

# IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES GÊNICAS EM PACIENTES HEMOFÍLICOS A GRAVES DO RIO GRANDE DO SUL



Vieira IA<sup>1</sup>, Petry-Gorziza R<sup>1</sup>, Kappel DB<sup>1</sup>, Rosset C<sup>1</sup>, Sinigaglia M<sup>2</sup>, Salzano FM<sup>1</sup>, Bandinelli E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Hemostasia, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Núcleo de Bioinformática, Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Contato: igor.biomed@hotmail.com

## Introdução

A hemofilia A (HA) é um distúrbio hemorrágico hereditário ligado ao cromossomo X, causado pela redução ou ausência da atividade do fator VIII da coagulação (FVIII:C) e resultante de mutações heterogêneas no gene do F8. Esse gene compreende 186 kb, consistindo em um dos maiores genes humanos (0,1% do cromossomo X), e é constituído por 26 éxons. Cerca de 50% dos indivíduos afetados apresentam a forma grave da doença, caracterizada por FVIII:C<1% e histórico clínico de sangramentos espontâneos ou após traumas leves, dentre os quais hematomas e hemartroses são característicos. Mais de 700 mutações associadas com a HA grave já foram descritas em diferentes populações, sendo as inversões dos íntrons 22 e 1 mais comumente encontradas (40-50% e 5%, respectivamente).

## Objetivos

Os objetivos gerais deste trabalho foram: 1) obter um perfil de alterações genéticas associadas com a doença; e 2) avaliar o potencial patogênico das mesmas por meio de ferramentas de bioinformática.

## Materiais e Métodos



- 48 pacientes com HA grave e resultado negativo para as inversões dos íntrons 22 e 1
- 100 indivíduos não-afetados



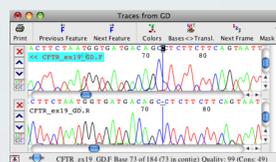
Extração de DNA por *Salting-out*



Purificação dos produtos da PCR  
Enzimas: *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase*



Sequenciamento pela empresa MacroGen Inc



Análise das sequências empregando os softwares *Codon Code Aligner* e *MEGA5.04*



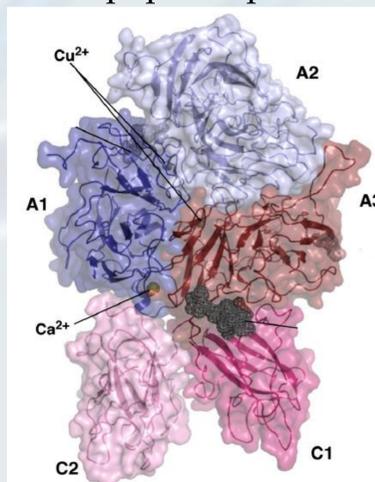
Estimativa do dano estrutural e funcional das mutações na proteína

prediction of functional effects of human nsSNPs

## Resultados e Discussão

Em uma análise prévia de 6 éxons sequenciados (1,3,7,6,16 e 26D), conforme indica a tabela 1, foram detectadas: 3 mutações de sentido trocado no éxon 3 (Ile76Thr, Asn90Tyr, Ser109Pro) e 1 mutação sem sentido no éxon 7 (Gly247\*).

Tais mutações não foram detectadas no grupo controle, sugerindo a associação das mesmas com a hemofilia. As mutações no éxon 3 conferem um provável dano à proteína, pela obtenção de um score de 0.99 e não estão descritas na literatura, enquanto que a mutação sem sentido no éxon 7 está descrita no banco de dados *online* HAMSTeRS [<http://hadb.org.uk/>]. As mutações encontradas estão situadas no domínio A1 da proteína, no qual foram descritos sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  (figura 1) que apresentariam um papel importante no enovelamento da proteína.



**Figura 1.** Estrutura tridimensional do FVIII com o domínio B deletado (fisiologicamente removido após a ativação catalítica). A partir da observação de regiões de homologia interna na sequência da proteína, foram estabelecidos 3 domínios estruturais diferentes A, B e C; abreviados como NH<sub>2</sub>-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. O FVIII se liga a dois íons cobre (em verde), em sítios internos aos domínios A1 e A3. Esses íons cobre estão localizados próximos, mas não na interface do domínio, indicando que seu papel em aumentar a interação entre a cadeia leve (domínios A1, A2 e B) e a cadeia pesada (A3, C1 e C2) é indireto. Acredita-se que, entre os resíduos 108-124, exista um sítio de ligação ao cálcio (em laranja) com papel na manutenção da interface entre os domínios C2 e A1. Adaptado de Chi Ki Ngo *et al.* (2008).

**Tabela 1.** Descrição das mutações detectadas nos pacientes incluídos no estudo, considerando-se uma análise preliminar de 6 éxons sequenciados do gene do F8.

Éxon	Mutação	Substituição de aminoácido	Tipo de mutação	Inibidores	HAMSTeRS	Polyphen
3	c.284 T>C	p.Ile76Thr	Sentido trocado	Não	Não descrita	Dano provável (0.99)
	c.325 A>T	p.Asn90Tyr				
	c.382 T>C	p. Ser109Pro				
7	c.796 G>T	p.Gly247*	Sem sentido	Sim	Descrita	-

## Conclusão

Os dados apresentados contribuem para o estabelecimento de uma relação estrutura-função, através da identificação de novas mutações no gene do F8 e seus prováveis efeitos. Além disso, o estudo é o primeiro a abordar, em nosso estado, a caracterização molecular das mutações gênicas em pacientes com HA grave, aspecto importante para a avaliação das manifestações clínicas, a elaboração de terapias diferenciadas e o aconselhamento genético.