

# Identificação de mutações no éxon 8 do gene F9 em pacientes com Hemofilia B

LARA HOCHSCHEID STELMACH, FRANCISCO M. SALZANO  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética

## INTRODUÇÃO

A Hemofilia B é uma doença hemorrágica causada pela redução da atividade do Fator IX (FIX), devido a mutações no gene F9, que codifica esta proteína. O padrão de herança é recessivo ligado ao X e existe grande heterogeneidade clínica nessa patologia, devido, entre outros fatores, à enorme variedade de mutações descritas. O gene F9 está localizado no cromossomo Xq27.1, sendo composto por 8 éxons.

Os pacientes afetados podem ser classificados em três grupos (graves, moderados e leves) de acordo com as características clínicas apresentadas e a quantidade de FIX produzida. São considerados casos graves aqueles em que a atividade do FIX é <1%, moderados quando apresentam atividade entre 1 e 5%, e leves quando a atividade do FIX está entre 5 e 40%. O tratamento é realizado pela reposição de FIX, purificado de plasma ou obtido por técnicas de DNA recombinante.

## OBJETIVO

O presente trabalho está integrado a um projeto que visa a detecção de mutações em pacientes com hemofilia B, no Rio Grande do Sul. Neste estudo foi analisada a região do éxon 8 do gene F9 em 36 pacientes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

No estudo foram incluídos 36 pacientes masculinos sem parentesco. O DNA destes pacientes foi extraído de leucócitos do sangue periférico através de método não enzimático descrito por Lahiri & Nurnberger (1991). O fragmento relativo ao éxon 8 foi amplificado por PCR em cada um dos pacientes, sendo o êxito do procedimento confirmado por eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídeo.

Os amplicons foram purificados através da incubação com enzimas (Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase) e foram encaminhados a uma empresa para o sequenciamento (Macrogen, Coréia do Sul). O programa CodonCode Aligner foi utilizado para importar as seqüências e fazer o alinhamento com seqüências referência do F9 do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). E o programa MEGA 5 foi utilizado para verificar efeitos das mutações em trocas de aminoácidos da proteína FIX.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, foram detectadas nove mutações na região do éxon 8, entre elas, oito são mutações de ponto: seis delas são de sentido trocado (Hys302Arg, Thr342Met, Gly413Arg, Gly432Val, Gly432Ala, Ile390Thr) e duas são mutações sem sentido (Arg298\*, Arg384\*). Foi encontrada também uma deleção que leva à mudança de fase de leitura (Arg358Serfs\*15). As mutações Hys302Arg e Thr342Met ocorreram em paciente com a forma moderada da doença e as demais em pacientes com a forma grave. Todas as mutações já estavam descritas no banco de dados da hemofilia B.

Os estudos prosseguem, visando uma descrição completa das mutações presentes em pacientes da nossa população.

## REFERÊNCIAS:

Lahiri, DK; Nurnberger, J (1991) A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucl Acids Res, 19:5444

Chavali, S; Mahajan, A; Ghosh, S; Mondal, B; Bharadwaj, D. (2011) Protein molecular function influences mutation rates in human genetic diseases with allelic heterogeneity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 412:716-722

Hinks, JL; Winship, PR; Makris, M; Preston, FE; Peake, IR; Goodeve, AC . (1999) A rapid method for haemophilia B mutation detection using conformation sensitive gel electrophoresis. British Journal of Haematology, 104:915-918

Lillicrap, D. (1998) The molecular basis os haemophilia B. Haemophilia, 4:350-357