfismos homo. / Heter.	c. -323_-313 insCCTATATCCT
Variante gênica	Arg43Lys
Polimorfismo sinônimo Heter.	Phe84Phe
Polimorfismo sinônimo Heter.	Glu95Glu
Polimorfismo sinônimo Heter.	Gln116Gln
Polimorfismo sinônimo Heter.	Arg139Arg
Polimorfismo sinônimo Heter.	Glu142Glu
Polimorfismo sinônimo Homo. /Heter.	His175His
Polimorfismo sinônimo Heter.	Gln281Gln
Mutação sentido trocado Homo.	Arg304Gln
Mutação sentido trocado Homo.	Thr324Met
Polimorfismo não sinônimo Homo.	Arg353Gln

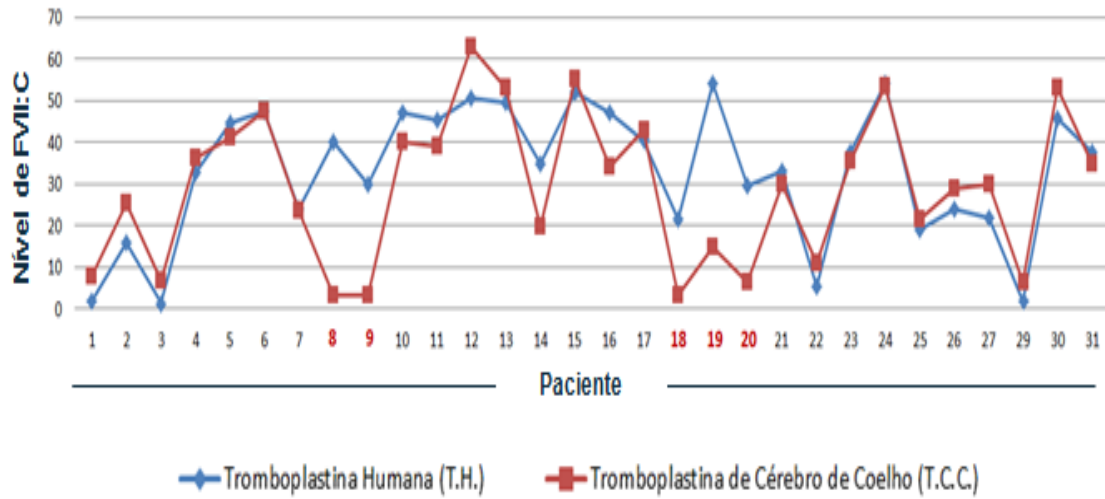
Abreviações: Heter.,heterozigose; Homo., Homozigose
Variantes gênicas já publicadas em banco de dados

Tabela 8 - Relação Fenótipo-Genótipo em Pacientes FVII:C < 2%

Variantes Gênicas	
Polimorfismos homo./ Heter.	c. -323_-313 insCCTATATCCT
Variante gênica	Arg43Lys
Polimorfismo sinônimo Heter.	Gln116Gln
Polimorfismo sinônimo Heter.	Glu142Glu
Polimorfismo não sinônimo Homo.	Arg353Gln

Abreviações: Heter.,heterozigose; Homo., Homozigose
Variantes gênicas já publicadas em banco de dados

Gráfico 1 - Dosagem de atividade de FVII em 30 pacientes com deficiência de FVII utilizando diferentes tromboplastinas



Legenda: A linha vermelha refere-se à dosagem de FVII:C usando tromboplastina de cérebro de coelho e a azul à tromboplastina humana. O paciente 28 não teve o nível de FVII:C dosado. Os números marcados em vermelho se referem aos pacientes que apresentaram grande variação na dosagem de FVII:C utilizando diferentes tromboplastinas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou um coorte de pacientes com deficiência de FVII e concluiu que não houve relação fenótipo e genótipo nos pacientes estudados, o que corrobora os dados da literatura. A maioria dos pacientes com deficiência de FVII moderada a leve são portadores de polimorfismos ou variações genéticas em homozigose. Baseado nesses resultados, constatamos que a realização da FVII:C para triagem pode ser realizado com tromboplastina de coelho, que se presta, na maioria dos casos, aos diagnóstico da deficiência de FVII. Entretanto, nos casos de baixos níveis plasmáticos de FVII:C uma nova dosagem utilizando tromboplastina humana deve ser realizada.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland science, Taylor & Francis Group, 2008. p.1268.

ALEXANDER, B. *et al.* Congenital SPCA deficiency: a hitherto unrecognized coagulation defect with hemorrhage rectified by serum and serum fractions. *J Clin Invest*, New York, v. 30, n. 6, p. 596-608, Jun 1951.

BALLEISEN, L. *et al.* Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: I. Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using, and menopause. *Thromb Haemost*, Stuttgart, v. 54, n. 2, p. 475-9, Aug 1985.

BERKNER, K. *et al.* Isolation and expression of cDNAs encoding human factor VII. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, New York, v. 51, Pt 1, p. 531-41, 1986.

BERNARDI, F. *et al.* Factor VII gene polymorphisms contribute about one third of the factor VII level variation in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Dallas, v. 16, n. 1, p. 72-6, Jan 1996.

BOLTIN, D. *et al.* Primary factor VII deficiency. *Isr Med Assoc J*, Israel, v. 10, n. 6, p. 475-6, Jun 2008.

BOWEN, D. J.; KEENEY, S. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb Haemost*. Germany, 2003. p. 201-2.

CLARK, D. P. *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution*. Oxford: Elsevier Academic Press, 2005.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ZAGO, M. A. *et al.* (Ed.). *Hematologia - fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 740-747.

FROMOVICH-AMIT, Y. *et al.* Characterization of mutations causing factor VII deficiency in 61 unrelated Israeli patients. *J Thromb Haemost*, Oxford, v. 2, n. 10, p. 1774-81, Oct 2004.

GIANSILY-BLAIZOT, M. Inherited factor VII deficiency. In: TCHERNIA, G. (Ed.). *Orphanet Encyclopedia*, Jun 2004. Disponível em: <<http://www.orpha.net/data/patho/Pro/en/FactorVIIDeficiency-FRenPro916.pdf>>. Acesso em 18 Nov. 2010.

GIANSILY-BLAIZOT, M. *et al.* Genotypic heterogeneity may explain phenotypic variations in inherited factor VII deficiency. *Haematologica*, Pavia, v. 87, n. 3, p. 328-9, Mar. 2002.

GIANSILY-BLAIZOT, M. *et al.* Analysis of biological phenotypes from 42 patients with inherited factor VII deficiency: can biological tests predict the bleeding risk? *Haematologica*, Pavia, v. 89, n. 6, p. 704-9, Jun 2004.

HAGEN, F. *et al.* Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 83, n. 8, p. 2412-6, Apr 1986.

HERRMANN, F. H. *et al.* Factor VII deficiency: clinical manifestation of 717 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor 7 gene. *Haemophilia*, Londres, v. 15, n. 1, p. 267-80, Jan 2009.

HOOD, J.; EBY, C. Evaluation of a prolonged prothrombin time. *Clin Chem*, New York, v. 54, n. 4, p. 765-8; discussion 768-9, Apr 2008.

JAYANDHARAN, G. *et al.* Molecular basis of hereditary factor VII deficiency in India: five novel mutations including a double missense mutation (Ala191Glu; Trp364Cys) in 11 unrelated patients. *Haematologica*, Pavia, v. 92, n. 7, p. 1002-3, Jul 2007.

MANDHYAN, R. *et al.* Congenital factor VII deficiency. *Br J Anaesth*, Altrincham, v. 104, n. 2, p. 267-8, Feb 2010.

MARIANI, G.; BERNARDI, F. Factor VII Deficiency. *Semin Thromb Hemost*, New York, v. 35, n. 4, p. 400-6, Jun 2009.

MARIANI, G. *et al.* Clinical manifestations, management, and molecular genetics in congenital factor VII deficiency: the International Registry on Congenital Factor VII Deficiency (IRF7). *Blood*, New York, v. 96, n. 1, p. 374, Jul 1 2000.

MATSUHISA, H. *et al.* Open-heart surgery in an infant with heterozygous factor VII deficiency. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 1037-8, Jun 2010.

McVEY, J. *et al.* Factor VII deficiency and the FVII mutation database. *Hum Mutat*, London, v. 17, n. 1, p. 3-17, 2001.

MEADE, T. *et al.* Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*, London, v. 2, n. 8506, p. 533-7, Sep 1986.

MONROE, D.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Dallas, v. 26, n. 1, p. 41-8, Jan 2006.

MORELLI, V. M. Estrutura e funções das plaquetas e das células endoteliais. In: ZAGO, M. A. *et al.* (Ed.). *Hematologia - fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 732-737.

O'BRIEN, D. P. *et al.* Purification and characterization of factor VII 304-Gln: a variant molecule with reduced activity isolated from a clinically unaffected male. *Blood*, New York, v. 78, n. 1, p. 132-40, Jul 1 1991.

O'HARA, P. J. *et al.* Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 84, n. 15, p. 5158-62, Aug 1987.

PERRY, D. Factor VII Deficiency. *Br J Haematol*, Oxford, v. 118, n. 3, p. 689-700, Sep 2002.

PERRY, D. J. Factor VII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Oxford, v. 14 Suppl 1, p. S47-54, Jun 2003.

PEYVANDI, F. *et al.* Molecular characterisation and three-dimensional structural analysis of mutations in 21 unrelated families with inherited factor VII deficiency. *Thromb Haemost*, Stuttgart, v. 84, n. 2, p. 250-7, Aug 2000.

POLLAK, E. *et al.* Asymptomatic factor VII deficiency in African Americans. *Am J Clin Pathol*, Baltimore, v. 126, n. 1, p. 128-32, Jul 2006.

RAO, L.; RAPAPORT, S. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 85, n. 18, p. 6687-91, Sep 1988.

RODRIGUES, D. N. *et al.* Prevalence of factor VII deficiency and molecular characterization of the F7 gene in Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Oxford, v. 14, n. 3, p. 289-92, Apr 2003.

ROSENTHAL, A. *et al.* Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res*, London, v. 21, n. 1, p. 173-4, Jan 1993.

SCARABIN, P. *et al.* Population correlates of coagulation factor VII. Importance of age, sex, and menopausal status as determinants of activated factor VII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Dallas, v. 16, n. 9, p. 1170-6, Sep 1996.

SHANKER, J. *et al.* Genotype-phenotype relationship of F7 R353Q polymorphism and plasma factor VII coagulant activity in Asian Indian families predisposed to coronary artery disease. *J Genet*, Bangalore, v. 88, n. 3, p. 291-7, Dec 2009.

TUDDENHAM, E. G. *et al.* Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology. *Thromb Haemost*, Stuttgart, v. 74, n. 1, p. 313-21, Jul 1995.

APÊNDICES

Apêndice A



CARTA-CONVITE

Belo Horizonte, de de 20 .

Prezado (a)

Tomo a liberdade de lhe escrever esta carta para convidá-lo a participar de uma pesquisa a ser iniciada na Fundação HEMOMINAS.

Estarei coordenando uma pesquisa que pretende estudar as causas genéticas da deficiência de fator VII para que possamos compreender melhor esta doença em nosso meio. Inicialmente estou convidando os pacientes portadores dessa deficiência, como é o seu caso.

Para que você seja incluído(a) neste estudo é preciso que você seja examinado(a) por mim, no ambulatório do HEMOMINAS, e que sejam colhidos 15 ml do seu sangue para realização de **exame de DNA** (para que possamos determinar o defeito genético associado à sua deficiência do fator VII). Esse exame não é para determinação de paternidade.

Vários benefícios serão advindos desta pesquisa, tais como a determinação do defeito genético que causa a sua deficiência e a determinação da condição de portador do gene da deficiência.

Os resultados deste estudo serão mantidos em segredo, podendo ser informados somente a você. Quando os resultados forem apresentados, serão mostrados em conjunto sem dizer que aquele teste é o 'seu ou de fulano'.

Sendo assim, solicitamos que você que telefone para a secretaria do ambulatório do HBH (3248 4511) para marcar a sua consulta. Forneceremos atestado de comparecimento para escola e/ou trabalho. Agradecemos desde já a sua colaboração.

Atenciosamente,

Suely Meireles Rezende

Isabel Figueiredo de M. Pereira

<p>Dra. Suely Meireles Rezende Doutora em Hematologia pela Universidade de Londres, Inglaterra Coordenadora do projeto</p>	<p>Isabel Figueiredo de M. Pereira Acadêmica do 10º período de Medicina – UFMG Estagiária da Fundação HEMOMINAS</p>
--	---

Apêndice B

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Estamos convidando você para participar da pesquisa “ Caracterização molecular da deficiência hereditária de fator VII em pacientes referenciados à Fundação HEMOMINAS” para que possamos compreender melhor a deficiência de fator VII em nosso meio. A deficiência de fator VII pode ser causada por defeito no gene que é responsável pela formação do fator VII (o fator que é deficiente no seu sangue). Gostaríamos de entender:

- 1- Quais são os defeitos genéticos que levam à deficiência de fator VII no nosso meio;
- 2- Qual a relação desses defeitos com a gravidade da doença;

À partir de então poderemos:

- 1- Diagnosticar se as pessoas da sua família são portadoras do gene que causa a deficiência;
- 3- Propiciar tratamento mais adequado para os pacientes, quando necessário.

A sua participação neste estudo é fundamental. Precisamos que você:

- 1- Seja examinado por um médico do ambulatório do HEMOMINAS;
- 2- Doe três tubos (10 ml no total) de sangue venoso para que seja realizada dosagem de fator VII e exame de DNA (para que possamos determinar o defeito genético associado à sua deficiência de fator VII).

O único risco para você estará relacionado à coleta de sangue (p. ex. a possibilidade de um hematoma no local da punção venosa) . Entretanto, vários benefícios serão advindos desta pesquisa, como dito acima.

Os resultados deste estudo serão mantidos sigilosos, podendo ser informados somente a você. Quando os resultados forem apresentados, serão mostrados em conjunto sem dizer que aquele teste é o “ seu ou de fulano”.

Eu consinto na minha participação na pesquisa descrita acima e tenho liberdade de não aceitar ou retirar o meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo à minha pessoa, caso não queira continuar participando da mesma.

Nome _____ do _____ participante: _____ N°

Prontuário: _____

Idade: _____ DN: ___/___/___ Estado civil: _____ Profissão:

Naturalidade: _____

Procedência: _____ Escolaridade: _____

Endereço _____ Residencial: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Telefone: _____

Endereço _____ Profissional: _____ E-

mail: _____

Nome e assinatura do responsável(em caso de menor): _____

Assinatura do paciente _____ Data:

___/___/___

Apêndice C

“Caracterização Molecular da Deficiência Hereditária de Fator VII em pacientes Referenciados à Fundação HEMOMINAS”

Avaliação clínica

Dados Gerais

Nome: _____

Prontuário: Data de nascimento: , , Idade: anos

Raça: Branca Não Branca Outra Sexo: (F ou M) Estado civil: (C;S;V;O)

Naturalidade: _____ Profissão: _____

Filiação: _____

Endereço atual: _____

Cidade: _____ Estado: E-mail: _____

CEP: - Telefone:

Dados da doença

Primeira consulta com suspeita de deficiência de fator VII: Data: , ,

Motivo: História familiar Sangramentos espontâneos Trauma Avaliação pré-operatória

História de sangramentos:

Epistaxe Equimoses Gengivorragias Extrações dentárias

Menorragias Metrorragias Enterorragias Outros: _____

Hemartroses Hematomas intramusculares
Local da hemartrose: _____ Local dos Hematomas: _____

Sangramento pós-cirúrgico Sangramento pós-traumático
Tipo de cirurgia: _____ Tipo de trauma: _____

Intensidade dos sangramentos: Leve Moderada Grave

História pregressa:

Cirurgias: (S ou N) Quais: _____

Internações: (S ou N) Motivo: _____

Outras doenças: (S ou N)

HAS DM Hipertrigliceridemia Tabagismo Etilismo

Transfusões sanguíneas: (S ou N) Datas: _____

Medicamentos em uso: _____

Sangramento pós-parto significativo: (S ou N) Uso de hormônios: (S ou N) G P A

História de TVP: (S ou N) História de EP: (S ou N)

História familiar para deficiência de fator VII: (P ou N) Consanguinidade: (S ou N)

Relato de prurido nas últimas consultas: (S ou N) Hipótese diagnóstica: _____

Acompanhamento ambulatorial progressivo:

	///	///	///	///	///	///	///	///	///
TP(segundos)									
AT(%)									

Fator II: % Fator V: % Fator IX: % Fator X: %

Provas de função hepática: (a mais atual) Data: //

TGO: TGP: GGT: BD: , BI: , BT: , F. alcalina:

Grupo sanguíneo: (AO;BO;OO;AB) Fator Rh: (P ou N)

Perfil sorológico: (o mais atual) Data: //

VDRL: Sífilis: T. cruzi: Chagas: HbsAg: Anti-Hbc: Anti-HCV:

Anti-HIV:ELISA 1: Anti-HIV:ELISA 2: Anti-HIV I/II (ELISA):

Estudo Familiar

Exame físicoFC: bpmPA: X mmHgFR: irpmPeso: , KgEstatura: , mIMC: , Data: , ,
Sinais ou sintomas de sangramentos na consulta atual: (S ou N)Seqüelas de hematomas e hemartroses: (S ou N)**Laboratório**

(Dados da consulta atual)

Exames de coagulação:

Data: , , PT: , segundos em , segundosAP: %PT: , segundos em , segundosAP: %

Imulologia:

Dosagem do Fator VII: %Dosagem do Fator VII: %

Estudo Molecular

Data: / /



A large empty rectangular frame occupying the majority of the page, intended for drawing or writing.

ANEXOS

Anexo A – Parecer Fundação Hemominas

 MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas		
PARECER CONSUBSTANCIADO		
1. Título do Projeto de Pesquisa: Caracterização molecular da deficiência hereditária de fator VII em pacientes referenciados à Fundação HEMOMINAS.		
SUJEITOS DA PESQUISA		
2. Número de sujeitos No Centro: 152 Total: 152	3. Grupos Especiais: Menor de 18 anos (<input checked="" type="checkbox"/>) Portador de deficiência mental () Embrão/feto () Relação de dependência (militares, presidiários...) () Outros () Não se aplica ()	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL		
4. Nome: Suelly Meireles Rezende		
5. Instituição a que pertence: Fundação HEMOMINAS		
INSTITUIÇÃO (ÕES) ONDE SERÁ REALIZADO		
6. Nome: Fundação Hemominas		
7. Unidade/Órgão:		
8. Participação Estrangeira: Sim () Não (<input checked="" type="checkbox"/>)		
9. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (<input checked="" type="checkbox"/>) Nacional () Internacional ()		
PATROCINADOR Não se aplica ()		
10. Nome: Fundação HEMOMINAS		
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP		
11. Data de Entrada: 13/06/03	12. Registro no CEP: 101	13. Data de análise: 04/07/03
14. Objetivos: Estabelecer a prevalência da deficiência do fator VII (FVII) nos pacientes e seus familiares atendidos no Ambulatório da Fundação Hemominas, conhecer os fatores causais responsáveis por esta deficiência, caracterizar molecularmente os casos de deficiência com suspeita de herança genética, e estabelecer um aconselhamento genético junto ao Serviço do Ambulatório da Fundação Hemominas.		
15. Sumário do Projeto: Serão reavaliados os 38 pacientes do Ambulatório da Fundação Hemominas registrados como deficientes em fator VII, bem como seus familiares. Serão realizados exames para determinação do tempo de protrombina, determinação da atividade de fator VII funcional e dosagem antigênica do fator VII, a fim de melhorar este diagnóstico inicial. A partir desta análise, os pacientes serão reclassificados, permitindo uma melhor adequação da terapêutica em deficiência de FVII nestes pacientes. Além disso, para os casos suspeitos de possuírem deficiência devido a causas genéticas, será feita a avaliação do gene do FVII para investigação de mutações, a partir da extração do DNA de amostras de sangue, ampliações de regiões do gene por PCR (reação em cadeia da polimerase), e seqüenciamento. Para todos estes exames, serão colhidos 15 ml de sangue de cada indivíduo participante. Confirmada alguma mutação, os familiares destes indivíduos também farão esta mesma caracterização molecular. Será posteriormente realizado, juntamente com o Serviço de atendimento do Ambulatório, o aconselhamento genético das famílias com deficiência de fator VII por causa genética.		
16. Comentário dos Relatores: O projeto encontra-se adequado às normas da Resolução 196/96, e foi aprovado.		
17. Parecer: Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Pendência () Não Aprovado () Data: 08/07/03 Data: Data:		
18. Encaminhamento a CONEP: Os dados acima para registro () O projeto para apreciação () Data:		19. Coordenador  Assinatura Carmelinda M. A. M. A. Coordenadora Geral de Serviço de Hematologia Fundação Hemominas

Anexo B – Parecer COEP - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 031/09

**Interessado(a): Profa. Suely Meireles Resende
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de abril de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Determinação das bases moleculares da deficiência hereditária de fator VII da coagulação**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. T. Marques Amaral', is positioned above the printed name.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

Anexo C - Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **FLÁVIA YANKOUS RABELO** nº de registro 2009655251. Às nove horas do dia **trinta de março de 2011**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação aprovada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“CARACTERIZAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FVII DA COAGULAÇÃO”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Suely Meireles Rezende, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Suely Meireles Rezende/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Cibele Velloso Rodrigues	Instituição: F Hemominas	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de março de 2011.

Profa. Suely Meireles Rezende/Orientadora _____

Profa. Cibele Velloso Rodrigues _____

Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes _____

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/Coordenadora _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Coord. PG em Ciências Aplicadas
à Saúde do Adulto
Faculdade de Medicina / UFMG

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

Anexo D - Declaração de Defesa de Dissertação de Mestrado



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Suely Meireles Rezende, Cibele Velloso Rodrigues e Ana Paula Salles Moura Fernandes, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“CARACTERIZAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FVII DA COAGULAÇÃO”**, apresentada pela mestranda **FLÁVIA YANKOUS RABELO**, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 30 de março de 2011.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Smeirelende'.

Profa. Suely Meireles Rezende
Orientadora

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Cibele'.

Profa. Cibele Velloso Rodrigues

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Paula Salles Moura Fernandes'.

Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes