

# Caracterização molecular das mutações em pacientes com a Doença de von Willebrand Tipo 3

Lara Hochscheid Stelmach, Francisco M. Salzano

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética

## INTRODUÇÃO

A Doença de von Willebrand (DvW) é um distúrbio hemorrágico resultante de alterações genéticas no gene do FvW - responsável pela síntese da proteína FvW - que se situa no braço curto do cromossomo 12 e possui 178 kb distribuídas em 52 éxons. A DvW é causada por alterações quantitativas ou qualitativas no gene do FvW, uma glicoproteína plasmática que medeia a agregação plaquetária nos locais de rompimento dos vasos sanguíneos; além de se ligar ao Fator VIII, protegendo-o da degradação pela ação de proteases presentes no plasma. Alterações quantitativas causam a DvW tipo 1 e tipo 3, sendo que pacientes do tipo 1 apresentam níveis reduzidos de FvW (entre 3-50%) e pacientes tipo 3 níveis de FvW menores que 3%, enquanto que anormalidades qualitativas causam a DvW tipo 2. O padrão de herança é autossômico recessivo, sendo que os afetados podem ser homocigotos ou heterocigotos compostos.

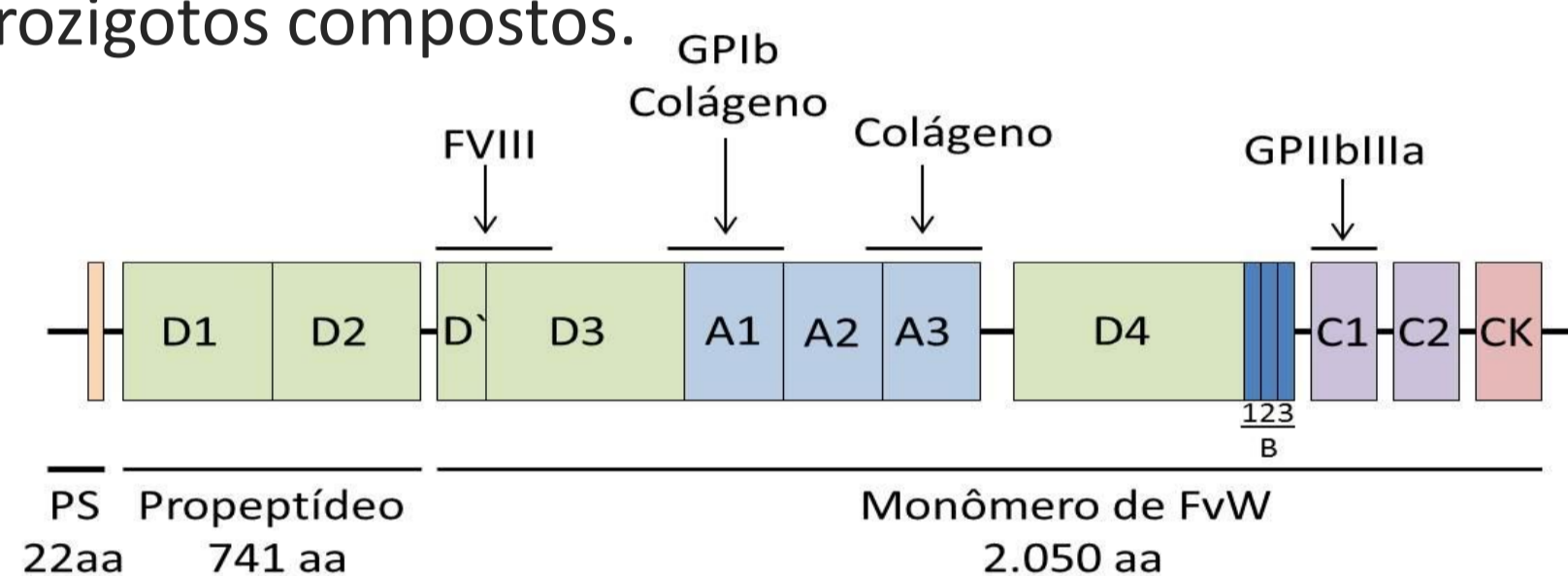


Figura 1: Estrutura primária do Fator de von Willebrand. A figura mostra uma pré-sequência, o propeptídeo, o FvW maduro e seus domínios de ligação.

## OBJETIVO

O presente trabalho está integrado a um projeto que visa a detecção de mutações em pacientes com DvW tipo 3, no Rio Grande do Sul. Neste estudo foi analisada a região do éxon 28 do gene do FvW, que codifica os Domínios A1, A2 e parte do Domínio A3 da proteína.

## MATERIAIS E MÉTODOS

No estudo foram incluídos 30 pacientes sem parentesco, diagnosticados previamente com a DvW tipo 3. 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 28 foi amplificado por PCR, sendo confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, e os amplicons foram preparados para o sequenciamento utilizando as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase. As amostras foram então encaminhadas a uma empresa terceirizada que realizou o sequenciamento.

As sequências obtidas após o sequenciamento foram comparadas com a sequência referência do FvW do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do alinhamento pelo programa CodonCodeAligner implementado no MEGA 5.04. A predição do efeito das mutações sem sentido foi realizada utilizando cinco algoritmos diferentes: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), SiFT (SortingIntoleranttoTolerant), HOPE (HaveOurProteinExplained), Mutation Taster e PROVEAN (ProteinVariationEffectAnalyzer).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento foram encontradas 8 mutações de sentido trocado na região que corresponde ao Domínio A1 da proteína, sendo elas: Val1279Ile, Ile1343Val, Val1360Ala, Phe1369Ile, Ser1378Phe, Arg1379Cys, Thr1381Ala e Ser1442Gly.

As tabelas 1 e 2 mostram o efeito das mutações encontradas conforme os diferentes algoritmos utilizados.

Tabela 1: Efeito das mutações no FvW, conforme os diferentes algoritmos.

Mutação	ALGORITMO			
	Polyphen-2	SIFT	PROVEAN	Mutation Taster
Val1279Ile	benigna	tolerado	neutra	causa doença
Ile1343Val	benigna	tolerado	neutra	causa doença
Val1360Ala	provável dano	tolerado	neutra	causa doença
Phe1369Ile	provável dano	prejudicial	neutra	causa doença
Ser1378Phe	provável dano	prejudicial	deletéria	polimorfismo
Arg1379Cys	provável dano	prejudicial	deletéria	polimorfismo
Thr1381Ala	benigna	tolerado	neutra	polimorfismo
Ser1442Gly	benigna	tolerado	neutra	polimorfismo

Tabela 2: Efeito das mutações no FvW, conforme o software HOPE.

Mutação	HOPE
Val1279Ile	resíduo mutante é maior
Ile1343Val	resíduo mutante é menor
Val1360Ala	resíduo mutante é menor
Phe1369Ile	resíduo mutante é menor
Ser1378Phe	resíduo mutante é maior, mais hidrofóbico
Arg1379Cys	perda de carga positiva, resíduo mutante mais hidrofóbico
Thr1381Ala	resíduo mutante menor, mais hidrofóbico
Ser1442Gly	resíduo mutante é menor

A partir destes dados, podemos observar que houve discrepâncias quanto aos efeitos das substituições de aminoácidos nos diferentes softwares, isso ocorre de acordo com a maneira que o programa realiza os cálculos de predição e, conforme o banco de dados que alimenta o programa.

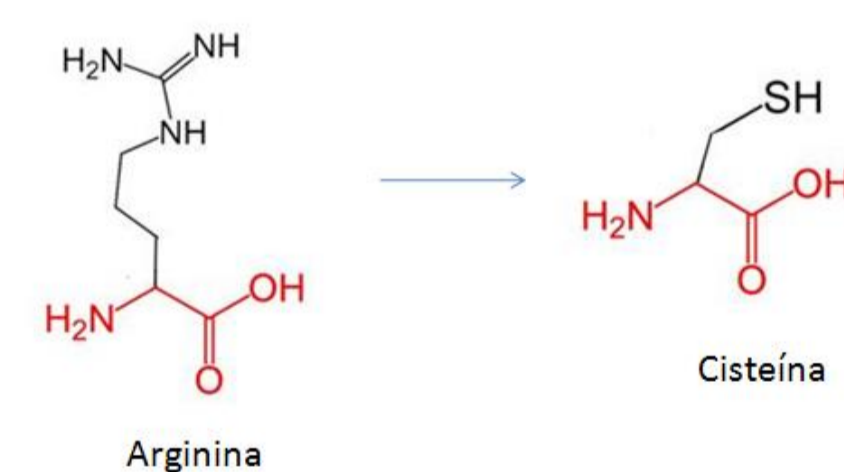


Figura 2: Diferença entre a estrutura dos resíduos de aminoácidos normal (arginina) e mutante (cisteína), resultantes da mutação Arg1379Cys.

Para que se obtenha a caracterização completa das mutações estudadas, outros aspectos devem ser analisados, como: o potencial eletroestático, a carga e a polaridade dos aminoácidos, a influência na estrutura secundária, bem como as interações intramoleculares e intermoleculares existentes no FvW. Portanto, os estudos seguem para um melhor entendimento sobre modificações no FvW que podem influenciar no fenótipo da DvW tipo 3.

## REFERÊNCIAS:

- Blombäck M, Eikenboom J, Lane D, Denis C, Lillicrap D. 2013. von Willebrand disease Biology. 2012. Haemophilia. 18 Suppl 4:141-7.
- Bowman M, Tuttle A, Notley C, Brown C, Tinlin S, Deforest M, Leggo J, Blanchette VS, Lillicrap D, James P. 2013. The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. J Thromb Haemost. 11:512-20.
- Lahiri DK, Nurnberg J. 1991. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucl Acids Res 19:5444.
- Lillicrap D & James PD. 2013. The molecular characterization of von Willebrand disease: good in parts. Brit J Haematol 161:166-176.
- Rodeghiero F. 2002. von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine. Haemophilia 8:292-300.