

Dalva Nery Rodrigues

# ***Detecção de mutações em pacientes deficientes do fator VII***

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Biomédica – Dalva Nery Rodrigues.*

*Campinas, 27 de agosto de 2002.*



*Prof. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi  
- Orientadora -*

Campinas

2002



UNICAMP

i

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**Dalva Nery Rodrigues**

**Biomédica**

***Detecção de mutações em  
pacientes deficientes do fator VII***

Dissertação Mestrado a Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Farmacologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

**Fonte Financiadora:** FAPESP Processo nº 97/00216-9

Campinas  
2002



UNICAMP

UNIDADE BC  
CHAMADA UNICAMP  
R618d  
EX  
OMBO BCI 51501  
ROC 16.837100  
DX  
REÇO R\$ 11,00  
ATA 13/11/02  
CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

CM00176428-2

ID 267029

R618d

Rodrigues, Dalva Nery

Detecção de mutações em pacientes deficientes do fator VII / Dalva Nery Rodrigues. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Polimorfismo. 2. Mutação (Biologia). 3. Genética Molecular.
4. Hemostasia. I. Joyce Maria Annichino Bizzacchi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
- III. Título.



UNICAMP

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador:**

**Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi**

---

---

**Membros:**

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Prof. Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro

Prof. Dr. Elbio Antonio D'amico

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 27/08/2002

---

200254523

## ***Dedicatória***

*Aos meus queridos pais, Antonio e Maria de Lourdes,  
como reconhecimento por todas as vezes que  
renunciaram aos seus sonhos para que pudessem  
realizar os meus e por seus valiosos incentivos na  
busca de meus ideais.*

# ***Agradecimentos***

---

A Deus por ter enriquecido minha mente e meu espírito com sua divina graça e misericórdia, iluminando o meu caminho para que eu pudesse concretizar este meu objetivo.

À Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e idéias construtivas realizados neste trabalho, pela amizade e inúmeros favores prestados durante este período de convívio.

Ao Hemocentro, da Unicamp, que me proporcionou conhecimento e crescimento profissional.

A Fapesp que me proporcionou ajuda financeira para realizar o meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora da dissertação de mestrado, Profa.Dra. Maria de Lourdes e Prof. Dr. Elbio, pelas valiosas sugestões.

As Profas. Vera e Ana Elizabete, pelos ensinamentos e paciência durante as aulas de Inglês.

A todos os pacientes e seus familiares, sem os quais eu não poderia concretizar este trabalho.

As funcionárias do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia: Devanira, Ucha, Cristina, Andréia, Tânia e Silmara, pelo carinho, amizade, respeito, auxílio técnico, paciência, tomando-se uma grande família.

As secretárias Arlete e Nicete pela atenção durante a execução deste trabalho.

À Sandrinha, Rosana e Ricardo, que trabalharam na confecção e uniformização desta Tese, pelo cuidado, dedicação e disponibilidade.

Aos amigos da pós-graduação: Yajaira, Helena, Norma, Ana Cláudia e João, pelo carinho, incentivo e longas conversas.

Aos amigos da pós-graduação que já se foram: Liliane, Luciana e Jeferson, pelos ensinamentos técnicos e amizade.

A todos os funcionários e colegas dos Laboratórios de Aférese, CFU, Coleta dos Doadores, Fracionamento, HLA, Parasitologia e Terapia Gênica pela amizade e convívio agradável.

As colegas Cyntia, Guacira e Maria, pela valiosa amizade.

À Fátima (in memoriam) pela amizade e carinho prestado nas aulas de inglês.

Ao senhor Gerino, pela simpatia e as muitas cópias reproduzidas durante o curso.

À Lucia, Reginaldo e Anderson pela amizade e por manter o nosso material de trabalho sempre limpos.

As médicas: Paula, Barbara e Adriana, pela amizade e favores prestados.

Aos amigos: Roberto, Myrtha, Celina e Josiane que sempre estiveram ao meu lado colaborando para a realização deste trabalho.

Ao José Carlos pelo carinho, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos que direta ou indiretamente sempre me ajudaram.

As minhas primas: Elisa, Elisana e Evandra que me deram o prazer de ver a vida com mais alegria.

Aos Professores e funcionários do Colégio Luís Galhardo que me acolheram quando precisei.

Aos Professores Dr. Mithytaka Soma e Luisa Ishikawa Ferreira da Puc-Campinas, pelo valioso convívio.

As assistentes sociais Rosana e Maria Luisa, que muito colaboraram nas convocações dos pacientes.

E a todos aqueles que se sentirem esquecidos, muito obrigada.

*O senhor meu Pai que me dá toda essa inspiração fazendo  
me sentir não o maior nem o melhor...*

*Apenas seguir minha missão...*

*Através das dádivas que do Senhor recebo...*

*Peço-lhe de coração, daí-me força para que meus atos e as  
minhas palavras não machuquem meu irmão.*

*Que o meu coração esteja sempre aberto em paz, e que toda  
nossa existência seja coroada de esperança e amor.*

(Luiz Carlos S. Ribas)

# Abreviações

---

aa	Aminoácido
CSGE	Eletroforese em gel sensível a conformação
Da	Dalton
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
FVII	fator VII
kb	Kilobases
M	Molar
mM	Milimolar
ND	Não determinado
Pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pH	Pontencial hidrogeniônico
(p/v)	Peso por volume
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SSCP	Polimorfismo de conformação de hélice simples
TBE	Tampão borato Tris EDTA
TEMED	(N,N,N',N'-tetrametilenodiamino)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTE	Tampão Tris Taurina EDTA
V	Volt
V/h	Volt por hora
(v/v)	volume por volume

# *Índice de Figuras*

---

<b>Figura 1.</b>	Vias de ativação do fator VII.....	40
<b>Figura 2.</b>	Polimorfismos do gene do F7.....	46
<b>Figura 2.</b>	Heredograma da família do paciente FVII-4.....	81
<b>Figura 3.</b>	Análise do SSCP e sequenciamento do paciente FVII-4.....	81
<b>Figura 4.</b>	Heredograma da família do paciente FVII-6.....	82
<b>Figura 5.</b>	Análise do CSGE e sequenciamento do paciente FVII-6.....	82
<b>Figura 6.</b>	Heredograma da família do paciente FVII-8.....	83
<b>Figura 7.</b>	Análise do SSCP e sequenciamento do paciente FVII-8.....	83
<b>Figura 8.</b>	Heredograma da família do paciente FVII-13.....	84
<b>Figura 9.</b>	Análise do CSGE e sequenciamento do paciente FVII-13.....	84
<b>Figura 10.</b>	Heredograma da família do paciente FVII-15.....	85
<b>Figura 11.</b>	Análise do CSGE e sequenciamento do paciente FVII-15.....	85
<b>Figura 12.</b>	Heredograma da família do paciente FVII-17.....	86
<b>Figura 13.</b>	Análise do CSGE e sequenciamento do paciente FVII-7.....	86

# *Índice de Tabelas*

---

<b>Tabela I.</b>	Sequência dos oligonucleotídeos.....	62
<b>Tabela II.</b>	Alelos polimórficos.....	78
<b>Tabela III.</b>	Padrões eletroforéticos do SSCP e CSGE.....	79
<b>Tabela IV.</b>	Resultados das dosagens dos fatores VII, IX, X e RNI dos pacientes estudados.....	80

<b>RESUMO</b> .....	xxiii
<b>SUMMARY</b> .....	xxix
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	34
1.1 FVII e Coagulação sanguínea .....	36
1.2 Estrutura protéica do Fator VII.....	40
1.3 Clonagem e caracterização do gene .....	43
1.4 Polimorfismos no gene do fator VII.....	45
1.5 Deficiência hereditária do fator VII.....	46
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	49
<b>3 - CASUÍSTICA</b> .....	51
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	57
4.1 Coleta de sangue.....	58
4.2 Determinação da atividade e antígeno de fator VII .....	58
4.3 Extração de DNA .....	59
4.4 Ampliação pela PCR.....	61
4.5 Método de Triagem de Mutações.....	65
4.5.1 SSCP .....	66
4.5.2 CSGE .....	66
4.6 Sequenciamento .....	68
4.7 Determinação de cinco polimorfismos no gene do F7.....	71
<b>5 - RESULTADOS</b> .....	73
<b>6 - DISCUSSÃO</b> .....	87
<b>7- CONCLUSÕES</b> .....	100
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	101

## **RESUMO**

---

O fator VII humano é uma glicoproteína dependente da vitamina K que tem a função de iniciar a coagulação sanguínea, ao formar um complexo com o fator tissular.

O gene do fator VII está localizado no cromossomo 13q34, é composto por 9 exons e 8 introns, e possui 12,8 kb.

A deficiência do fator VII é transmitida por herança autossômica recessiva, e os aspectos clínicos são muito variáveis, nem sempre havendo uma correlação entre a atividade do fator VII e a tendência hemorrágica.

Apenas um estudo, em 705 doadores de sangue de origem inglesa, determinou que a prevalência da deficiência de fator VII foi de 2,1%.

A origem étnica da população brasileira é muito diferente, sendo altamente heterogênea e composta de imigrantes da Europa, África, Ásia e indígenas.

Neste estudo a prevalência da deficiência de fator VII em 267 pacientes brasileiros acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro-Unicamp, por alteração laboratorial do tempo de protrombina, ou quadro clínico hemorrágico foi de 3,7%.

A análise das mutações no gene do F7 em seis pacientes não relacionados, permitiram a identificação de um defeito genético em todos os pacientes, incluindo uma nova mutação de ponto. O rastreamento das alterações moleculares foi realizado pelos métodos de SSCP e CSGE, que se mostraram complementares.

O método de SSCP evidenciou um padrão anormal em dois pacientes não relacionados, referente a mutação G10828A no exon 8, levando a substituição R304Q.

O CSGE revelou quatro padrões anormais referentes a três mutações no exon 8 (G10846T que corresponde a C310F; G10828A que corresponde a R304Q; e G10909A que corresponde a G331D) e uma mutação no exon 6 (G8926T que corresponde a I140S), esta a única ainda não descrita anteriormente.

A atividade plasmática do fator VII varia significativamente inter e intra-individualmente. Essas variações podem ser decorrentes de fatores adquiridos e genéticos. Assim determinamos cinco polimorfismos no gene do fator VII (5'F7, IVS7, R353Q, -401G/T e -402G/A), mas apesar do pequeno número de pacientes analisados, não se detectou nenhuma relação entre os genótipos e a atividade do fator VII.

## **SUMMARY**

---

Factor VII is a vitamin K-dependent glycoprotein with a pivotal role in the initiation of the blood coagulation, following interaction with tissue factor.

The Factor VII gene is located on chromosome 13q34 and consists of nine exons and eight introns spanning 12,8Kb.

Factor VII deficiency is transmitted as an autosomal recessive trait, the incidence of the disorder in the general population being 1 in 500,000.

The clinical manifestations of Factor VII deficiency are variable, and there is no correlation between coagulation activity and tendency to bleed.

A prevalence of 2,1% was reported for Factor VII deficiency in a series of 705 English blood donors. In the present study, the prevalence of Factor VII deficiency based on an altered prothrombin time or hemorrhagic state 267 Brazilian patients attended at the Hemostasis Ambulatory of Hemocentre at UNICAMP was 3,7%.

Analysis of the Factor VII gene in six unrelated patients revealed a genetic defect in all cases, including a new point mutation. The screening for molecular alterations was done using SSCP and CSGE, which gave complementary results.

SSCP gave an abnormal pattern in two unrelated patients in which the mutation G10828A in the exon 8, resulted in the substitution R304Q.

CSGE identified four abnormal patterns resulting from three mutations in exon 8 (G10846T corresponding to C310F; G10828A corresponding to R304Q; and G10909A corresponding to G331D) one mutation in exon 6 (G8926T corresponding to I140S), the only one of these mutations not already described.

Plasma Factor VII activity showed considerable inter-and intra-individual variation which may have resulted from acquired or genetic factors.

Five polymorphisms in the Factor VII gene, which can contribute to Factor VII level variation were described (5'F7, IVS7, R353Q, -401G/T and -402G/A). However, the study of these patients with FVII deficiency demonstrated no relationship between the genotypes and Factor VII activity.

# **INTRODUÇÃO**

---

O sistema hemostático é responsável pela manutenção do sangue fluido dentro do sistema vascular, através do equilíbrio entre os componentes que compõem esse sistema. A alteração desses componentes pode desencadear um quadro clínico caracterizado por sangramento ou trombose (Tuddenham and Cooper, 1994).

Os fatores que compõem a hemostasia são o endotélio vascular, as plaquetas, o sistema de coagulação e fibrinólise. O endotélio vascular normal mantém o sangue fluido inibindo a coagulação e a agregação plaquetária e promovendo a fibrinólise. As plaquetas participam da hemostasia, formando um agregado plaquetário e acelerando o processo de coagulação sanguínea, em locais de exposição do subendotélio. A coagulação sanguínea é decorrente de uma série de reações enzimáticas, na qual os fatores de coagulação, zimógenos de serino-proteases, são convertidos em enzimas ativas. Essas enzimas atuam convertendo seu procofatores em cofatores, favorecendo a aproximação dos diversos fatores de coagulação a nível das superfícies celulares. A natureza sequencial das reações, na qual os produtos funcionam como a próxima enzima, amplifica a velocidade da reação. O evento final é a formação do coágulo de fibrina.

Também participam da hemostasia, vários anticoagulantes naturais, que evitam que o processo de prevenção de sangramento leve a um quadro trombótico.

A fibrinólise é um processo análogo de transformação de zimógenos em enzimas proteolíticas, que resulta na formação de plasmina, que tem o papel de hidrolizar o coágulo de fibrina.

### **Fator VII e Coagulação Sanguínea**

Fisiologicamente, em situações normais, a ativação da coagulação não ocorre na circulação sanguínea. Esta ativação vai depender de fatores desencadeantes, como resultado de uma injúria mecânica ou alterações bioquímicas. Apesar de esquematicamente a coagulação sanguínea estar dividida em vias intrínseca e extrínseca, esta separação não ocorre. O fator crítico para o início da coagulação é o fator tissular, que é um receptor de membrana celular para o fator VII e VIIa.

O fator tissular é expresso na grande maioria das células que normalmente não tem contato direto com o sangue. Após uma injúria vascular esse contato pode se iniciar. Também, mediadores como a endotoxina, podem estimular os monócitos e células endoteliais, a sintetizarem citocinas, fator de necrose tumoral e interleucina-1, que induzem a biosíntese do fator

tissular. O fator tissular é o único fator da coagulação sanguínea que não requer proteólise para se tornar ativado.

O fator tissular liga-se com uma alta afinidade, tanto ao fator VIIa como ao fator VII, formando um complexo 1:1 na superfície celular. Após a ligação ao fator tissular, o fator VII é rapidamente convertido a fator VIIa, tanto pelo fator Xa como IXa. Contudo, é importante salientar que o fator VII ligado ao fator tissular apresenta uma auto-ativação.

Fisiologicamente, o fator VII é o único que circula na sua forma ativada em pequenas concentrações no plasma, representando 1% do fator VII total. Isto poderia explicar em parte como a coagulação sanguínea pode se iniciar em meio a tantos precursores inativos no plasma, além de que a maior parte dos fatores de coagulação ativados apresentam uma vida média muito curta, sendo rapidamente inativados por seus inibidores.

Somente o complexo fator tissular/VIIa é enzimaticamente ativo. Esse complexo pode ativar a coagulação sanguínea por 2 vias: na primeira ocorre ativação do fator IX por proteólise, e na segunda via ativa diretamente o fator X, que parece ser o mecanismo predominante nos estudos *in vitro* (figura 1).

Esta reação é altamente regulada pelo complexo formado entre o fator Xa e o inibidor da via extrínseca (TFPI), uma proteína sintetizada pelas células endoteliais. Este inibidor liga-se primeiramente ao fator Xa e então forma

um tetrâmero com o fator tecidual/fator VII.

Quando o fator VIIa ligado ao fator tissular incorpora-se a fosfolipídios, sua atividade sobre os fatores IX e X é potencializada milhares de vezes. Isto porque a concentração desses substratos localmente fica muito aumentada, e parece que o fator tissular promove uma maior superfície de ligação para substratos maiores.

Vários estudos empregaram técnicas de mutagênese direcionada, com o objetivo de investigar os sítios de ligação entre o fator VII e o fator tissular. Esses estudos demonstraram que certas ligações são importantes na estabilidade do complexo formado, e outras para potencializar a ação enzimática do fator VIIa ao aumentar a afinidade do substrato pelo fator VII. Na presença do TFPI, a via de propagação da coagulação é a intrínseca, via fator IXa. O fator IX pode ser ativado pelo fator XIa, independente da via extrínseca. O papel das proteínas de contato (fator XII, procalicreína e cininogênio de alto peso molecular) nessa fase é questionável, pois suas deficiências não estão associadas a sangramento.

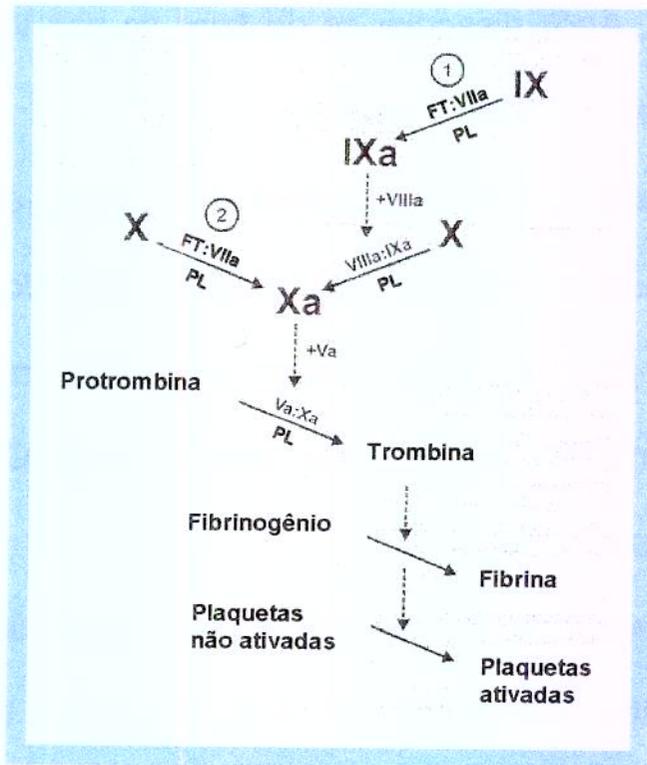
Contudo, a fase de contato pode iniciar-se pela ligação do fator XII a uma superfície negativa, auto ativando-se. Posteriormente atuará sobre a procalicreína e o fator XI, formando calicreína e fator XIa.

O fator IXa, ativado tanto pela via intrínseca como pela extrínseca, forma um complexo com o fator VIIIa, complexo tenase, que posteriormente ativa

o fator X. O fator VIII é um cofator que circula no plasma ligado ao fator de von Willebrand. Após dissociar-se do fator de von Willebrand o fator VIII é ativado pelos fatores Xa e trombina.

Uma vez formado, o fator Xa catalisa a formação de trombina a partir da protrombina, lentamente. Contudo, a associação do fator Xa ao fator Va, ativado tanto pelo Xa como pelas primeiras moléculas de trombina formadas, potencializa enormemente essa reação. O complexo fator Xa/Va é denominado protrombinase.

A trombina gerada atua sobre múltiplos substratos, incluindo o fibrinogênio, os fatores V, VIII e XIII, proteínas C e S. Portanto, a trombina tem um papel central na coagulação. A trombina atua sobre o fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A e B, resultando na formação dos monômeros e polímeros de fibrina. A resistência da fibrina à degradação pela plasmina depende das ligações mediadas pelo fator XIIIa e da ligação da  $\alpha_2$ -antiplasmina ao coágulo.



**Figura 1.** Vias de ativação da coagulação sanguínea pelo complexo Fator tissular-fator VII ativado.

### Estrutura protéica do Fator VII

O fator VII é uma glicoproteína de cadeia única, composta de 406 aminoácidos e PM de 50 KDa. O fator VII é sintetizado no fígado e circula no plasma numa concentração de 500ng/mL.

Os domínios estruturais do fator VII constituem-se, a partir da região amino-terminal, de um domínio rico em ácido  $\gamma$ -carbóxi-glutâmico (domínio

GLA), separado por uma hélice aromática, de 2 domínios de fator de crescimento epidermal (domínio EGF), e do domínio catalítico serina, caracterizado pela tríade His193, Asp242 e Ser344. Estudos demonstraram que o fator VII apresenta domínios estruturais semelhantes aos fatores IX, X e proteína C, além de uma organização genética semelhante de exons e introns.

O fator VII, como as outras proteínas vitamina K-dependentes, apresenta um peptídeo sinalizador na sua porção amino-terminal, que direciona a secreção da proteína no retículo endoplasmático, seguido de um propeptídeo, que permite modificações dos resíduos ácido-glutâmicos no domínio GLA a nível celular. O peptídeo sinalizador e o propeptídeo são removidos antes da secreção da proteína.

O fator VII contém 10 resíduos ácido-glutâmicos, resultantes de modificações durante sua biosíntese. Essas modificações são essenciais para sua atividade, uma vez que possibilitam a ligação reversível do fator VII ao cálcio e conseqüentemente às membranas fosfolipídicas com carga negativa.

A hélice aromática, adjacente ao domínio GLA, consiste de uma pequena sequência de aminoácidos, e apesar de ser codificada por outro exon, é considerada como parte do domínio GLA.

O domínio serina-protease é homólogo às enzimas tripsina e quimotripsina. Como muitas outras serina-proteases da coagulação, este domínio liga-se a um único íon cálcio. A conversão do fator VII a fator VIIa ocorre pela clivagem da ligação peptídica Arg152-Ile153. Como consequência, o fator VIIa é composto de 2 cadeias polipeptídicas, unidas por uma ponte dissulfídica. A cadeia leve compreende o domínio GLA, a hélice aromática e os 2 EGF, tendo 152 aminoácidos, e um PM de 20KDa. A cadeia pesada é que possui o sítio catalítico da molécula, compreende 254 aminoácidos e aproximadamente 30KDa. Ao contrário de muitas outras proteínas da coagulação, a ativação do fator VII não gera a liberação de nenhum peptídeo.

O fator VII contém 2 cadeias de carboidratos na porção N-terminal, ligados aos resíduos Asn145 e Asn 322. Também apresenta 2 pequenas cadeias de carboidratos ligados ao primeiro domínio EGF: glicose, glicose-xilose ligada a Ser52, e uma fucose ligada a Ser60.

O fator VII pode ser isolado do plasma por cromatografia convencional, ou por cromatografia utilizando anticorpos monoclonais. O fator VII recombinante pode ser produzido em cultura de células de mamíferos.

## Clonagem e caracterização do gene

O cDNA que codifica o fator VII foi isolado por Hagen et al (1986). O sequenciamento deste clone permitiu a determinação da sequência de aminoácidos do fator VII. A região codificadora compreende 1398pb que resultarão em um peptídeo de 60 aminoácidos, seguidos por 406 aminoácidos da proteína madura. As regiões não codificadoras 5' e 3' de 35 e 1026pb respectivamente, também foram identificadas. A ausência de 65 nucleotídeos de um dos clones de cDNA foi interpretado como um processo alternativo de transcrição do RNA. Isto resulta na remoção dos aminoácidos -18 a -39 e um peptídeo sinalizador de 38 aminoácidos, ao invés de 60 aminoácidos, como encontrado no fator II, proteína C, e fator IX (Berkner et al, 1986).

A análise de clones genômicos do fator VII humano permitiram a caracterização do gene (O'Hara et al, 1987), que consiste de 9 exons separados por 8 introns, com um tamanho de aproximadamente 12,8 kb. Os exons variam em tamanho, de 25pb até 1600pb para o exon 8, que codifica o sítio ativo da molécula. O exon 1b está ausente em aproximadamente 90% dos mRNA do fator VII (Berkner et al 1986).

Os *splice site* seguem o padrão consenso (Breathnach e Chambon, 1981).

Apesar da posição dos introns do fator VII ser homóloga ao das outras

proteínas vitamina K dependentes, o comprimento das regiões não codificadoras varia consideravelmente (O'Hara et al 1987). O intron C do fator VII e da proteína C não são muito diferentes, sugerindo um ancestral comum para esses 2 genes. Apesar de nenhum TATA box ter sido encontrado, a sequência do gene de -366 a -260 exibe considerável homologia com regiões e possíveis elementos promotores dos genes do fator IX e da proteína C (O'Hara et al, 1987).

Somente uma sequência de poliadenilação (AATAAA) está presente na região 3' do gene do fator VII, 980pb após o codon de terminação. Entretanto, a caracterização de vários clones de cDNA (Hagen et al 1986) mostrou três sequências alternativas de poliadenilação localizados 15, 19 e 41pb após o AATAAA.

Várias outras regiões sequenciais desempenham um papel na formação da região final 3' do mRNA, incluindo um CACTG (Berget, 1984)

e sequências ricas em (G) (revisado por Proudfoot e Whitelow, 1988).

As mutações do gene do FVII combinada com a descrição da estrutura cristalográfica do fator VIIa, proporcionou uma nova compreensão da estrutura/função desta proteína. A identificação de novas mutações promove o conhecimento da relação genótipo/fenótipo na deficiência do fator VII.

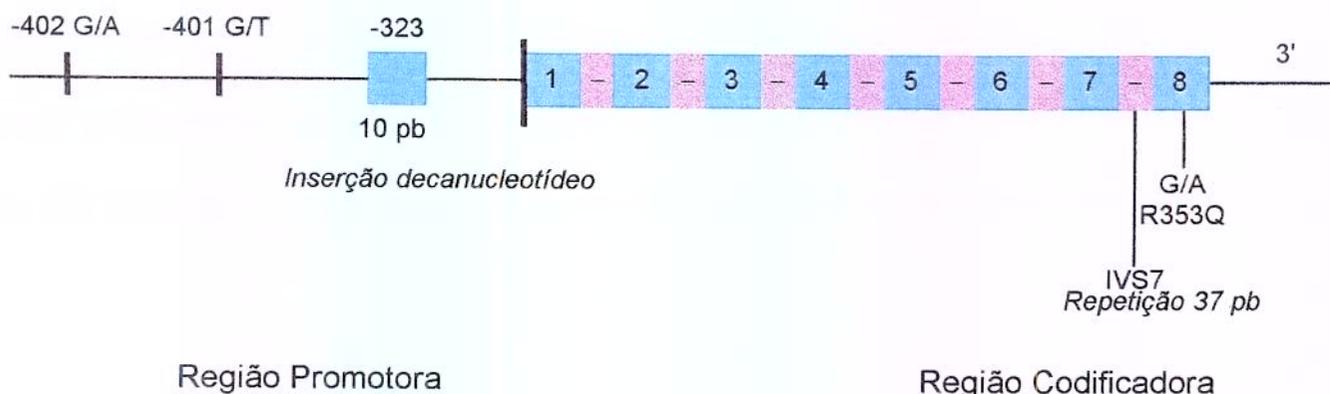
Os animais "knockout" são excelentes modelos para se avaliar a função de

um gene em estudo. O fator VII é o único fator conhecido que se liga ao fator tissular. Portanto, embriões knockouts deficientes em fator VII deveriam ter um fenótipo semelhante à deficiência de fator tissular, caracterizada por uma circulação embriônica defeituosa com alterações vasculares e morte aos 9 dias de gestação. Contudo, o que se verificou é que esses animais apresentaram um desenvolvimento embrionário normal, mas com hemorragia letal nas primeiras 24 horas de vida (Rosen ED et al, 1997).

### **Polimorfismos no gene do fator VII**

O gene do fator VII é muito polimórfico e recentemente foram descritos vários polimorfismos, associados a atividade coagulante deste fator: a inserção/deleção de um decanucleotídeo na região promotora, a repetição de um monômero no intron 7, as trocas de um G por um T na posição -401, de um G por A na posição -402, e de um G por A no códon 353 do exon 8. Inúmeros estudos analisaram esses polimorfismos em pacientes com doença arterial, mas os resultados são muito variáveis e às vezes contraditórios (Bernardi, van Hooft) (Figura 2).

Em um estudo publicado no último ano, a análise de alguns desses polimorfismos em pacientes com deficiência de fator VII não evidenciou nenhuma associação com os níveis de fator VII (Millar et al 2000).



**Figura 2.** Polimorfismos do gene do fator VII

### Deficiência hereditária do fator VII

A deficiência do fator VII é considerada rara, e é transmitida por herança autossômica recessiva (Cooper et al, 1997). Indivíduos com deficiência grave do fator VII podem apresentar sangramentos associados a risco de vida, contudo não há uma boa correlação entre a atividade coagulante do fator VII e a tendência hemorrágica. Além disso, há relatos de famílias com redução da atividade do fator VII e tendência a trombose.

As bases moleculares da deficiência do fator VII tem sido determinadas pelo estudo de inúmeros indivíduos portadores da doença, resultando na

identificação de uma variedade de mutações de ponto que acometem a região codificadora e de splice site, assim como mais raramente, mutações caracterizadas por pequenas deleções ou mutações na região promotora do gene do fator VII. Segundo o último database, mais de 70 mutações já foram descritas até o momento (MCVEY et al, 2001, FVII database, europium.csc.mrc.ac.uk).

Na população geral, a deficiência hereditária do fator VII é referida como 1 em 500.000 indivíduos.

A deficiência do fator VII pode ser assintomática, nos casos leves e moderados, até situações com sangramento importante, como nos casos graves. Pacientes assintomáticos apresentam níveis de atividade do fator VII superiores a 20% e são heterozigotos, duplo heterozigotos ou homozigotos. Pacientes com deficiência moderada, caracterizada por níveis de atividade entre 2 e 20%, podem ser duplo heterozigotos ou homozigotos para mutação missense do gene do fator VII. A deficiência grave caracteriza-se por níveis de fator VII muito reduzidos ou não detectáveis, e freqüentemente está relacionada a mutações afetando os sítios de *splice* ou *frameshifts* (MARIANI G et al, 1998).

Em 1981, Ragni et al, revisou 138 pacientes classificados como portadores da deficiência do fator VII, porém este diagnóstico somente foi confirmado em 75 casos. A proporção entre os sexos foi de 1 para 1, com

aproximadamente 20% de consangüinidade nas 63 famílias dos 75 pacientes estudados. A hemorragia no sistema nervoso central ocorreu em 16% dos casos, e neste grupo havia 44% de consangüinidade. Isto sugere que a homozigose para certas mutações que causam deficiência de fator VII estão associado com um fenótipo com quadro clínico hemorrágico mais grave.

É interessante citar que alguns pacientes com deficiência de fator VII apresentam uma discrepância entre os níveis indetectáveis de atividade do fator VII utilizando-se fator tissular de coelho, e o quadro clínico hemorrágico muito leve (O'BRIEN et al, 1991). O que se verificou é que quando a dosagem da fator VII foi realizada com fator tissular humano recombinante os níveis aumentaram para aproximadamente 30%. A alteração protéica caracterizava-se por uma ligação anormal ao fator tecidual, que é espécie-específica. A mutação responsável por este defeito é a substituição da Arg por Gln no resíduo 304.

## **OBJETIVOS**

---

Visto que:

- A deficiência do fator VII é uma doença rara;
- É importante compreender os mecanismos genéticos relacionados à deficiência do fator VII;
- No Brasil, a deficiência do fator VII ainda não foi caracterizada do ponto de vista molecular;

Este trabalho teve por objetivos analisar:

- ❖ a prevalência da deficiência de FVII em pacientes com doenças hemorrágicas.

E em um grupo de pacientes brasileiros com deficiência de fator VII

- determinar as mutações no gene do F7
- a transmissão familiar das mutações identificadas
- Verificar a influência de cinco polimorfismos localizados no gene do F7 sobre a concentração do fator VII

## ***CASUÍSTICA***

---

Durante o período de janeiro de 1996 a dezembro de 2000, foram avaliados no ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp 267 pacientes, para diagnóstico e tratamento de doenças hemorrágicas, caracterizadas por quadro clínico de sangramento ou apenas por alteração de exame laboratorial de coagulação sanguínea.

O diagnóstico de deficiência de fator VII foi estabelecido em 10 pacientes, levando a uma prevalência de 3.74%. Seis pacientes eram do sexo feminino e 4 do sexo masculino, sendo 6 caucasóides e 4 negróides, com uma idade média de 22 anos (desvio padrão 8.73 anos). Dois pacientes eram assintomáticos e somente procuraram o atendimento por alargamento do tempo de protrombina em exame pré-operatório. Os 8 pacientes restantes apresentavam sangramento cutâneo-mucoso caracterizado por epistaxe e menorragia. Três pacientes apresentaram quadro clínico hemorrágico mais importante, necessitando de transfusão sanguínea.

Dos 10 pacientes com deficiência de fator VII apenas 6 concordaram em participar do projeto de análise molecular do gene do fator 7. Dois pacientes eram assintomáticos, 2 apresentaram sangramento menor e 2 apresentaram sangramento grave.

Os familiares também foram convocados para avaliação, para verificar a cosegregação da mutação genética e da deficiência do fator VII.

O quadro clínico de cada um dos pacientes participantes deste estudo está descrita em detalhes a seguir.

### ***Caso Clínico 1***

**Registro:** (FVII-4)

**Idade:** 30

**Sexo:** feminino

**Raça:** negróide

**Dados clínicos:** A paciente apresentou um quadro purpúrico, caracterizado por petéquias em membros, com piora no período menstrual. A biópsia de pele foi compatível com farmacodermia. Nos antecedentes pessoais referia menorragia desde a menarca. Antecedente familiar negativo.

## **Caso Clínico 2**

**Registro:** FVII-6

**Idade:** 30 anos

**Sexo:** feminino

**Raça:** caucasóide

**Dados clínicos:** A paciente relatava epistaxe espontânea unilateral, desde a infância, tendo sido descartada causa local em avaliação pela otorrinolaringologia. Apresentou sangramento após uma extração dentária. Teve 3 episódios de hemorragia menstrual, aos 12, 19 e 22 anos, recebendo transfusão em um deles. Os pais são primos em primeiro grau.

## **Caso Clínico 3**

**Registro:** FVII-8

**Idade:** 36 anos

**Sexo:** masculino

**Raça:** negróide

**Dados Clínicos:** O paciente apresentou um alargamento do tempo de protrombina (RNI) em exame pré-operatório, para cirurgia oftalmológica. O paciente negava qualquer antecedente hemorrágico, tanto pessoal como familiar.

#### ***Caso Clínico 4***

**Registro:** FVII - 13

**Idade:** 24 anos

**Sexo:** feminino

**Raça:** caucasóide

**Dados Clínicos:** A paciente apresentava quadro de menorragia desde a menarca. Teve melhora espontânea da menstruação, mas como apresentava muitas equimoses e relatava o aparecimento de 2 hematomas foi encaminhada para investigação.

#### ***Caso Clínico 5***

**Registro:** FVII – 15

**Idade:** 9 anos

**Sexo:** masculino

**Raça:** negróide

**Dados Clínicos:** O paciente apresentou epistaxe bilateral intensa, de aparecimento espontâneo, aos 4 anos de idade. A avaliação pela otorrino não evidenciou nenhuma causa local. Às vezes apresentava equimoses em local de trauma. Negava história familiar para doença hemorrágica ou consanguinidade.

## **Caso Clínico 6**

**Registro:** FVII-17

**Idade:** 19 anos

**Sexo:** feminino

**Raça:** caucasóide

**Dados Clínicos:** A paciente apresentou alargamento do tempo de protrombina (RNI) em exame pré-operatório. Antecedente pessoal e familiar negativo para doença hemorrágica.

## ***MÉTODOS***

---

A análise e o diagnóstico laboratorial da deficiência do fator VII foram concluídos a partir de dados clínicos e laboratoriais, através das dosagem tanto da atividade como da concentração antigênica do fator VII.

A análise molecular foi realizada por métodos de triagem que incluíram o SSCP e o CSGE, seguidos de sequenciamento.

### **Coleta da sangue:**

Para as dosagem de fator VII foram colhidos 4,5 ml de sangue com 0,5 ml de citrato de sódio, numa concentração de 3,8%. Logo após a coleta o sangue foi centrifugado a 4000 rpm, e o plasma foi rapidamente congelado a -80°C.

Para obtenção do DNA foram coletados 20 ml de sangue periférico com anticoagulante EDTA (10%). Após lise das hemácias, o *pellet* de leucócitos foi separado e armazenado a - 80°C, até que o DNA fosse extraído.

### **Determinação da atividade e antígeno de fator VII**

A atividade do fator VII foi avaliada por método de coagulação (Triplett et al, 1985), utilizando-se o plasma deficiente em fator VII (Dade, Miami, USA), tromboplastina derivada de cérebro de coelho (Dade, Miami, USA), e um calibrador.

A variação normal da atividade do FVII foi estabelecida no laboratório, pela sua dosagem em 100 plasmas normais. Os resultados foram expresso em %.

Nos casos em que os pacientes foram convocados e compareceram para uma nova coleta (4 pacientes) a dosagem de fator VII também foi realizada empregando-se tromboplastina recombinante humana (Organon, Durham, USA).

O antígeno do fator VII foi determinado utilizando-se um anticorpo monoclonal, baseado na técnica de Elisa utilizando-se o kit Asserachrom (Diagnostica Stago), e os resultados foram expressos em %.

### **Extração do DNA de sangue periférico**

Para lise e separação do *pellet*, os 20 ml de sangue colhidos com EDTA foram centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm a 4°C, descartando-se o plasma. Ao precipitado foram adicionados 5 volumes de cloreto de amônia 144 mM e 1/2 volume de bicarbonato de amônia 10 mM, sendo misturados por inversão, para lisar as hemácias. Após 15 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras por 20 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a partir de 5 ml do sedimento obtido adicionou-se o tampão TKM 1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 10 mM,

MgCl<sub>2</sub> 10 mM EDTA 0,2 mM) e 125 µl de Triton-X100 (Sigma); misturou-se por inversão e então o material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em 5 ml de tampão TKM 1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspensão em 0,8 ml de tampão TKM 2 (NaCl 400 mM, KCl 10 mM, Tris- HCl 10 mM, pH 7,6 MgCl<sub>2</sub> 10 mM) e 50µl de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio) para lisar os leucócitos, e incubado em banho-maria a 55°C por 20 minutos. Após esse período acrescentou-se 300µl de NaCl 5M, para precipitação de proteínas, misturado por inversão e então centrifugado novamente por 10 minutos a 12000 rpm.

O sobrenadante recolhido foi submetido à extração através da adição de 500µl de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v) e 500µl de fenol redestilado e saturado com Tris-HCl pH 8,0, seguida de centrifugação por 5 minutos a 12000 rpm. Este procedimento foi repetido somente com 1000µl de clorofórmio/álcool isoamílico. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 2 volumes de etanol a 100% e 0,2 volumes de acetato de sódio 3M para precipitação do DNA. Incubou-se a -20°C por aproximadamente 2 horas, sendo centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com 1 ml de etanol 70% gelado, centrifugando-se novamente. Descartou-se o

sobrenadante e secou-se o precipitado de DNA obtido à temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi resuspenso em quantidade apropriada de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) e deixado durante a noite a 4°C para total dissolução. Sua concentração foi estimada em espectrofotômetro através do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nM.

### **AMPLIFICAÇÃO PELA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)**

A amplificação do DNA genômico dos exons do fator VII foi realizada segundo o procedimento descrito por Saiki et al., (1988), utilizando-se os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1.

**Tabela I.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos exons do gene do fator VII.

Exon	Sequência	Posição	Tamanho
1A	GGAATGTCAACAGGCACGGG ACTGCCCTTCCACCAAGTTT	-41 a -22 +90 a +109	150pb
1B	GCTCACAGCATGGCCTTATG CACTGGGCCCCAGGACAAAA	+1091 a 1109 +1219 a 1239	149pb
2	AAGGATGGGCGAACGGGGTG TTCACCGCCGCCGTGCAGTG	+3730 a 3750 +3960 a 3980	350pb
3-4	GGGTGCTCTGGTGAAGGTGC CAGCTCCCCAGGGCCCTCTG	+5810 a 5830 +6100 a 6120	340pb
5	CTGACCCCCAGAAGCCCCTC CTAGTGGGACAGGGACTGGT	+7740 a 7760 +7960 a 7980	292pb
6	TAGTGGCACGTTCATCCCTC AAGGCTTCAAGACCCTCAGG	+8840 a 8860 +9040 a 9060	240pb
7	AATGTGACTTCCACACCTCC GATGTCTGTCTGTCTGTGGA	+9560 a 9580 +9979 a 9990	440pb
8AB	GGCAGGTGGTGGAAAGGGCC CAGGCAGTCCTGGGTCATCA	+10500 a 10520 +10830 a 10851	351pb
8CD	GAACGGACGTTCTCTGAGAG CCACAGGCCAGGGCTGCTGG	+10710 a 10731 +11140 a 11160	450pb

A amplificação do DNA genômico dos 9 exons foi realizada individualmente pelo aparelho ciclador de temperatura (Perkin Elmer Cetus) a partir da reação com aproximadamente 0,5µg de DNA, 40 pmoles de cada oligonucleotídeo, 330µM de dNTP (mistura de dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão da enzima (Tris-HCL 10 mM, pH 9,0, 25°C; KCL 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM) e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL), para um volume final de 100µl. Foi também utilizado DMSO 10% para os exons 3-4, 5,6 e 8AB, 6% para os exons 1A, 1B e 8CD. Volume final 100µl.

Foram realizados 35 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (as temperaturas utilizadas para cada iniciador segue abaixo), e extensão (72°C) no aparelho ciclador de temperatura. O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 7 minutos.

Programas utilizados:

**Para padronização dos Exons 1B,2,3-4 e 5:**

Desnaturação: 94°C por 5 minutos

35 ciclos: 94°C – 1 minuto para desnaturação

58°C – 1 minuto para anelamento

72°C – 1 minuto para extensão

Finalização: 72°C – 7 minutos

### **Para padronização dos Exons 6,7 e 8CD :**

Desnaturação: 94°C por 5 minutos

35 ciclos: 94°C – 1 minuto para desnaturação

57°C – 1 minuto para anelamento

72°C – 1 minuto

Finalização: 72°C – 7 minutos

### **Para padronização dos Exons 1A e 8AB**

Desnaturação: 94°C por 5 minutos

35 ciclos: 94°C – 40 segundos para desnaturação

57°C – 40 segundos para anelamento

72°C – 1 minuto e 30 segundos para extensão

Finalização: 72°C – 7 minutos

Os produtos de amplificação pela PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

## **MÉTODO DE TRIAGEM DAS MUTAÇÕES**

**SSCP pelo sistema automático "Phastsystem ® Pharmacia (Pharmacia, Uppsala, Suécia)**

O produto da PCR foi diluído a 1:2 numa solução contendo formamida 95%, 10 mM de EDTA pH 8,0, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol. Essa mistura foi desnaturada por 5 minutos a 94°C e 10µl foram submetidos a eletroforese. A corrida eletroforética foi desenvolvida em gel de poliacrilamida a 20%, de tamanho 43 mm x 50 mm x 0,45 mm, em tampão acetato 0,112 M e Tris 0,112 M, pH 6,5, utilizando-se o tampão L-Alanina 0,88 M, Tris 0,25 M, pH 8,8 em 3% de agarose para isoeletrofocalização. As condições de corrida foram: 150 V, 5,0 mA, 1,0 W, 15°C, 10 V/h; aplicação das amostras: 400 V, 5,0 mA, 1,0 W, 15°C, 20 V/h e corrida: 340 V, 5,0 mA 1,0 W, 15°C, 500 V/h.

Os fragmentos de DNA foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata em programa automático, nas condições descritas a seguir: Ácido tricloracético a 20% por 5 minutos a 20°C, glutaraldeído a 5% por 5 minutos a 50°C, água destilada por 2 minutos a 50°C (2 vezes), nitrato de prata a 0,4% por 8 minutos a 40°C, água destilada por 30 segundos a 30°C (2 vezes), carbonato de sódio a 5%, formaldeído 0,0375% por 4

minutos a 30°C, ácido acético a 5% por 2 minutos a 50°C, e glicerol a 13% por 3 minutos a 50°C.

### **SSCP (método não automatizado)**

O produto da PCR foi diluído 1:2 na mesma solução descrita para o método automatizado. Essa mistura foi desnaturada por 5 minutos a 94°C e 12µl foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% utilizando-se o tampão TEB 1X.

O gel de poliacrilamida foi então submetido à coloração com uma solução de brometo de etídeo 1% por 15 minutos, sendo visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

### **(CSGE) Análise por eletroforese em gel sensível à conformação**

Independente dos resultados obtidos pelo SSCP, foi utilizado um outro método, considerado de alta sensibilidade (Ganguly et al., 1993; Williams et al., 1995), para o rastreamento de mutações. O princípio de tal método é a detecção de pequenas alterações, como inserções, deleções e mutações de ponto, que quando presentes podem formar heteroduplex de DNA. O CSGE utiliza um sistema de solventes desnaturantes que favorecem a tendência dessas mutações em produzir mudanças

conformacionais e, conseqüentemente, aumentar a migração diferencial dos heteroduplexes de DNA durante a eletroforese. Este procedimento pode ser aplicado a qualquer produto de 200–800 pb e não requer equipamentos especiais ou preparação das amostras.

Para o CSGE foi utilizado um aparato para sequenciamento de DNA (Gibco–BRL) de dimensões 31 cm X 38,5 cm X 0,8 mm e 32 poços. Uma solução estoque de 39.6g de acrilamida (Sigma) e 0,4g de 1,4–Bis (acryloyl)–piperazina (BAP; Fluka) foi preparada em 100 ml de água destilada e usada para preparar um gel de poliacrilamida 10%, contendo etilenoglicol 10% (v/v) (Sigma), formamida 15% (v/v) (Gibco/BRL), 1X TTE (Tris 72 mM, taurina 24 mM, EDTA 0,4 Mm, pH 8,0), persulfato de sódio 10% e TEMED.

Antes da eletroforese, 20µl de cada amostra amplificada pela PCR foram aquecidos a 98°C por 5 minutos, seguido de incubação a 68°C por 1 hora para favorecer a formação de heteroduplexes. Após esta incubação, retirou-se uma alíquota de 5µl de cada amostra e misturou-se com 5µl de tampão de amostra (v/v) etilenoglicol 20% (v/v), formamida 30% (v/v), xilenocianol 0,4% (p/v), azul de bromofenol 0,4% (p/v), e o volume total desta mistura foi aplicado em uma canaleta do gel.

Foi realizada uma pré-corrída a 300V por 30 minutos e as amostras foram submetidas a eletroforese a 300V por 16 horas, usando como tampão de corrída TTE 0,25X para a parte superior da cuba, e TTE 1X para a parte inferior da mesma.

Após a corrída eletroforética, uma das placas de vidro foi removida e o gel foi então submetido a coloração com uma solução de brometo de etídeo 2,83 mg/l por 10 minutos, seguida por uma descoloração com água deionizada por 5 minutos. As bandas foram então visualizadas com um equipamento manual de luz ultravioleta e a região onde se localizavam as bandas foram cortadas e transferidas para um transiluminador, onde foi fotografada.

## **Seqüenciamento**

Para a confirmação das alterações de mobilidade eletroforética encontradas no gene do FVII, pelos métodos de SSCP e/ou CSGE, foi realizado seqüenciamento direto pelo método de Sanger (1977), utilizando-se os mesmos pares de iniciadores da amplificação por PCR, e os Kits de seqüenciamento Sequenase PCR Product Sequencing "kit", United States Biochemical – Amersham Life Science. As reações foram feitas acompanhadas de um controle normal, seguindo o protocolo:

## **Thermo-Sequenase Cycle Sequencing Kit:**

### **1. *Pré tratamento enzimático do produto de PCR***

Cinco  $\mu\text{l}$  do produto da reação de PCR foram tratados com 1  $\mu\text{l}$  de exonuclease I (10U/ $\mu\text{l}$ ) e 1  $\mu\text{l}$  de fosfatase alcalina de camarão (2U/ $\mu\text{l}$ ). Esta mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e a 80°C por 15 minutos para inativação das enzimas.

### **2. *Reação de marcação***

Em um tubo de reação foram adicionados 25 pmoles do iniciador referente ao exon a ser sequenciado, tampão T4 polinucleotídeo quinase na concentração final de Tris-HCL 60 mM, pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM; KCL 0,2 M, 25 pmoles de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP (Du Pont) e 10 unidades da enzima T4 polinucleotídeo quinase em um volume final de 10 $\mu\text{l}$ . Incubou-se 10 minutos a 37°C e para a desnaturação da enzima e conseqüente término da reação, o tubo foi incubado por 4 minutos a 95°C.

### **3. *Reação de seqüenciamento***

Foram utilizados para a reação de seqüenciamento 2  $\mu\text{l}$  do PCR tratado, 2  $\mu\text{l}$  de tampão para Thermo-Sequenase 10X, 2  $\mu\text{l}$  do iniciador

marcado e 2  $\mu$ l da enzima Thermo-Sequenase em um volume final de 17,5  $\mu$ l.

Quatro  $\mu$ l da mistura acima foram adicionados aos tubos previamente identificados e contendo 4  $\mu$ l de cada uma das misturas de terminação (G, A, T, C). Acrescentou-se 1 gota de óleo mineral e as amostras foram submetidas a uma nova reação de PCR, utilizando-se as temperaturas de anelamento do PCR original. Após 35 ciclos a reação foi interrompida com a adição de 4  $\mu$ l de solução de bloqueio contendo formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%.

### **Eletroforese em gel desnaturante**

A corrida eletroforética dos tubos de reação (G, A, T, C), obtidos a partir dos protocolos descritos anteriormente, foi realizada em gel de poliacrilamida a 6% na proporção de 19:1 acrilamida/bis acrilamida, em tampão TTE, uréia 7 M, persulfato de amônio a 10% e 0,04% de TEMED. O gel foi preparado em placas de dimensões 38 X 50 cm com espaçadores de 0,4 mm de espessura e de gradiente de espessura com 0,25 mm até 4 mm. Foi utilizado como tampão de corrida, o tampão TTE (Tris 72 m M, pH 8,0, Taurina 24mM, EDTA 0,4 m M).

As corridas foram feitas a uma potência constante de 80W, estimando-se que a temperatura atinja em média 50°C. Para isso foi feita uma pré corrida com a mesma potência durante aproximadamente 40 minutos para que a placa ficasse aquecida. Após isso as amostras foram aplicadas, pareadas com um controle normal, sendo previamente desnaturadas por 4 minutos a 94°C. A duração da corrida variou de 2 até 5 horas dependendo da região que se pretendia ler. O sistema foi então desmontado e o gel foi seco em secadora de gel (Bio-Rad) durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 80°C. Após o gel estar completamente seco foi colocado dentro de um cassete em contato com um filme de raio X. O gel foi exposto por 1 dia e então revelado.

### **Determinação de cinco polimorfismos no gene do F7**

Foram investigados cinco polimorfismos no gene do F7, que podem estar associados a concentração de fator VII no plasma.

O primeiro caracteriza-se pela inserção de um decanucleotídeo na região 5' na posição -323 (F7 5': alelo A<sub>2</sub> - inserção do decanucleotídeo e alelo A<sub>1</sub> - ausência do decanucleotídeo). A amplificação da região que contém o polimorfismo, fornece um fragmento de 582 pb ou 572 pb, que após a digestão pela enzima de restrição *Mbo* I fornece dois fragmentos com 143

pb e 439 pb (alelo A<sub>2</sub>), ou 133 pb e 439 pb (alelo A<sub>1</sub>), respectivamente (Marchetti et al 1993).

O segundo polimorfismo (IVS7) caracteriza-se pela inserção de monômeros na região hipervariável 4 do intron 7. Após a amplificação pela PCR os fragmentos obtidos foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose e de acordo com o peso molecular identificado foram classificados em : alelo a com 480 pb 7 monômeros e alelo b com 443 pb com 6 monômeros (Marchetti et al 1991).

O terceiro polimorfismo (R353Q) decorre de uma substituição G/A no codon 353 do exon 8 e foi detectado pela PCR seguida de digestão com a enzima de restrição *Msp* I, gerando 2 fragmentos de 205 pb e 67 pb (alelo M1- 353R), ou apenas um fragmento de 272 pb (alelo M2 – 353Q) (Green et al 1991).

Os dois últimos polimorfismos, -401 G/T e -402G/A, estão localizados na região promotora do gene do F7, e foram detectados por PCR seguida da digestão com as enzimas de restrição *Xmn* I e *Pst* I, respectivamente (van't Hooft et al, 1999).

Os alelos A2, a, M2, T e G dos 5 polimorfismos descritos anteriormente estão associados a redução da atividade do fator VII.

## ***RESULTADOS***

---

O diagnóstico da deficiência do fator VII foi estabelecido quando a atividade do fator estava abaixo dos valores normais estabelecidos pelo laboratório de Hemostasia do Hemocentro. Em alguns pacientes a dosagem do antígeno do fator VII foi também determinada.

Os valores normais da atividade e do antígeno do fator VII, de acordo com a sua dosagem em 100 indivíduos normais, considerando-se a média $\pm$ 2 desvios padrões, foi de  $99\pm 15\%$  e  $88\pm 14\%$ , respectivamente.

Dez dos 267 pacientes foram diagnosticados como deficientes em fator VII, o que corresponde uma prevalência de 3,7%. Cinco dos pacientes (50%) eram assintomáticos e foram avaliados somente por apresentarem um tempo de protrombina prolongado em exame pré-operatório. Dos 5 pacientes restantes, apenas 1 apresentava um quadro hemorrágico importante, e 4 relataram clínica hemorrágica leve. A idade média dos pacientes foi de  $23\pm 8,73$  anos (mínimo 5, máximo 36 anos), sendo 5 do sexo masculino e 6 do sexo feminino, 6 caucasóides e 4 negróides.

Somente foi possível a realização da análise molecular em 6 dos pacientes com deficiência do fator VII, sendo 3 assintomáticos, 2 com sangramento menor e 1 com sangramento grave. A idade média destes pacientes foi de  $27,5\pm 8,9$  anos (mínimo 9, máximo 36 anos), sendo 2 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, 3 caucasóides e 3 negróides. Familiares de todos os 6

pacientes participaram do estudo, para confirmação do diagnóstico, da hereditariedade, e da segregação da deficiência com a mutação.

A tabela IV mostra os resultados dos exames de coagulação dos pacientes diagnosticados como deficientes em fator VII e investigados molecularmente.

As figuras 1, 3, 5, 7, 9 e 11 mostram os heredogramas com expressão clínica e atividade do fator VII dos membros de cada família.

Foram realizadas as amplificações dos 9 exons do gene do fator 7, incluindo as junções exon-intron. A triagem empregada para pesquisa das mutações permitiu o reconhecimento de padrões alterados em todos os pacientes, sendo 2 pelo SSCP e 4 pelo CSGE (alterações descritas na tabela II). Os fragmentos que apresentaram um padrão eletroforético anormal pelas técnicas de triagem empregadas foram sequenciados para identificação da alteração molecular. O sequenciamento foi realizado a partir de novos produtos de PCR, com o intuito de se evitar que o padrão de migração anormal e a alteração molecular correspondente fossem resultado da incorporação errônea de nucleotídeos durante a amplificação dos fragmentos de DNA pela PCR. Além disso, os sequenciamentos foram repetidos mais de uma vez com amostras obtidas de PCR diferentes para a confirmação das mutações encontradas.

O sequenciamento dos fragmentos com padrão anormal permitiu a identificação de 4 mutações de ponto, sendo uma delas verificada em 3 dos pacientes.

A única mutação ainda não descrita na literatura, caracterizada por uma transversão G→T na posição 8926, no exon 6, convertendo Ile140 por Ser (I140S), foi detectada no paciente FVII-15 (figura 10).

Como essa mutação foi identificada pelo CSGE, para confirmação de que não se tratava de um polimorfismo, realizou-se a pesquisa dessa alteração em 100 amostras de DNAs de neonatos. Os resultados mostraram que o padrão anormal não estava presente em nenhuma das amostras.

As outras 3 mutações, já descritas anteriormente, localizavam-se no exon 8: a primeira caracterizada por uma transversão na posição 10846, convertendo Cys por Phe na posição 310 (C310F), detectada no paciente FVII-6 (figura 4); a segunda caracterizada por uma transversão G→A na posição 10909, levando a troca da Gly331 por Asp (G331D) no paciente FVII-17 (figura 12); e a última, uma transversão G→A na posição 10828 convertendo a Arg304 por uma Gln (R304Q) nos pacientes FVII-4, FVII-8 e FVII-13 (figuras 2, 6 e 8). Todas as mutações estavam presentes em heterozigose, com exceção da C310F, detectada em homozigose na única paciente com deficiência grave de fator VII (paciente FVII-6).

A análise da associação entre os níveis de fator VII e os polimorfismos no gene do F7 foi investigada pela genotipagem dos mesmos nos 6 pacientes com deficiência de fator VII estudados molecularmente.

A tabela II mostra os níveis de atividade (FVII:C) e antígeno do fator VII, o genótipo dos cinco polimorfismos, e as mutações detectadas nos 6 pacientes.

A análise da atividade do fator VII entre os 2 grupos étnicos não mostrou diferença entre brancos e negros ( $92\pm 27\%$  e  $103\pm 28\%$ , respectivamente).

Apesar de ser a mutação mais frequente entre os pacientes com deficiência de fator VII, nenhum dos indivíduos Negros ou Caucásóides apresentou essa mutação. A genotipagem do polimorfismo R353Q nos 2 grupos étnicos revelou que apesar de não estatisticamente significativo, os heterozigotos apresentavam níveis reduzidos de fator VII em relação aos homozigotos não mutantes ( $102\pm 26\%$  versus  $108\pm 28\%$ ,  $p=0,09$ , nos Negros;  $84\pm 31\%$  versus  $93\pm 25\%$ ,  $p=0,59$ , nos Caucásóides, respectivamente).

**Tabela II.** Alelos polimórficos: a e b polimorfismo de repetição do intron 7 (Marchetti et al, 1991), A1 e A2, polimorfismo de inserção da região 5' do gene do F7 (Marchetti et al, 1993), M1 e M2<sup>353</sup> Arg-Gln (Green et al, 1991). TH- tromboplastina derivada de coelho; TR tromboplastina derivada humana.

Paciente	FVII:C (%) TH	FVII:C (%) TR	FVII:Ag (%)	Alelos Polimórficos	Mutação	Troca de aminoácidos
FVII-4	38	26	70	bb A1A1 -401GG -402GA	M1M1  10828 G→A hetero	R304Q
FVII-6		3	NA	bb A1A1 -401GG -402GA	M1M1  10846 G→T homo	C310F
FVII-8		40	26	ab A1A2 -401GT -402GG	M1M2  10828 G→A hetero	R304Q
FVII-13	45	44	40	bb A1A1 -401GG -402GG	M1M1  10828 G→A hetero	R304Q
FVII-15	62	54	45	aa A1A2 -401GT -402GA	M1M2  8926 G→T hetero	I140S
FVII-17	36	31	90	bb A1A1 -401GG -402GG	M1M1  10909 G→A hetero	G331D

**Tabela III.** Padrões eletroforéticos encontrados no SSCP e CSGE e resultado do sequenciamento dos padrões alterados dos 6 pacientes estudados.

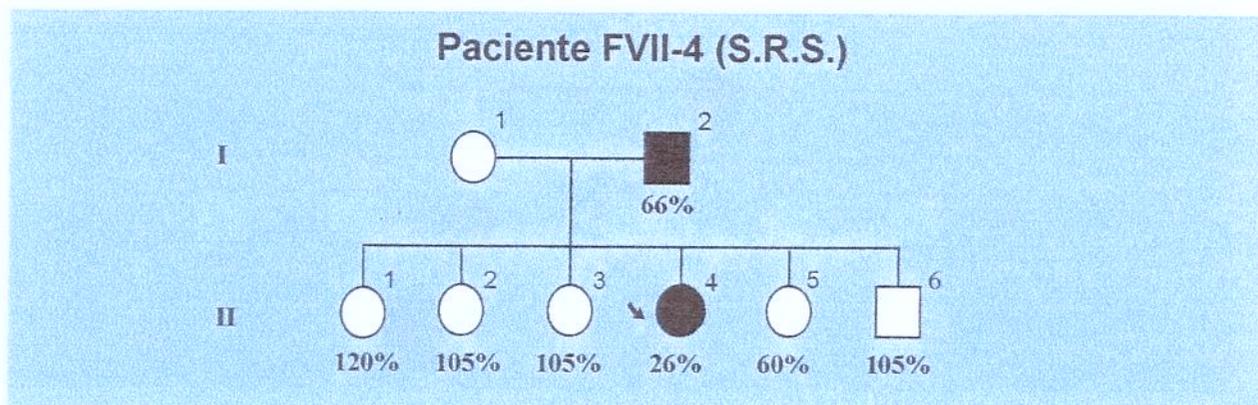
PACIENTES	SSCP (padrão)	CSGE (padrão)	SEQUENCIAMENTO
FVII 4	EX1-normal EX2-normal EX3-4 normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-anormal	EX1-normal EX2-normal EX3-4-normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-normal	EX8 – 10828 (G→A) mutação de ponto
FVII 6	EX1-normal EX2-normal EX3-4normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-normal	EX1-normal EX2-normal EX3-4-normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-anormal	EX8 – 10846 (G→T) mutação de ponto
FVII 8	EX1-normal EX2-normal EX3-4normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-anormal	EX1-normal EX2-normal EX3-4-normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-normal	EX8 – 10828 (G→A) mutação de ponto
FVII 13	EX1-normal EX2-normal EX3-4normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-normal	EX1-normal EX2-normal EX3-4-normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-anormal	EX8 – 10828 (G→A) mutação de ponto
FVII 15	EX1-normal EX2-normal EX3-4normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-normal	EX1-normal EX2-normal EX3-4-normal EX5-normal EX6-anormal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-normal	EX8 – 8926 (G→T) mutação de ponto
FVII 17	EX1-normal EX2-normal EX3-4normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-normal	EX1-normal EX2-normal EX3-4-normal EX5-normal EX6-normal EX7-normal EX8ab-normal EX8cd-anormal	EX8 – 10909 (G→A) mutação de ponto

**Tabela IV.** Resultados das dosagens dos fatores VII, IX, X e RNI dos pacientes estudados.

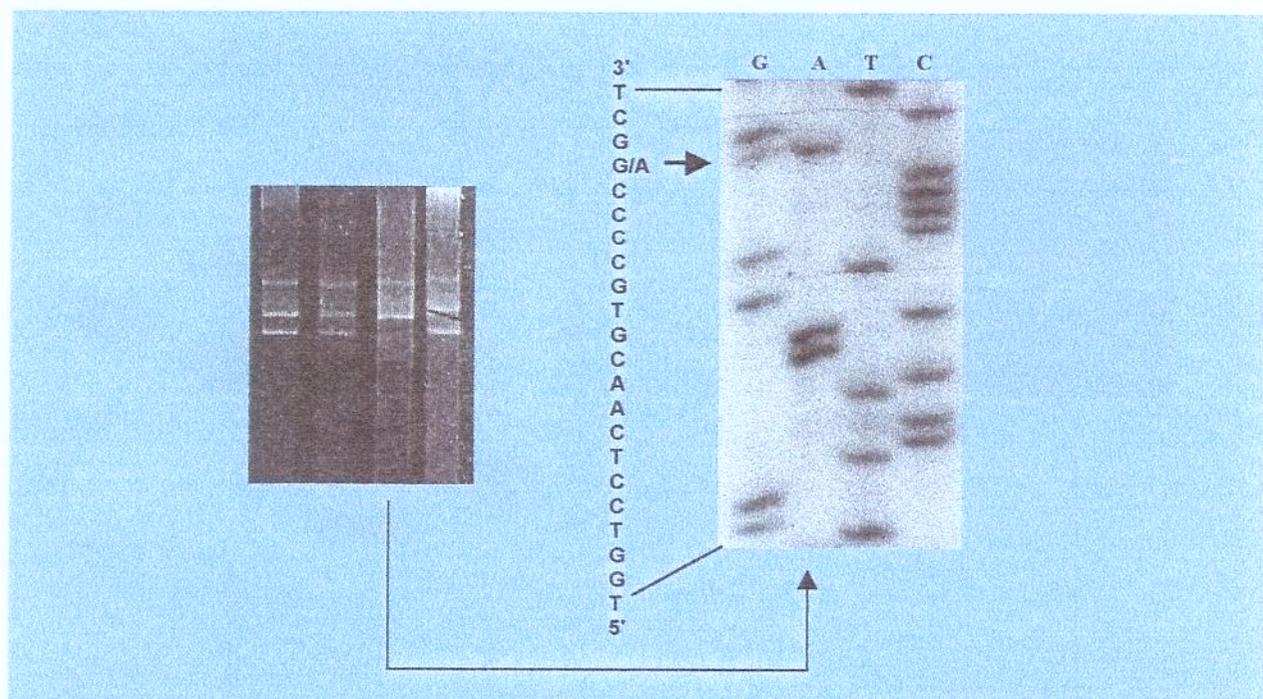
<b>Pacientes</b>	<b>RNI</b>	<b>FVII</b> <b>(69-129%)</b>	<b>FIX</b> <b>(70-140%)</b>	<b>FX</b> <b>(70-120%)</b>
FVII-4	1.41	26%	89%	80%
FVII-6	1.32	3%	140%	108%
FVII-8	1.83	34%	96%	88%
FVII-13		44%		90%
FVII-15	1,24	48%%	176%	129%
FVII-17		28%	88%	106%

RNI- relação normalizada por um padrão internacional.

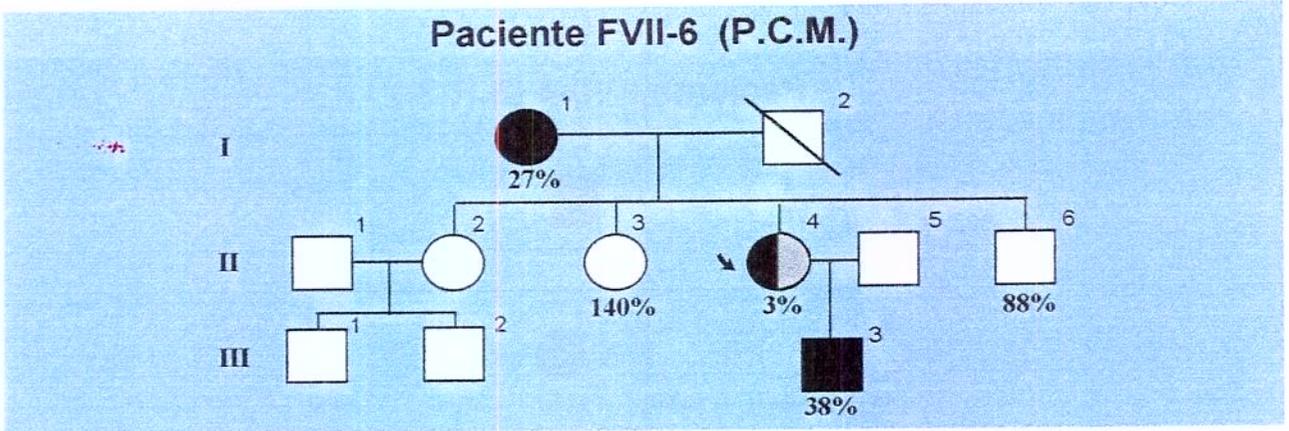
O resultados em ( ) representam a variação normal da atividade dos fatores dosados



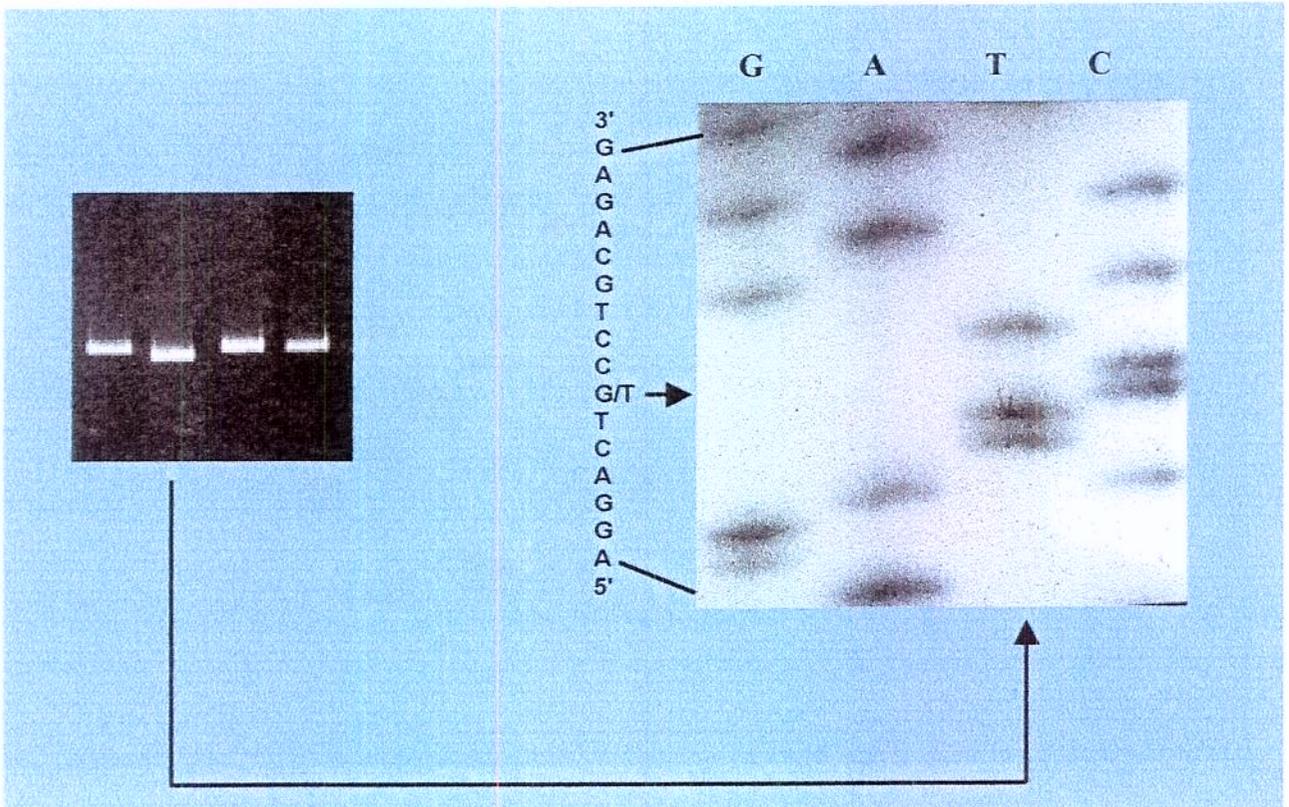
**Figura 3:** Herodograma da família da paciente FVII-4. (■●) Indivíduos heterozigotos para mutação do FVII. (□○) Indivíduos normais.(↘) Propósito



**Figura 4:** Análise de SSCP do exon e identificação da alteração molecular por sequenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

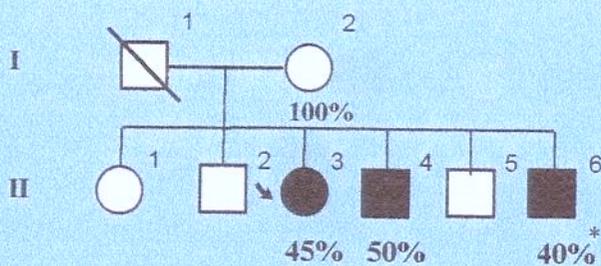


**Figura 5:** Herodograma da família da paciente FVII-6. (●) Indivíduo heterozigoto para mutação do FVII. (◐) Indivíduo homozigoto. (□○) Indivíduos normais. (↘) Propósito

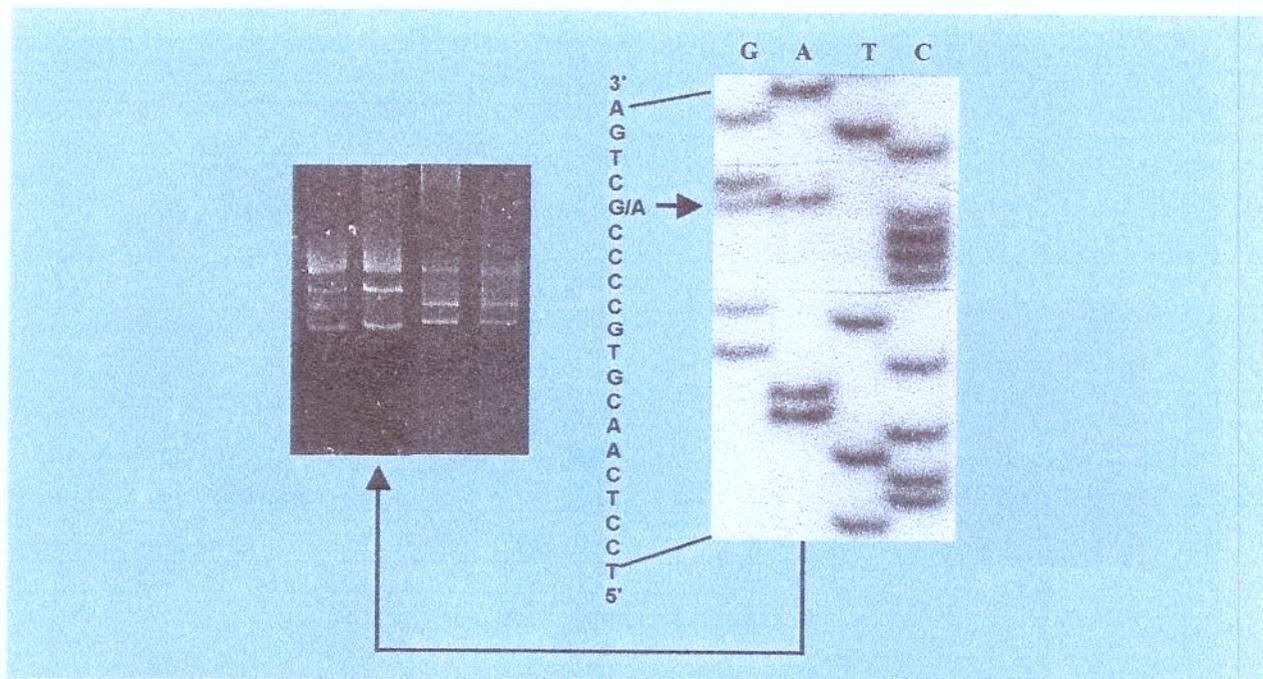


**Figura 6:** Análise de CSGE do exon e identificação da alteração molecular por sequenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

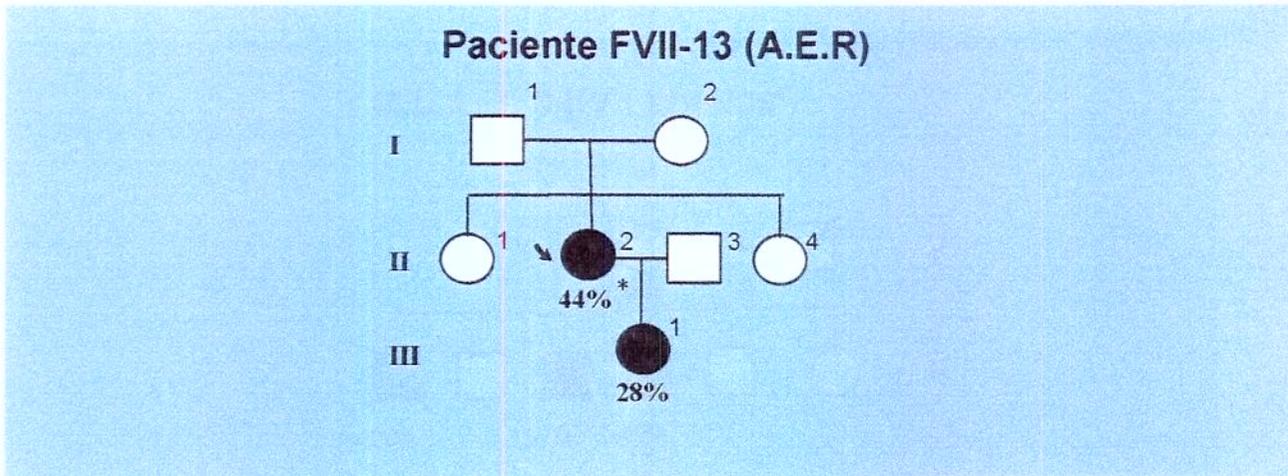
### Paciente FVII-8 (E.A.J.M.)



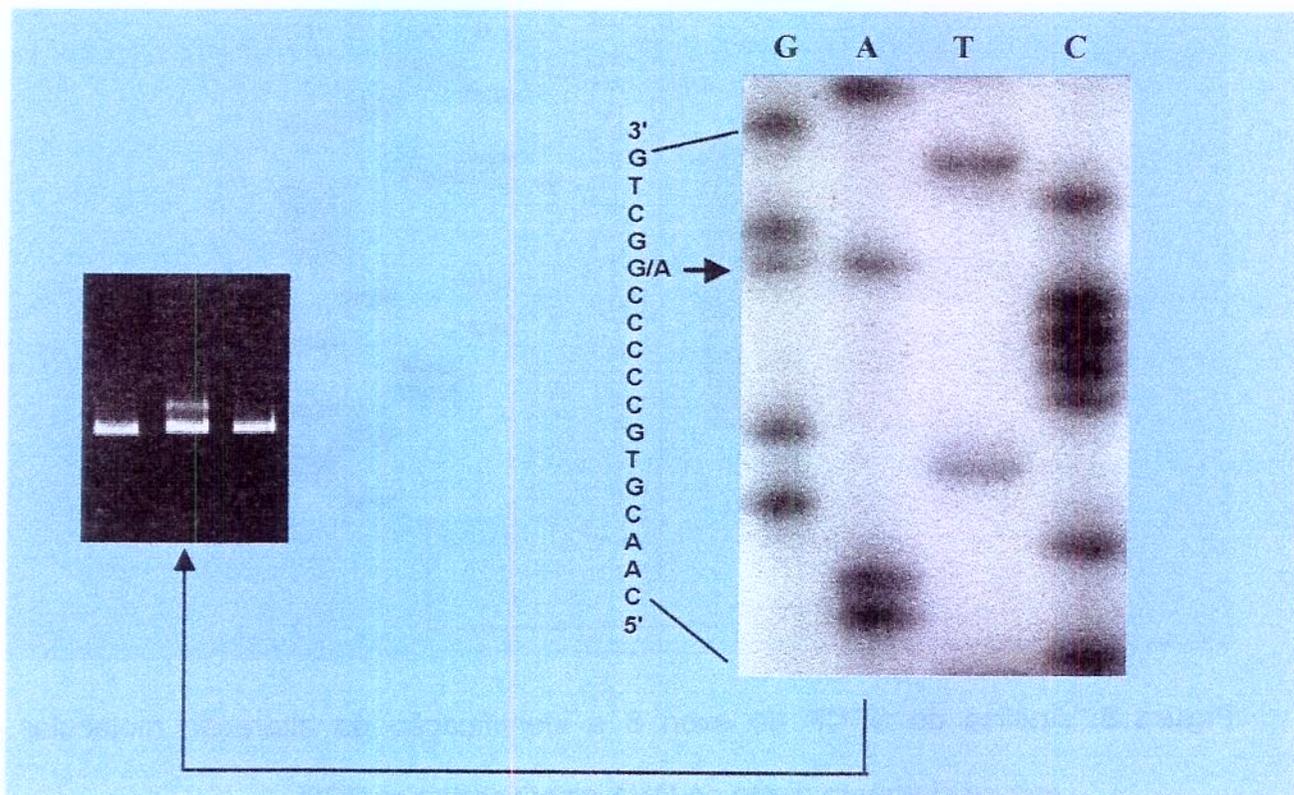
**Figura 7:** Herodograma da família da paciente FVII-8. (■●) Indivíduos heterozigotos para mutação do FVII. (□○) Indivíduos normais.(↘) Propósito



**Figura 8:** Análise de SSCP do exon 8 e identificação da alteração molecular por sequenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

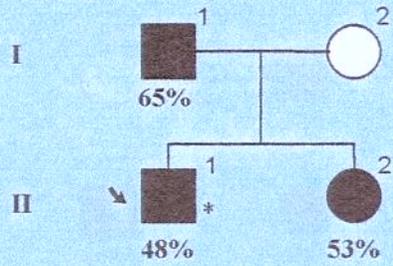


**Figura 8:** Herodograma da família da paciente FVII-13. (●) Indivíduos heterozigotos para mutação do FVII. (□○) Indivíduos normais.(↘) Propósito

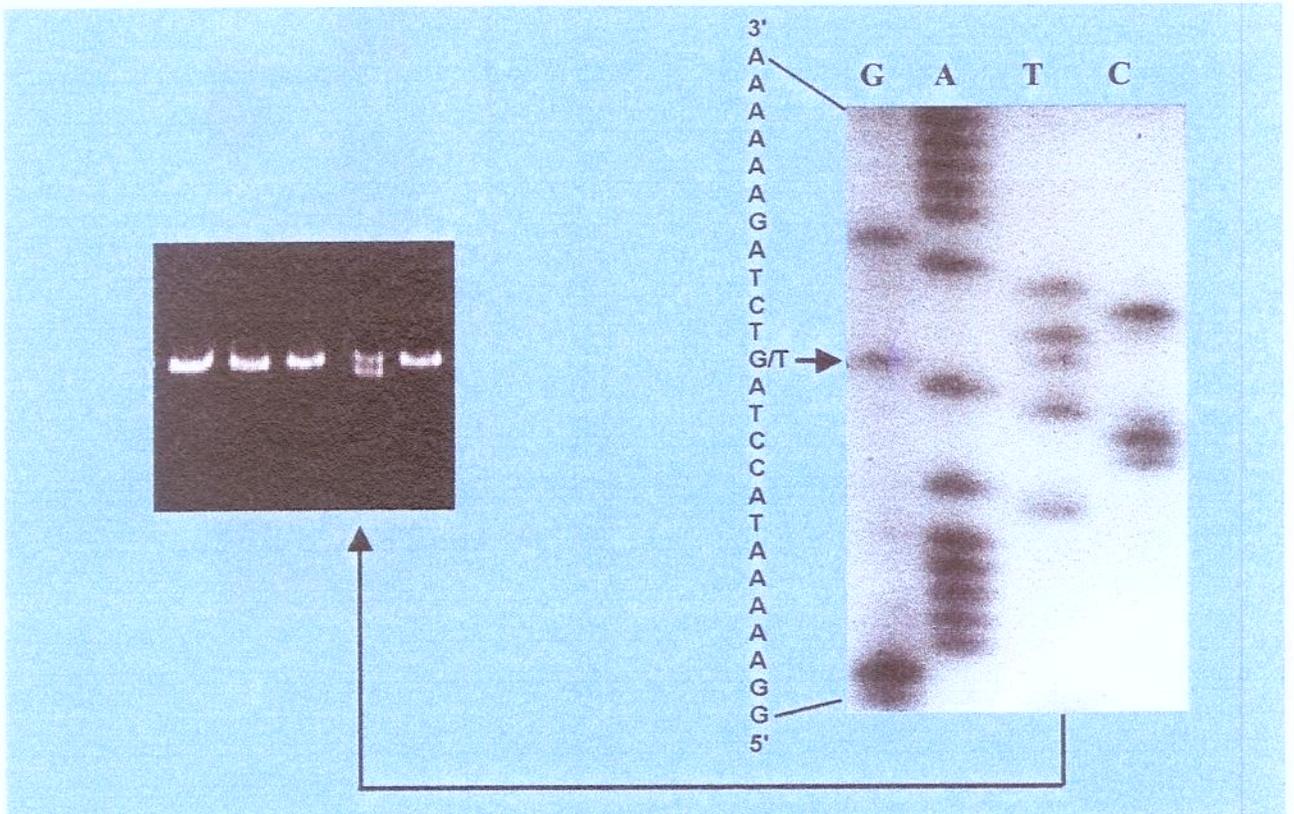


**Figura 9:** Análise de CSGE do exon 8 e identificação da alteração molecular por sequenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

### Paciente FVII-15 (F.A.O.)



**Figura 11:** Herodograma da família do paciente FVII-15. (■) Indivíduos heterozigotos para mutação do FVII. (□○) Indivíduos normais.(↘) Propósito



**Figura 12:** Análise de CSGE do exon 6 e identificação da alteração molecular por sequenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

### Paciente FVII-17 (A.B.)

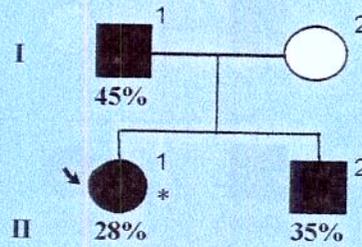


Figura 13: Herodograma da família do paciente FVII-17. (●■) Indivíduos heterozigotos para mutação do FVII. (○) Indivíduos normais. (↘) Propósito

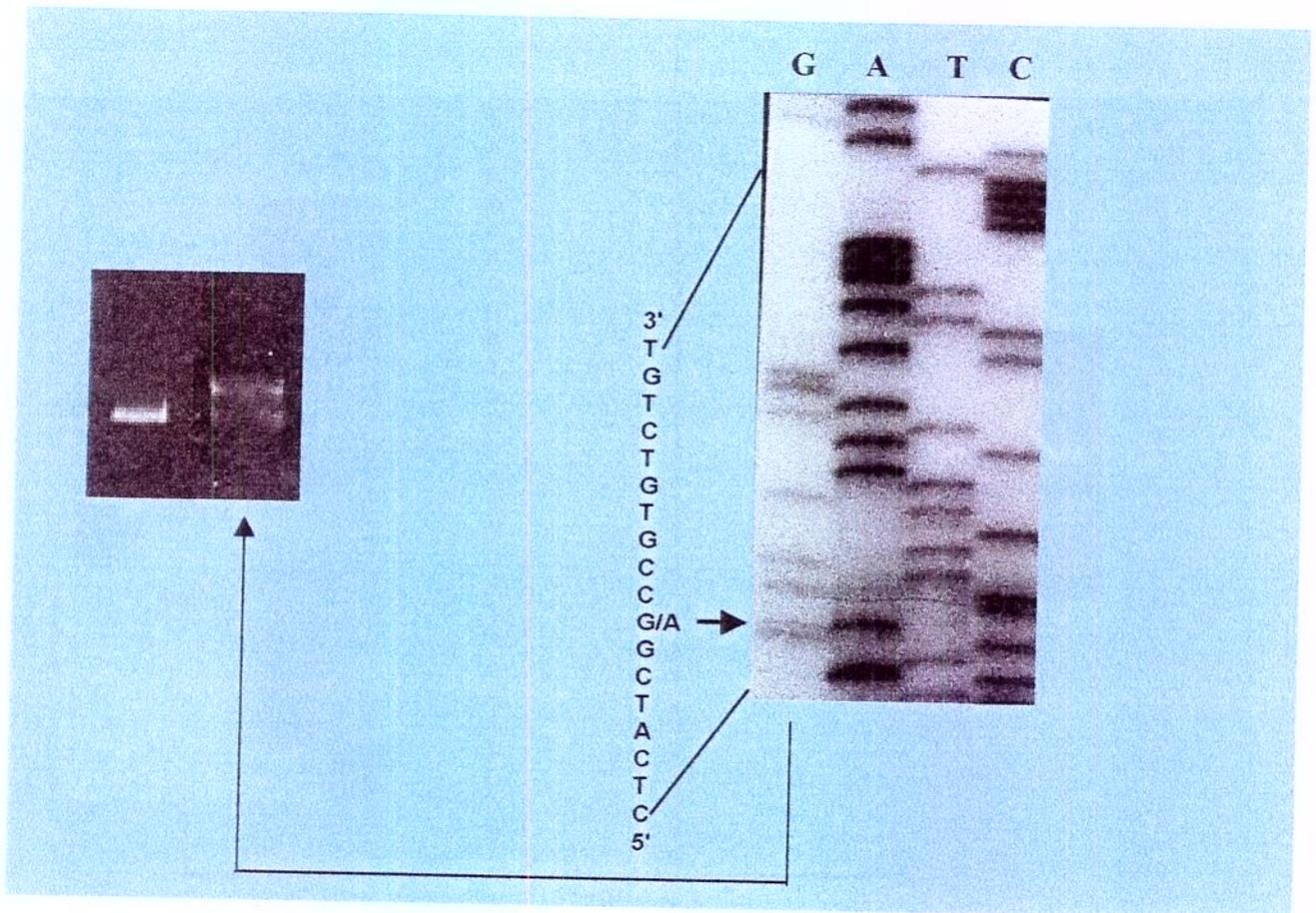


Figura 14: Análise de CSGE do exon e identificação da alteração molecular por sequenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

## ***DISCUSSÃO***

---

A prevalência da deficiência de fator VII, baseada na atividade do fator, em um grupo selecionado de 267 pacientes brasileiros, com ou sem sangramento, encaminhados ao ambulatório de Hemostasia do Hemocentro para investigação diagnóstica foi de 3.74% (10 pacientes), e é superior a descrita em um estudo realizado com 705 doadores de sangue da Inglaterra, de 2.1% (Howard et al, 1994). Não encontramos na literatura nenhum outro estudo sobre a prevalência de deficiência de fator VII, o que não propicia parâmetros para uma comparação. Por outro lado, torna os nossos resultados mais interessantes como dados inéditos.

Talvez a maior prevalência verificada em nosso estudo seja decorrente da seleção dos pacientes, uma vez que o Hemocentro é uma unidade de referência para vários outros serviços de saúde, e atende muitos pacientes que já foram investigados inicialmente em outros centros. Portanto são encaminhados ao nosso Serviço, pacientes com quadro hemorrágico e assintomáticos, o que difere do estudo inglês, que apenas avaliou doadores de sangue, que são inicialmente considerados como indivíduos sem qualquer patologia. Inclusive por ter avaliado apenas indivíduos sadios, a prevalência de 2.1% é elevada. Isso é até salientado na discussão daquele estudo, que sugere que o valor inferior de normalidade

da atividade do fator VII deveria estar abaixo do valor por eles considerada, que foi de 60%.

É importante salientar que em todos os nossos pacientes, os exames foram repetidos, após reposição da vitamina K por via oral, assim como foi descartada qualquer doença hepática.

Os resultados obtidos são interessantes para ressaltar que a deficiência de fator VII não é tão rara, e que muitos dos pacientes não tem conhecimento de que são portadores, incluindo mulheres com menorragia.

Como geralmente apenas a deficiência grave está associada a quadro clínico importante de sangramento, isto talvez justifique porque esse diagnóstico é subestimado na população heterozigota assintomática.

Dos 10 pacientes com diagnóstico de deficiência de fator VII, apenas 1 paciente (homozigoto) apresentava sangramento significativo, e 2 pacientes apesar de terem necessitado transfusão sanguínea durante intervenção cirúrgica, tinham um quadro hemorrágico muito frustro. Cinco pacientes apresentaram sangramento menor e 2 eram assintomáticos. O sangramento menor foi caracterizado por epistaxe ou menorragia, o que mais uma vez corrobora a hipótese de muitos pacientes da população geral com deficiência de fator VII não serem investigados, porque os sintomas hemorrágicos às vezes não são valorizados pelo próprio paciente. (Tuddenham et al, 1995). Inclusive, muitos dos pacientes e familiares

portadores de deficiência de VII deste estudo já haviam se submetido a cirurgias anteriormente, sem qualquer sangramento anormal relatado

Neste estudo foi evidente que a deficiência grave de fator VII é a única que tem maior importância clínica, pois pode estar associada a sérias complicações hemorrágicas (Tuddenham et al, 1995).

Durante a realização desta pesquisa, dois pacientes foram submetidos a intervenção cirúrgica, e verificou-se um sangramento discretamente aumentado no intra-operatório. Como os pacientes já sabiam ser portadores da deficiência, foram corretamente orientados, tendo disponível o concentrado de fator VII (Novoseven, Novo Nordisk), caso necessitassem durante o procedimento cirúrgico. Isto mostra que apesar de clinicamente não tão importante, o diagnóstico da deficiência de fator VII permite condutas médicas adequadas tanto para o paciente como para a equipe que o assiste. Vale salientar que muitas vezes esse diagnóstico na verdade previne que o paciente receba transfusões desnecessárias.

A literatura refere que a apresentação clínica da deficiência de fator VII é muito variável e ainda não estão definidos todos os fatores que contribuem para essa variação. Triplett (1985) sugeriu que um dos determinantes clínicos de sangramento em pacientes com deficiência de fator VII poderia estar relacionado a origem racial. Em um estudo de 26 pacientes com deficiência de fator VII nenhum dos 9 de origem negra apresentavam

estar relacionado a origem racial. Em um estudo de 26 pacientes com deficiência de fator VII nenhum dos 9 de origem negra apresentavam sangramento, quando comparados a um grupo com sintomas hemorrágicos, com o mesmo grau e/ou tipo de deficiência, composto por 16 Caucasóides e um hispânico. Além disso, alterações funcionais do fator VII foram mais frequentes nesse último grupo. A população brasileira possui uma alta miscigenação, e uma elevada proporção de negros. Contudo, não notamos uma diferença no quadro clínico neste grupo estudado, e 4 dos pacientes diagnosticados com deficiência de fator VII de origem Negróide apresentaram sangramento moderado, semelhante aos Caucasóides, inclusive 2 pacientes (1 Negróide e 1 Caucasóide) portadores da mesma mutação.

Outro fator que poderia contribuir para a variação nos níveis de fator VII, e que pode ter uma correlação com o quadro clínico é o tipo de reagente utilizado para a dosagem do mesmo. Assim, quando a dosagem é realizada com tromboplastina recombinante humana, verifica-se uma correlação clínico-laboratorial. Neste estudo a dosagem de fator VII com tromboplastina recombinante humana, além da tromboplastina de coelho, foi realizada em 4 dos 6 pacientes investigados molecularmente (tabela II). Em todos os casos, apesar dos níveis de atividade do fator VII serem um

pouco superiores ao obtido com a tromboplastina de coelho, apresentavam-se reduzidos, compatíveis com a deficiência.

Apesar da paciente FVII-4 apresentar níveis mais reduzidos de fator VII que as pacientes FVII-8 e FVII-13, na presença da mesma mutação, clinicamente não houve diferença em relação a história hemorrágica.

Vale ainda ressaltar que observamos pacientes com uma clínica variável, mesmo na presença de níveis comparáveis de fator VII, evidenciando que outros fatores, ainda não definidos também influenciam no quadro hemorrágico.

Recentemente foram descritos 5 polimorfismos no gene do F7, que podem contribuir para até 30% de sua variação no plasma (Green et al., 1991, Marchetti et al., 1993; Bernardi et al., 1996; Pollak et al., 1996; van't Hooft et al., 1999). Estes incluem a inserção de um decanucleotídeo na posição -323 (F7 5'), -401G/T e -402G/A na região promotora, um polimorfismo com variável número de inserções de 37 pb na região 4 do intron 7 (IVS7), com 3 alelos mais frequentes, e a troca de um G por um A no codon 353 do exon 8, convertendo R por Q.

Os polimorfismos localizados na região promotora interferem na ligação com proteínas nucleares e conseqüentemente na transcrição do fator VII. Os alelos A2 e o -401T estão associados com níveis reduzidos de fator VII e o alelo -402A com níveis elevados. Também demonstrou-se que o fator

VII 353Q (alelo M2) é secretado com menor eficiência *in vitro* (Hunault et al 1997); e que o alelo a do IVS7, com sete repetições, está associado a níveis reduzidos de fator VII.

Apesar do pequeno número de pacientes estudados, a análise desses polimorfismos nos 6 pacientes com deficiência de fator VII, com o objetivo de definir alguma relação entre os níveis de fator e o genótipo, não evidenciou nenhuma associação. Nenhum dos pacientes apresentava um genótipo para os polimorfismos que pudesse contribuir para resultados como a presença da mesma mutação e níveis diferentes de fator VII (pacientes FVII-4, FVII-8 e FVII-13, tabela II). Os resultados inclusive mostraram uma associação inversa, pois os pacientes que apresentavam o genótipo associado a níveis reduzidos de fator VII, mostraram níveis mais elevados do mesmo (FVII-8 e FVII-15), e os com genótipo associado a níveis aumentados de fator VII, níveis mais reduzidos do mesmo (FVII-4, FVII-13 e FVII-17). A ausência de correlação entre esses polimorfismos e os níveis de fator VII em pacientes deficientes nesse fator também foi relatado recentemente em um estudo (Millar et al, 2000).

De acordo com o último database de deficiência de fator VII, estão incluídos 238 indivíduos com mutações do gene do F7 (FVII mutation database; europium.csc.mrc.ac.uk).

A pesquisa das mutações no gene do fator 7 somente foi realizada em 6 pacientes, que concordaram em participar do estudo.

As alterações do gene F7 que causam deficiência do fator VII incluem 70 mutações (Mcvey et al, 2001). Das substituições de pares de bases, 87% são missense, e 40% dessas são transições C→T ou G→A dentro dos dinucleotídeos CpG, conhecidas como mutações hot spot.

A única mutação ainda não descrita na literatura identificada neste estudo, localizada no exon 6 e caracterizada pela troca de um G por um T na posição 8926, levou a troca de uma isoleucina por uma serina (I140S). Esta mutação substitui um aminoácido com uma cadeia lateral hidrofóbica não polar, por outro com uma cadeia lateral hidrofílica neutra, que apesar de não ionizada, apresenta uma polaridade elevada. Isto deve afetar a conformação e a função desta proteína, pois o paciente portador desta mutação apresentou níveis diminuídos de FVII:Ag e atividade reduzida com tromboplastina de coelho.

O exon 6 codifica a região que contém o peptídeo de ativação do fator VII (R152).

Alterações dessa região podem interferir com sua ativação e conseqüentemente com sua função coagulante.

A análise do fator VII recombinante que contém a mutação R152Q, demonstrou que apesar de se ligar adequadamente ao fator tissular, o mesmo não apresenta nenhuma atividade coagulante.(Chaing et al, 1994). Assim como descrita em outros estudos, a mutação mais comum em nossa casuística, detectada em 3 pacientes, foi a 10828G→A no codon 304, que acomete uma região de dinucleotídeo CpG do exon 8, um hotspot do genoma humano. Esta mutação está localizada em uma região altamente homóloga aos outros fatores dependentes da vitamina K, incluindo os fatores II, IX, X, e proteína C, uma família de proteínas originárias de um ancestral comum. Isto evidencia a importância desta região para esse fator da coagulação. A mutação R304Q remove a cadeia lateral com carga positiva da arginina, alterando a estrutura da molécula do fator VII, importante para sua função e ativação (O'Brien et al 1991, James et al 1991).

A análise cristalográfica desse fator mostrou que a arginina 304 liga-se a três moléculas de água, numa superfície hidrofílica entre o fator VII e o fator tissular (O'Brien et al, 1994). A presença da glutamina 304 pode portanto perturbar a área de contato entre os fatores VII e o fator tissular. Isto seria uma explicação para a deficiência de subtipo 2. Contudo neste mesmo estudo dois pacientes apresentavam, repetidamente, níveis reduzidos de antígeno. Poderíamos questionar a presença de outra

mutação, mas isto foi descartado nas regiões analisadas com os métodos empregados.

Uma revisão do database, mostrou que apesar do subtipo 2 ser o mais frequente, alguns pacientes são classificados como subtipo 1, semelhante aos nossos pacientes.

A mutação 10846 G→T, uma transversão no codon 310 no exon 8 deu origem a mutação missense C310F, e foi detectada em homozigose na única paciente com sangramento grave. Os pais são primos em primeiro grau, e o estudo familiar permitiu a identificação da mesma mutação em heterozigose em sua mãe e em seu filho. A troca de Cys por Phe abole a formação de uma ponte dissulfídica, com Cys 329. C310 é conservada em todas as serino proteases, e sua substituição pode alterar a conformação molecular, com preservação da estrutura e estabilidade da molécula (Bernardi et al 1994). A perda de atividade observada nessa variante sugere que essa região do fator VII participa de sua função. Esta região é distante do sítio ativo da molécula, mas próxima do resíduo R304, que está implicado na interação com o fator tissular.

Essa mutação foi descrita em pacientes com deficiência de fator VII CRM+. Por outro lado, mutações no gene do fator IX que correspondem topologicamente a esta mutação estão relacionados a hemofilia B CRM-. Infelizmente, os níveis de antígeno do fator VII não puderam ser

determinados neste paciente, contribuindo para uma maior compreensão do efeito desta mutação.

A transição 10909G→A no codon 331 do exon 8, levando a troca de uma glicina pelo ácido aspártico (G331D), foi detectada em uma paciente assintomática. Esta mutação já havia sido descrita anteriormente (Zheng et al, 1996), e a molécula mutante provavelmente é disfuncional, pela alteração de ligação tanto ao fator tissular como ao fator X e IX.

Essa mutação acomete um sítio localizado próximo a região de ligação do fator VII com os fatores X e IX, no domínio catalítico, conforme demonstrado por análises de inibição peptídica (Kumar et al 1991). A presença de um ácido aspártico nessa posição leva a criação de um potencial iônico que interrompe a ligação do fator VII com seus substratos. A presença do ácido aspártico, que possui uma grande cadeia lateral carregada negativamente pode levar a uma menor capacidade de formação de ângulos, e portanto na dobradura da molécula.

Em todas as famílias, com exceção da família FVII-6, em que amostras plasmáticas não puderam ser obtidas, observou-se que a deficiência segregou com a mutação (Figuras 3,5,7,9,11 e 13), confirmando que esta deve ser a responsável pela deficiência de fator VII.

A estratégia de rastreamento de mutações mostrou que o SSCP e o CSGE foram métodos complementares, apesar do CSGE ter sido mais efetivo na

detecção de alterações. Nos casos em que a mutação não cria um sítio de digestão para uma enzima de restrição, esses métodos podem ser úteis para um estudo populacional.

Recentemente sugeriu-se que o quadro clínico e níveis mais elevados de fator VII em pacientes portadores dessa deficiência pode ter relação com o grupo racial. Como os 3 pacientes portadores da mutação R304Q eram assintomáticos, sendo 2 negros e 1 caucasóide, avaliamos esta mutação assim como a atividade de fator VII, em 49 negros e 49 caucasóides, doadores de sangue sem qualquer antecedente pessoal ou familiar de história hemorrágica. A mutação R304Q não foi detectada em nenhuma das amostras e a atividade do fator VII estava dentro da variação normal, indicando que a deficiência não é comum nesses dois grupos étnicos brasileiros. A diferença do resultado obtido pelo estudo realizado na Inglaterra (Howard et al, 1994), pode ser decorrente do número de indivíduos analisados e dos métodos empregados.

A análise do polimorfismo R353Q nesse grupo de doadores revelou que apesar de estatisticamente não significativo, o genótipo heterozigoto para a mutação estava associado a níveis reduzidos de fator VII, nos 2 grupos raciais, corroborando outros estudos (Green et al, 1991).

Este foi o primeiro estudo da América Latina que avaliou as alterações moleculares em pacientes com deficiência de fator VII. As análises

permitiram a identificação de 4 diferentes mutações de ponto, incluindo uma nova mutação (I140S).

Há na literatura apenas um relato sobre a prevalência da deficiência de fator VII em doadores de sangue. Este estudo portanto é um dos únicos a avaliar a prevalência dessa deficiência em indivíduos atendidos em um ambulatório especializado de doenças hemorrágicas, contribuindo para uma melhor compreensão e conduta em relação aos portadores dessa patologia.

## ***CONCLUSÕES***

---

- 1) A deficiência de fator VII, apesar de ter sido considerada rara parece se mais frequente na população, principalmente em pacientes encaminhados a serviços especializados para investigação de doenças hemorrágicas.
- 2) O quadro clínico da deficiência de fator VII é variável, e geralmente os pacientes heterozigotos foram assintomáticos ou com exceção dos pacientes com deficiência em homozigose.
- 3) Os métodos de pesquisa de mutações, SSCP e CSGE, foram úteis na triagem de alterações moleculares no gene F7.
- 4) As mutações missense no gene F7 foram mais frequentes, e a mutação R304Q conforme descrito anteriormente, foi a mais comum.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

1. -Bauer KA, ten Cate H, Barzegar S, Spriggs DR, Sherman ML, Rosemberg RD. Tumor Necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanisms of humans, *Blood*, 1989, 74: 165-171.
2. Berget SM Are V4 small nuclear ribonucleoproteins involved in polyadenylation? *Nature*, 1984, 309:179:182.
3. Berkner K, Bushy S, Davie E, Hart C, Insley M, Kisiel W, Kumar A, Murray M, O'Hara P, Woodburg R, Hagen F. Isolation and Expression of cDNAs encoding human factor VII. *Cold spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 1986, 51:531-541.
4. Bernardi F, Liney D.L, Patracchini P, Gemati D, Legnani C, Arcieri P, Pinotti M, Redaelli R, Ballerini G, Pemberton S, Wacey A . I, Mariani G, Tuddenham E.D.G, Marchetti G. Molecular defects in CRM + factor VII deficiencies: modelling of missense mutations in the catalytic domain of FVII. *British Journal of Haematology*, 1994, 86:610–618.
5. Bernardi F, Arcieri P, Bertina R.M, Chiarotti F, Corral J, Pinotti M, Prydz H, Samama M, Sandset P.M, Strom R, Vicente G.V, Mariani G. Contribution of factor VII genotype to activated FVII levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17:2548-2553.
6. Bjoern S, Foster DC, Thim L, Wiberg FC, Christensen M, Komiayama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266:11051-11057.
7. Brinkhous KM, Hedner U, Garris JB, Diness V, Reed MS. Effect recombinant factor VIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia and von willebrand's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1989, 86: 1382-1386.

8. Broze GJ, Majerus PW Purification and properties of human coagulation factor VII. *Met Enzym*, 1981, 80: 228-237.
9. Chaing SH, High KA Fator VII Charlotte: A missense mutation in the first EGF-like domain resulting in severe bleeding dis thesis. *Blood*, 1990, 75 supplement 1:417.
10. Di Castelnuovo A, D'Orazio A, Amore C, Falanga A, Kluft C, Donati M.B, Iacoviello L. Genetic modulation of coagulation factor VII plasma levels: contribution of different polymorphisms and gender-related effects. *Thromb Hemost*, 1998, 80(4):592-597
11. Fagan K, Wilkinson I, Allen M, Brounlea S The coagulation fator VII regulator is located on 8p 23.1. *Human genetics*, 1998, 79:365-367.
12. Fair DS, Marlar RA Biosynthesis and secretion of fator VII, protein C, protein S and the protein C inhibitor from a human hepatona cell line. *Blood*, 1986, 67: 64-70.
13. Fineman RM, Ablow RC, Breg WR, Wing SD, Rose JS, Rothman Slg, Warpinski J. Complete and partial trisomy of different segments of chromosome 8. Case reports and review. *Clinical Genetics*, 1979, 16:390-398.
14. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel eletrophoresis for detection of. Single-base differences in double-strand PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proceding of in National Academy of Sciences USA*, 1993, 90:10325-10329.
15. Gershwin ME, Gude JK Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in cogenital fator VII deficiency. *New England Journal of Medicine*, 1973, 288:141-142.
16. Giannelli F, Green P.M, Hight K.A, Sommer S, Lillicrap D.P, Ludwig M, OLK k, Reitsma P.H, Goosens M, Yoshioka A, Brownlee G.G. Haemophia B: database of point mutations and short addtions and deletions, third edition. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20:2027-2063.

17. Gilgenkrants S, Brinquel ME, André E, Alexandre P, Jalbert P, Marec B, Pouzol P, Pommmerenil M. Structural genes of Coagulation factors VII X located on 13q34. *Annales de Génétique*, 1986, 29: 32-35.
18. Girolami A, Burrul A, Sticchi A Congenital Deficiency of factor XII with normal subunits S and lack of subunit A. Report of a new family. *Acta Haematologica*, 1977, 58: 17-26.
19. Godall HC, Madsen K, Nissen-Meyer R. Thromboembolism in patient with total proconvertin (factor VII) deficiency. *Acta Medica Scandinavica*, 1962, 171: 325-327.
20. Gordon EM, Ratnoff OD, Jones PK. The role of augmented Hageman factor (factor VII) titers in the cold promoted activation of factor VII and spontaneous shortening of the prothrombin time in women using oral contraceptives. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1982, 99: 363-369.
21. Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humpries S. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arteriosclerosis*, 1991, 11: 540-546.
22. Grouchy J de, Josso F, Beguin S, Turlean C, Jalbert P, Laurent C. Déficit en factor VII de la coagulation Chez trois sujets trisomiques 8. *Annales de Génétique*, 1974, 17: 105-108.
23. Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, Grant FJ, Soari GC, Woodburg RG, Hart CE, Lusley M, Kisiel W, Kurachi K, Davie EW. Characterization of Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1986, 83: 2412-2416.
24. Hassan HJ, Leonardi A, Chelucci C, Mattia G, Maciose G, Guerriero R, Russo G, Mannucci PM, Peschle C. Blood coagulation factors in human embryonic/fetal development "Preferential expression of the F VII / tissue factor pathway. *Blood*, 1986, 76: 1158-1164.

25. Hedner U, Davie EW (1989) Introduction to hemostasis and vitamin K- dependent coagulation factors. pp 2107-2134. In: The metabolic basis of inherited disease. Beaudet AL, Valle D (Eds) 6 th Fdm, Mcgraw-Hill, New York.
26. Howard, PR., Bovill, EG., Pike, J., Church, WR., Tracy, RP. F VII antigen levels in a healthy blood donor population. *Thrombosis and Haemostasis*, 1994, **72**: 21-27.
27. Iacoviello L, Castelnovo AD, Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, Kluft C, Donati MB (1998) Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *The new England journal of medicine* 358: 79-85
28. James HL, Girolami A, Hubbard JG, Kumar A, Fair DS.(1993) The dysfunction of coagulation factor VII<sub>Padua</sub> results from substitution of arginine -304 by glutamine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1172: 301-305.
29. Krawczak M, Cooper DN (1991) Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence environment. *Hum Gen* 86: 425-441.
30. Kumar A, Fair SD (1993) Specific molecular interaction sites on factor VII involved in factor X activation. *Eur. J. Biochem.* 217: 509-518 .
31. Lawson JH, butenas S, Ribarik N, Mann KG (1993) Complex-dependent inhibition of factor VII a by antithrombin III and heparin. *Journal of Biological Chemistry* 266: 767-770
32. Marchetti G, Patracchini M, Ferrati M, Bernardi F (1993) A polymorphism in the 5' region of. coagulation factor VII gene (7) caused by an inserted decanucleotide. *Human Genet* 90:575-576.
33. Mcvey J.H, Boswell E. J, Takamiya O, Tamagnini G, Valente V, Fidalgo T, Layton M, Tuddenham E.D.G (1998) Exclusion of. the First EGF domain of. factor VII by a Splice Site Mutation Causes Lethal Factor VII Deficiency. *Blood*, 92:920-926.
34. Millar DS, Grundy, Cooper DN, Kakkar VV, Schwartz M, Scheibel E (1992) Prenatal exclusion of severe factor VII deficiency by DNA sequencing. *Lancet* 339: 1359

35. Millar DS, Grundy, Cooper DN, Kakkar VV, Schwartz M, Scheibel E (1992) Prenatal exclusion of severe factor VII deficiency by DNA sequencing. *Lancet* 339: 1359
36. Millar DS, Kemball-Cook G, Mcvey JH, Tuddenham EG, Mumford AD, Attock GB, Reverter JC, Lanir N, Parapia LA, Reynaud J, Meili E, Martinowitz U, Prangnell DR, Krswczak M, Cooper DN (2000) Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. *Human Genetics*, 107: S327-S342.
37. Nemerson, Y (1988) Tissue factor and hemostasis. *Blood* 71: 1-8
38. Nishimura H, Kawabata S, Kisiel W, Ikemaka T, Takao T, Shimonishi Y, Iwanag S (1989) Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xy1 2- Glc) O- glycosidically linked to a serine residue in the epidermal growth factor like domain of human factors VII and IX and protein Z. *Journal of Biological Chemistry* 264: 20320-20325
39. O'Brien DP, Gale KM, Anderson JS, McVey JH, Miller GJ, Meade TW, Tuddenham EDG Purification and Characterization of factor VII 304-Gln. A variant molecule with reduced activity isolated from a clinically unaffected male. *Blood* 78: 132-140, 1991
40. O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, Gray CL, Insley MY, Hagen Murray MJ (1987) Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K, dependent protein participating in blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa* 84: 5158-5162.
41. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1986) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism, 1986
42. Ohiwa M, Hayashi T, Wada H, Minamikawa K, Shirakawa S, Suzuki K. Factor VII Mie: Homozygous Asymptomatic Type I Deficiency Caused by Amino Acid Substitution of His (CAG) for Arg (247) (CGC) in the Catalytic Domain. *Thromb Haemost*, 71(6) 733-774, 1994

43. Pfeiffer RA, O++ R, Gilgenkrants S, Alexandre P (1982) Deficiency of coagulation factors VII and associated deletion of a chromosome 13 (q34): Evidence from two cases with 46, xy, + (13;y) (q 11: q34). *Human Genetics* 62: 358-360
44. Prydz H, Haffner F (1980) Synthesis of factor VII in morris hepatoma (MH.C1) cells in : vitamin K metabolism and vitamin K dependent proteins. JW Suttie (ED) University Park Press, Baltimore, P 542-545
45. Ragni Mv, Lewis JH, Spero JA, Hasiba V (1981) Factor VII deficiency. *American Journal of Haematology* 10: 79-88
46. Rao LVM, Rapaport SI (1988) Activation of factor VII bound to tissue factor: A key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proceeding of in National Academy of Sciences USA* 84: 6687-6691
47. Rosen ED, Chan JCY, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther E, Jalbert LR, Albrecht S, Zhong L, Lissens A, Schoonjans L, Moons L, Collen D, Castellino FJ, Carmeliet P (1997) Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* 390: 290-293.
48. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
49. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceeding of in National Academy of Sciences USA* 74:5463-5467.
50. Seligsohn U, Asterud B, Brown SF, Griffin JH, Rapaport SI (1979) Activation of human factor VII in plasma and in purified systems. Roles of activated factor IX, Kallikrein and activated factor XII. *Journal of Clinical Investigation* 64: 1056-1065.
51. Solanki DI, Corn M (1980) Thrombolism in patients with hereditary deficiency of coagulation disorders. *Southern Medical Journal* 73: 944-946.
52. Spurling NW, burton LK, Peacock R, Pilling T (1972) Hereditary factor VII deficiency in the beagle. *British Journal of* 59-67.

53. Thim L, Bjoern S, Christense M, Nicolaisen EM, Lund-Hanses T, Pedersen AH, Hedner U (1988) Amino acid sequence and posttranlation modifications of human fator VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells, *Biochemistry* 27: 7785-7793.
54. Triplet DA, Brandt Jt, Batard MA, Dixon Js, Fair DS (1985) Hereditary fator VII deficiency Heterogeneity defined by combined functional and immunochemical analysis. *Blood* 66: 1284-1287.
55. Tripodim, Citarella F, Guida S, Galeffi P, Gallo E, Ferraza P, Amicone L, Mariani R, Longobardi C, Fantoni A (1986a) Molecular studies on DNA sequences coding for fator VII and XII of human coagulation. *Italian Journal of Biochemistry* 35: 328-332
56. Tuddenham EDG, Pemberton S, Cooper DN (1995) Inherited fator VII deficiency: genetics and molecular pathology. *Trombosis and Haemostasis* 74:323-321.
57. Tuddenham EDG, Cooper DN - Introduction *The Molecular Genetics of Hemostasis and its Inherited Disorders*. 1<sup>a</sup> ed . Oxford University Press Inc. - New York. Pp 1-18, 1994.
58. Tuddenham EDG, Cooper DN - Factor VII. *The Molecular Genetics of Hemostasis and its Inherited Disorders*. 1<sup>a</sup> ed . Oxford University Press Inc. - New York. Pp 112: 121, 1994.
59. Wildgoose P, Hansen LL, Nielsen FE, Glazer S, Hedner U (1992) Measurement of busal levels of fator VII a in hemophilia A and B patientes. *Blood*. 80: 25-28
60. Wilgoose P, Berkener KL, Kisiel W (1990b) Synthesis purification and characterization of an Arg 152-> Gln side directed mutant of recombinant human. *Blood clotting fator VII*. *Biochemistry* 29: 3413-3420.

61. Willians CJ, Rock M, Considine E, Mccarron S, Gow P, Ladda R, McLain D, Michels VM, Murphy W, Prockop DJ, Ganguly A (1995) Three new point mutations in type II procollagen (COL2A1) and identification of. A fourth family with the COL2A1 Arg 519→Cys base substitution using conformation sensitive gel eletroforesis. Human Molecular Genetics 309-312.
62. Van't Hooft, FM, Silveira A, Tornvall P, Lliadou A, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A (1999) Two common functional polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration Blood 93 (10): 3432-3441.
63. Zheng DQ, Shurafa M, James HL. (1996) Factor VII G331D: a variant molecule involving replacement of a residue in the substrate-binding region of the catalytic domain. Blood Coagulation and Fibrinolysis 7: 93-96.