

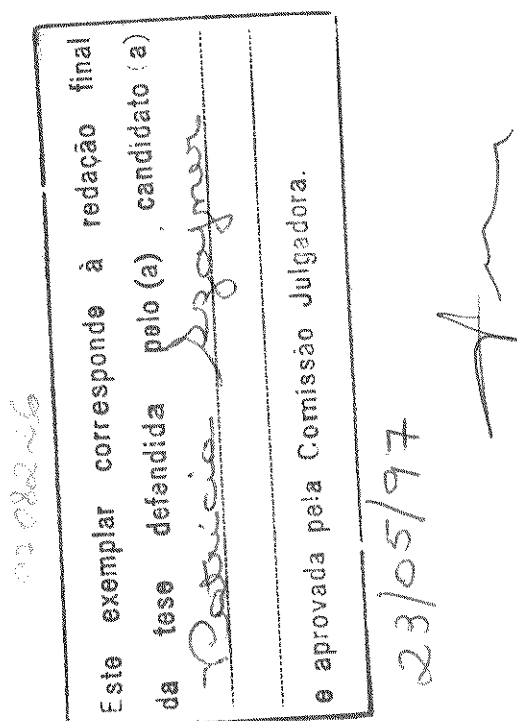
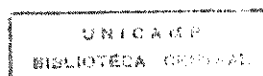
**"IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ALTERAÇÕES MOLECULARES NO GENE DO FATOR IX
EM PACIENTES COM HEMOFILIA B"**

Patricia Szajner

Orientador: Prof. Dr. Fernando F. Costa

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração Genética.

1997



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
53382
 V. E
 TOMBO DC/ 31065
 PROC. 281/97
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 15/07/97
 N.º CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00098798-9

7
Sz381

Szajner, Patricia.

Identificação e caracterização de alterações moleculares no gene do fator IX em pacientes com hemofilia B / Patricia Szajner. -- Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador: Fernando Ferreira Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hemofilia. 2. Sangue - Fator IX de coagulação. 3. Hereditariedade. 4. Mutação. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

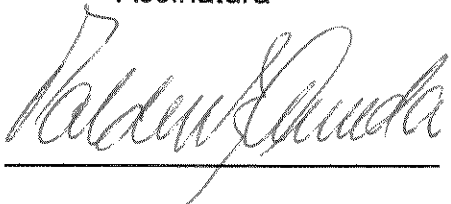
Campinas, 23 de Maio de 1997

Banca Examinadora:

Titulares

Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Assinatura



Prof. Dr. Valder R. Arruda

Assinatura



Prof. Dr. Fernando F. Costa

Assinatura

Suplente

Prof. Dr. Adilson Leite

Assinatura



APROVADA

Aos meus pais,
por todo o amor dedicado e
por nunca terem deixado de acreditar...

Ao Felipe,

Pelo apoio, paciência e compreensão

Pela presença, alegria e carinho

Pelas idéias e pelas histórias

Por me ensinar a gostar e confiar...

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando F. Costa por ter aceito ser meu orientador tão repentinamente e por ter tornado possível a realização desta tese.

Ao Valder e à Silvana, pela orientação, por tudo que me ensinaram, pela ajuda em todos os momentos, pelas correções, pela paciência, pelas longas conversas, pelas alegrias, pelos desabafos e por terem tornado melhores os meus dias.

À Mônica pela amizade de muitos anos e principalmente por ter me convidado para trabalhar no Hemocentro, socorrendo-me em um momento muito difícil.

À Dani e ao Vagner pelo bom humor e alto astral quase constantes.

À Ângela, pelas soluções e géis de seqüenciamento, além das intermináveis histórias de tartarugas...

À Tereza por não deixar faltar nada.

À Simone por tornar viável nosso trabalho, por não esquecer do café, por garantir a festa de aniversário de todos e por NUNCA esquecer de cobrar uma dívida.

Ao Carlos e à Lena, pela experiência e pela companhia.

À Ucha, Cris e Deva por todos os DNAs.

À Raquel, Silvana, Elizete e Maria Inês pela capacidade e disposição para solucionar nossos problemas.

À Malu, Sandrinha e Rosana que tornam nosso trabalho mais fácil e muito mais bonito.

À Christine Hackel por participar da minha pré-banca e contribuir para a melhoria da tese.

Ao Prof. Dr. Pieter H. Reitsma e ao Prof. Dr. Dezdo David pelo fornecimento dos oligonucleotídeos utilizados em todas as análises.

Ao pessoal da manutenção que trabalha muito para manter tudo funcionando...

Ao Sr. Jorge e ao Sr. Caruso da portaria por terem garantido nossa segurança.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro

ÍNDICE GERAL

ABREVIACOES 9

RESUMO 10

INTRODUÇÃO..... 12

 As Bases Moleculares da Coagulação Sangüínea..... 13

 Regulação da Coagulação Sangüínea 19

 Hemofilia..... 22

 Fator IX..... 24

 Ativação do Fator IX 29

 O Gene do Fator IX 31

 Detecção de Portadoras do Gene da Hemofilia B..... 33

 Identificação das Alterações Moleculares no Gene do Fator IX 35

 Fator IX: Um Modelo para o Estudo de Mutações em Células Germinativas 38

 Análise de Mutações no Gene do Fator IX 40

 Terapia Gênica e Hemofilia B..... 41

OBJETIVOS 43

CASUÍSTICA..... 44

MÉTODOS..... 44

 Avaliação dos Parâmetros de Coagulação..... 44

 Extração de DNA a Partir de Leucócitos 45

 PCR-SSCP..... 46

 Detecção do Polimorfismo de Conformação de Hélice Simples (SSCP) 46

 Identificação da Mutação por Seqüenciamento Direto do Fragmento Obtido por PCR 52

 Análise dos Haplótipos 55

RESULTADOS 58

 PCR-SSCP..... 58

 Mutações nos 29 Pacientes Hemofílicos B 70

 Análise dos Haplótipos 73

 Mutações “Missense” em Sítios Conservados 77

 Análise dos Sítios CpG 78

 Determinação das Portadoras do Gene Ligado  Hemofilia..... 80

DISCUSSÃO..... 85

 Detecção da Portadora de Hemofilia B 86

 Análise de SSCP Não-Radioativo e Radioativo..... 86

 Detecção das Mutações nos 29 Pacientes Hemofílicos B 88

 Mutações nos Diferentes Domínios do Fator IX 90

 Padrão de Mutação na Amostra Analisada 97

 Mutações nos Sítios CpG 98

 Resíduos Espaçadores no Fator IX 100

 Processo Ambiental Versus Endógeno 101

 Efeito do Fundador 103

CONCLUSOES..... 105

SUMMARY 106

BIBLIOGRAFIA..... 108

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea..... 14

FIGURA 2: Diagrama do Gene do Fator IX e Seus Domínios Protéicos 24

FIGURA 3: Representação Esquemática das Vias de Ativação do Fator IX..... 31

FIGURA 4: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon B e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 59

FIGURA 5: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 4 e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 60

FIGURA 6: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon F e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 61

FIGURA 7: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 7 e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 62

FIGURA 8: Análise de SSCP Não-Radioativo da Região H1 do Exon 8 e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 63

FIGURA 9: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 8 e Identificação das Alterações Moleculares por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 64

FIGURA 10: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 6 e Identificação do Polimorfismo Malmö por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 65

FIGURA 11: Análise de SSCP Radiotivo do Exon 1 e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 67

FIGURA 12: Análise de SSCP Radiotivo do Exon 4 e Identificação das Alterações Moleculares por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 68

FIGURA 13: Análise de SSCP Radiotivo do Exon 8 e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR..... 69

FIGURA 14: Análise dos Sítios Polimórficos do Gene do Fator IX para Determinação dos Haplótipos 75

FIGURA 15: Sequenciamento dos Diferentes Alelos Dde I (IA:RY(i))..... 76

FIGURA 16: Sequenciamento do Fragmento de PCR Correspondente ao Exon 8 para Determinação da Portadora da Alteração Molecular na Família do Hemofílico HB16..... 84

TABELA I: Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados na Amplificação das Diferentes Regiões do Gene do Fator IX..... 51

TABELA II: Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados na Análise dos Haplótipos do Gene do fator IX..... 56

TABELA III: Alterações Moleculares Identificadas no Gene do Fator IX. 72

QUADRO 1: Resumo das Alterações de Sequência nos 29 pacientes analisados..... 73

TABELA IV: Análise dos Haplótipos 77

TABELA V: Mutações Independentes em Linhagens de Células Germinativas..... 79

TABELA VI: Comparação do Padrão de Mutações Independentes entre Diferentes Populações 80

TABELA VII: Análise dos Haplótipos para Detecção da Portadora na Família do Paciente HB6 82

TABELA VIII: Análise dos Haplótipos para Detecção da Portadora na Família do Paciente HB16..... 83

ABREVIATÖES

HB	Hemofílico B
FVII/FT	Complexo fator VII e fator tecidual
FVIIa/FT	Complexo fator VII ativado e fator tecidual
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
ATIII	Antitrombina III
Hya	Ácido eritro-β-hidroxiaspártico
kb	Kilobases
pb	Pares de base
FIX:C	Atividade coagulante do fator IX
SSCP	Polimorfismo de conformação de hélice simples
RFLP	Polimorfismo de fragmento de restrição
DGGE	Eletroforese em gel gradiente de desnaturação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
TBE	Tampão tris borato EDTA
ddNTP	Didesoxinucleotídeo trifosfato
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FIXα	Intermediário da ativação do fator IX
FIXaα	Intermediário da ativação do fator IX

RESUMO

A hemofilia B é uma doença hemorrágica hereditária caracterizada pela deficiência ou anormalidade da atividade coagulante do fator IX (FIX:C). O gene que controla a produção do fator IX está localizado no cromossomo X, na posição Xq27.1. É constituído por oito exons e sete íntrons abrangendo uma região de aproximadamente 33,5 kb que origina um mRNA de 2,2 kb. A análise do gene do fator IX de hemofílicos indica que cerca de 95% das alterações moleculares são identificadas nas seqüências correspondentes à região promotora, regiões codificadoras e sítios de excisão de íntrons. A maioria das mutações apresenta origem independente. As mutações de ponto são as alterações moleculares descritas em aproximadamente 85% dos casos de hemofilia B, sendo o restante devido a perdas ou inserções gênicas. A análise do polimorfismo de conformação de hélices simples de DNA (SSCP) possibilita o rastreamento rápido e eficaz de mutações. A identificação das mutações pelo seqüenciamento direto do DNA permite a determinação precisa da portadora, diagnóstico pré-natal e viabiliza o aconselhamento genético.

A comparação das mutações e quadros clínicos dos pacientes estudados neste trabalho com aqueles descritos em publicações anteriores também permitem a avaliação do efeito destas alterações na atividade do fator IX.

Neste estudo foi realizada a análise das alterações moleculares no gene do fator IX de 29 pacientes portadores de hemofilia B. A metodologia consistiu na amplificação das regiões codificadoras e promotora do gene do fator IX pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior análise do SSCP radioativo e não-radioativo, este último em um sistema automático de eletroforese (*Phastsystem*[®] Pharmacia), corado com nitrato de prata. A identificação das mutações foi realizada pelo seqüenciamento direto do fragmento do DNA com padrão anormal no SSCP. Com o emprego destas técnicas foi possível o reconhecimento de alterações moleculares em todos os pacientes analisados. Cinco mutações de ponto foram detectadas apenas na análise de SSCP radioativo. O seqüenciamento dos fragmentos com padrão de migração anormal permitiu a detecção de 31 mutações de ponto no gene do fator IX. Destas alterações, 22 representavam mutações diferentes, das quais 6 ainda não

descritas na literatura. Em um paciente foram encontradas três alterações nucleotídicas, uma delas uma mutação silenciosa na posição 31.093. A análise dos haplótipos indica que 24 mutações identificadas neste estudo apresentam origem independente. Quatro pacientes originários do Estado do Pará apresentam mesma mutação e haplótipo idêntico evidenciando a ocorrência de um possível efeito do fundador.

O estudo das mutações no gene do fator IX apresenta-se como um modelo para a determinação do padrão das alterações moleculares em linhagens de células germinativas. O padrão de mutações identificado no gene do fator IX é semelhante entre Caucásios, Asiáticos, e pequenos grupos de Hispânicos e Negróides. A população brasileira apresenta origem étnica bastante heterogênea e é representada por imigrantes provenientes da Europa, África, Ásia e pelas populações indígenas residentes mostrando-se, desta forma, distinta das demais populações previamente analisadas.

O padrão de mutação verificado neste estudo é semelhante àquele observado em outras populações o que sugere a predominância dos processos endógenos na determinação das mutações espontâneas em células germinativas.

INTRODUÇÃO

Os conceitos modernos de coagulação sangüínea datam do século XIX, após a descoberta da origem plasmática das fibras de fibrina e o posterior isolamento de seu precursor, o fibrinogênio. Em meados de 1850, Andrew Buchanan publicou um trabalho no qual demonstrava que um segundo fator plasmático (mais tarde denominado de trombina) era necessário para converter fibrinogênio em fibrina. Em 1892, Alexander Schmidt postulou que a trombina não poderia ser um constituinte normal do plasma e propôs que a mesma deveria circular na corrente sangüínea como um precursor inerte. Deste modo evoluiu o conceito de via de coagulação (Ratnoff e Forbes, 1991; Sussman, 1992).

Em 1905, Paul Moravitz publicou uma monografia que resumia os experimentos realizados durante o século XIX e que levaram à formulação da teoria da coagulação sangüínea a qual envolvia a interação de quatro fatores. Três destes fatores estariam presentes no plasma - a protrombina, os íons cálcio e o fibrinogênio - enquanto que o quarto componente, a tromboquinase (correspondente ao que hoje denominamos tromboplastina ou fator tecidual), parecia estar contido em plaquetas ou leucócitos. Segundo as idéias da época, o contato do sangue com tecidos ou outras superfícies provocaria a aglutinação das plaquetas e leucócitos com conseqüente liberação do fator tecidual. Este fator, por sua vez, reagiria com a protrombina na presença de Ca^{+2} para gerar a trombina que converteria o fibrinogênio em fibrina. O rompimento das células dos tecidos representaria uma segunda fonte de fator tecidual, que desencadearia o processo de coagulação mais rapidamente ao redor da lesão (Rapaport e Rao, 1995).

Com o passar dos anos foram descobertos novos fatores plasmáticos e tornou-se cada vez mais evidente que o processo de coagulação poderia ser desencadeado por pelo menos dois caminhos distintos. O primeiro, como estabelecido por Moravitz, seria ativado pela exposição do sangue ao fator tecidual, agora identificado como uma glicoproteína localizada na superfície dos fibroblastos que se encontram distribuídos estrategicamente por todo o corpo para evitar a hemorragia. A segunda via foi estabelecida com a observação de que o sangue coagula quando em

contato com a superfície negativamente carregada do vidro, que ativa a proteína plasmática denominada Fator de Hageman (fator XII) sem a liberação do fator tecidual. (Rapaport e Rao, 1995). A via dependente do fator tecidual foi denominada via extrínseca da coagulação enquanto que a via independente deste fator foi denominada via intrínseca da coagulação.

As Bases Moleculares da Coagulação Sangüínea

A coagulação sangüínea é um mecanismo fisiológico de defesa que garante a integridade do sistema circulatório em organismos superiores (Furie e Furie, 1988; Iwanaga, 1993). O aparato hemostático evoluiu de maneira a controlar o balanço entre dois requerimentos conflitantes da circulação sangüínea: a manutenção da fluidez do sangue, que permite seu fluxo pela árvore vascular, e a capacidade de evitar hemorragias, através da formação de polímeros de fibrina que impedem mecanicamente a saída do sangue dos vasos quando o tecido é submetido a qualquer forma de dano (Tuddenham e Cooper, 1994).

A coagulação do sangue é resultado da conversão seqüencial de pró-enzimas e pró-cofatores plasmáticos para suas formas ativadas por meio de duas vias de reações enzimáticas. Estas vias, denominadas vias intrínseca e extrínseca da coagulação sangüínea convergem em uma via comum após a ativação do fator X (**Figura 1**) (Davie e Ratnoff, 1964; MacFarlane, 1964; Davie, 1995). Embora este "modelo de cascata" de reações seqüenciais tenha facilitado o estudo e a análise do processo hemostático *in vitro*, ele tem se mostrado inadequado para a compreensão do complexo sistema de regulação da coagulação sangüínea *in vivo* (Lawson *et al.*, 1994).

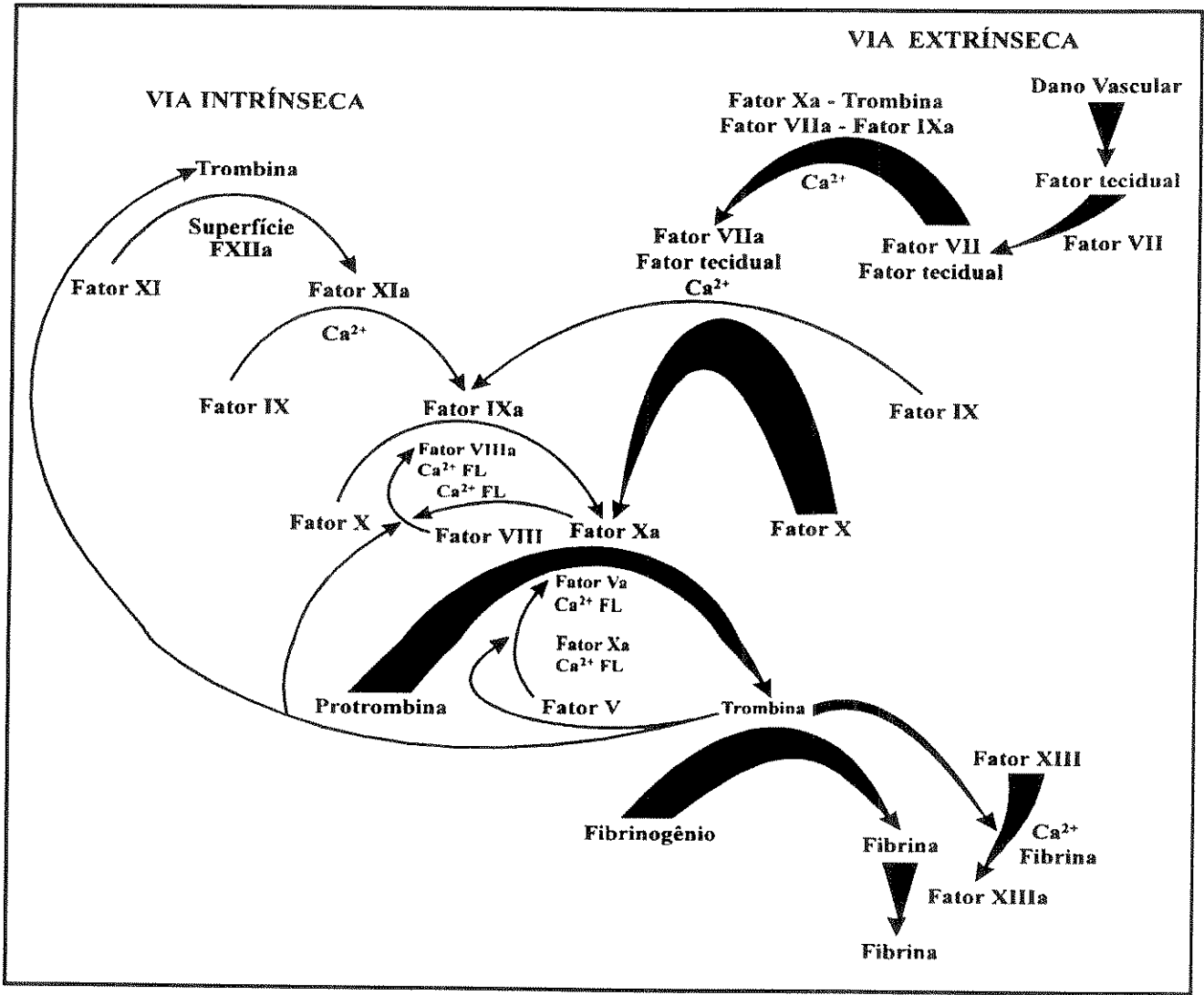


Figura 1: Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea

A ativação da via extrínseca da coagulação (lado direito) ocorre após dano vascular e exposição do fator tecidual ao sangue. A via intrínseca (lado esquerdo) pode ser iniciada quando a trombina é gerada, levando à ativação do fator XI. As duas vias convergem no processo de ativação do fator X. Os fatores ativados são indicados com a letra minúscula a, i.e., XIa, Xa, IXa, etc. FL refere-se ao fosfolipídio. Retirado de Davie *et al.* (1991).

Via Intrínseca da Coagulação

Há mais de 30 anos atrás, duas propostas semelhantes foram independentemente postuladas e representam a base da via intrínseca da cascata de coagulação (Davie *et al.*,1991). Esta via inicia-se com a ativação do fator XII pela calicreína, quando em contato com superfícies negativamente carregadas, como vidro, caolina, carbonato de bário, celite, asbestos, ácido elágico, dextran sulfato, etc. (via de

ativação por contato) (Davie e Ratnoff, 1964; Tans e Rosing, 1987; Pixley e Colman, 1993). Acredita-se que o ativador fisiológico do fator XII pode estar presente nas células vasculares subendoteliais ou na superfície celular endotelial estimulada, embora este componente ainda não tenha sido identificado (Bauer *et al.*, 1990; Pixley e Colman, 1993). O fator XIIa gerado cliva o fator XI, produzindo o fator XIa, na presença de cininogênio de alto peso molecular (Kurachi e Davie, 1977; Brunné *et al.*, 1993). O fator XIa, por sua vez, desprende-se da superfície na qual estava aderido e, na presença de Ca^{2+} , promove a conversão do fator IX em fator IX ativado (FIXa). A ativação do fator IX envolve duas clivagens e a liberação de um peptídeo de ativação (DiScipio *et al.*, 1978). O fator IXa forma um complexo trimolecular, denominado complexo “tenase”, com os fatores VIIIa e X, em superfícies fosfolipídicas. Na presença de íons cálcio, o fator VIIIa acelera a clivagem e ativação do fator X pelo fator IXa. O fator Xa, por sua vez, liga-se à protrombina (fator II) e ao fator Va, também em superfícies fosfolipídicas, dando origem ao chamado complexo protrombinase. A protrombina é, então, clivada originando trombina. Esta última atua sobre as moléculas de fibrinogênio promovendo a liberação de fibrinopeptídeos, com a produção de monômeros de fibrina. Estes monômeros polimerizam-se espontaneamente e originam as redes de fibrina que compõem o coágulo. A trombina é também responsável pela ativação do fator XIII, uma transamidase plasmática que garante a estabilização do coágulo através da formação de ligações ϵ -(γ -glutamil)lisina entre duas moléculas adjacentes de fibrina. O fator XIIIa também promove a ligação de proteínas plasmáticas como fibronectina e α 2-antiplasmina às cadeias α da fibrina, resultando na incorporação das mesmas ao coágulo (Davie *et al.*, 1991; Mann e Laszlo, 1993).

Finalmente, a trombina também participa da ativação (“feedback” positivo) dos fatores V, VII, VIII e XI, um processo essencial para a rápida geração da própria trombina e conseqüente formação dos polímeros de fibrina (Kenneth e Lorand, 1993).

Via Extrínseca da Coagulação

O sistema extrínseco de coagulação inicia-se pela ação de uma apoproteína ativa, denominada fator tecidual (FT), integrada na membrana de diferentes tipos

celulares, e particularmente evidente nas células subendoteliais da parede vascular, no cérebro e placenta (Ratnoff e Forbes, 1991; Tuddenham e Cooper, 1994). O rompimento da parede vascular permite que o fator VII presente no plasma se ligue aos sítios de fator tecidual das células do tecido adjacente, originando o chamado complexo fator VII/fator tecidual (FVII/FT). Em menores proporções observa-se a formação do complexo entre o fator tecidual e o fator VII ativado (FVIIa/FT) que circula no sangue em pequenas quantidades (Rao e Rapaport, 1988). Este último complexo realiza a clivagem do fator X, da mesma maneira que o faz o fator IXa na via intrínseca, produzindo fator Xa. O fator Xa gerado, por sua vez, é responsável pela ativação do fator VII em complexo com o fator tecidual, amplificando a resposta do organismo à injúria do sistema vascular (Rao e Rapaport, 1988; Ratnoff e Forbes, 1991). O complexo FVIIa/FT é também responsável pela ativação do fator IX (Osterud e Rapaport, 1977; Hoffman *et al.*, 1986; Warn-Cramer e Bajaj, 1986), gerando fator IXa, que atua no complexo "tenase", descrito na via intrínseca. O fator Xa gerado interage com o fator Va no complexo protrombinase, responsável pela formação de trombina e posterior polimerização dos monômeros de fibrina.

Alguns trabalhos demonstraram que o fator Xa também atua na ativação do fator IX, tornando o processo de coagulação ainda mais complexo (Lawson *et al.*, 1994). O mecanismo e a cinética de ativação dos fatores X e IX pelo complexo FVIIa/FT e a própria ativação do fator IX pelo fator Xa são objetos de controvérsia entre diferentes grupos de estudo. Lawson e Mann (1991) propuseram um modelo que explica o papel do complexo FVIIa/TF e dos fatores IX e X na via extrínseca da coagulação sangüínea. Segundo a proposta, o complexo FVIIa/FT seria responsável pela conversão de uma pequena quantidade de fator X para fator Xa e fator IX para fator IX α . O fator Xa gerado atuaria, juntamente com o complexo FVIIa/FT, na clivagem da ligação peptídica entre os resíduos Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ do fator IX, produzindo o intermediário FIX α . Finalmente o complexo promoveria a clivagem da segunda ligação peptídica do fator IX, liberando o peptídeo de ativação e produzindo o fator IXa β com atividade catalítica. O fator IXa β , quando em complexo com o fator VIIIa propagaria a ativação do fator X (Lawson e Mann, 1991).

Via Intrínseca Versus Via Extrínseca

A constatação de que pacientes com deficiência hereditária em uma das proteínas plasmáticas do início da via de contato da coagulação (fator XII, pré-calicreína ou cininogênio de alto peso molecular) não apresentam episódios hemorrágicos (Hathaway *et al.*, 1965; Colman *et al.*, 1975) associada à observação de que o complexo catalítico FVIIa/FT é capaz de ativar não somente o fator X, como também o fator IX (Osterud e Rapaport, 1977), levam à sugestão de que a via extrínseca seja a principal responsável pelo processo de ativação da coagulação *in vivo* (Bauer *et al.*, 1990). Além disto, ainda não foi possível identificar o ativador fisiológico do fator XII, apesar da via intrínseca ter sido bem caracterizada *in vitro*. Tais fatos tornam suspeita a relevância biológica da via de contato da coagulação na iniciação da resposta hemostática fisiológica (Lawson *et al.*, 1994).

Entretanto, indivíduos com deficiência no fator XI apresentam quadro clínico heterogêneo que varia desde os casos assintomáticos até casos com quadro hemorrágico semelhante ao observado nas hemofilias A e B, sugerindo que este fator pode desempenhar um papel significativo na resposta hemostática (Lawson *et al.*, 1994). Esta hipótese tem sido testada e resultados indicam que o fator XIa desempenha um potencial papel na amplificação da taxa de ativação intrínseca *in vivo* (ten Cate *et al.*, 1996). Foi demonstrado (Gailani e Broze, 1991; Broze e Gailani, 1993) que o fator XI pode ser ativado por "feedback" positivo (retroalimentação) pela α -trombina. Neste modelo, a ativação do fator XI tem função importante na propagação da resposta hemostática após a iniciação do processo de coagulação pelo complexo FVIIa/FT da via extrínseca. Embora esta hipótese apresente fortes evidências experimentais, a possibilidade de iniciação da via intrínseca decorrente da ativação do fator XI pela trombina e independente da ação do fator XII tem sido fortemente contestada (Brunné *et al.*, 1993).

Desta forma, fica atribuída à via extrínseca um papel fundamental na iniciação do processo de coagulação *in vivo*, gerando, entretanto, um paradoxo interessante. Uma vez que o complexo FVIIa/FT é responsável pela iniciação da coagulação e considerando-se que este complexo representa um potente ativador do fator X, os

fatores IXa e VIIIa passariam a ser supérfluos no controle da hemostasia (Gailani e Broze, 1991; Lawson *et al.*, 1994). Por outro lado, a ocorrência dos episódios hemorrágicos ocasionados por deficiência nos fatores VIII e IX, correspondentes às hemofilias A e B respectivamente, são evidências diretas da importância destes fatores no processo de coagulação sangüínea. O conhecimento das deficiências e as observações das complicações hemorrágicas delas decorrentes tornam evidente a importância dos fatores II, V, VII, VIII, IX e X na regulação da hemostasia.

A análise das propriedades e do mecanismo de ação do inibidor da via do fator tecidual (TFPI) permitiu a formulação de um modelo revisado do processo de coagulação (Broze *et al.*, 1988) que concilia os resultados obtidos *in vitro* e explica os requerimentos fisiológicos das vias intrínseca e extrínseca para regulação da hemostasia do sistema circulatório.

Neste modelo, a coagulação inicia-se com a lesão da superfície endotelial e a exposição do fator tecidual ao fator VIIa presente no plasma, originando o complexo FVIIa/FT. Este complexo ativa pequenas quantidades de fator IX e fator X. Com a geração do fator Xa o efeito inibitório do TFPI passa a se manifestar e, deste modo, a prevenir a ativação dos fatores X e IX pelo complexo FVIIa/FT. Nestas condições, a ativação do fator X passa a depender da ação do complexo FIXa/FVIIIa. O fator IXa é resultante da ação inicial do FVIIa/FT e da ativação suplementar promovida pelo fator XIa (Broze *et al.*, 1988; Rapaport, 1989; Broze *et al.*, 1990; Gailani e Broze, 1991).

Este modelo sugere que a via extrínseca desempenha um papel importante na **iniciação** do processo de síntese da fibrina enquanto que a via intrínseca é responsável principalmente pela **manutenção e amplificação** da formação da fibrina na cascata de coagulação *in vivo* (Davie *et al.*, 1991; Broze e Gailani, 1993; ten Cate *et al.*, 1996).

Hoffman *et al.* (1986) demonstraram que os fatores IXa e Xa gerados na fase inicial do processo de coagulação pelo complexo FVIIa/FT desempenham papéis fisiológicos distintos. A principal função do fator Xa parece ser a ativação de plaquetas pela geração de pequena quantidade de trombina na proximidade das mesmas. O

fator IX, por sua vez, seria responsável pelo aumento da produção de trombina através da ativação do fator X na superfície das plaquetas ativadas.

Regulação da Coagulação Sangüínea

Para a manutenção da hemostasia e integridade do sistema vascular torna-se evidente a necessidade de um complexo sistema de regulação e controle da coagulação sangüínea (Rosemberg e Rosemberg, 1984). Este controle é realizado por diferentes inibidores das proteases que atuam no processo de coagulação ou pela via da proteína C. As enzimas proteolíticas envolvidas na coagulação sangüínea (trombina, fatores XIa, Xa, IXa, VIIa, proteína C etc) apresentam em seu sítio ativo uma tríade catalítica constituída pelos resíduos serina, histidina e ácido aspártico característica das denominadas serina proteases do tipo tripsina. Os inibidores das serina proteases podem ser divididos em dois grupos principais: as serpinas e as kuninas (Salvesen e Pizzo, 1994). Os principais representantes das serpinas e kuninas nas reações da coagulação sangüínea são, respectivamente, a Antitrombina III (ATIII) e o Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI), descritos a seguir.

Antitrombina III

O plasma humano contém uma família de inibidores de serina proteases, conhecidos como serpinas, cuja função é neutralizar enzimas ativas de vários sistemas fisiológicos, tais como coagulação, fibrinólise e sistema complemento, e limitar danos autopatológicos.

A principal serpina que atua na regulação da cascata de coagulação é a antitrombina III. Este inibidor plasmático é capaz de inativar as serina proteases da via intrínseca, incluindo fatores XIa, IXa, Xa e trombina, e em menor proporção, inibir a atividade do complexo FVIIa/FT (Tuddenham e Cooper, 1994). A antitrombina III forma complexos com os fatores ativados interferindo, deste modo, na atividade enzimática destas enzimas da cascata de coagulação. Entretanto, a inibição da trombina, fator IXa e fator Xa pela antitrombina III atinge níveis muito baixos e insuficientes para prevenir

o processo de coagulação. Estas taxas são dramaticamente aumentadas pela heparina, um complexo de glicosaminoglicanos polisulfatados que se liga à antitrombina III e atua sobre esta última provocando modificações conformacionais na molécula, neutralizando cargas no centro reativo e induzindo a formação de complexos ternários entre as proteases, o inibidor e a heparina (Evans *et al.*, 1992; Olson *et al.*, 1992). Estudos revelam que heparan sulfato, um oligossacarídeo tipo heparina, com atividade anticoagulante, é encontrado na superfície de células do endotélio vascular (Damus *et al.*, 1973; Marcum e Rosenberg, 1984).

Outros inibidores plasmáticos de proteases que apresentam papel significativo na regulação da coagulação sangüínea foram identificados e caracterizados e incluem cofator heparina II, α 1-antitripsina, α 2-antiplasmina, inibidor do ativador de plasminogênio 1, inativador de C1, inibidor de proteína C ativada e inibidor da via extrínseca.

Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI)

O inibidor do fator tecidual foi originalmente denominado inibidor da coagulação associado à lipoproteína (LACI- "Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor") por Broze *et al.* (1988) e inibidor da via extrínseca (EPI - "Extrinsic Protein Inhibitor") por Rao e Rapaport (1987). Esta proteína foi inicialmente isolada de uma linhagem celular de hepatoma (HepG2) (Broze e Miletich, 1987), e é também produzida *in vitro* por linhagens de células endoteliais, linhagens de células tipo monócito, células de pulmão, rim e pâncreas (Broze *et al.*, 1990). As células responsáveis pela síntese do inibidor *in vivo* ainda não foram determinadas. O TFPI é um inibidor de serina protease que contém uma seqüência amino-terminal ácida seguida de três domínios do tipo Kunitz e uma região carboxi-terminal básica (Wun *et al.*, 1988). Os inibidores desta família (kuninas) atuam por um mecanismo comum no qual o inibidor simula a forma do substrato da protease e subsequente promove a clivagem desta enzima. Em termos cinéticos os inibidores do tipo Kunitz tipicamente produzem uma inibição lenta, forte, competitiva e reversível (Broze *et al.*, 1990).

Este inibidor, como o próprio nome sugere, é responsável pela inativação do complexo FVIIa/FT. O mecanismo proposto para esta inibição envolve a formação de um complexo quaternário constituído de fator Xa, TFPI, fator VIIa e fator tecidual e divide-se em duas etapas. No primeiro passo, o fator Xa se liga à arginina do centro reativo do segundo domínio tipo Kunitz do inibidor e é neutralizado em uma reação independente de íons cálcio. Em um segundo passo, ocorre a ligação dos complexos TFPI/FXa e VIIa/TF, em uma reação na qual o fator VIIa liga-se à lisina do centro reativo do primeiro domínio tipo Kunitz. Desta maneira estabelece-se o complexo quaternário com conseqüente perda de atividade catalítica do complexo FVIIa/FT, em um processo Ca^{+2} -dependente (Broze *et al.*, 1988; Rapaport, 1991; Rapaport e Rao, 1995).

Via da Proteína C Ativada

A inibição da síntese de trombina provocada pela proteína C representa a principal via de controle da coagulação sangüínea (Ratnoff e Forbes, 1991). A proteína C circula na corrente sangüínea como um zimógeno de uma serina protease e é ativada pela própria trombina (Kisiel *et al.*, 1977; Kisiel, 1979) quando esta encontra-se ligada a um receptor presente nas células endoteliais intactas, denominado trombomodulina (Owen e Esmon, 1981; Esmon *et al.*, 1982). A ativação da proteína C se dá pela clivagem de uma única ligação peptídica na extremidade amino-terminal da cadeia pesada da proteína, que resulta na liberação de um pequeno peptídeo de ativação (12 aminoácidos) (Kisiel, 1979). A proteína C ativada atua especificamente na proteólise limitada dos fatores Va e VIIa, importantes cofatores da cascata de coagulação, inativando-os completamente. Para esta reação, a proteína C ativada também requer a ligação de um cofator, a proteína S (Walker, 1980), uma glicoproteína plasmática sintetizada pelas células endoteliais e pelo fígado. O complexo proteína C/proteína S atua sobre os fatores Va e VIIa, na superfície fosfolipídica de plaquetas ou no endotélio, na presença de íons cálcio.

Diferente de outras serina proteases que atuam na coagulação sangüínea, a proteína C ativada não é inativada pela antitrombina III, mesmo na presença de

heparina. A ação anticoagulante da proteína C é neutralizada por um inibidor plasmático específico, denominado inibidor da proteína C, de acordo com sua função (Suzuki *et al.*, 1983).

Hemofilia

Hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária recessiva, decorrente de defeitos nos genes localizados no cromossomo X que codificam para as proteínas que atuam na cascata de coagulação sangüínea. Deficiências de atividade do fator VIII acarretam a denominada hemofilia A ou hemofilia clássica, que representa cerca de 85% do total destas doenças hereditárias, enquanto que defeitos no fator IX caracterizam a hemofilia B, responsável por aproximadamente 15% dos casos de hemofilia descritos (Broze e Miletich, 1987). Outros fatores de coagulação, tais como fator V, fator VII, fator X e fator XI protrombina e fibrinogênio podem apresentar deficiências com conseqüente quadro hemorrágico do portador homozigoto. Estes casos apresentam freqüência muito baixa e não são denominados hemofilias, uma vez que os genes responsáveis pela codificação destas proteínas são autossômicos.

A existência de dois tipos de hemofilia foi proposta inicialmente em 1947 quando Pavlovsky misturou plasma de dois indivíduos com quadro clínico característico de hemofilia grave e observou que o tempo de coagulação tornou-se normal. Entretanto, a hemofilia B foi caracterizada completamente somente cinco anos mais tarde, em 1952, por três grupos independentemente, os quais determinaram que o quadro hemorrágico era decorrente da deficiência em um fator de coagulação diferente do fator VIII (Aggeler *et al.*, 1952; Biggs *et al.*, 1952; Schulman e Smith, 1952).

As hemofilias A e B são clinicamente indistinguíveis e podem se expressar nas formas leve, moderada e grave de acordo com a atividade coagulante residual do fator envolvido. O quadro clínico mostra-se grave quando os níveis de atividade coagulante apresentam-se menores que 1% da atividade normal do fator no plasma de indivíduos não afetados. Os casos moderados caracterizam-se por uma atividade de 1% a 5% dos valores normais, enquanto que a hemofilia leve é característica de

indivíduos com atividade residual do fator superior a 5% até 30% da normal (Lozier e Brinkhous, 1994). Os sangramentos ocorrem espontaneamente nos casos graves e menos comumente nos moderados. Nos indivíduos que apresentam hemofilia leve são observados sangramentos geralmente após intervenção cirúrgica.

A incidência de hemofilia A nos diversos grupos étnicos é variável, com valores aproximados de 1 caso para cada 5.000 a 10.000 nascimentos de homens. A hemofilia B, por sua vez apresenta uma incidência aproximada de 1 caso para 25.000 a 30.000 indivíduos do sexo masculino (Thompson, 1986; Brownlee, 1988; Chan *et al.*, 1991; Giannelli *et al.*, 1996). No Brasil, a incidência de hemofilia (A e B) possivelmente apresenta-se superior a 1:20.000 nascimentos de homens. Entretanto, a análise das diferentes regiões do Brasil indicou um número inferior ao esperado, o que pode ser explicado pela dificuldade de diagnóstico observada nas diversas regiões (excluindo a região sudeste) e ausência de registros dos pacientes (Melo, 1989).

O quadro clínico da hemofilia inclui hemartroses, hemorragias musculares e em outros tecidos e em cavidades decorrentes de trauma ou mesmo espontâneas. As hemartroses são as complicações hemorrágicas mais comuns do aparelho locomotor sendo as articulações dos joelhos, cotovelos e tornozelos as mais comumente acometidas. A hemorragia intracraniana está entre os problemas mais graves que afetam os hemofílicos e foi a principal causa de morte por nesta doença até o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida nos anos 80.

Hemofilia B

A hemofilia B é uma doença hemorrágica hereditária resultante da deficiência ou ausência da atividade do fator IX (FIX:C) na cascata de coagulação sangüínea (Green *et al.*, 1989). A doença apresenta padrão de herança Mendeliana recessiva e encontra-se ligado ao cromossomo X e como consequência observa-se que a hemofilia B limita-se quase exclusivamente a indivíduos do sexo masculino, enquanto que as mulheres apresentam-se apenas como portadoras da deficiência. A prevalência da hemofilia B no Brasil é similar àquelas verificadas em todas as populações estudadas até o momento. A análise de 52 instituições de atendimento às

coagulopatias no Brasil revelou que 86% dos casos de hemofilia correspondem à hemofilia A e 14% representam casos com hemofilia B (Melo, 1989).

Cerca de um terço dos casos de hemofilia B são decorrentes de mutações esporádicas (Roberts, 1993), um nível semelhante àquele observado para hemofilia A.

Fator IX

O fator IX é uma glicoproteína precursora de uma serina protease dependente de vitamina K que desempenha importante papel nas vias intrínseca e extrínseca da coagulação sanguínea (Figura 2).

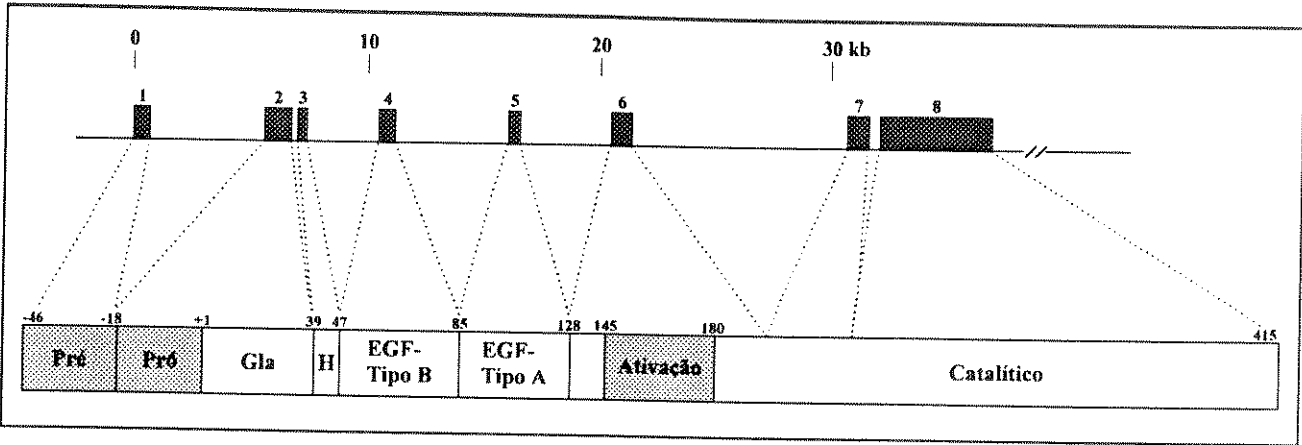


Figura 2: Diagrama do Gene do Fator IX e Seus Domínios Protéicos

Acima: Representação esquemática do gene do fator IX mostrando os 8 exons (1-8) separados pelas seqüências correspondentes aos introns. Abaixo: Domínios do fator IX. Os números indicam a posição dos resíduos de aminoácidos que delimitam os diferentes domínios. As áreas em cinza correspondem às regiões que são clivadas antes da secreção na corrente sanguínea ou durante o processo de ativação do fator IX. As linhas pontilhadas indicam o segmento da proteína codificado por cada exon. Pré = pré-peptídeo, Pró = pró-peptídeo, Gla = região com 11 resíduos de glutamato γ -carboxilados, H = domínio hidrofóbico, EGF-Tipo B = domínio tipo EGF com um sítio de alta afinidade por Ca^{+2} , EGF-Tipo A = domínio tipo EGF sem sítio para ligação de Ca^{+2} , Ativação = seqüência peptídica clivada no processo de ativação do fator IX e Catalítico = domínio serina protease contendo a triade catalítica His²²¹, Asp²⁶⁹ e Ser³⁶⁵. Retirado de Giannelli *et al.* (1992).

O fator IX é sintetizado primariamente no fígado como um pré-pró-peptídeo de cadeia única (Kurachi e Davie, 1982; Salier *et al.*, 1990). Esta molécula é submetida a várias modificações durante e após o processo de tradução com subsequente secreção na corrente sangüínea. Estas modificações incluem a clivagem do peptídeo-sinal e do pró-peptídeo, glicosilação, β -hidroxilação do resíduo Asp⁶⁴, formação de pontes dissulfeto e γ -carboxilação dos 12 resíduos de ácido glutâmico do domínio Gla na extremidade N-terminal da proteína. O fator IX liberado na corrente sangüínea apresenta-se como um zimógeno de peso molecular aproximado de 57.000 (incluindo 17% de carboidrato) (DiScipio *et al.*, 1978) constituído por 415 aminoácidos. Esta molécula precursora é ativada pelo fator XIa e/ou pelo complexo FVIIA/FT que promovem uma proteólise limitada em seu sítio de ativação (Kurachi *et al.*, 1992).

A estrutura primária do fator IX foi parcialmente determinada por seqüenciamento da proteína e inteiramente deduzida a partir dos dados da seqüência do cDNA correspondente ao gene (Choo *et al.*, 1982; Kurachi e Davie, 1982).

O mRNA que codifica para o gene do fator IX humano apresenta três possíveis sítios de iniciação da tradução, que correspondem aos resíduos de metionina nas posições -46, -41, e -39 em relação à tirosina da extremidade amino-terminal da proteína madura. Estudos de comparação da seqüência do gene do fator IX de diferentes espécies sugerem que a metionina na posição -39 seja o provável sítio de iniciação da tradução em humanos (Larson e High, 1992). Este sítio também coincide com a seqüência consenso para iniciação da tradução em eucariotos, proposta por Kozac (1986).

A controvérsia acerca do sítio exato de início da tradução mantém indeterminado o número de resíduos de aminoácidos encontrados na seqüência pré-pró-líder presente na extremidade N-terminal do precursor da proteína madura que circula na corrente sangüínea. O pré-peptídeo consiste dos primeiros aminoácidos da molécula precursora e constitui um típico peptídeo-sinal hidrofóbico, que possibilita a secreção da proteína do hepatócito para o sangue. Esta seqüência é liberada do fator IX, antes da sua secreção, pela ação de uma peptidase sinal que cliva a proteína entre os resíduos de aminoácido Cys⁻¹⁹ e Thr⁻¹⁸.

O pró-peptídeo compreende os 18 resíduos seguintes e é altamente homólogo aos domínios encontrados em outras proteínas da coagulação dependentes de vitamina K, tais como, protrombina, fator X, fator VII, proteína C e proteína S (Pan e Price, 1985). Esta seqüência de aminoácidos constitui um sítio necessário e suficiente para o reconhecimento da γ -carboxilase dependente de vitamina K que atua na carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico adjacentes ao pró-peptídeo (Foster *et al.*, 1987; Jorgensen *et al.*, 1987). O pró-peptídeo, assim como o peptídeo-sinal, é clivado antes da secreção e a enzima supostamente responsável por este processo é a serina protease tipo subtilisina denominada PACE/furina (Bristol *et al.*, 1993; Wasley *et al.*, 1993).

O fator IX circulante apresenta seis domínios estruturais claramente definidos: um domínio N-terminal que contém resíduos γ -carboxiglutâmicos, uma pequena seqüência hidrofóbica, dois domínios tipo fator de crescimento epidérmico ("EGF-like"), um peptídeo de ativação e um domínio catalítico do tipo serina protease na extremidade C-terminal. Estas estruturas apresentam alta homologia com os respectivos domínios que constituem os fatores VII, X e proteína C (Furie e Furie, 1988).

Nos primeiros 40 aminoácidos da proteína madura são observados 12 resíduos de ácido glutâmico que, após o processo de tradução, sofrem a carboxilação do carbono γ , originando os resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico observados na extremidade N-terminal da proteína circulante (Bucher *et al.*, 1976; Fryklund *et al.*, 1976). Este domínio, rico em ácido glutâmico, foi denominado domínio ou região Gla e é encontrado em todas as proteínas da coagulação dependentes de vitamina K. O domínio Gla constitui um importante sítio para ligação de Ca^{+2} (Morita *et al.*, 1984) e também é requerido para ligação do fator IX às membranas fosfolipídicas (Jones *et al.*, 1985). A ligação de Ca^{+2} às cargas negativas do grupo carboxil promove uma modificação nas estruturas secundária e terciária da proteína, com formação de segmentos de α -hélice e estruturas em forma de laço ("loop") em sua extremidade amino terminal. Esta conformação, estabilizada pela ligação dos íons cálcio, é essencial para função biológica das proteínas dependentes de vitamina K, incluindo o

fator IX (Furie e Furie, 1995). Observações recentes indicam a presença de sítios específicos para a ligação de Mg^{+2} no domínio Gla do fator IX (Sekiya *et al.*, 1996), que também seriam responsáveis por alterações conformacionais na molécula, promovendo o aumento da atividade coagulante desta serina protease (Sekiya *et al.*, 1995; Sekiya *et al.*, 1996). Estudos demonstram que o domínio Gla e/ou os domínio tipo EGF apresentam um sítio para a interação do fator IXa com o seu cofator, o fator VIIIa (O'Brien *et al.*, 1995). Além disto, a região Gla possibilita a interação do fator IX com um suposto receptor de célula endotelial, juntamente com os dois módulos tipo EGF descritos abaixo (Ryan *et al.*, 1989; Stenflo, 1991).

Entre a região Gla e os domínios tipo EGF observa-se um pequeno segmento de aminoácidos aromáticos cuja seqüência consenso, obtida pela comparação dos fatores VII, IX, X, protrombina e proteína C, é Phe-Trp-X-X-Tyr. Este domínio hidrofóbico forma uma hélice anfipática na protrombina (Tulinsky, 1991) e acredita-se que esta mesma estrutura possa ser observada nas demais proteínas que apresentam esta região. A função biológica desta seqüência hidrofóbica não foi determinada, mas estudos com fator X e protrombina demonstraram que, na presença de Ca^{+2} , o domínio Gla forma heterodímeros com regiões de proteínas homólogas e a hélice anfipática serviria para orientar os dímeros em posição paralela (Harlos *et al.*, 1987).

Após a pequena hélice hidrofóbica são observados dois domínios constituídos por cerca de 40 resíduos de aminoácidos cada, que apresentam alta homologia com o fator de crescimento epidérmico e são, por esta razão, denominados domínios tipo EGF. A seqüência consenso destes domínios é constituída por seis resíduos de cisteína que dão origem a três pontes dissulfeto intracadeia (Stenflo, 1991). O primeiro domínio tipo EGF do fator IX apresenta um sítio que se liga com alta afinidade a um único íon Ca^{+2} (Handford *et al.*, 1990). Estudos de ressonância nuclear magnética (NMR) dos domínios tipo EGF isolados do fator IX demonstraram que os resíduos Asp⁴⁷, Asp⁴⁹ e Asp⁶⁴ estão diretamente envolvidos na ligação do íon cálcio (Cooke *et al.*, 1987; Rees *et al.*, 1988).

Os módulos tipo EGF das proteínas plasmáticas dependentes de vitamina K sofrem modificações pós-traducionais. No fator IX ocorre a hidroxilação do ácido

aspártico na posição 64, um processo que origina o ácido eritro- β -hidroxiaspártico (Hya). Entretanto, esta hidroxilação é observada em apenas cerca de 30% das moléculas da proteína (Fernlund e Stenflo, 1983). Estudos demonstraram que a hidroxilação do resíduo Asp⁶⁴ não altera a especificidade de ligação com o cálcio e que o grupo hidroxil não é o ligante direto do íon nos domínios tipo EGF (Sunnerhagen *et al.*, 1993). Apesar disto não se descarta a existência de uma possível função biológica para a hidroxilação do ácido aspártico no fator IX e acredita-se que o Hya desempenhe algum papel nas interações entre os módulos EGF e os demais domínios do fator IX e/ou módulos de outras proteínas (Sunnerhagen *et al.*, 1993). O primeiro domínio tipo EGF do fator IX humano apresenta um dissacarídeo ligado ao resíduo serina da posição 53 (Nishimura *et al.*, 1989) e um tetrassacarídeo ligado à serina na posição 61 (Nishimura *et al.*, 1992). A função do carboidrato ligado às serinas e a enzima responsável pela glicosilação do módulo tipo EGF ainda não foram determinadas (Stenflo, 1991).

Existem evidências que sugerem que os domínios tipo EGF contribuem para a ligação do fator IX a um suposto receptor de célula endotelial (Ryan *et al.*, 1989) e que a extremidade carboxi-terminal deste domínio interage com o fator VIIIa (Astermark e Stenflo, 1991; O'Brien *et al.*, 1995). Além disto, o domínio EGF pode atuar como um espaçador que permite o posicionamento correto do domínio catalítico do fator IX em relação ao domínio de ligação da proteína às superfícies fosfolipídicas, para a interação apropriada com o substrato da reação, o fator X (Stenflo, 1991).

O domínio adjacente ao segundo módulo tipo EGF é denominado peptídeo de ativação e corresponde a um segmento de 35 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 10.000. Neste peptídeo são observados dois sítios de glicosilação, nos resíduos Asn¹⁵⁷ e Asn¹⁶⁷. O fator XIa e o complexo FVIIa/FT clivam duas ligações peptídicas entre os resíduos Arg¹⁴⁵-Asn¹⁴⁶ e Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ do fator IX e liberam o peptídeo de ativação na corrente sanguínea (DiScipio *et al.*, 1978). A clivagem deste peptídeo ativa o precursor, originando o fator IXa que apresenta atividade catalítica e atua na proteólise e ativação do fator X, na presença do fator VIIIa, Ca⁺² e fosfolípídeo. O peptídeo de ativação parece não desempenhar nenhuma outra função no fator IX

(Tuddenham e Cooper, 1994). Além disto, estudos comparativos mostram que esta seqüência não apresenta muita identidade entre as diferentes espécies analisadas (Sarkar *et al.*, 1990).

Na extremidade carboxi-terminal da proteína encontra-se o domínio catalítico que abrange os resíduos de aminoácidos 181 a 415. Este domínio apresenta alta homologia com os sítios ativos das enzimas tripsina, quimotripsina, elastase, trombina e fator X (Katayama *et al.*, 1979). Estas proteínas pertencem ao grupo das chamadas serina proteases, caracterizadas pela presença de uma tríade catalítica serina, histidina e ácido aspártico no sítio ativo (Garrett e Grisham, 1995), específica para a hidrólise de ligações peptídicas contendo arginina e lisina. Modelos hipotéticos da estrutura tridimensional dos fatores IXa e Xa foram gerados em computadores, com base na homologia de seqüência destas proteínas e no conhecimento prévio da estrutura terciária obtidas pela análise cristalográfica das serina proteases do sistema digestivo. A análise comparativa destes modelos mostra uma alta homologia das estruturas localizadas no interior do centro catalítico e em seus sítios ativos, enquanto que na superfície encontram-se as regiões denominadas variáveis. Estas regiões seriam, supostamente, responsáveis pelo reconhecimento e pela ligação do substrato, ou seja, pela especificidade de cada enzima (Furie *et al.*, 1982)

O domínio serina protease do fator IX apresenta um sítio com alta afinidade por Ca^{+2} , localizado no segmento que abrange os aminoácidos 231 a 265. Supõe-se que este segmento peptídico assumira a conformação de um laço na superfície da molécula e que esteja envolvido na ligação do fator IXa ao seu cofator, o fator VIIIa (Bajaj *et al.*, 1992). Este tipo de estrutura secundária também é observada nas demais serina proteases da cascata de coagulação, como fator VII, proteína C e fator X.

Ativação do Fator IX

O fator IX é liberado na corrente sangüínea como um zimógeno de uma serina protease de cadeia única, e desta forma não apresenta atividade enzimática. A ativação do precursor ocorre em duas fases (**Figura 3**) (DiScipio *et al.*, 1978). No

primeiro passo, a ligação peptídica dos resíduos Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ é clivada (clivagem α), originando um intermediário (fator IX α) constituído de duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ponte dissulfeto. O FIX α tem sido caracterizado como um intermediário desprovido de atividade enzimática (DiScipio *et al.*, 1978; Lawson e Mann, 1991), mas trabalhos recentes demonstraram que apesar deste intermediário não apresentar atividade proteolítica, o que impossibilita a clivagem e ativação do fator X, ele apresenta uma atividade amidolítica (Lenting *et al.*, 1995). No segundo passo ocorre a clivagem da ligação Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ (clivagem β) com a liberação do peptídeo de ligação e produção do fator IXa β com atividade serina esterase (DiScipio *et al.*, 1978). A análise comparativa da proteína precursora e do fator IXa β com os intermediários FIX α e FIXa α , resultantes da clivagem das ligações peptídicas Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ e Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ respectivamente, possibilitou a determinação do papel da clivagem Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ na ativação do fator IX. Esta clivagem parece desempenhar um papel importante na formação do complexo fator VIII/Fator IX, pois garante a exposição do sítio de ligação do fator IX à cadeia leve do fator VIIIa. A atividade proteolítica do fator IXa β depende diretamente da exposição do sítio de ligação do seu cofator (Lenting *et al.*, 1995).

O fator IX ativado apresenta uma cadeia leve N-terminal, correspondente aos domínios Gla, EGF-1, EGF-2, e uma cadeia pesada C-terminal, que representa o domínio catalítico serina protease, conectadas por uma ponte dissulfeto formada pelos resíduos cisteína nas posições 132 e 279. Acredita-se que após a clivagem da ligação β o resíduo N-terminal do domínio catalítico Val¹⁸¹ forme um par iônico com o resíduo Asp³⁶⁴ adjacente ao sítio ativo serina da enzima, de acordo com o observado nos estudos do mecanismo de ação da quimotripsina (Handford *et al.*, 1991).

O fator IX pode ser ativado pela ação proteolítica do fator XIa, um componente da via intrínseca da coagulação (Fujikawa *et al.*, 1974; DiScipio *et al.*, 1978), ou pela atividade do complexo FVIIa/FT, constituinte da via extrínseca (Osterud e Rapaport, 1977), sempre na presença de Ca⁺². Como descrito anteriormente, o fator IX também pode ser ativado pelo fator X, na presença de fosfolipídios e Ca⁺² (Lawson e Mann, 1991). Independente do fator que está atuando na ativação do fator IX, este processo se dá de maneira idêntica, segundo o processo descrito acima.

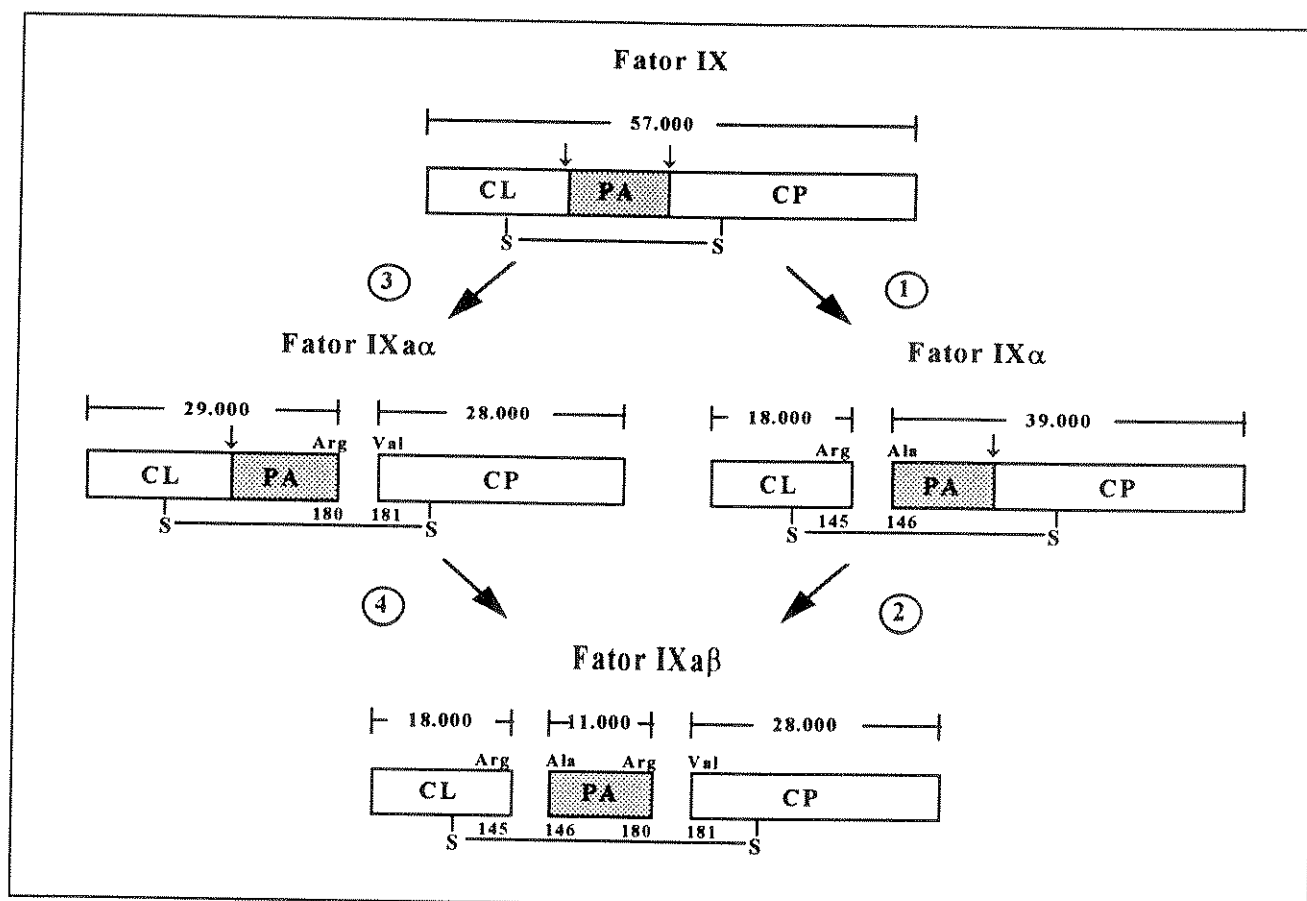


Figura 3: Representação Esquemática das Vias de Ativação do Fator IX

O complexo enzimático FVIIa/FT e o fator XIa catalisam a clivagem das ligações peptídicas no fator IX, produzindo o fator IXaβ. Uma das vias da ativação do fator IX envolve a clivagem da ligação Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ seguida da clivagem da ligação Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ (passos 1 e 2) com a produção do intermediário denominado fator IXα. A segunda via de ativação do fator IX caracteriza-se pela clivagem da ligação Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ seguida da clivagem da ligação Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶, que origina o intermediário denominado fator IXαα. Retirado de Lawson, J. H. e Mann, K. G. (1991).

O Gene do Fator IX

A clonagem do mRNA (Choo *et al.*, 1982; Kurachi e Davie, 1982) e do DNA genômico do gene do fator IX humano possibilitou a caracterização de sua sequência nucleotídica completa (Yoshitake *et al.*, 1985). O gene do fator IX abrange cerca de 33,5 kb (Yoshitake *et al.*, 1985) e localiza-se na porção distal do braço longo do cromossomo X, na posição Xq27.1, próximo ao sítio do X frágil (Chance *et al.*, 1983; Purrello *et al.*, 1985). O gene é composto por sete íntrons e oito exons, estes últimos

representando apenas 4% da sequência nucleotídica (Thompson, 1986) e responsáveis por codificarem os oito domínios do fator IX (**Figura 2**). O cDNA do fator IX apresenta cerca de 2,8 kb e contém uma extensa extremidade 3' não-traduzida. Embora o papel desta região não tenha sido determinado, são observados duas possíveis estruturas em forma de grampo ("stem loop") que podem desempenhar alguma função na regulação da síntese da proteína (Roberts, 1993), como já demonstrado em outros casos ((Birnstiel *et al.*, 1985; Jackson e Standart, 1990; Eckner *et al.*, 1991; Manley e Proudfoot, 1994).

O gene do fator IX apresenta alta homologia de estrutura e organização com outros fatores plasmáticos dependentes de vitamina K, tais como FX, FVII e proteína C. Estas proteínas apresentam domínios comuns e tal observação enfatiza a idéia de que a evolução de uma nova proteína ocorre pela duplicação, transposição e modificação gênicas ou por embaralhamento ("shuffling") de exons (Patthy, 1985; Brenner, 1988). Neste último modelo, a transferência de módulos entre as proteínas com homologia de sequência pode ser facilitada por pareamento imperfeito e recombinação ("cross-over") dupla ou por conversão gênica (Patthy, 1985). Cada um dos exons pode ser considerado um módulo que codifica um domínio homólogo em cada proteína.

Os genes dos fatores IX, X, VII e proteína C apresentam oito exons. O exon 1 codifica o domínio correspondente ao pré-peptídeo ou peptídeo-sinal. O exon 2 origina o módulo pró-peptídeo e o domínio Gla. Como citado anteriormente, o pró-peptídeo contém o sítio de reconhecimento da γ -carboxilase, responsável pela carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico do domínio Gla (Foster *et al.*, 1987). O fato destes domínios localizarem-se em um mesmo exon sugere a conexão funcional destas duas regiões. O exon 3 é responsável por codificar o pequeno segmento de aminoácidos aromáticos observado entre os domínios Gla e EGF-1. Por sua vez, os exons 4 e 5 dão origem aos domínios EGF-1 e 2, respectivamente.

A ativação das pró-enzimas requer a clivagem proteolítica em sítios que são específicos para cada uma das proteínas plasmáticas. O exon 6 é responsável por codificar a sequência de aminoácidos que assume a conformação que define a

especificidade da reação proteolítica. No gene do fator IX este exon codifica o peptídeo de ativação liberado após a clivagem de duas ligações peptídicas nas extremidades deste domínio. Por fim, o módulo catalítico é codificado pelos exons 7 e 8. Os resíduos que constituem a tríade catalítica encontram-se dispersos entre os dois exons - histidina é codificada pelo exon 7 enquanto o ácido aspártico e a serina são codificados pelo exon 8 (Furie e Furie, 1988). O exon 8 também codifica a grande região 3' não-traduzida.

Deteção de Portadoras do Gene da Hemofilia B

A determinação precisa das mutações responsáveis pela hemofilia B permite a detecção da portadora e o diagnóstico pré-natal, de maneira informativa na maioria dos casos da doença (Larson e High, 1992). Apesar do desenvolvimento de tratamentos modernos para hemofilia baseados na reposição do fator de coagulação deficiente no plasma, a natureza crônica da doença, a necessidade de repetidas infusões intravenosas e o alta risco de infecções por vírus como hepatite e HIV, faz com que mulheres, em cuja família são verificados casos de hemofilia, queiram conhecer os riscos de transmissão da doença para seus descendentes (Bröcker-Vriends *et al.*, 1992).

Embora a medida da atividade coagulante do fator IX tenha sido utilizada no reconhecimento da portadora do gene defectivo do fator IX, este dado não provê um diagnóstico conclusivo. Isto se deve ao fato de que o nível de atividade coagulante do fator IX obtido da análise de portadoras muitas vezes se sobrepõe à faixa dos valores considerados normais, impossibilitando seu reconhecimento (Orstavik *et al.*, 1979). Foi demonstrado que apenas 2% das mulheres obrigatoriamente heterozigotas apresentam atividade reduzida do FIX:C. Por sua vez, o diagnóstico pré-natal baseado em ensaios de coagulação no sangue do feto mostra-se limitado pelo fato de poder ser realizado apenas no segundo trimestre da gravidez e por apresentar risco de sangramento no processo de punção do cordão umbilical (Mibashan *et al.*, 1979). Para a determinação precisa da portadora e diagnóstico pré-natal tornou-se necessária a identificação exata

da alteração molecular responsável pela hemofilia B ou determinação de polimorfismos ligados à mesma.

Técnicas moleculares, como a análise dos polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP - "Restriction Fragment Length Polymorphism") tanto por "Southern blot" quanto por amplificação de fragmentos específicos (PCR), seguida de digestão com enzimas de restrição também apresentam limitações para detecção precisa de portadoras (Green *et al.*, 1989). O estudo de ligação de sítios polimórficos requer heterozigotidade da portadora. O equilíbrio de Hardy-Weinberg mostra que quando a frequência de dois alelos na população é igual ($p=q=0,5$), a frequência de heterozigotos é de somente 50%. Assim, mesmo em uma taxa de distribuição alélica favorável, um único polimorfismo intragênico será útil em apenas metade dos casos. A utilização de múltiplos sítios polimórficos independentes aumenta a proporção de indivíduos heterozigotos para um ou demais polimorfismos analisados. Entretanto, estudos têm demonstrado que alguns dos sítios polimórficos intragênicos do gene do fator IX apresentam-se em desequilíbrio de ligação (Graham *et al.*, 1985).

A análise de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) é eficaz na ligação do gene afetado em apenas 80% dos casos de hemofilia em Caucásios, com 99% de confiabilidade quando seis sítios intragênicos são utilizados (Winship e Brownlee, 1986). Além disto, é verificada uma grande variação na incidência de heterozigotidade entre diferentes grupos étnicos (Graham *et al.*, 1991). Em Negróides, os sítios 5' *Bam HI* e *Bam HI* no íntron 3 são úteis para análise da portadora enquanto que em Caucásios estes sítios mostram-se pouco informativos (Driscoll *et al.*, 1988). Orientais, tais como chineses (Chan *et al.*, 1991), japoneses (Kojima *et al.*, 1987) e malásios (Graham *et al.*, 1991) apresentam baixa incidência ou ausência de vários sítios polimórficos comuns no gene do fator IX de Caucásios (*Dde I*, *Msp I*, *Taq I* e *Xmn I*), tornando virtualmente impossível o diagnóstico da portadora a partir da análise de RFLP nestas populações (Kojima *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 1991). Embora tenham sido descobertos novos sítios polimórficos no gene do fator IX (Toyozumi *et al.*, 1995), não foi verificado um aumento no número de elementos informativos para a detecção das portadoras devido à frequência alélica desfavorável, ao desequilíbrio de ligação

observado entre os marcadores intragênicos comumente analisados e a possível ocorrência de recombinação (3 a 5%) entre os sítios polimórficos extragênicos (Graham *et al.*, 1988; Bröcker-Vriends *et al.*, 1992). Além disto, a heterogeneidade de populações em todo o mundo e a miscigenação dificultam a análise dos sítios polimórficos para a determinação de doenças.

O estudo dos sítios polimórficos para detecção de portadoras e diagnóstico pré-natal requer a participação de um número mínimo de indivíduos-chave da família, que muitas vezes não estão disponíveis para análise. Além disto, erros podem ser introduzidos decorrentes da não-paternidade (Poon *et al.*, 1993).

Os casos esporádicos de hemofilia compreendem aproximadamente 30 a 50% dos casos de hemofilia descritos. Nestas famílias, a análise de polimorfismo não permite a determinação do nível da geração na qual surgiu a alteração molecular, impossibilitando o diagnóstico da portadora (Peake *et al.*, 1993).

Assim, a identificação da alteração molecular responsável pela hemofilia B se faz necessária para a determinação precisa da portadora, possibilitando o aconselhamento genético e viabilizando o desenvolvimento do diagnóstico pré-natal. A detecção da mutação por seqüenciamento ou por análise por enzimas de restrição quando sítios são criados ou eliminados pela alteração nucleotídica não apresenta as complicações geradas por não-paternidade, recombinação ou homozigosidade. Além disto, não depende da disponibilidade de membros da família ou história familiar.

Identificação das Alterações Moleculares no Gene do Fator IX

Inicialmente os métodos de detecção de alterações gênicas baseavam-se na análise de "Southern blot" que permitia apenas a identificação de grandes deleções no gene ou de alterações em sítios de restrição. Técnicas de clonagem vinculadas ao seqüenciamento dos genes defectivos também eram metodologias empregadas na determinação de mutações no gene do fator IX. Estes métodos se mostraram, entretanto, pouco sensíveis ou muito lentos para permitir a rápida aquisição da informação disponível na população altamente heterogênea de mutações que inclui

deleções, inserções e mutações de ponto que afetam todas as regiões do gene do fator IX, com exceção do sítio de poliadenilação (Green *et al.*, 1989; Giannelli *et al.*, 1996).

A maioria das alterações moleculares observadas no gene do fator IX são representadas por mutações de ponto (cerca de 85%), incluindo transições e transversões. Deleções, inserções ou rearranjos gênicos mais complexos são identificados no restante dos casos (Kurachi *et al.*, 1992; Roberts, 1993). A disponibilidade da sequência nucleotídica completa e o desenvolvimento de tecnologia eficiente para a análise de DNA, como a técnica de PCR, permitiram um rápido progresso no estudo dos mecanismos moleculares responsáveis por várias doenças, incluindo a hemofilia B (Kurachi *et al.*, 1992).

A observação de que cerca de 95% das alterações moleculares responsáveis pela hemofilia B ocorrem nas regiões codificadoras (Sommer e Ketterling, 1994) permitiu que a análise para identificação de mutações se restringisse a cerca de 4% da sequência nucleotídica, correspondente aos exons, regiões de excisão de íntrons e região promotora do gene.

A sexta edição do banco de dados de alterações moleculares de hemofilia B (1996) apresenta 1380 registros de pacientes com hemofilia B. Nestes pacientes foram identificadas 86 deleções e 21 inserções de pequenos fragmentos (<30 pares de bases), além de 6 casos de inserção e deleção simultâneas. Também estão descritos 18 pacientes com duas mutações, 1 paciente com 3 mutações, 2 mosaicismos somáticos e 21 casos de hemofilia em mulheres. Dos 1380 pacientes estudados, 552 apresentam alterações moleculares que correspondem a eventos de origem independente e o restante apresenta mutações recorrentes. Destas 552 alterações nucleotídicas, 333 representam diferentes mutações "missense", que levam à substituição de resíduos de aminoácidos no fator IX. No Brasil, poucos estudos foram realizados para a determinação de mutações no gene do fator IX de hemofílicos B. Apenas 24 pacientes brasileiros foram analisados e somente um deles não teve a alteração molecular identificada (Figueiredo, 1993; Figueiredo, 1995).

O desenvolvimento de diferentes métodos de rastreamento para detecção de mutações de ponto aplicados no estudo do gene do fator IX facilita, ainda mais, a caracterização da maioria dos defeitos moleculares relacionados à hemofilia B. Estes métodos, em geral incluem amplificações por PCR das regiões codificadoras, de excisão e promotora. Vários métodos foram empregados na análise do gene do fator IX, entre eles, a eletroforese em gel com gradiente de desnaturação ou DGGE ("Denaturing Gradient Gel Electrophoresis"), a análise de heteroduplex, e a análise de polimorfismo de conformação de hélice simples ou SSCP ("Single-Strand Conformation Polymorphism"). Dentre estes, o SSCP e o DGGE são utilizados com maior frequência no rastreamento das mutações do fator IX pois, em geral, permitem a detecção das alterações moleculares em 70 a 90% dos casos analisados, respectivamente (Grompe, 1993).

A análise de PCR-SSCP apresenta-se como um método rápido e seguro que permite o reconhecimento de seqüências de bases que diferem do normal por apenas um nucleotídeo após eletroforese do produto do PCR em gel de poliacrilamida não desnaturante (Orita *et al.*, 1989). A principal vantagem desta técnica é a sua simplicidade e sensibilidade (Grompe, 1993). A técnica de PCR-SSCP, associada com o seqüenciamento das regiões nas quais foram localizadas as possíveis mutações, pode permitir a identificação e a caracterização dos defeitos moleculares responsáveis pela hemofilia B e conseqüentemente possibilitar o diagnóstico preciso da portadora destas mutações. Alguns trabalhos foram realizados utilizando a técnica de SSCP radioativo para rastreamento das alterações moleculares nas diferentes regiões do gene do fator IX em pacientes hemofílicos B (Fraser *et al.*, 1992; David *et al.*, 1993; Lin e Shen, 1993; Poon *et al.*, 1993).

A técnica de SSCP não-radioativo pode fornecer uma melhoria no diagnóstico das mutações uma vez que os resultados podem ser obtidos em um menor tempo e sem necessidade da disponibilidade de isótopos radiotivos.

Fator IX: Um Modelo para o Estudo de Mutações em Células Germinativas

A hemofilia B apresenta vários atributos que fazem do seu estudo uma boa estimativa do padrão e da taxa de mutações recentes e espontâneas em linhagens de células germinativas em humanos. Quase todos os casos da doença na população são facilmente diagnosticados, uma vez que uma redução de apenas duas vezes em relação ao limite inferior do nível de atividade do fator IX observado em 95% da população (0,5 a 1,5 U) leva ao aparecimento dos sintomas da hemofilia B. Outras doenças, tais como doença de Lesh-Nyhan, distrofia muscular de Duchenne e fenilcetonúria requerem redução de 10 a 100 vezes no valor normal de atividade para que possam ser identificadas.

Além disto, a existência de centros especializados na assistência à hemofilia facilita a concentração de um grande número de pacientes, possibilitando o estudo epidemiológico para determinação da incidência das mutações esporádicas (*de novo*), um parâmetro necessário para o cálculo das taxas de mutação (Koeberl *et al.*, 1990; Montandon *et al.*, 1992). Os estudos epidemiológicos indicaram a ocorrência de episódios hemorrágicos leves a moderados em mulheres heterozigotas para o alelo defectivo, eliminando a possibilidade de ocorrência de vantagem do heterozigoto no processo de seleção. Deleções totais do gene não comprometem a viabilidade do feto, de maneira que não são observadas perdas seletivas de certos tipos de alterações moleculares durante a embriogênese (Sommer e Ketterling, 1994).

As doenças ligadas ao cromossomo X com quadro clínico moderado ou grave, quando associadas à inexistência de terapias efetivas, tornam-se responsáveis por uma menor eficácia reprodutiva do indivíduo afetado, levando, ao longo das gerações, a uma rápida eliminação das mutações que causam esta doença. Assim sendo, até meados da década de 70, quando a terapia de reposição do fator IX tornou-se disponível, os pacientes com hemofilia B grave ou moderada não se reproduziam eficientemente e deste modo não perpetuavam seus alelos defectivos. O padrão de mutações hoje observado no gene do fator IX reflete, portanto, os eventos mutacionais recentes que ocorreram nos últimos 150 anos (Sommer, 1992). Dos casos de

hemofilia B grave e moderada, 95% representam eventos mutacionais de origem independente.

Por outro lado, as alterações moleculares no gene do fator IX responsáveis pelo fenótipo de hemofilia B leve não afetaram o potencial reprodutivo dos indivíduos afetados, mesmo antes da disseminação das terapias adequadas. As mutações identificadas são observadas em alta frequência nos casos leves de hemofilia B e estão associadas a um possível efeito do fundador (mutações em descendentes de um ancestral comum) (Ketterling *et al.*, 1991). Em contraste, as mutações recessivas que ocorrem em genes autossômicos são eliminadas lentamente, uma vez que duas cópias do alelo defectivo são necessárias para o desenvolvimento da doença.

O próprio gene do fator IX apresenta vantagens para o estudo do padrão de mutações recentes em humanos. O gene apresenta um tamanho moderado de aproximadamente 33,5 kb, dos quais apenas cerca de 2,2 kb representam regiões de provável importância funcional. Esta pequena região pode ser seqüenciada rapidamente e permite a detecção de cerca de 95% das mutações que ocorrem no gene do fator IX (Sommer, 1995). A seqüência nucleotídica completa do gene encontra-se disponível (Yoshitake *et al.*, 1985), facilitando a localização precisa e a caracterização de deleções, inserções, duplicações ou mutações intragênicas (Sommer, 1992). O gene do fator IX não apresenta domínios repetitivos com função semelhante, de maneira que substituições de bases únicas frequentemente provocam a doença. Finalmente, todas as alterações moleculares deletérias identificadas no gene do fator IX produzem um único fenótipo para a doença.

A análise das mutações já identificadas no gene do fator IX revelou sítios preferenciais para a ocorrência de mutações ("hot spot"). Dentre eles, o dinucleotídeo CpG está associado com uma alta frequência de transições C para T (ou de G para A, se a mutação ocorrer na fita complementar), correspondendo a mais de 25% das mutações independentes observadas no gene do fator IX (Sommer, 1992). O dinucleotídeo CpG foi identificado como um "hot spot" de mutações em vários outros genes, tais como o gene fator VIII (Yousoufian *et al.*, 1986), gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Vulliamy *et al.*, 1988), entre outros. Em genomas de eucariotos,

a citosina do dinucleotídeo CpG encontra-se em sua maioria na forma metilada 5-metilcitosina (^{Me}C). A 5-metilcitosina apresenta-se instável e por um processo de desaminação espontânea é convertida para timina. Uma vez que a timina é um constituinte normal do DNA, o reparo acurado destas lesões requer a detecção do par G:T e a sua correção para G:C e não para A:T (Green *et al.*, 1990).

Foi demonstrado que o dinucleotídeo CpG também é um sítio preferencial para ocorrência de transversões que representam cerca de 16% de todas as transversões observadas no gene do fator IX. A taxa de transversões (G:C→T:A e G:C→C:G) no sítio CpG é cinco vezes maior que aquela esperada para sítos não-CpG (Ketterling *et al.*, 1994). O aumento de transversões neste dinucleotídeo sugere a necessidade de uma reavaliação do modelo que explica as mutações em CpG.

O padrão de mutações espontâneas identificado no gene do fator IX de Caucásios, Asiáticos, e pequenos grupos de Hispânicos e Negróides apresenta-se semelhante, sugerindo que os processos endógenos (desaminação, depurinação, erros de replicação, etc.) ou agentes mutagênicos distribuídos homogeneamente por todo o mundo, são os principais responsáveis pelo surgimento das alterações moleculares nas diferentes populações (Sommer, 1992; Gostout *et al.*, 1993; Thorland *et al.*, 1995). Entretanto, exceções ao padrão geral podem ser identificadas em populações expostas a diferentes condições ambientais ou a mutagênicos específicos (Thorland *et al.*, 1995).

A população brasileira apresenta origem étnica bastante heterogênea e é representada por imigrantes provenientes da Europa, África, Ásia e pelas populações indígenas residentes mostrando-se distinta das demais populações previamente estudadas. A análise desta população acrescenta dados importantes para a compreensão dos processos determinantes do padrão de mutações no gene do fator IX.

Análise de Mutações no Gene do Fator IX

A detecção e a identificação das mutações no gene do fator IX podem gerar várias informações acerca das relações de estrutura e função da proteína,

principalmente no que diz respeito à ligação do fator IX com seu substrato (fator X), cofator (fator VIII), interações celulares, alterações conformacionais e regulação da expressão gênica. Alterações moleculares têm sido observadas em virtualmente todos os domínios do fator IX (exceto na região 3' não-traduzida), possibilitando o estudo bioquímico e estrutural de diversos variantes genéticos que apresentam deficiência funcional e sua comparação com a proteína normal.

A hemofilia B de Leyden é um bom exemplo de como uma mutação gênica pode prover informações acerca da significância funcional de regiões do gene. Os pacientes com esta doença apresentam níveis baixos de fator IX durante a infância que são corrigidos gradualmente durante a puberdade, resultando na recuperação clínica do indivíduo. Esta hemofilia é causada por mutações na região promotora do gene do fator IX e a análise destes variantes evidencia que a recuperação após a puberdade pode ser mediada pela ação da testosterona em um elemento de resposta a andrógenos localizado nesta região (Briët *et al.*, 1982).

Mutações no pró-peptídeo (Bristol *et al.*, 1993), domínios tipo EGF (McCord *et al.*, 1990; Winship e Dragon, 1991), peptídeo de ativação (Liddell *et al.*, 1989; Bertina *et al.*, 1990) e domínio catalítico (Bertina *et al.*, 1990; Miyata *et al.*, 1994) também foram identificadas e caracterizadas e o estudo bioquímico das proteínas variantes forneceu informações a respeito do processamento pós-traducional da proteína, dos sítios de ligação de Ca^{+2} e Mg^{+2} , ativação do fator IX, conformação e atividade do domínio serina protease, interação com os fatores VIII, X e fosfolipídios, ligação na superfície de plaquetas ativadas, etc.

Terapia Gênica e Hemofilia B

A compreensão do processo de maturação do fator IX e das consequências funcionais de cada passo deste processo tem importantes implicações no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento de hemofilia B (Furie e Furie, 1995). A hemofilia B está entre as doenças genéticas com maior probabilidade de melhoria ou cura por terapia gênica, que consiste na introdução de

um gene do fator IX normal em células somáticas do paciente visando a produção e suprimento permanente do fator de coagulação ao indivíduo. Como o fator IX atua em meio extracelular, muitas células apresentam-se como potenciais alvos para a terapia gênica. As células selecionadas para a produção do fator IX recombinante devem ser capazes de produzir e secretar o fator IX biologicamente ativo em concentrações suficientes para a recuperação da via da coagulação sangüínea. Para isto, as células devem ser capazes de realizar eficientemente todas as modificações pós-traducionais e processamento do fator IX verificadas na biossíntese do fator IX nos hepatócitos (Gerrard *et al.*, 1993; Kurachi e Yao, 1993). A transferência de genes do fator IX vem sendo realizada em fibroblastos da pele, células endoteliais, células de músculo esquelético, queratinócitos e nos próprios hepatócitos (Gerrard *et al.*, 1993), mas os níveis plasmáticos de fator IX obtidos até o momento estão muito abaixo dos valores considerados terapêuticos (Fallaux *et al.*, 1995). Para a obtenção de resultados efetivos faz-se necessário o desenvolvimento de melhores estratégias de transferência de genes e de transplante das células transduzidas, desenvolvimento de vetores de expressão mais eficazes (promotores fortes) e maior conhecimento das funções dos domínios do fator IX e do processo de maturação e secreção da proteína.

OBJETIVOS

Foram objetivos deste estudo a identificação e caracterização das alterações moleculares no gene do fator IX em pacientes com hemofilia B de diferentes regiões do Brasil utilizando-se principalmente a técnica de SSCP não-radioativo como método de rastreamento e a determinação dos haplótipos do gene do fator IX para a identificação das origens das mutações.

CASUÍSTICA

Neste estudo foram analisados 20 pacientes com hemofilia B não-relacionados em acompanhamento regular nos ambulatórios de hemostasia do Hospital das Clínicas da UNICAMP e Hospital Brigadeiro de São Paulo. Além destes, foram estudados 9 pacientes hemofílicos B (HB34, HB35, HB36, HB39, HB40, HB43, HB45, HB46, HB47) acompanhados pelo Hemocentro do Pará (HEMOPA).

MÉTODOS

Avaliação dos Parâmetros de Coagulação

O diagnóstico da hemofilia B foi realizado a partir dos dados clínicos e laboratoriais, com a análise dos tempos de tromboplastina parcial ativada, de protrombina, trombina e tempo de sangramento. O fator IX teve sua concentração determinada e foi realizado o estudo do inibidor da atividade desta proteína.

Para análise dos parâmetros da coagulação foi necessário um volume de sangue de 4,5 ml colhido em frasco contendo 0,5 ml de citrato de sódio 3,8%.

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) estima a atividade da via intrínseca da coagulação no plasma. Este teste de coagulação foi realizado a partir de 100 µl de plasma citratado ao qual foi adicionado 100 µl de caulim e 100 µl de cefalina preparada a partir de extrato humano, para a ativação da coagulação (Proctor e Rapaport, 1961). Os resultados obtidos foram expressos relativos ao tempo de coagulação de uma mistura de plasma de indivíduos normais.

O tempo de protrombina (TP) é uma medida da coagulação iniciada pelo sistema extrínseco. Este valor foi obtido a partir de 100 µl de plasma citratado, com 100 µl de tromboplastina de cérebro humano, segundo método desenvolvido por Quick *et al.* (1935). Os resultados representam os tempos dos pacientes relativos aos valores determinados para uma mistura de plasmas de um grupo de indivíduos normais. Estes valores relativos foram posteriormante corrigidos pelo valor da tromboplastina de

referência internacional e expressos em RNI (relação de normatização internacional) (Pooler, 1975).

Para determinação do tempo de trombina, utilizou-se 200 μ l de plasma e 100 μ l de trombina (Jim, 1957). Os resultados foram expressos de maneira igual aos valores de tempo de tromboplastina parcial ativada.

Para a dosagem do FIX:C foi utilizado um plasma artificialmente deficiente em fator IX e aplicado o método de correção de tromboplastina parcial ativada (Proctor e Rapaport, 1961). Os resultados foram expressos em porcentagem. A dosagem de FIX:Ag foi realizada pelo método de imunoeletroforese em placa de agarose 1% (Laurell, 1966).

A pesquisa do inibidor do fator IX foi conduzida em plasma citratado, pelo método de Kasper *et al.* (1975). Primeiramente, recipientes distintos contendo plasma do paciente e a mistura de plasmas de um grupo de indivíduos normais, foram incubados por duas horas a 37°C em tampão imidazólico 0,05M, pH 7,3, com 0,585 g de NaCl em cada 100 ml. Após a incubação as amostras foram misturadas em proporções iguais e foi determinada a atividade coagulante residual do FIX:C.

Extração de DNA a Partir de Leucócitos

Foram colhidos 5 a 20 ml de sangue periférico em frasco estéril, contendo solução de 10% de EDTA (sal dissódico do ácido etilenodinitrotetracético) como anticoagulante. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação foi descartado o plasma sobrenadante e os eritrócitos foram lisados com uma mistura das soluções de cloreto de amônio NH_4Cl 0,144 M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio NH_4HCO_3 0,01 M (0,5 vez o volume de células). Após agitação à temperatura ambiente por 15 minutos, o hemolisado foi centrifugado por 20 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos foi submetido à lise em uma solução de NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, 4,2 g de uréia, 1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, durante 16 horas a 37°C.

Adicionou-se, então, uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, em uma proporção de 25:24:1 (volume/volume). A amostra foi agitada lentamente e a seguir centrifugada por 20 minutos a 2500 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo estéril, repetindo-se o procedimento acima. Uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi, então, adicionada (volume/volume) repetindo-se a centrifugação.

Seguindo-se à transferência da fase aquosa para um novo tubo, a precipitação do ácido nucléico foi conduzida pela adição de acetato de sódio 3 M pH 5,3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (3X o volume).

O DNA foi solubilizado em solução Tris pH8,0 10mM: EDTA 0,1mM pH 7,4 (tampão TE), ou em água desionizada e estéril e teve sua concentração e pureza estimadas em espectrofotômetro, a partir dos valores de densidade ótica nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm (Sambrook *et al.*, 1982).

PCR-SSCP

O rastreamento de mutações nas regiões codificadoras e promotora do gene do fator IX foi realizado pelo método de análise de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP), baseado no método originalmente descrito por Orita e colaboradores (1989). Para a análise do SSCP foram utilizados os métodos radioativo e não-radioativo, nos diferentes fragmentos obtidos pelo emprego da metodologia de PCR (Saiki *et al.*, 1988).

Detecção do Polimorfismo de Conformação de Hélice Simples (SSCP)

Amplificação das Amostras

A técnica de PCR para amplificação dos exons 1 ao 8 foi realizada a partir de aproximadamente 0,5 µg de DNA genômico, 100 pmoles de cada oligonucleotídeo, 200 µM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl pH 9,6, 25°C; 2,5 mM de (NH₄)₂SO₄; 50 mM de NaCl e

2,5 mM de $MgCl_2$), 200 μ g de BSA (Soro Albumina Bovina) e 2,5 unidades de Taq polimerase em um volume final de 100 μ l.

Para a amplificação dos diferentes fragmentos foram utilizados, alternativamente, dois pares de oligonucleotídeos (**Tabela I**) para cada exon analisado. Para facilitar a compreensão, o primeiro conjunto será identificado por números (1 a 8) e o segundo por letras (A a H) referentes aos exons estudados. Os conjuntos de oligonucleotídeos foram selecionados visando maior eficiência e praticidade no desenvolvimento dos experimentos.

As misturas de reação para amplificação dos exons 1, 4, 5 e 6 foram mantidas a 94°C por 5 minutos para a desnaturação do DNA e em seguida foram submetidas a 35 ciclos que consistiam de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de hibridação a 60°C por 0,5 minuto e uma fase para extensão da cadeia de DNA a 72°C por 1 minuto, em aparelho ciclador de temperatura "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer Cetus). Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 2% , corados com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta.

Para amplificação dos exons 2,3; 7; e 8 foi utilizado protocolo semelhante àquele aplicado para os demais exons acima mencionados, com alteração apenas na temperatura e no tempo de hibridação. Nestes casos, a temperatura utilizada para hibridação dos oligonucleotídeos foi de 56°C por 1 minuto.

A amplificação dos exons F, G, H (dividido em H1 e H2) exigiu a temperatura de hibridação de 60°C por 1 minuto, enquanto que para a amplificação dos exons A e D foi utilizada a temperatura de hibridação de 53°C por 1 minuto e para os exons B,C e E 50°C por 1 minuto.

Os exons 2 e 3 foram amplificados em um único fragmento devido ao fato de se apresentarem separados apenas por uma pequena sequência correspondente ao íntron b e pelo tamanho reduzido do próprio exon 3 (25 nucleotídeos). O fragmento originado desta amplificação apresenta 499 pares de base (pb), sendo inapropriado para análise de SSCP que pressupõe a utilização de fragmentos de DNA com aproximadamente 200 a 300 pb. Assim sendo, o produto da amplificação dos exons

2 e 3 foi submetido à digestão pela enzima *Hinf I*, originando dois fragmentos menores, com 114 e 385 pb.

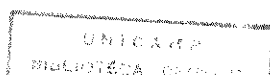
O produto de amplificação do exon 8 também apresentava-se impróprio para análise de SSCP pois exibía uma sequência de 662 pb. Este fragmento foi digerido pela enzima *Xmn I*, originando produtos menores, com 418 e 244 pb cada um.

As reações de digestão foram realizadas a partir de 10 µl do PCR incubado por cerca de 16 horas a 37°C após adição de 1 µl das enzimas *Hinf I* e *Xmn I* para os exons 2,3, e 8, respectivamente.

Análise do SSCP Não-Radioativo

À uma alíquota de 3 µl do produto da reação de amplificação (ou da digestão, nos casos dos exons 2,3 e 8) foram adicionados 3, 6 ou 9 µl de uma solução contendo 95% de formamida, 10 mM de EDTA pH 8,0, 0,1% azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol, de acordo com a necessidade de diluição das amostras. Esta mistura foi desnaturada a 95°C por 5 minutos e 1,0 µl foi submetido a eletroforese no sistema automático *Phastsystem® Pharmacia (Pharmacia, Sollentuna, Sweeden)*. A corrida eletroforética foi desenvolvida em gel homogêneo de poliacrilamida 20% de tamanho 43 mm x 50 mm x 0,45 mm, em tampão 0,112 M acetato e 0,112 M Tris-HCl pH 6,4 e realizada em tampão 0,88 M L-Alanina, 0,25 M Tris em 3% agarose para isoeletrofocalização, pH 8,8. As condições da corrida foram: (1) Pré-corrida: 400 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 10 Vh; (2) Aplicação das amostras: 25V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 2 Vh; e (3) Corrida: 400 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 400 Vh, para os exons 1; 2,3; 4; 5; 7 e 8. Para análise do exon 6 foram necessárias diferentes condições de corrida eletroforética: 1) Pré corrida: 150 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 4°C, 10Vh, ; (2) Aplicação das amostras: 100V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 4°C, 2 Vh; e (3) Corrida: 150 V; 5,0 mAmp, 1,0 W, 4°C, 350 Vh.

Os fragmentos de DNA foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata em programa automático. Para esta coloração o gel foi submetido a banhos consecutivos nas soluções e condições a seguir:



1. ácido tricloacético 20% a 20°C por 5 minutos;
2. glutaraldeído 5% a 50°C por 5 minutos;
3. água desionizada a 50°C por 2 minutos (2X);
4. nitrato de prata 0,4% a 40°C por 8 minutos;
5. água desionizada a 30°C por 0,5 minuto (2X)
6. carbonato de sódio 2,5%, formaldeído 0,001% a 30°C por 0,5 minuto;
7. carbonato de sódio 2,5%, formaldeído 0,001% a 30°C por 5 minutos;
8. ácido acético 5% a 50°C por 2 minutos;
9. glicerol 13% a 50°C por 3 minutos.

SSCP Radioativo

O rastreamento das mutações por SSCP radioativo foi realizado de maneira semelhante ao SSCP não-radioativo descrito acima. Neste caso, o volume final de reação de amplificação das seqüências de DNA (PCR) foi de 10 µl para cada exon de cada paciente, para evitar a manipulação de grandes quantidades de material radioativo. Foi acrescentado à mistura de reação de amplificação (com concentrações iguais às mencionadas anteriormente), 0,1µl de [α -³²P] dCTP (~3000Ci/mmol, 10 mCi/ml) para incorporação de radioatividade nas seqüências de DNA.

Também para o estudo de SSCP radioativo se fez necessária a digestão dos fragmentos correspondentes aos exons 2 e 3 pela enzima de restrição *Hinf I* e do exon 8 pela enzima *Xmn I*.

As amostras de DNA amplificadas e digeridas foram diluídas primeiramente em uma solução 0,1% SDS e 10 mM de EDTA, numa proporção de 1:20 (volume/volume). Seguiu-se, então uma segunda diluição da amostra em uma solução de 95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol, na proporção 1:2. Deste modo, a amostra a ser analisada foi diluída em uma proporção final de 1:40 (volume/volume). Em casos específicos nos quais a incorporação de

radiação aos fragmentos amplificados não se mostrou muito efetiva, as amostras foram submetidas a diluições menores, nas proporções de 1:10 ou 1:5, diretamente em solução de 95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol.

Estas amostras diluídas foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e cerca de 4 µl foram submetidas à uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 6 ou 8% (19:1 acrilamida/ bis-acrilamida) homogêneo (Sambrook *et al.*, 1982), com medidas 31 cm x 38,5 cm x 0,4 mm, contendo 0,89 M de Tris-HCl, 0,89 M de ácido bórico e 20 mM de EDTA (tampão TBE) e 10% de glicerol. O tampão de corrida utilizado neste experimento foi o TBE descrito acima. A corrida eletroforética foi levada a efeito durante 16 horas sob potência constante de 4 W e temperatura de 4°C em tampão TBE 1X. Após a corrida o gel foi transferido para papel 3 MM e seco a 80°C por uma hora, em aparato secador de gel. A análise dos polimorfismos foi por fim realizada após a exposição de um filme de raio X ao gel seco, por 24 horas à temperatura ambiente.

Em ambas as técnicas os mutantes foram identificados por seu padrão eletroforético anormal.

Tabela I: Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados na Amplificação das Diferentes Regiões do Gene do Fator IX

Região	Oligonucleotídeos (5'-3') ^{a, b}	Posição ^c	Produto	T. Hibrid. ^d
Promotor e Exon 1	TCAC TTGTCCCAAGAGGCCA GGCAAGCATACTCAATGTAT	-115 a -96 156 a 137	271 pb	60°C
Exon A	ou CCATTCTCTTCACTTGTCC AAAGGCAAGCATACTCAATG	-125 a -106 158 a 139	282 pb	53°C
Exon 2,3 e Íntron 2	AAGACTTTCTTAAGAGATGT ATATGTTTCATATATTAGCT	6246 a 6265 6745 a 6726	499 pb	56°C
Exon B,C e Íntron 2	ou GACTTTCTTAAGAGATGT TTATCTATTTATGCAGAGAA	6248 a 6265 6783 a 6764	535 pb	50°C
Exon 4	GCATTCTAAGCAGTTTACGT CAGAGGGAAACTTTGAACCA	10342 a 10361 10551 a 10532	209 pb	60°C
Exon D	ou AATGAGTATCTACAGGGGAG TCAACTTGTTTCAGAGGGAAA	10316 a 10335 10562 a 10541	246 pb	53°C
Exon 5	GCATGTAAATGATGCTGTT ATGCTGAAGTTTCAGATACA	17626 a 17645 17851 a 17832	225 pb	60°C
Exon E	ou GTAGTTCCATGTACTTTTTA TGTAGGTTTGTTAAATGCT	17601 a 17620 17866 a 17847	265 pb	50°C
Exon 6	GTTCCATTGCGCAATGAGAA CCTGTGTCTTGCCAGCTGAGC	20308 a 20327 20618 a 20598	310 pb	60°C
Exon F	ou TGGGCCTCAATCTCAATTTT CAGCTGAGCTCCAGTTTGA	20278 a 20297 20606 a 20587	328 pb	60°C
Exon 7	TGTATTATGCAGTAAGAGTC AGCTAGTGGTGCTGCAGATT	30001 a 30020 30195 a 30176	194 pb	56°C
Exon G	ou TGCCAGCACCTAGAAGCCAA TATTAAAGAGCTAGTGGTGCTGC	29928 a 29947 30203 a 30181	275 pb	60°C
Exon 8	TCTGTGTATGTGAAATACTG GTTAGTGAGAGGCCCTGTTA	30769 a 30788 31431 a 31412	662 pb	60°C
Região H1	ou GGTCCCAAGTAGTCACTTAG CCACTATCTCCTTGACATGA	30745 a 30764 31218 a 31199	473 pb	60°C
Região H2	e CTTCCATGAAGGAGGTAGAG AGTTAGTGAGAGGCCCTGTTA	31177 a 31196 31432 a 31412	255 pb	60°C

^a Exon 1-8 - Fornecido por Pieter H. Reitsma, *Holanda*
^b Exon A-H2 - Fornecido por Dezdo David, *Portugal*
^c Número de Yoshitake *et al.* (1985)
^d Temperatura de Hibridação

Identificação da Mutação por Seqüenciamento Direto do Fragmento Obtido por PCR

Os estudos de SSCP permitiram o rastreamento e a identificação das regiões nas quais possivelmente se localizavam as alterações moleculares responsáveis pelo fenótipo de hemofilia B em cada paciente. Para a determinação precisa da mutação foi realizado o seqüenciamento direto dos fragmentos de PCR que apresentaram padrão eletroforético anormal nas análises de SSCP radioativo ou não.

O produto do PCR foi purificado para a aplicação dos protocolos de seqüenciamento apresentadas nos manuais dos “kits” da USB: “Sequenase PCR Product Sequencing Kit” e “Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit”, ambos baseados no método de Sanger (1977).

Sequenase PCR Product Sequencing Kit

Purificação dos Produtos de PCR

As reações de amplificação de fragmentos pela técnica de PCR requerem dois oligonucleotídeos (“primers”) que delimitam as regiões de interesse e dinucleotídeos trifosfato dNTPs para a síntese das cadeias de DNA. Parte destes oligonucleotídeos e dNTPs permanecem intactos após a reação de PCR e deste modo, acabam por interferir nas reações de seqüenciamento dos produtos obtidos por este método. Para a remoção dos oligonucleotídeos e dNTPs remanescentes foram utilizadas duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão, respectivamente. Deste modo, a uma alíquota de 5µl de reação de PCR foram adicionadas 10 unidades da enzima exonuclease I em tampão 20 mM Tris-HCl pH7,5; 5 mM 2-mercaptoetanol e 50% glicerol e 2 unidades de fosfatase alcalina de camarão em tampão 25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1mM de MgCl₂; 0,1 mM de ZnCl₂ e 50% de glicerol. Esta mistura foi, então, incubada primeiramente a 37°C por 15 minutos para a atuação das enzimas e em seguida a 80 °C por 15 minutos para a inativação das mesmas.

Hibridação do Oligonucleotídeo e Reação de Marcação com [³⁵S]dATP

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado cerca de 0,5 pmol de DNA, correspondentes a 2 ou 3 µl da alíquota tratada, em função do número de pares de bases do fragmento analisado. Ao DNA tratado foram adicionados 5 pmoles do oligonucleotídeo selecionado, em um volume final de 10 µl. Esta mistura foi submetida a temperatura de 100°C por 2-3 minutos e rapidamente resfriada em banho de gelo e álcool por 5 minutos, de modo a permitir a hibridação do oligonucleotídeo à seqüência de DNA e evitando a rehibridação da dupla fita do DNA.

Aos 10 µl da mistura de DNA hibridado ao oligonucleotídeo foram adicionadas as seguintes soluções: tampão de reação para a concentração final de 23 mM de Tris-HCl pH7,5; 11 mM de MgCl₂ e 28,5 mM de NaCl; solução de de ditiotretol na concentração final de 5,7 mM, mistura de marcação para concentração final de 0,17 µM de dGTP, 0,17 µM de dCTP e 0,17 µM de dTTP; 5 µCi de [³⁵S]dATP e 3,2 unidades de Sequenase versão 2.0 T7 DNA polimerase em um volume final de 17,5 µl. Esta mistura foi levemente agitada e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos.

Reação de Terminação

Esta mistura de reação foi, então, distribuída em quatro tubos (3,5 µl em cada tubo), cada um contendo 2,5 µl de uma mistura dos desoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e um didesoxinucleotídeo, nas concentrações indicadas:

Tubo A: 8µM de ddATP e 80 µM de cada dATP, dCTP, dTTP e dGTP e 50mM de NaCl

Tubo C: 8µM de ddCTP e 80 µM de cada dATP, dCTP, dTTP e dGTP e 50mM de NaCl

Tubo G: 8µM de ddGTP e 80 µM de cada dATP, dCTP, dTTP e dGTP e 50mM de NaCl

Tubo T: 8µM de ddTTP e 80 µM de cada dATP, dCTP, dTTP e dGTP e 50mM de NaCl

Estes tubos foram, então, incubados a 37°C por 10 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 4 µl de solução 95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol.

Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit

Este segundo protocolo utilizado no seqüenciamento dos fragmentos com mobilidade eletroforética anormal nos estudos de SSCP, também exige a etapa de purificação dos produtos de PCR descrita no método anterior e que garante a remoção dos oligonucleotídeos e dNTPs pela atividade hidrolítica das enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão. Este método difere daquele descrito anteriormente por utilizar uma DNA polimerase termoestável que permite o emprego de um termociclador nas reações de seqüenciamento.

Marcação do oligonucleotídeo

Em um tubo de reação foram adicionados 20 pmoles do oligonucleotídeo referente ao exon a ser seqüenciado, tampão da polinucleotídeo quinase na concentração final de 60 mM de Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM de $MgCl_2$; 0,2 M de KCl, 25 pmoles de $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ e 10 unidades da enzima T4 polinucleotídeo quinase em um volume final de 10 μ l. Após breve agitação e centrifugação a mistura de reação foi incubada a 37°C por 10 minutos. Para desnaturação da enzima e conseqüente término da reação, o tubo foi incubado a 95°C por 5 minutos.

Reação no Ciclador de Temperatura

Em um tubo de microcentrífuga adicionou-se 15 a 20 ng de DNA, correspondentes a 1 ou 2 μ l da alíquota de PCR tratado; tampão de reação para concentração final de 30 mM de Tris-HCl, pH 9,5 e 7,4 mM de $MgCl_2$; 0,5 pmoles de oligonucleotídeo marcado; e 8 unidades de Thermo Sequenase DNA polimerase juntamente com 0,0012 unidades de pirofosfatase inorgânica de *Thermoplasma acidophilum*, em um volume final de 17,5 μ l. Esta mistura de reação foi, então, distribuída em quatro tubos (4 μ l em cada) contendo 4 μ l das seguintes soluções:

Tubo A: 1,5 μ M de ddATP e 150 μ M de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP

Tubo C: 1,5 μ M de ddCTP e 150 μ M de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP

Tubo G: 1,5 μ M de ddGTP e 150 μ M de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP

Tubo T: 1,5 μ M de ddTTP e 150 μ M de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP

Foram, então, adicionados cerca de 10 µl de óleo mineral sobre cada reação de terminação. Após uma breve centrifugação, foi iniciado o programa no ciclador de temperatura que consistia de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 0,5 minuto, hibridação a 50°C a 60°C de acordo com o oligonucleotídeo selecionado por 0,5 minuto e extensão a 72°C por 0,5 a 1 minuto de acordo com o número de pares de base do fragmento a ser analisado.

Com a finalização dos ciclos foram acrescentados 4 µl da solução formamida 95%, 20 mM de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol.

Eletroforese em Gel Desnaturante

A corrida eletroforética dos tubos de reação (G, A, T e C), obtidos a partir de ambos os protocolos acima descritos, foi realizada em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida/bis-acrilamida - 19:1) (Sambrook *et al.*, 1982), 72 mM de Tris-base, 24 mM de Taurina, 0,4 mM de Na₂EDTA.2H₂O, pH 8,0, 7 M de uréia, 3,5 mM de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED (N, N, N', N'- tetramethylenediamine). O gel foi preparado em placas de dimensões 38 cm x 50 cm, com espaçadores de gradiente de espessura variando de 0,25 mm até 0,4 mm. Foi utilizada, como tampão de corrida, a solução tampão tolerante à glicerol (Tris-base 72 mM, taurina 24 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,0. Foram aplicados cerca de 3,0 µl de cada amostra, para separação dos fragmentos de DNA marcados radioativamente e o gel foi submetido à potência constante de 75 W (aproximadamente 1800V, 50 mA) por 2 ou 4 horas. Por fim, transferiu-se o gel para papel 3 MM e o mesmo foi seco a 80°C por 1,5 horas. O filme de raio X foi mantido em exposição ao gel por cerca de 24 horas, à temperatura ambiente.

Análise dos Haplótipos

São conhecidos vários sítios polimórficos intragênicos e extragênicos associados com o gene do fator IX. Dentre eles se destacam o *Msp I* (a 5', posição - 698) (Camerino *et al.*, 1985), *Bam HI* (a 5', posição -561) (Driscoll *et al.*, 1988; Green *et al.*, 1992), VNTR *Dde I* ou IA:RY(i) (íntron 1) (Winship *et al.*, 1984; Green *et al.*, 1992;

Jacobson *et al.*,1993), *Bam* *HI* (íntron 2) (Hay *et al.*,1986), *Xmn* *I* (íntron 3) (Winship *et al.*,1984), *Taq* *I* (íntron 4) (Driscoll *et al.*,1985), *Mnl* *I* (exon 6) (McGraw *et al.*,1985) e *Hha* *I* (a 3', ~8kb) (Winship *et al.*,1989).

Para análise dos haplótipos dos pacientes estudados neste trabalho foram selecionados cinco polimorfismos encontrados no gene do fator IX: *Bam* *HI* a 5', VNTR *Dde* *I*, *Taq* *I*, *Mnl* *I*, e *Hha* *I*. Para a identificação dos diferentes polimorfismos foi realizada a amplificação, pela técnica de PCR, dos fragmentos de DNA que abrangiam as regiões que continham os sítios polimórficos de interesse. As condições de amplificação foram iguais àquelas descritas anteriormente. Para a amplificação foram utilizados os pares de oligonucleotídeos apresentados na **Tabela II**.

Tabela II: Seqüência dos Oligonucleotídeos Utilizados na Análise dos Haplótipos do Gene do Fator IX

Polimorfismo	Oligonucleotídeos (5'-3')	Posição ^d	Produto	T. Hibrid. ^e
<i>Bam</i> <i>HI</i> ^b	GCTGGATAAATTGGACATACC GTCTCCAGCCTGTAGCTTGTC	-744 a -724 -455 a -475	289 pb	58°C
IA:RY(i) ^a	GGGACCACTGTCGTATAATGTGG CTGGAGGATAGATGTCTCTATCTG	5315 a 5337 5661 A 5685	variável	58°C
<i>Mnl</i> <i>I</i> ^c	TGGGCCTCAATCTCAATTTT CAGCTGAGCTCCAGTTTGA	20278 a 20297 20606 a 20587	328 pb	60°C
<i>Hha</i> <i>I</i> ^a	ACAGGCACCTGCCATCACTT AGATTTCAAGCTACCAACAT	extremidade 3'	230 pb	60°C

^a Peake *et al.* (1993)
^b Green *et al.* (1992)
^c Fornecido por Dezdo David, *Portugal*
^d Número de Yoshitake *et al.* (1985)
^e Temperatura de Hibridação

Os diferentes produtos obtidos da amplificação por PCR foram então submetidos à digestão com diferentes enzimas de restrição cada qual responsável pelo reconhecimento de um sítio polimórfico específico. Os nomes atribuídos aos polimorfismos fazem referência às enzimas de restrição utilizadas para sua análise. A reação de digestão consistiu na adição de 8 µl do produto da reação de PCR, 1,5 µl da

solução tampão respectivo à enzima utilizada, 2 a 3 unidades de enzima, solução de soro albumina bovina (BSA) quando necessário, em um volume final de 15 µl.

Após a reação de digestão, as amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose 2% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) para verificação da presença (+) ou ausência (-) do sítio de reconhecimento da enzima de restrição.

O sítio polimórfico intragênico especificado como VNTR *Dde I* é identificado de maneira distinta daquela apresentada para os demais polimorfismos. Neste caso, os polimorfismos são identificados por uma variação no tamanho dos fragmentos obtidos na reação de amplificação. Na população brasileira foram observados seis diferentes alelos *Dde I* que apresentam tamanho variável de 295 a 411 pares de base (Figueiredo *et al.*, 1994).

RESULTADOS

PCR-SSCP

SSCP Não-Radioativo

A análise de polimorfismo de conformação de hélice simples (SSCP) em sistema não-radioativo permitiu a determinação do padrão eletroforético anormal em 27 fragmentos de DNA correspondentes a 27 pacientes hemofílicos B dos 29 pacientes analisados neste estudo. Por este método foi possível observar um padrão anormal de corrida eletroforética em 1 fragmento correspondente ao exon 2 do paciente referido como HB40; 1 fragmento correspondente ao exon 4 (HB17); 5 fragmentos correspondentes ao exon 6 (pacientes HB1, HB13, HB16, HB20 e HB34); 1 do exon 7 (HB10) e 19 fragmentos do exon 8 (pacientes HB2, HB6, HB7, HB9, HB11, HB12, HB15, HB22, HB23, HB26, HB31, HB35, HB36, HB39, HB43, HB45, HB46, HB47, HB49) (**Figuras 4 a 9**).

O estudo de SSCP dos fragmentos correspondentes ao exon 6 foram dificultados pela presença do sítio dimórfico G:C (Malmö A) ou A:T (Malmö B), correspondente ao primeiro par de base do códon do resíduo 148 (**Figura 10**). O par A:T apresentou-se mais freqüente na amostra analisada e os fragmentos de DNA provenientes de pacientes que apresentavam o par G:C apresentaram um padrão de migração diferente daquele observado na maioria. Desta forma, todos os fragmentos referentes ao exon 6 com padrão anormal de corrida eletroforética foram integralmente seqüenciados para a determinação da presença do sítio dimórfico ou de uma mutação de ponto.

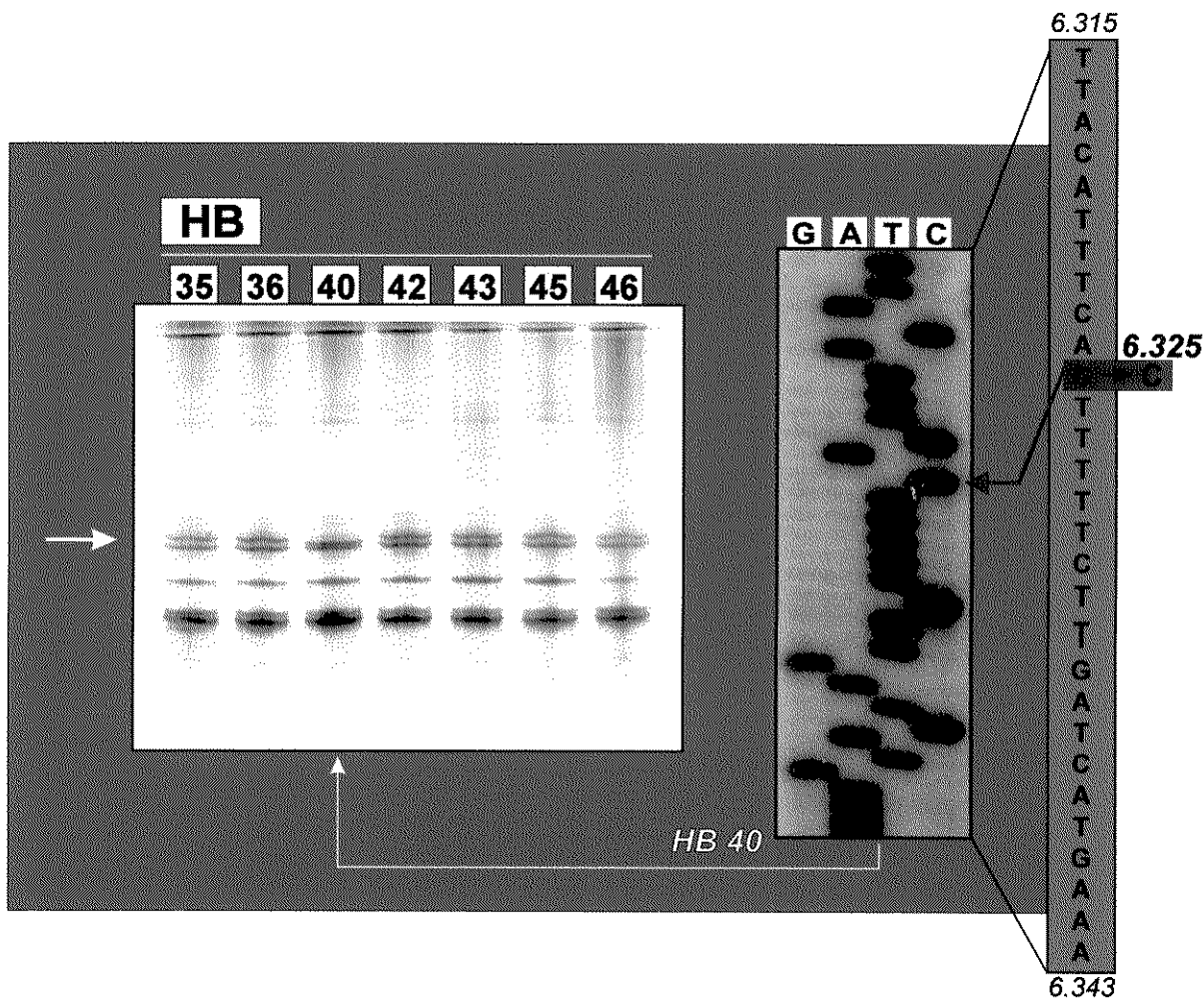


Figura 4: Análise de SSCP Não- Radioativo do Exon B e Identificação da Alteração Molecular por Seqüenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon B do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB35, HB36, HB40, HB42, HB43, HB45 e HB46, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA do paciente HB40 apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon B do gene do fator IX do paciente HB40. O seqüenciamento revelou a transversão G→C na posição 6.325 (indicado em vermelho) no sítio de excisão do íntron 1.

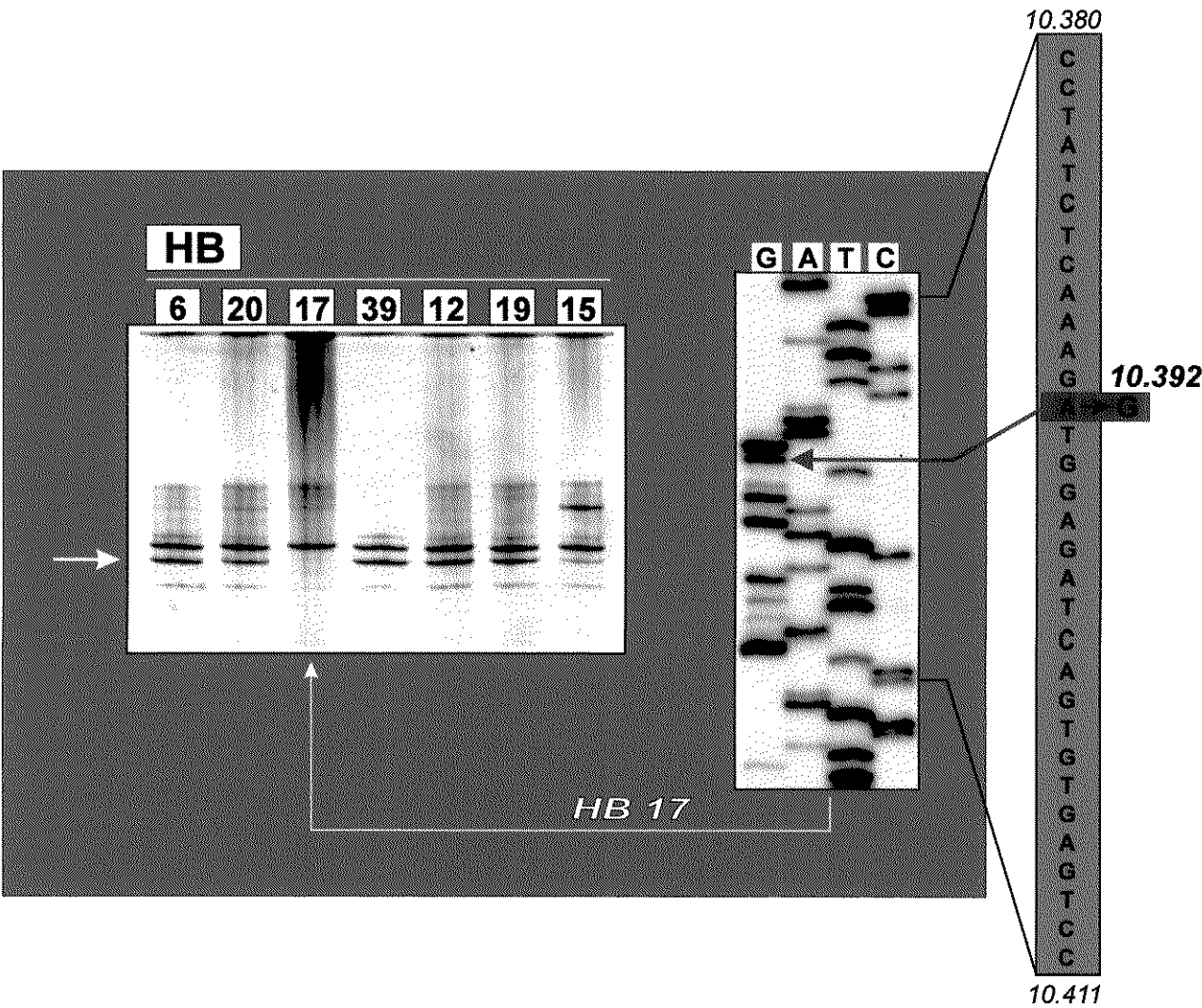


Figura 5: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 4 e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 4 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB6, HB20, HB17, HB39, HB12, HB19 e HB15, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA do paciente HB17 apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). O fragmento de DNA do paciente HB19 não apresentou padrão de migração anormal na análise de SSCP não-radioativo, embora a presença de alteração molecular tenha sido detectada pela análise de SSCP radioativo. À direita, uma parte da auto-radiografia da sequência nucleotídica do exon 4 do gene do fator IX do paciente HB17. O sequenciamento revelou a transição A→G na posição 10.392 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Asp⁴⁷ para Gly.

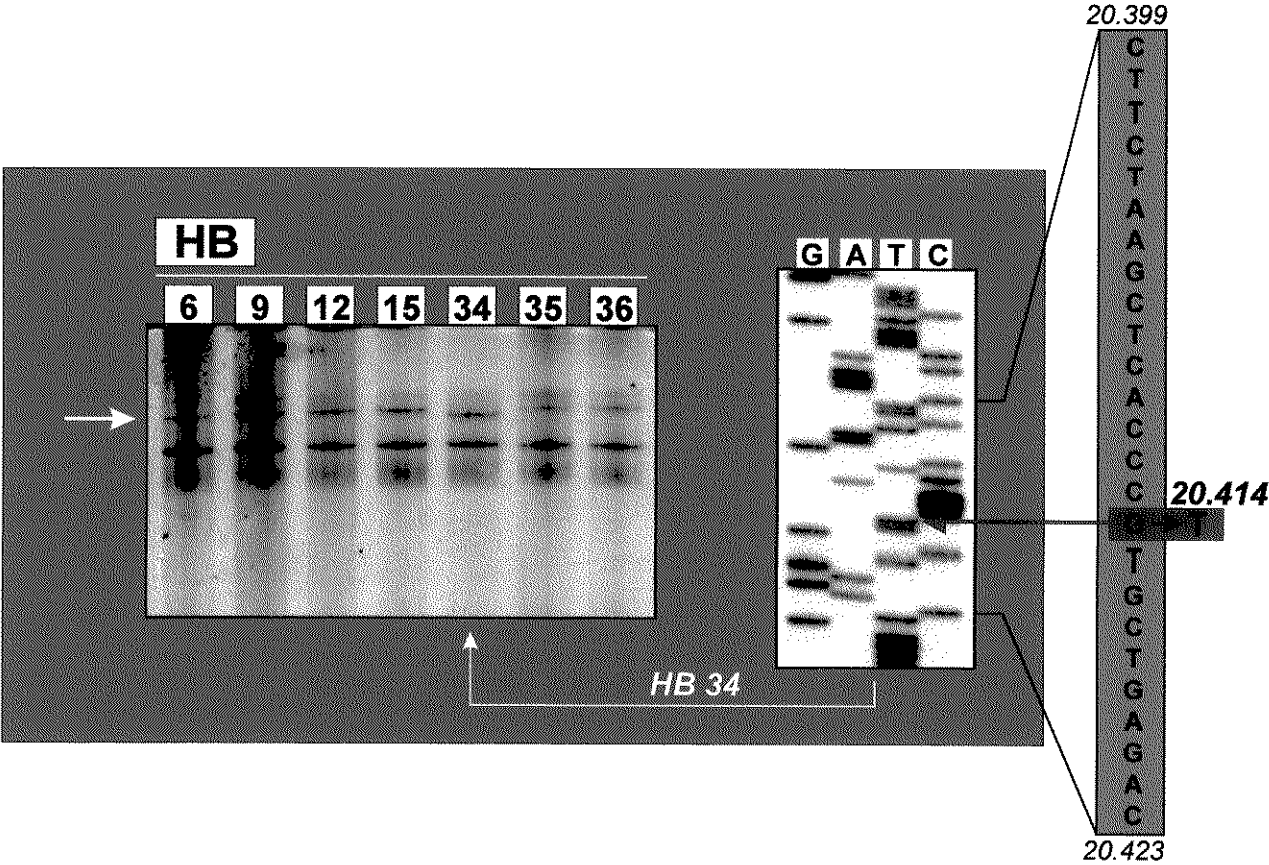


Figura 6: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon F e Identificação da Alteração Molecular por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon F do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB6, HB9, HB12, HB15, HB34, HB35 e HB39, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA do paciente HB34 apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da sequência nucleotídica do exon F do gene do fator IX do paciente HB34. O sequenciamento revelou a transversão G→T na posição 20.414 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Arg¹⁴⁵ para Leu.

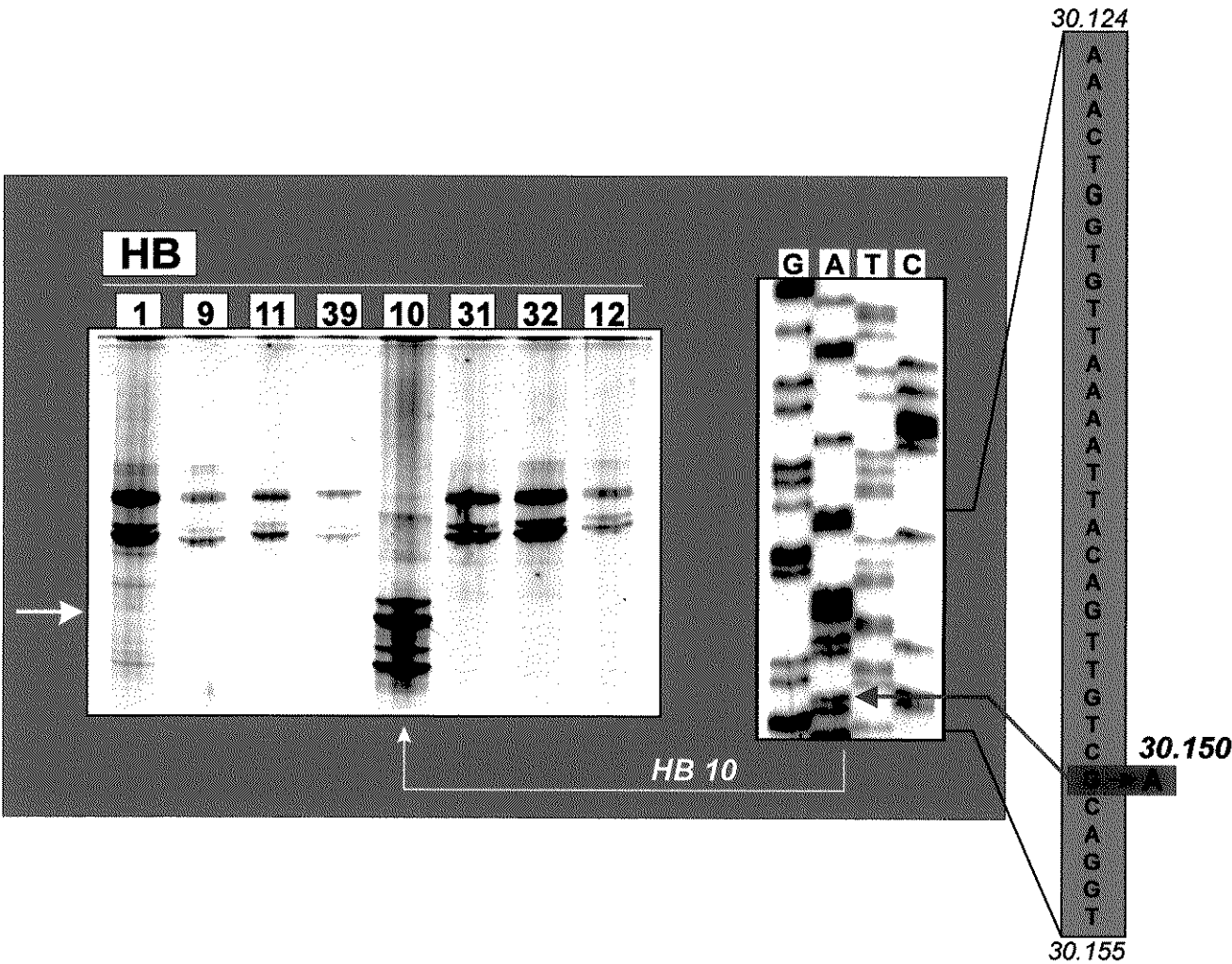


Figura 7: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 7 e Identificação da Alteração Molecular por Seqüenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 7 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB1, HB9, HB11, HB39, HB10, HB31, HB32 e HB12, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA do paciente HB10 apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 7 do gene do fator IX do paciente HB10. O seqüenciamento revelou a transição G→A na posição 30.150 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Ala²³³ para Thr.

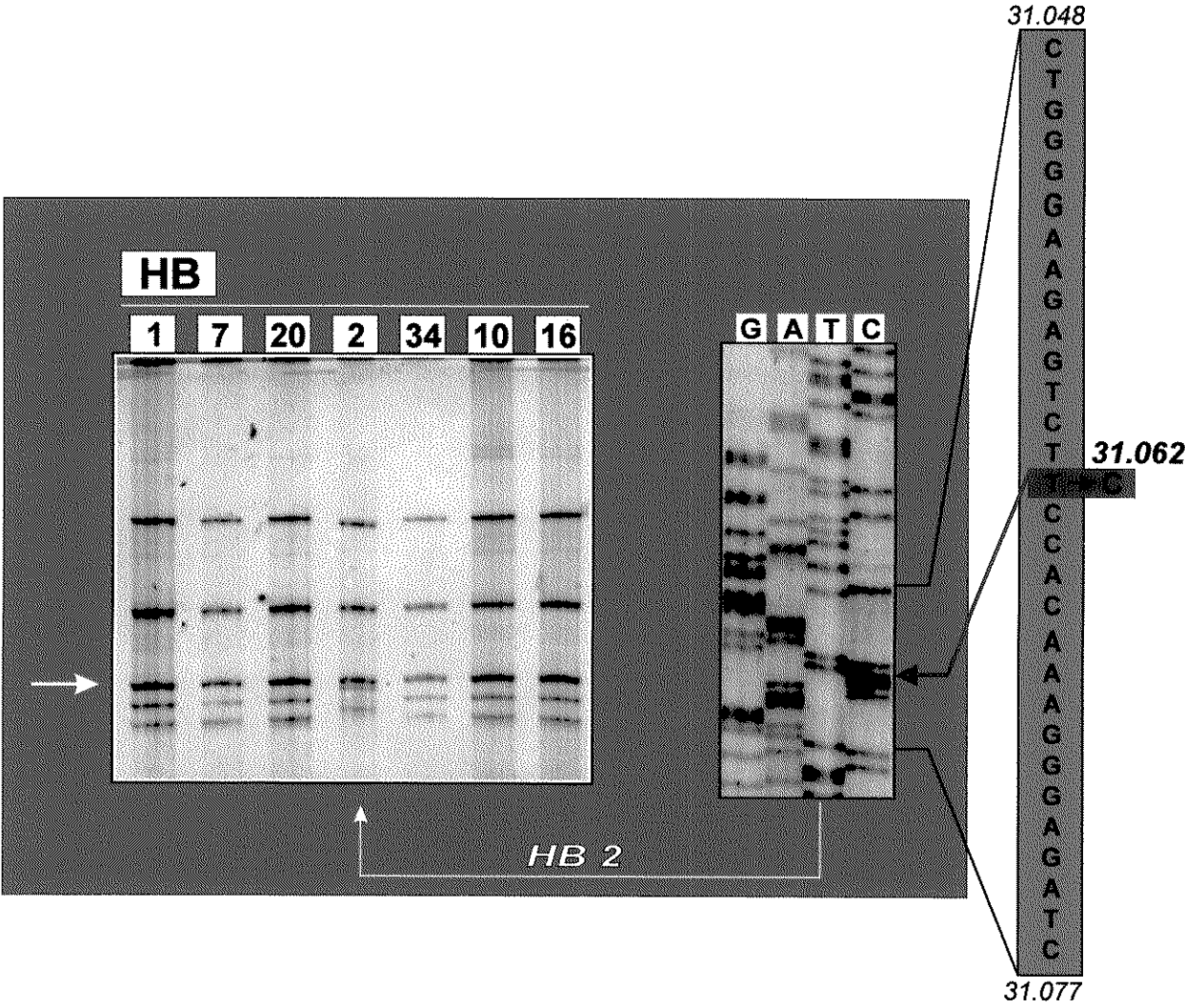


Figura 8: Análise de SSCP Não-Radioativo da Região H1 do Exon 8 e Identificação da Alteração Molecular por Seqüenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR, digeridos com a enzima de restrição *Xmn I*, correspondentes à região H1 do exon 8 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB1, HB7, HB20, HB2, HB34, HB10 e HB16, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA do paciente HB2 apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). O fragmento de DNA do paciente HB16 não apresentou padrão de migração anormal na análise de SSCP não-radioativo, embora a presença de alteração molecular tenha sido detectada pela análise de SSCP radioativo. À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica da região H1 do exon 8 do gene do fator IX do paciente HB2. O seqüenciamento revelou a transição T→C na posição 31.062 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Phe³¹⁴ para Ser.

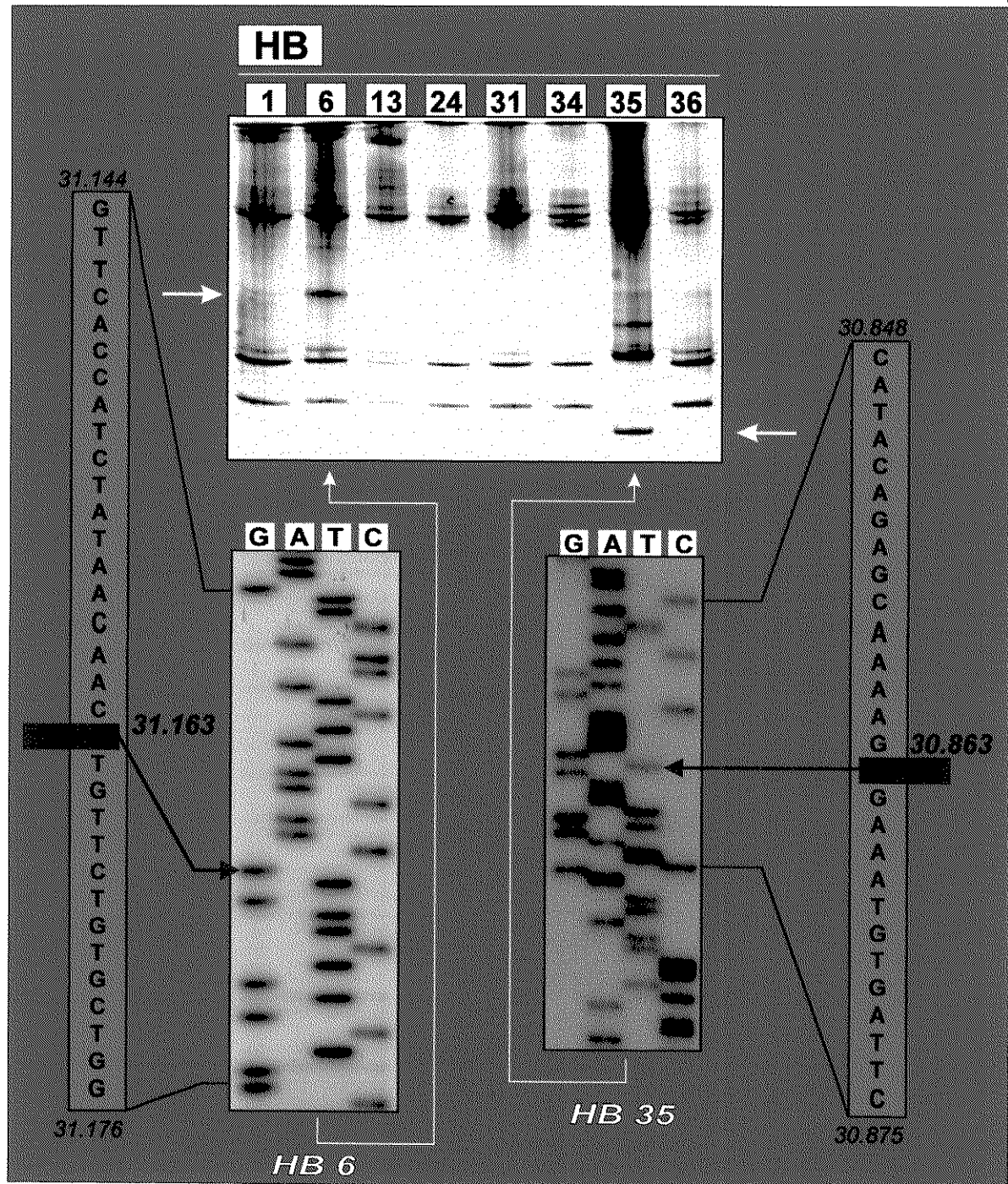


Figura 9: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 8 e Identificação das Alterações Moleculares por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

Acima, gel de SSCP dos fragmentos de PCR, digeridos com a enzima de restrição *Xmn I*, correspondentes ao exon 8 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB1, HB6, HB13, HB24, HB31, HB34, HB35 e HB36, corado com nitrato de prata. Os fragmentos de DNA dos pacientes HB6 e HB35 apresentaram padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com as setas). Abaixo à esquerda, uma parte da auto-radiografia da sequência nucleotídica do exon 8 do gene do fator IX do paciente HB6. O sequenciamento revelou a transição A→G na posição 31.163 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Met³⁴⁸ para Val. Abaixo à direita, uma parte da auto-radiografia da sequência nucleotídica do exon 8 do gene do fator IX do paciente HB35. O sequenciamento revelou a transição C→T na posição 30.863 (indicado em vermelho) que resulta na formação de um códon de terminação precoce (TGA) na posição correspondente ao resíduo Arg²⁴⁸.

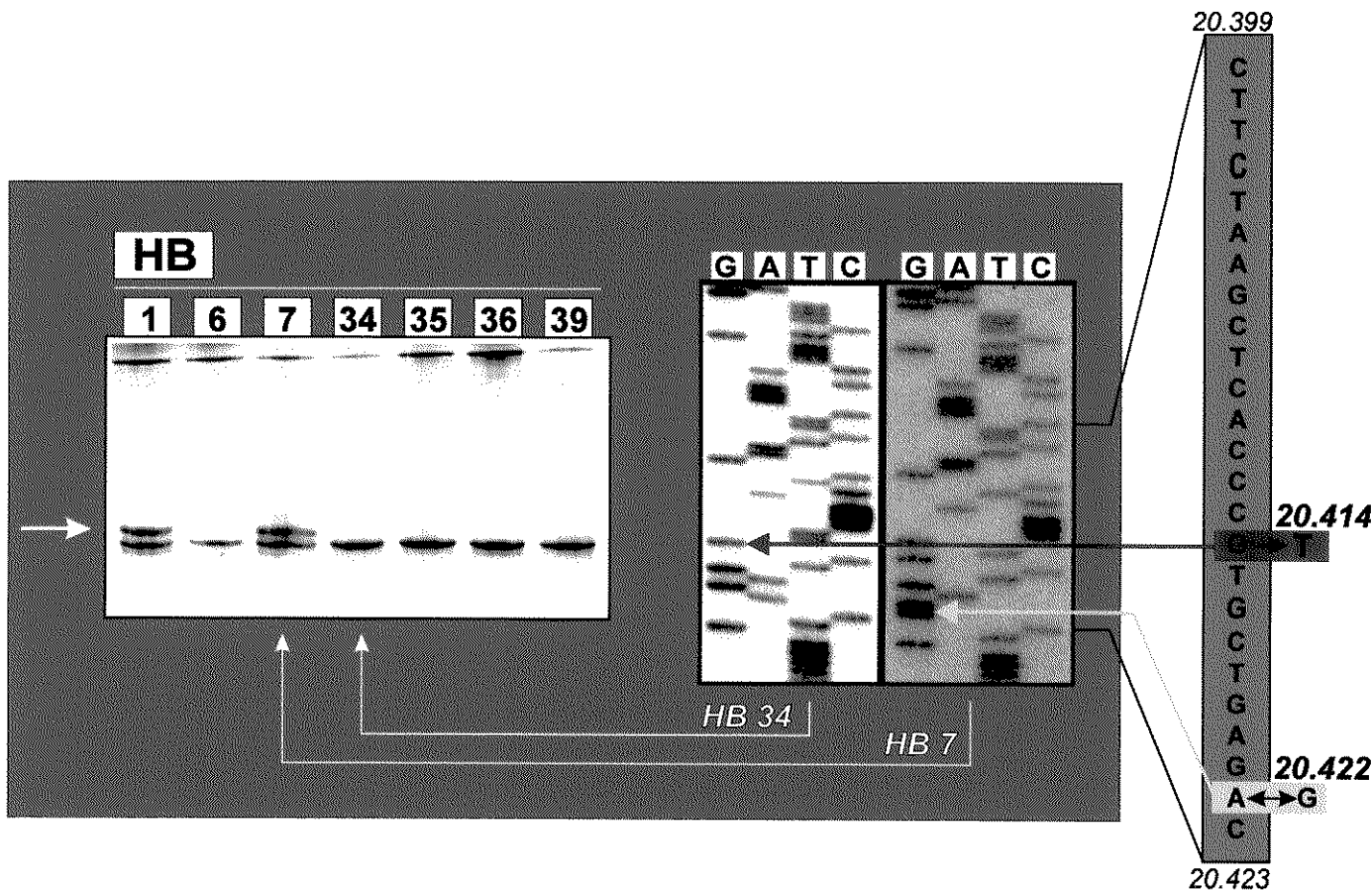


Figura 10: Análise de SSCP Não-Radioativo do Exon 6 e Identificação do Polimorfismo Malmö por Sequenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 6 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB1, HB6, HB7, HB34, HB35, HB36 e HB39, corado com nitrato de prata. Os fragmentos de DNA dos pacientes HB1 e HB7 apresentaram padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, parte das auto-radiografias da seqüência nucleotídica do exon 6 do gene do fator IX dos pacientes HB7 e HB34. O seqüenciamento revelou a presença do sítio dimórfico Malmö A (G:C) e Malmö B (A:T) nos pacientes HB7 e HB34, respectivamente (indicado em amarelo). O seqüenciamento do fragmento de DNA correspondente ao exon 6 do paciente HB34 também revelou a transversão G→T na posição 20.414 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Arg¹⁴⁵ para Leu, como detectado na análise de SSCP dos fragmentos de PCR referentes ao denominado exon F.

A técnica de SSCP não-radioativo para a detecção de possíveis alterações moleculares em diferentes fragmentos de DNA das diferentes regiões do gene do fator IX mostrou-se muito susceptível a variações de temperatura, voltagem, amperagem e tempo aos quais são submetidas as amostras durante a corrida eletroforética, de maneira semelhante ao observado nos estudos com p53, HLA-DQA e K-ras (Hongyo *et al.*, 1993). Assim sendo, alguns fragmentos de PCR estudados apresentaram padrão de migração anormal somente sob condições específicas de eletroforese, apresentando um padrão normal quando submetidos às condições mais comumente empregadas nas análises de SSCP realizadas neste trabalho.

Quando não foi possível determinar o padrão eletroforético anormal em nenhum dos fragmentos correspondentes aos diferentes exons de um determinado paciente sob as condições padrão de temperatura, voltagem e tempo de corrida empregadas, as amostras foram submetidas a novas corridas sob diferentes parâmetros o que possibilitou a determinação das prováveis regiões de alteração molecular nestas casos.

SSCP Radioativo

Os fragmentos de DNA correspondentes às oito regiões referentes ao promotor, exons e sítios de excisão de íntrons do gene do fator IX dos 29 pacientes hemofílicos B foram submetidos à análise de SSCP radioativo para confirmação dos padrões anormais de migração observados na técnica de SSCP não-radioativo e identificação de padrões eletroforéticos anormais não detectados no sistema automático de eletroforese.

A análise de SSCP a partir de produtos radioativos de PCR permitiu a determinação de padrões de migração anormais em 5 fragmentos, de 5 pacientes respectivamente, que não haviam sido identificados pela técnica de SSCP não-radioativo. Foi detectado o padrão anormal em 1 fragmento correspondente ao exon 1 (HB32), 1 referente ao exon 2 (HB1), 2 referentes ao exon 4 (HB19 e HB31) e 1 correspondente ao exon 8 (HB16) (**Figuras 11, 12 e 13**). Além disto, o padrão eletroforético anormal determinado pela análise de SSCP não-radioativo foi confirmado nos estudos de SSCP radioativo.

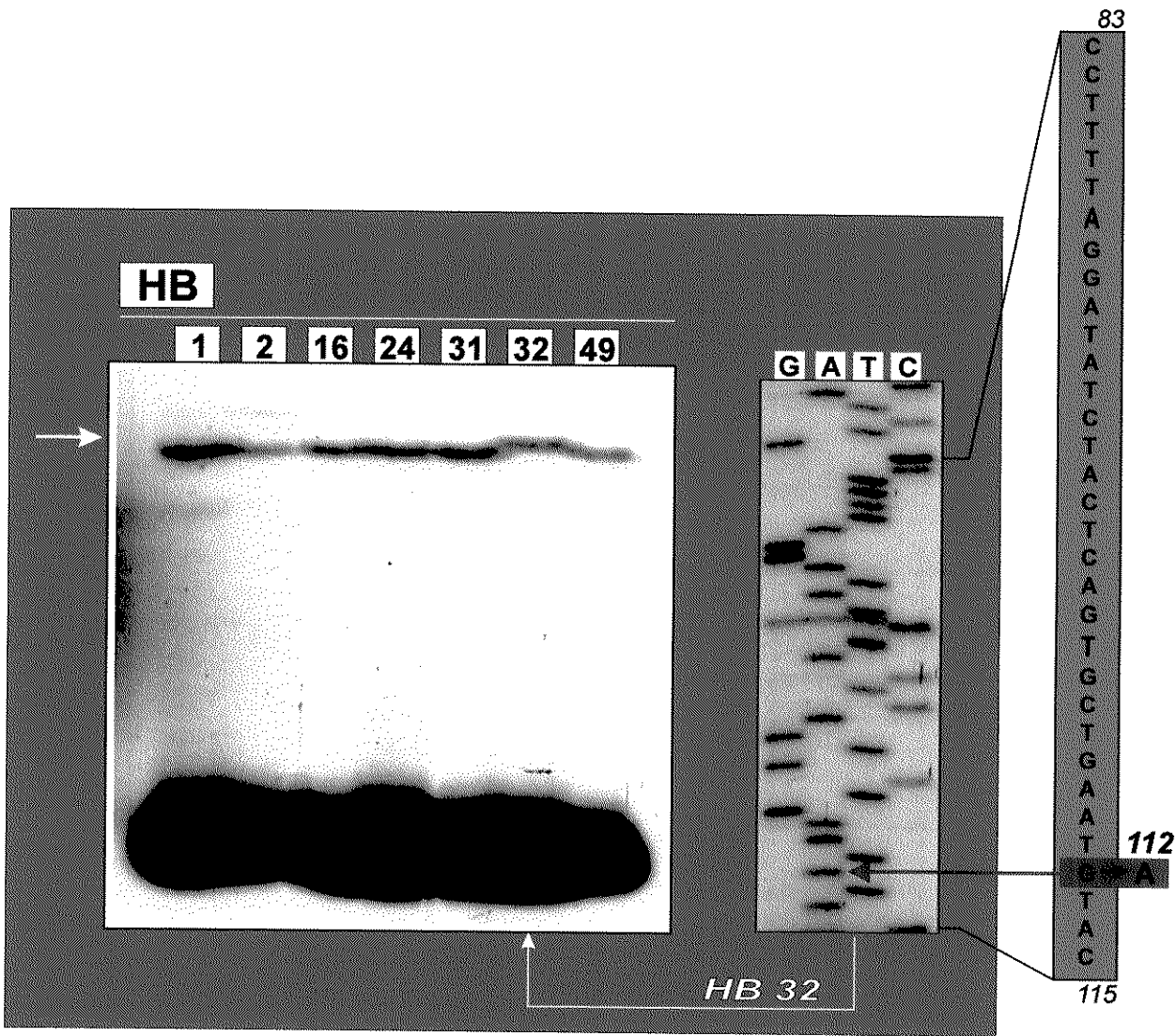


Figura 11: Análise de SSCP Radioativo do Exon 1 e Identificação da Alteração Molecular por Seqüenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, auto-radiografia do gel de SSCP dos fragmentos de PCR, marcados com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, correspondentes ao exon 1 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB1, HB2, HB16, HB24, HB31, HB32 e HB49. O fragmento de DNA do paciente HB32 apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 1 do gene do fator IX do paciente HB32. O seqüenciamento revelou a transição G→A na posição 112 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Cys¹⁹ para Tyr. Esta mutação não havia sido identificada na análise de SSCP não-radioativo.

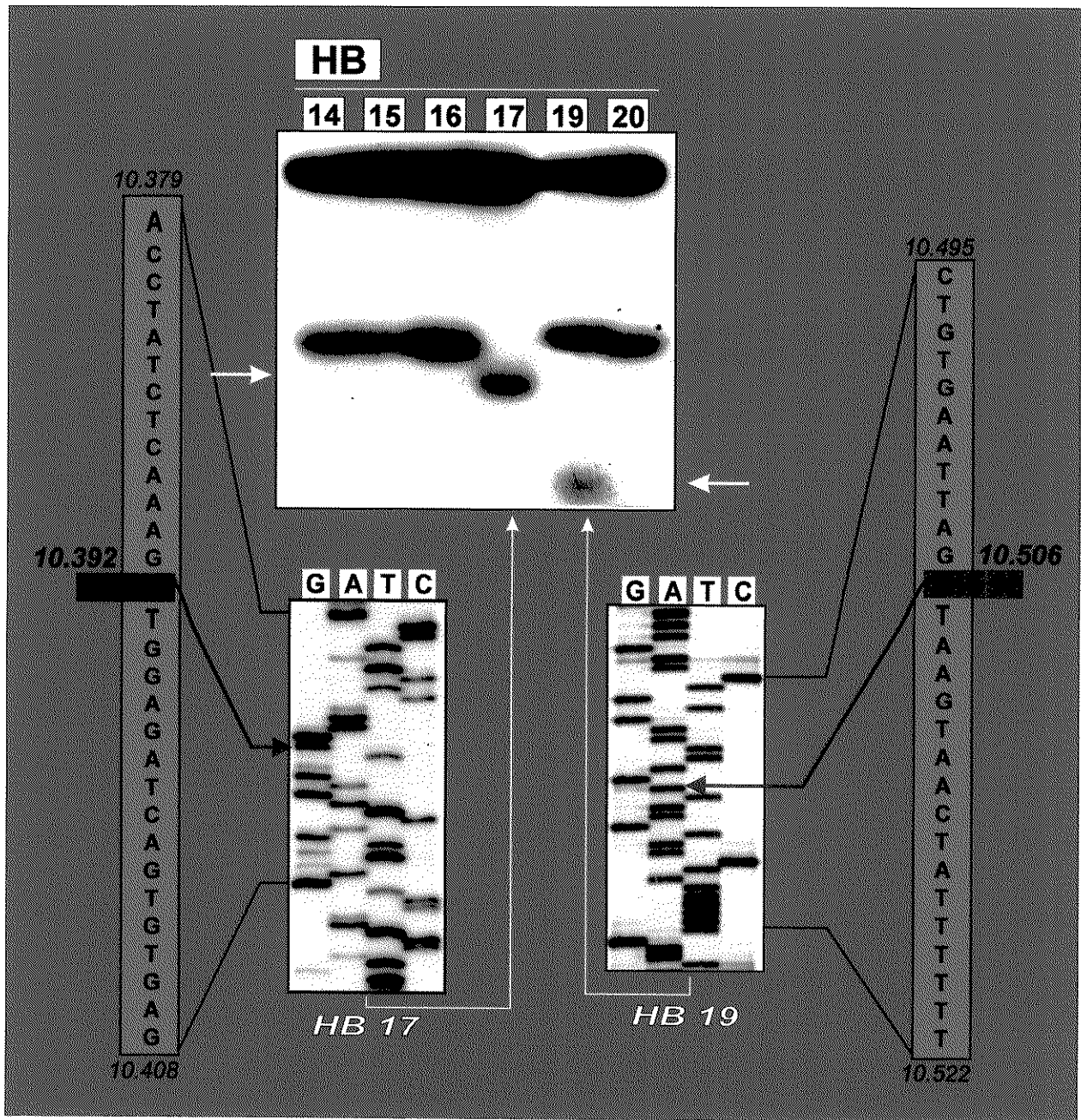


Figura 12: Análise de SSCP Radioativo do Exon 4 e Identificação das Alterações Moleculares por Seqüenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

Acima, auto-radiografia do gel de SSCP dos fragmentos de PCR, marcados com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, correspondentes ao exon 4 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB14, HB15, HB16, HB17, HB19 e HB20. Os fragmentos de DNA dos pacientes HB17 e HB19 apresentaram padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com as setas). Abaixo à esquerda, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 4 do gene do fator IX do paciente HB17. O seqüenciamento revelou a transição A→G na posição 10.392 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Asp⁴⁷ para Gly. Abaixo à direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 4 do gene do fator IX do paciente HB19. O seqüenciamento revelou a transição G→A na posição 10.506 (indicado em vermelho) no sítio de excisão do íntron 4. Esta mutação não havia sido identificada na análise de SSCP não-radioativo.

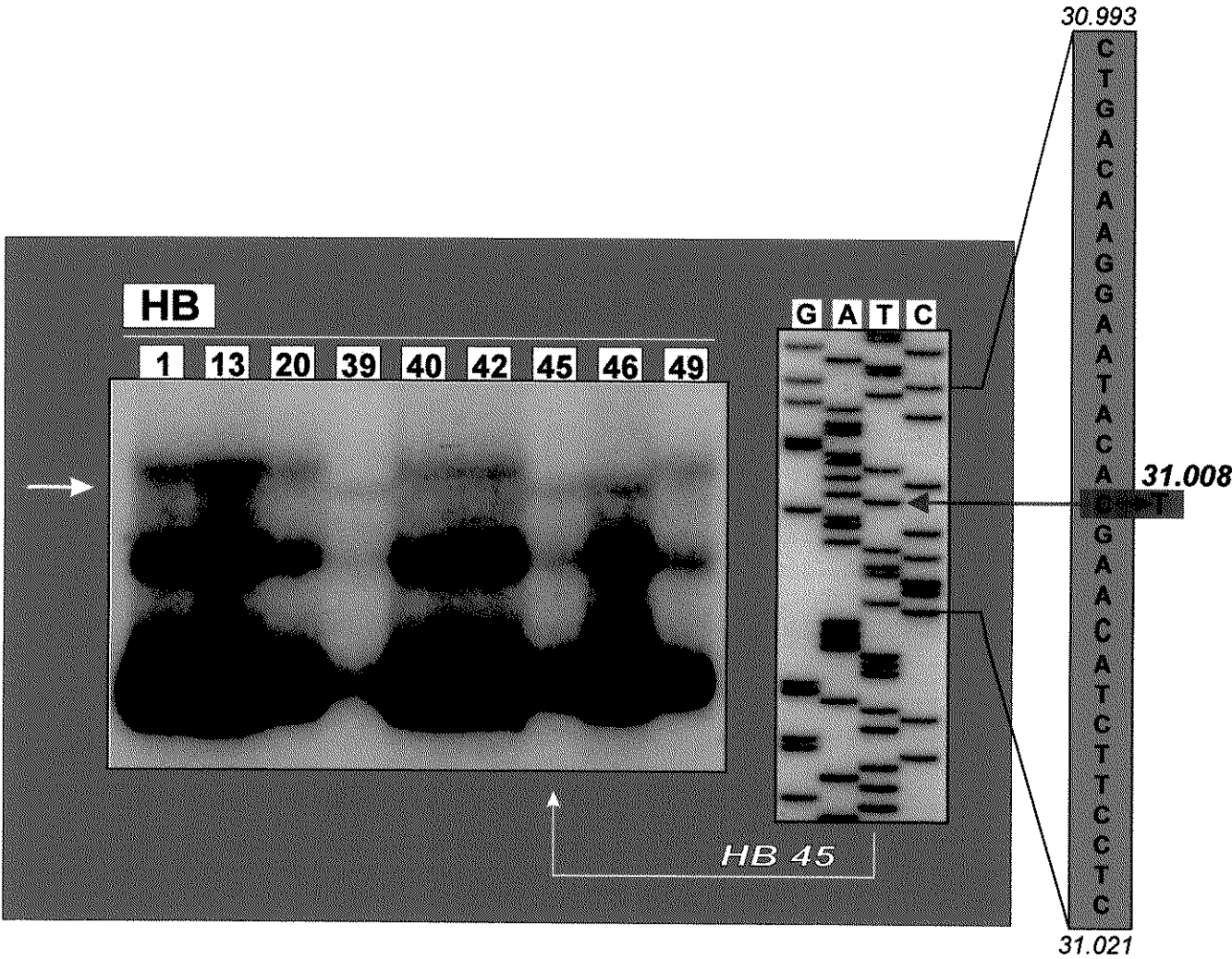


Figura 13: Análise de SSCP Radioativo do Exon 8 e Identificação da Alteração Molecular por Seqüenciamento Direto do DNA Amplificado por PCR

À esquerda, auto-radiografia do gel de SSCP dos fragmentos de PCR, marcados com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, correspondentes ao exon 8 do gene do fator IX dos pacientes hemofílicos HB1, HB13, HB20, HB39, HB40, HB42, HB45, HB46 e HB49. O fragmento de DNA dos pacientes HB39, HB45 e HB46 apresentaram padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 8 do gene do fator IX do paciente HB45. O seqüenciamento revelou a transição C→T na posição 31.008 (indicado em vermelho) que resulta na substituição do resíduo de aminoácido Thr²⁹⁶ para Met. O seqüenciamento dos fragmentos de DNA referentes ao exon 8 dos pacientes HB39 e HB46 revelou a presença da mesma mutação de ponto identificada no paciente HB45.

Mutações nos 29 Pacientes Hemofílicos B

Os fragmentos que apresentaram padrão eletroforético anormal na análise do SSCP radioativo e não-radioativo foram seqüenciados para a determinação da alteração molecular responsável pela migração eletroforética diferenciada.

O seqüenciamento foi realizado a partir de novos produtos de PCR, com o intuito de evitar que o padrão de migração anormal e a alteração molecular correspondente fossem resultado da incorporação errônea de nucleotídeos durante o processo de amplificação dos fragmentos de DNA na reação anterior de PCR. Além disto, o seqüenciamento dos fragmentos foi repetido com amostras obtidas de diferentes reações de PCR para a confirmação das mutações determinadas.

O seqüenciamento dos fragmentos com padrão eletroforético anormal permitiu a identificação de 30 mutações de ponto nas regiões correspondentes aos exons e sítios de excisão de íntrons do gene do fator IX nos 29 pacientes analisados (**Tabela III**). O resumo das alterações moleculares identificadas neste estudo está apresentada no **Quadro 1**. O paciente referido como HB31 apresentou duas mutações, a primeira caracterizada por uma transição A→G no sítio de excisão do íntron 4 na posição 10.512 e a segunda por uma transversão C→A no exon 8 na posição 31.223, levando à substituição do aminoácido prolina para treonina. Além destas mudanças na seqüência nucleotídica, o paciente HB31 também apresentou uma substituição neutra na posição 31.093 correspondente ao terceiro nucleotídeo do códon para Gln³²⁴, no exon 8. Como não foi possível determinar se esta substituição silenciosa representa um variante raro (polimorfismo de baixa freqüência) ou uma mutação de ponto (Koeberl *et al.*, 1989), ela não foi incluída nas diferentes análises para determinação do padrão de mutações que caracteriza o gene do fator IX. Não foi observado nenhum caso de deleção de pequenas ou grandes regiões do gene do fator IX na amostra analisada neste estudo.

O seqüenciamento dos fragmentos correspondentes ao exon 6 dos pacientes HB1, HB7 e HB16, que apresentaram padrão de migração anormal nas análises de SSCP radioativo e não-radioativo, revelou a presença do sítio dimórfico denominado Malmö A (**Figura 10**) e a ausência de outras alterações na seqüência nucleotídica nesta região. Nestes pacientes as mutações foram identificadas nos exons 2 e 8, nos

quais também foram detectados padrões anormais de corrida eletroforética em análise de SSCP radioativo.

Das 30 mutações observadas (não considerando a mutação silenciosa da posição 31.093), 22 (73%) representavam alterações nucleotídicas diferentes. Três pacientes (HB15, HB22 e HB23) apresentaram a mesma mutação de ponto, caracterizada por uma transição de G→A na posição 30.864 levando à alteração do aminoácido 248 de Arg para Gln. Cinco pacientes provenientes do Pará (HB36, HB39, HB43, HB45 e HB46) apresentaram a transição nucleotídica de C→T na posição 31.008 (**Figura 13**), com a alteração do aminoácido Thr da posição 296 para Met. Por fim, três pacientes apresentaram a transição A→G do nucleotídeo de posição 31.163 que leva à mudança da Met de posição 348 para Val (**Figura 9**).

Dentre as mutações de ponto identificadas, apenas três afetam sítios de excisão de íntrons e três representam mutações "nonsense" (formação de códons de terminação precoces), sendo que a grande maioria das alterações moleculares encontradas nesta amostra correspondem a mutações "missense" (alterações nos resíduos de aminoácidos da proteína).

As mutações identificadas neste estudo foram observadas predominantemente no domínio catalítico do fator IX. Das 31 alterações moleculares identificadas, 22 localizam-se na porção carboxi-terminal da proteína, particularmente nos nucleotídeos que perfazem o exon 8. Apenas uma alteração molecular foi identificada na sequência do pró-peptídeo, uma no domínio Gla, uma no domínio EGF-1, uma no domínio EGF-2, e por fim, duas mutações foram determinadas no peptídeo de ativação.

A identificação das alterações moleculares dos pacientes hemofílicos analisados no presente estudo permitiu a determinação de seis mutações não descritas previamente na literatura (Giannelli *et al.*, 1996). Estas mutações estão indicadas na **Tabela III**.

Tabela III: Alterações Moleculares Identificadas no Gene do Fator IX

Paciente #	FIX:C ^a	Alteração nucleotídica ^b	Alteração no aminoácido ^b	Domínio funcional	CpG	Nível de conservação do aa ^c	Haplótipo #
HB 32	4,8%	112 G→A	-19, C→Y*	peptídeo-sinal	não	S	2
HB 40	<1%	6.325 G→C	acceptor splice (b)	—	não	—	7
HB 1	<1%	6.460 C→T	29, R→Stop	Gla	sim	—	9
HB 17	24%	10.392 A→G	47, D→G	EGF-1	não	G	5
HB 19	1%	10.506 G→A	donor splice (d)*	—	não	—	6
HB 13	2%	20.374 T→C	132, C→R	EGF-2	não	G	7
HB 34	9%	20.414 G→T	145, R→L	ativação	sim	S	2
HB 20	1%	20.518 C→T	180, R→W	ativação	sim	G	9
HB 10	9,4%	30.150 G→A	233, A→T	catalítico	sim	G	5
HB 35	<1%	30.863 C→T	248, R→Stop	catalítico	sim	—	5
HB 15	2,5%	30.864 G→A	248, R→Q	catalítico	sim	P	5
HB 22	7%	30.864 G→A	248, R→Q	catalítico	sim	P	5
HB 23	6,5%	30.864 G→A	248, R→Q	catalítico	sim	P	5
HB 47	4%	30.987 G→C	289, C→S*	catalítico	não	G	4
HB 36	6%	31.008 C→T	296, T→M	catalítico	sim	S	3
HB 39	nd ^d	31.008 C→T	296, T→M	catalítico	sim	S	3
HB 43	9%	31.008 C→T	296, T→M	catalítico	sim	S	5
HB 45	4%	31.008 C→T	296, T→M	catalítico	sim	S	3
HB 46	nd ^d	31.008 C→T	296, T→M	catalítico	sim	S	3
HB 2	8%	31.062 T→C	314, F→S*	catalítico	não	S	2
HB 12	1,6%	31.118 C→T	333, R→Stop	catalítico	sim	—	6
HB 6	3,7%	31.163 A→G	348, M→V	catalítico	não	G	1
HB 9	5%	31.163 A→G	348, M→V	catalítico	não	G	1
HB 11	4,7%	31.163 A→G	348, M→V	catalítico	não	G	6
HB 7	<1%	31.202 T→A	361, C→S	catalítico	não	G	9
HB 16	2%	31.263 G→C	381, G→A*	catalítico	não	G	8
HB 49	1,0%	31.289 G→A	390, A→T	catalítico	não	P	5
HB 26	<1%	31.340 T→A	407, W→R*	catalítico	não	G	2
HB 31	<1%	10.512 A→G	donor splice +7	—	não	—	3
		31.093 G→A	324, Q→Q	mut. neutra	não	—	3
		31.223 C→A	368, P→T	catalítico	não	G	3

^a Atividade coagulante do fator IX

^b Número de Yoshitake *et al.* (1985)

^c Classes de conservação são abreviadas como a seguir: G = resíduo genérico, P = resíduo parcialmente genérico e S = específico do fator IX (Bottema *et al.*, 1991)

^d nd - atividade de fator IX não foi determinada. Quadro clínico observado típico de hemofilia B leve.

* mutações não descritas anteriormente

Quadro 1: Resumo das Alterações de Seqüência nos 29 pacientes analisados

1. Número de mudanças de seqüência nas oito regiões de provável significância funcional.....	31
2. Número de mutações independentes.....	24
3. Número de pacientes com uma segunda alteração.....	1
4. Tipo de mutação	
Transições.....	17
Transversões.....	7
Microdeleções (<50pb).....	0
Deleções.....	0
Inserções.....	0
5. Localização da mutação	
Deleção total do gene.....	0
Suposta região promotora.....	0
Região 5' não traduzida.....	0
Seqüência codificadora.....	21
Sítios de excisão de íntrons.....	3
Região 3' não traduzida (poli A).....	0
6. Conseqüências Funcionais	
Proteína "missense".....	18
Proteína truncada ("nonsense").....	3
Deleção parcial ou total de aminoácidos.....	0
Excisão anormal.....	3
Diminuição da expressão/ tradução.....	0

Análise dos Haplótipos

A análise dos haplótipos do gene do fator IX foi realizada para possibilitar a identificação da portadora da alteração molecular nas famílias dos pacientes estudados e para a determinação da origem de cada uma das mutações. A partir da identificação dos diferentes sítios polimórficos do gene do fator IX é possível determinar se alterações moleculares idênticas foram originadas em eventos independentes ou apresentam uma origem ancestral comum. Se dois ou mais pacientes são portadores de uma mesma alteração molecular e seus genes apresentam haplótipos idênticos considera-se que mutação tenha ocorrido em um evento único. Por outro lado, se as mutações iguais forem observadas em genes com haplótipos diferentes, considera-se que as mutações foram originadas em eventos independentes.

Determinação dos Haplótipos

A análise dos sítios polimórficos *Bam* *HI*, *Mnl* *I*, VNTR *Dde* *I* e *Hha* *I* dos 29 pacientes hemofílicos B (**Figura 14**) permitiu a determinação de nove haplótipos diferentes (**Tabela IV**). Os pacientes HB15, HB22 e HB23 com a mesma alteração molecular na posição 30.864 apresentaram o mesmo haplótipo do tipo 5. Os pacientes originários do Estado do Pará HB36, HB39, HB45 e HB46 com a mutação na posição 31.008 apresentaram o mesmo haplótipo do tipo 3, enquanto que o paciente HB43 portador da mesma mutação, apresentou um haplótipo do tipo 5, diferente dos demais. Finalmente, os pacientes HB6 e HB9 com alteração nucleotídica na posição 31.163 apresentaram o mesmo haplótipo do tipo 1 diferente do paciente HB11 no qual foi observada uma mutação idêntica, mas haplótipo do tipo 6. A identificação de uma mesma mutação em haplótipos diferentes indica que estas alterações moleculares se originaram em eventos independentes. Assim sendo, as alterações nucleotídicas observadas nos 29 pacientes hemofílicos B desta amostra representam 24 eventos mutacionais de origem independente.

A análise do sítio polimórfico VNTR *Dde* *I* (IA:RY(i)) dos 29 pacientes hemofílicos B permitiu a identificação de quatro diferentes alelos: AB, A₂B₂, A₃B e um variante de AB (**Figura 15**), em que A = (GT)(AC)₃(AT)₃(GT)(AT)₄ e B = A com um dinucleotídeo 3' AT adicional (Jacobson *et al.*, 1993). O alelo AB, com tamanho de 319 pb, apresentou maior frequência na amostra estudada (83%), seguido do alelo A₂B₂ de 369 pb (14%), de acordo com o observado em estudos anteriores (Figueiredo *et al.*, 1994). O alelo incomum A₃B, com 367 pb, foi identificado no paciente HB47, através do seqüenciamento direto do fragmento de PCR, uma vez que a corrida eletroforética em gel de agarose é ineficaz na diferenciação deste alelo do A₂B₂ com apenas 2 pb a mais. Um variante do alelo AB, não descrito anteriormente, foi identificado nos pacientes HB6 e HB9 e é caracterizado pela deleção de 12 pb a montante da região das seqüências repetidas A e B do íntron 1 do gene do fator IX.

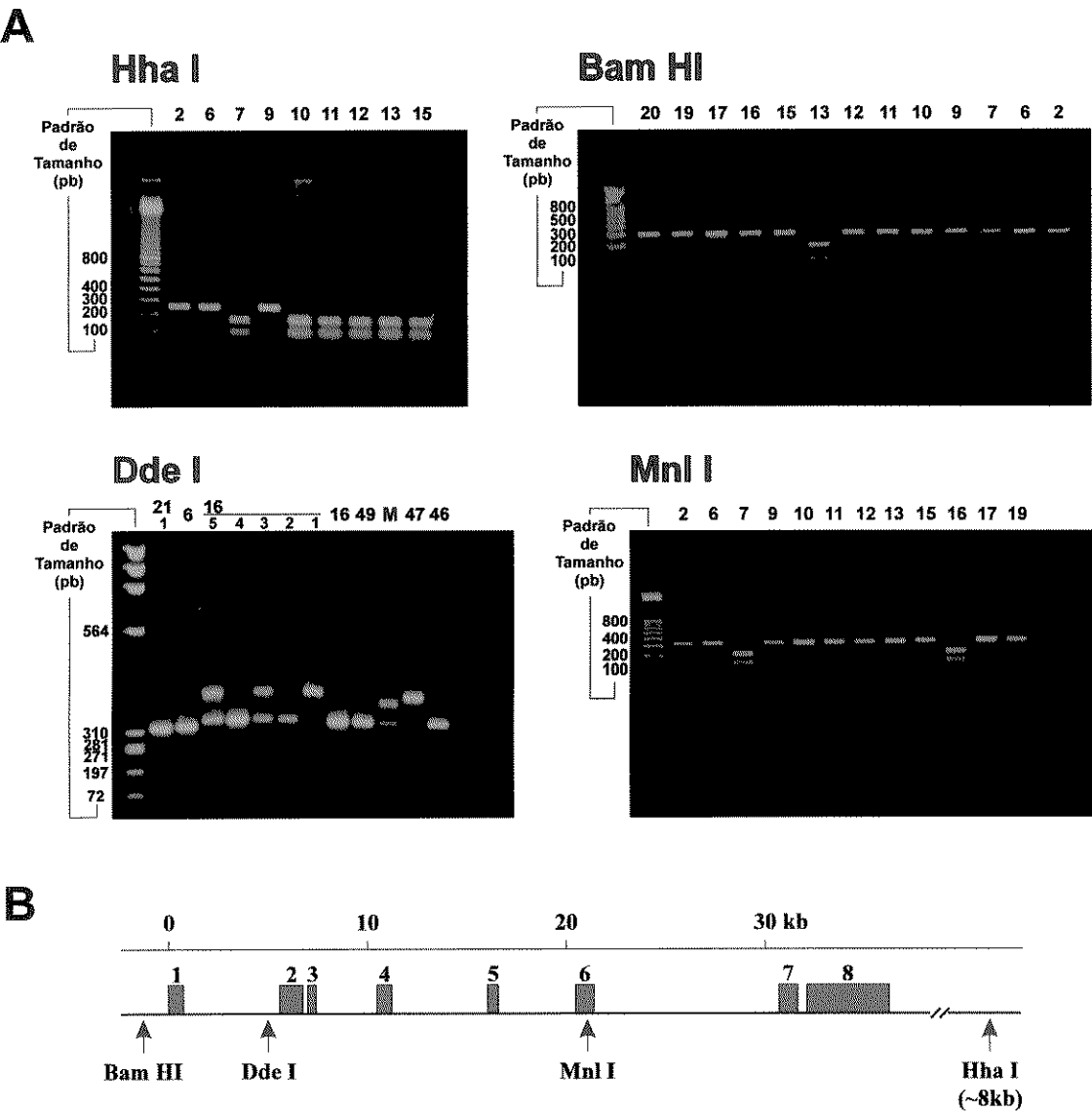


Figura 14: Análise dos Sítios Polimórficos do Gene do Fator IX para Determinação dos Haplótipos

A) Géis de agarose 2% corados com brometo de etídio para análise dos sítios polimórficos *Bam HI*, *Dde I*, *Mnl I* e *Hha I*. Acima à esquerda, análise do sítio *Hha I* situado a 3' do gene do fator IX. Os fragmentos de PCR de 230 pb dos pacientes HB2, HB6, HB7, HB9, HB10, HB11, HB12, HB13 e HB15 foram submetidos à digestão com a enzima *Hha I* para determinação da presença ou ausência do sítio de restrição. Acima à direita, análise do polimorfismo *Bam HI* situado na região 5' do gene do fator IX. Os fragmentos de PCR de 289 pb dos pacientes HB20, HB19, HB17, HB16, HB15, HB13, HB12, HB11, HB10, HB9, HB7, HB6 e HB2 foram submetidos à digestão com a enzima *Bam HI* para determinação da presença ou ausência do sítio de restrição. Abaixo à esquerda, análise do polimorfismo VNTR *Dde I* (IA:RY(i)) situado no íntron I do gene do fator IX. Os fragmentos de PCR de HB21-1, HB6, HB16-5, HB16-4, HB16-3, HB16-2, HB16-1, HB16, HB49, HB47 e HB46 apresentaram tamanho variado de 319, 367 e 369 pb. A canaleta indicada com a letra M (marcador) é uma mistura de produtos de PCR de tamanhos 310, 328 e 346pb. Abaixo à direita, análise do polimorfismo *Mnl I* situado no exon 6 do gene do fator IX. Os fragmentos de PCR de 328 pb dos pacientes HB2, HB6, HB7, HB9, HB10, HB11, HB12, HB13, HB15, HB16, HB17 e HB19 foram submetidos à digestão com a enzima *Mnl I* para determinação da presença ou ausência do sítio de restrição. B) Esquema do gene do fator IX indicando os oito exons e a posição dos sítios de restrição das enzimas *Bam HI*, *Dde I*, *Mnl I* e *Hha I*.

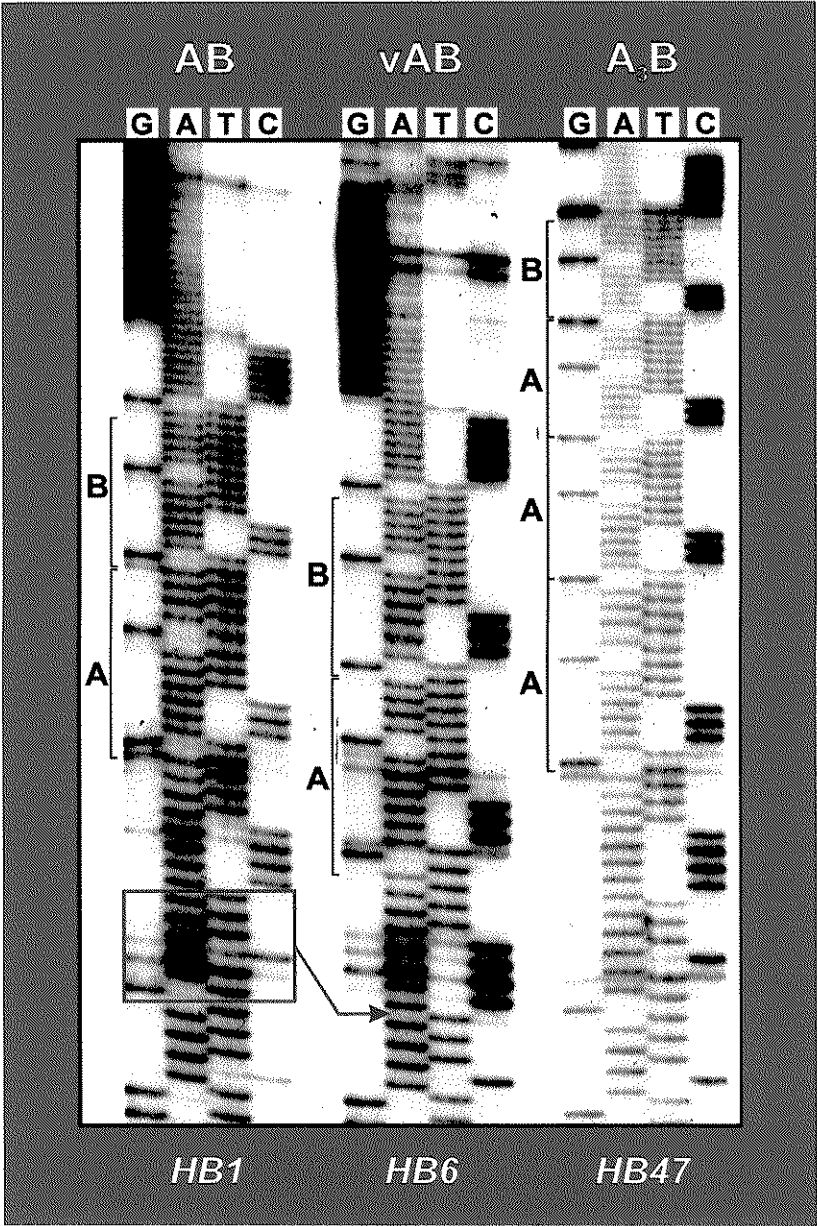


Figura 15: Seqüenciamento dos Diferentes Alelos Dde I (IA:RY(i))

Parte das auto-radiografias do seqüenciamento direto dos fragmentos de DNA da região polimórfica do íntron 1 (Dde I ou IA:RY(i)) do gene do fator IX dos pacientes HB1, HB6 e HB47 (da esquerda para a direita). O seqüenciamento revelou três alelos distintos, denominados AB, vAB e A₃B de tamanho 319 pb, 307 pb e 367 pb, respectivamente, em que A = GT(AC)₃(AT)₃GT(AT)₄ e B = GT(AC)₃(AT)₃GT(AT)₅. O paciente HB6 apresentou um alelo Dde I semelhante ao alelo AB mas caracterizado por uma deleção de 12 pb (seqüência indicada no quadrado vermelho) a montante da região das repetições A e B. Este variante (vAB) não havia sido descrito anteriormente.

Tabela IV: Análise dos Haplótipos

Haplótipo #	Polimorfismos			
	<i>Mnl I</i>	<i>Hha I</i>	<i>Bam HI</i>	IA:RY(i) ^a
1	-	-	-	AB-12pb (vAB)
2	-	-	-	AB
3	-	-	+	AB
4	-	-	+	A ₃ B
5	-	+	-	AB
6	-	+	-	A ₂ B ₂
7	-	+	+	AB
8	+	-	-	AB
9	+	+	-	AB

^aA = (GT)(AC)₃(AT)₃(GT)(AT)₄ e B = (GT)(AC)₃(AT)₃(GT)(AT)₄ (AT)

Mutações “Missense” em Sítios Conservados

São definidos quatro níveis de conservação de resíduos a partir da comparação das seqüências do fator IX de diferentes espécies de mamíferos e das serina proteases relacionadas (fator VII, fator X e proteína C) de bovinos e humanos (Bottema *et al.*,1991). Um resíduo é classificado como genérico (G) se for idêntico no fator IX de todas as espécies e for também idêntico nas três proteases da coagulação sangüínea. Um resíduo é considerado específico de fator IX (S) se ele for idêntico no fator IX de todas as espécies mas não idêntico em qualquer das serina proteases relacionadas. O resíduo é denominado parcialmente genérico se ele for idêntico no fator IX de todas as espécies e idêntico em uma ou duas das serina proteases. Se um resíduo é substituído no fator IX de qualquer uma das espécies analisadas ele é classificado como não-conservado.

Um resíduo pode ser substituído de maneira conservada no fator IX das diferentes espécies. As substituições consideradas altamente conservativas são: Ser/Thr, Ser/Ala, Tyr/Phe, Arg/Lys, Ile/Leu/Val, Asn/Asp, Asp/Glu, Gln/Asn e Glu/Gln

(Bottema *et al.*,1991). A classificação dos resíduos de aminoácidos do fator IX nos grupos definidos como genérico, parcialmente genérico, específico e não-conservado foi modificada para permitir as substituições consideradas altamente conservativas.

Os alinhamentos das seqüências do fator IX de diferentes espécies e das seqüências dos fatores IX, VII, X, e proteína C indica que a maioria das mutações identificadas nos Caucasóides surgem em resíduos conservados evolutivamente.

A análise dos 29 pacientes hemofílicos B brasileiros mostra que todas as mutações identificadas correspondem a alterações em resíduos de aminoácidos conservados. Das 18 mutações “missense” de origem independente, 11 (61%) ocorrem em resíduos de aminoácidos genéricos (G), 2 (11%) ocorrem em resíduos parcialmente genéricos (PG) e 5 (28%) ocorrem em resíduos especificamente conservados no fator IX mas não nas serina proteases relacionadas (S). Nenhuma mutação “missense” foi identificada em sítios não conservados.

Análise dos Sítios CpG

As mutações de ponto foram divididas segundo sua ocorrência em sítios denominados CpG, considerados pontos de maior probabilidade de ocorrência de transições C→T ou G→A. Nesta análise foram consideradas todas as mutações resultantes de eventos independentes, excluindo a alteração neutra identificada no paciente HB31, na posição 31.093. A partir da análise dos sítios polimórficos do gene do fator IX foi possível determinar a origem independente de 24 alterações moleculares das 30 mutações identificadas neste estudo.

O padrão das mutações independentes identificadas nos pacientes analisados neste estudo foi comparada com amostras definidas previamente em hemofílicos B dos Estados Unidos (Gostout *et al.*,1993; Sommer e Ketterling, 1994) e mexicanos de origem hispânica (Thorland *et al.*,1995) (**Tabelas V e VI**). Transições e transversões em sítios CpG foram analisadas separadamente porque estas mutações são causadas por diferentes mecanismos mutacionais e ocorrem em elevadas taxas se comparadas a transições e transversões em sítios não-CpG (Bottema *et al.*,1993; Ketterling *et al.*,1994).

Neste estudo foram identificadas 9 (36%) mutações (transições e transversões) em sítios CpG. As 16 alterações moleculares restantes (64%) localizam-se em sítios não-CpG. As transições A:G e C:T em sítios CpG ou não corresponderam a 75% do número total das mutações identificadas, confirmando os valores obtidos da análise das amostras de Caucasóides americanos e mexicanos de origem hispânica (Tabela V).

Tabela V: Mutações Independentes em Linhagens de Células Germinativas

	Brasileira ^a n=24	E.U.A.Caucasóides ^b n=127	Mexicana ^c n=32	E.U.A. ^d n=203
Transição em sítio CpG	8 (33,3%)	35 (28%)	11 (34%)	54 (27%)
Transição em sítio não CpG	9 (37,5%)	40 (31%)	9 (28%)	72 (35%)
Transversão em sítio CpG	1 (4,2%)	6 (5%)	1 (3%)	8 (3,9%)
Transversão em sítio não CpG	6 (25%)	26 (20%)	5 (16%)	41 (20%)

^a Padrão de mutações observado neste estudo
^b Padrão de mutações em Caucasóides dos E.U.A. descrito por Gostout *et al.* (1993)
^c Padrão de mutações em Hispânicos do México descrito porThorland *et al.* (1995)
^d Padrão de mutações em hemofílicos B dos E.U.A. descrito por Sommer e Ketterling (1994)

Tabela VI: Comparação do Padrão de Mutações Independentes entre Diferentes Populações

	Brasileira X Caucasóide	Brasileira X Mexicana	Brasileira X E.U.A
Transição em sítio CpG	$X^2_{(1)}=0,30$ $p=0,56$	$X^2_{(1)}=0,01$ $p=0.93$	$X^2_{(1)}=0,49$ $p=0,48$
Transição em sítio não-CpG	$X^2_{(1)}=0,33$ $p=0,56$	$X^2_{(1)}=1,83$ $p=0,176$	$X^2_{(1)}=0,04$ $p=0,84$
Transversão em sítio CpG	$p=0,69^*$	$p=0,67^*$	$p=0,64^*$
Transversão em sítio não-CpG	$X^2_{(1)}=0,25$ $p=0,618$	$p=0,29^*$	$p=0,37^*$

Teste do Qui-quadrado

*Teste exato de Fisher

Determinação das Portadoras do Gene Ligado à Hemofilia

Foi realizada a análise de haplótipos para detecção de portadoras da família dos pacientes HB6 e HB21 (**Tabela VII**) e da família do paciente HB16 (**Tabela VIII**)

Da família do paciente HB6 foram estudados mais três hemofílicos catalogados como HB21, HB21-1 e HB21-7. Todos apresentaram o mesmo haplótipo - / - / vAB / - para os sítios polimórficos *Mnl I*, *Hha I*, IA:RY(i) e *Bam HI* respectivamente. Este haplótipo caracteriza o alelo defectivo ligado à hemofilia B nesta família. Como era esperado, a mãe do hemofílico HB21 e irmã dos hemofílicos HB21-1 e HB21-7, referida como HB21-5, é portadora do alelo defectivo com haplótipo - / - / vAB / - e apresenta um segundo alelo normal com haplótipo + / + / AB / - para os mesmos sítios polimórficos. O pai (HB21-6) do paciente HB21, por sua vez, apresenta um alelo normal com haplótipo + / - / AB / - distinto dos demais.

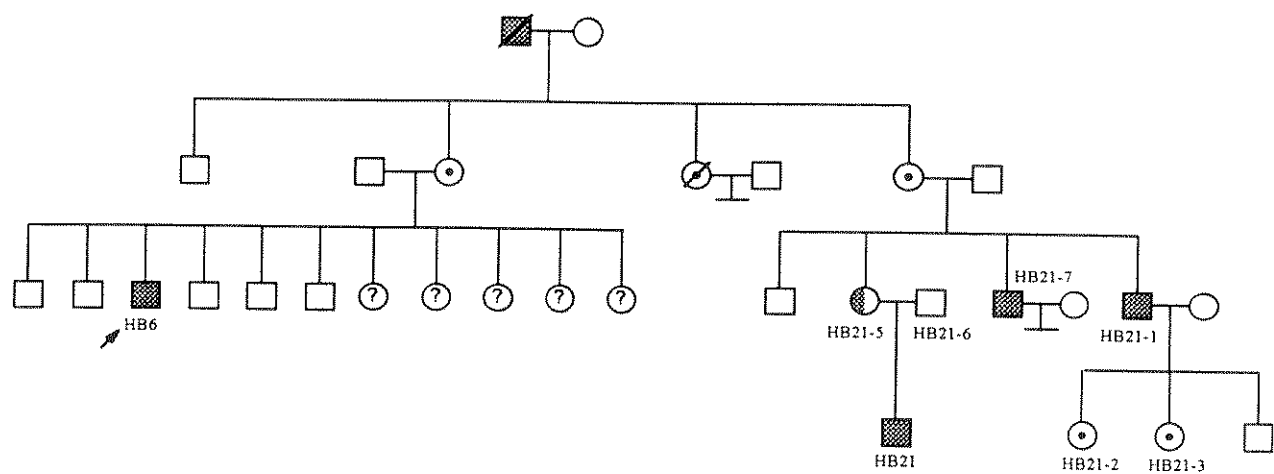
As filhas do hemofílico 21-1 (HB21-2 e HB21-3) também foram estudadas e uma vez que um de seus cromossomos X é proveniente do pai, ambas serão necessariamente portadoras do gene anômalo responsável pela doença, o que pode ser confirmado pela detecção do haplótipo - / - / vAB / -. O outro alelo, proveniente da

mãe HB21-4, apresenta haplótipo + / - / AB / - e não apresenta anormalidades. Nesta família não foi analisada nenhuma portadora potencial do alelo anômalo do gene do fator IX.

A análise dos sítios polimórficos *Mnl I*, *Hha I*, *IA:RY(i)* e *Bam HI* do paciente hemofílico HB16 produziu o haplótipo + / - / AB / - , correspondente ao alelo defectivo responsável pela hemofilia B. O haplótipo da mãe (HB16-2) foi determinado e conforme o esperado foram detectados dois alelos distintos: + / - / AB / - referente ao alelo anômalo e - / + / AB / - referente ao alelo normal. O haplótipo do pai (HB16-1) também foi determinado (- / + / A₂B₂ / -), apresentando-se distinto dos demais.

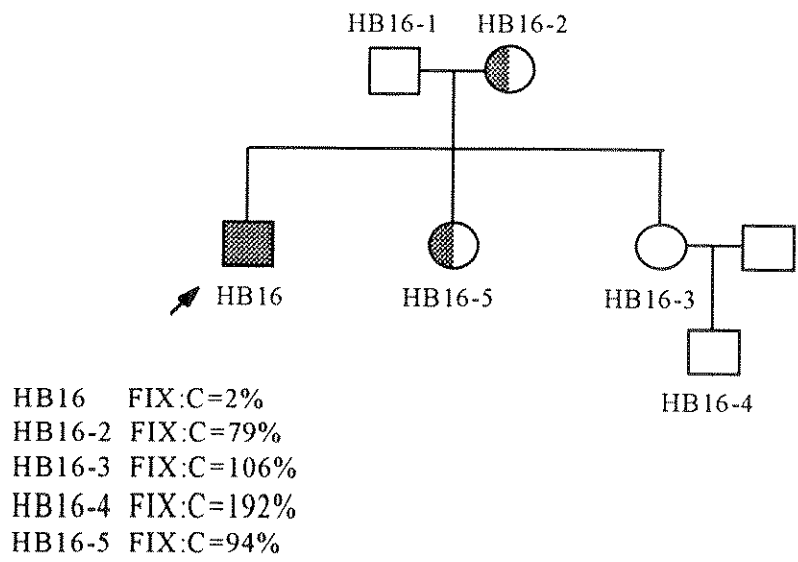
Duas possíveis portadoras do alelo afetado foram analisadas. Ambas são irmãs do paciente HB16 e foram catalogadas como HB16-3 e HB16-5. A análise dos quatro dimorfismos dialélicos de HB16-3 revelou a presença dos alelos com haplótipos - / + / A₂B₂ / - proveniente do pai e + / + / AB / - diferente dos alelos identificados na mãe. O filho desta mulher, catalogado como HB16-4, não é hemofílico B e apresenta o alelo + / + / AB / - observado na mãe HB16-3. Por esta razão, é possível concluir que o alelo + / + / AB / - não está ligado ao gene afetado. Por outro lado, a análise de HB16-5 indicou a presença dos alelos com haplótipos - / + / A₂B₂ / - referente ao cromossomo X do pai e + / - / AB / - que identifica o alelo portador da alteração molecular. O seqüenciamento dos fragmentos correspondente ao exon 8 do gene do fator IX dos indivíduos desta família confirmam os resultados deduzidos da análise dos diferentes sítios polimórficos (**Figura 16**)

Tabela VII: Análise dos Haplótipos para Detecção da Portadora na Família do Paciente HB6



	Polimorfismos			
	<i>Mnl I</i>	<i>Hha I</i>	IA:RY(i)	<i>Bam HI</i>
Paciente HB 6	-	-	vAB	-
Paciente HB 21	-	-	vAB	-
Tio HB 21-1	-	-	vAB	-
Prima HB 21-2	+/-	-/-	vAB/AB	-/-
Prima HB 21-3	+/-	-/-	vAB/AB	-/-
Tia HB 21-4	+/+	-/-	AB/AB	-/-
Mãe HB 21-5	+/-	+/-	vAB/AB	-/-
Pai HB 21-6	+	-	AB	-
Tio 21-7	-	-	vAB	-

Tabela VIII: Análise dos Haplótipos para Detecção da Portadora na Família do Paciente HB16



	Polimorfismos			
	<i>Mnl I</i>	<i>Hha I</i>	IA:RY(ii)	<i>Bam HI</i>
Paciente HB 16	+	-	AB	-
Pai HB 16-1	-	+	A ₂ B ₂	-
Mãe HB 16-2	+/-	+/-	AB/AB	-/-
Irmã HB 16-3	+/-	+/+	AB/A ₂ B ₂	-/-
Sobrinho HB 16-4	+	+	AB	-
Irmã HB 16-5	+/-	+/-	AB/A ₂ B ₂	-/-

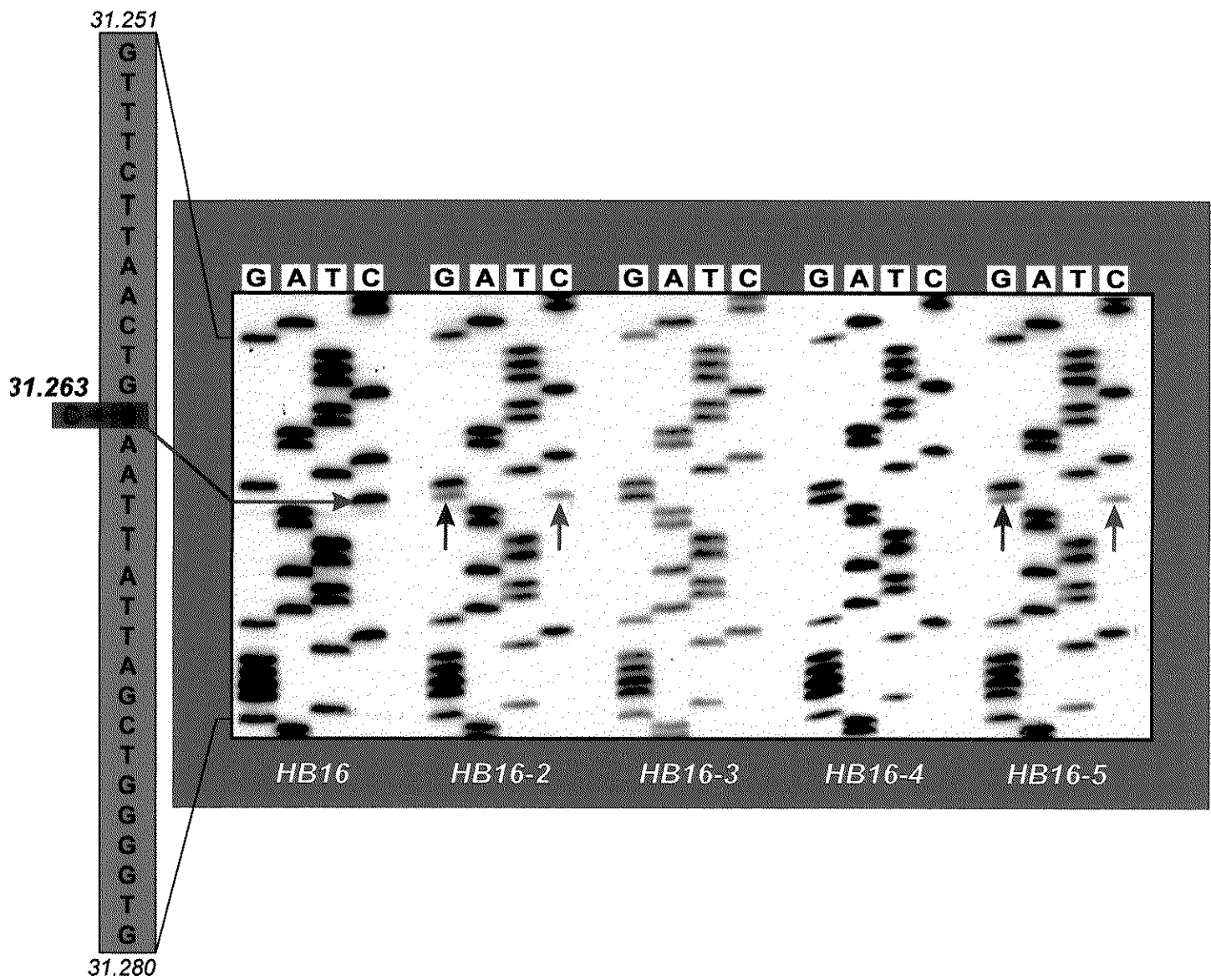


Figura 16: Seqüenciamento do Fragmento de PCR Correspondente ao Exon 8 para Determinação da Portadora da Alteração Molecular na Família do Hemofílico HB16

Parte da auto-radiografia do seqüenciamento dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 8 do paciente HB16 e sua família HB16-2 (mãe), HB16-3 (irmã), HB16-4 (sobrinho não-hemofílico) e HB16-5 (irmã). No paciente HB16 foi identificada a transversão G→C na posição 31.263, responsável pela substituição do resíduo de aminoácido Gly³⁸¹ para Ala (indicada com a seta vermelha). O seqüenciamento de HB16-2 e HB16-5 evidencia a presença de um alelo normal (setas azuis) e um alelo com a alteração molecular (setas vermelhas) caracterizando-as como portadoras da mutação responsável pela hemofilia B. Por sua vez, o seqüenciamento de HB16-3 e HB16-4 indica homozigose para o alelo normal.

DISCUSSÃO

Hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossomo X amplamente distribuída entre os diferentes grupos populacionais estudados. Seu tratamento é baseado fundamentalmente na reposição do fator IX coagulante obtido a partir do plasma humano, acarretando em um alto risco de transmissão de patógenos virais, particularmente os vírus das hepatites C e B (HCV e HBV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que contribuem para o aumento da morbidade da doença (Lozier e Brinkhous, 1994; Lusher, 1995). As técnicas de purificação do plasma por cromatografia com a utilização de anticorpos monoclonais, inativação por calor e tratamentos com detergentes virucidas produzem concentrados de fator IX que oferecem menores riscos de contaminação por agentes infecciosos ou de desenvolvimento de doenças tromboembólicas (Roberts e Eberst, 1993). O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante também tem provido uma série de “produtos sintéticos” para tratamento das hemofilias A e B. Entretanto, o alto custo da administração de concentrados de fator IX (puros ou sintéticos) para tratamento de hemofilia impede sua utilização em todos os casos da doença, de maneira que apenas uma pequena porcentagem (20%) dos pacientes hemofílicos tem acesso a tratamento adequado. No Brasil várias instituições utilizam apenas o plasma fresco congelado no tratamento dos pacientes com hemofilia B favorecendo a transmissão de doenças infecciosas, de maneira que a contaminação por HIV apresenta-se como a principal causa de morte de hemofílicos no país (Melo, 1989).

Por estas razões, o aconselhamento genético nos casos de hemofilia mostra-se como uma alternativa eficiente para o controle da doença na população. O aconselhamento genético de hemofilia B requer a detecção da portadora do gene do fator IX defectivo ou o diagnóstico pré-natal. O método que permite um diagnóstico preciso da portadora fundamenta-se na análise do DNA, através dos estudos de ligação de sítios polimórficos (RFLPs) ou da identificação da alteração molecular responsável pela doença.

Detecção da Portadora de Hemofilia B

A determinação dos haplótipos das famílias dos pacientes HB6 e HB16 foi realizada para a identificação ou exclusão das portadoras do gene ligado à hemofilia. A análise dos quatro polimorfismos dialélicos (*Bam* HI, *Hha* I, *Mnl* I e *Dde* I) mostrou-se informativa na família do paciente HB6 e permitiu a confirmação das portadoras obrigatórias HB21-2, HB21-3 e HB21-5. O paciente HB6 possui cinco irmãs potencialmente portadoras da mutação responsável pela hemofilia B nesta família. O estudo dos polimorfismos ou a análise direta da alteração molecular seriam de grande utilidade para a identificação ou exclusão das portadoras, possibilitando o aconselhamento genético.

No caso da família do paciente HB16, a irmã catalogada como HB16-3 apresentou um haplótipo diferente (+ / + / AB / -) daquele identificado nos alelos da mãe HB16-2 (+ / - / AB / - e - / + / AB / -). Tal observação pode ser explicada pela ocorrência de recombinação intragênica ou por não-paternidade. Neste caso, o diagnóstico da portadora pela análise de haplótipos fica impossibilitada, evidenciando a necessidade da identificação da alteração molecular para a determinação precisa da portadora e diagnóstico pré-natal em alguns casos de hemofilia B. Como HB16-3 possui um filho HB16-4 com atividade coagulante do fator IX normal e haplótipo + / + / AB / -, é possível concluir que este haplótipo não apresenta-se ligado à alteração molecular responsável pela hemofilia B. Baseado nesta observação é possível supor que HB16-3 não seria portadora do alelo defectivo do gene do fator IX. Neste caso, o nascimento e a análise dos sítios polimórficos do filho HB16-4 foram essenciais para a exclusão da portadora, desviando dos objetivos de prevenção por aconselhamento genético.

Análise de SSCP Não-Radioativo e Radioativo

A técnica de PCR-SSCP não-radioativo para o rastreamento das alterações moleculares no gene do fator IX de pacientes com hemofilia B permitiu a detecção de um padrão anormal de corrida eletroforética em 90% dos pacientes analisados neste

estudo. Os pacientes que não apresentaram padrão de migração anormal na análise de SSCP não-radioativo foram submetidos à análise de SSCP radioativo, que permitiu a localização das alterações moleculares nestes casos.

Embora a análise de SSCP radioativo tenha se mostrado mais eficaz na detecção de alterações moleculares, este método apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, a análise de SSCP radioativo em gel de poliacrilamida requer uma corrida eletroforética a baixas voltagens para evitar o aquecimento responsável por alterações conformacionais nos fragmentos de DNA estudados. Isto faz com que esta técnica demande um tempo maior para a sua execução. Para obtenção de resultados consistentes faz-se necessário o controle preciso da temperatura do gel durante a eletroforese, o que é dificultado pelas grandes dimensões dos géis utilizados nesta análise. Além disto, a necessidade da autoradiografia para visualização dos resultados (que pode exigir múltiplas exposições) implica em um tempo adicional para a obtenção de uma imagem clara do padrão de migração eletroforética (Hongyo *et al.*, 1993). Por fim, o requerimento de isótopos radioativos restringe a utilização desta metodologia aos centros nos quais este material encontra-se disponível.

Apesar das dificuldades relacionadas acima, a técnica de SSCP radioativo foi e ainda é utilizada para o rastreamento de mutações e análise de sítios polimórficos no gene do fator IX em diferentes amostras populacionais (Fraser *et al.*, 1992; David *et al.*, 1993; Lin e Shen, 1993; Poon *et al.*, 1993) e apresenta-se eficiente em 80% (David *et al.*, 1993) a 96% (Poon *et al.*, 1993) dos casos analisados. Este método também vem sendo utilizado na detecção de mutações no gene do fator VIII e outras anormalidades genéticas.

Por outro lado, a técnica de SSCP não-radioativo, em sistema automático ou não, elimina os problemas apontados na análise de SSCP radioativo. A análise de SSCP de fragmentos de PCR não-radioativos não se limita à disponibilidade dos isótopos e apresenta-se como um método rápido e eficaz na detecção de alterações moleculares responsáveis por diferentes doenças. Além disto, esta análise requer géis de poliacrilamida de pequenas dimensões, que facilitam o controle das condições da corrida eletroforética.

Deste modo, uma boa estratégia para o rastreamento de mutações no gene do fator IX pode se constituir da análise de SSCP não-radioativo para detecção da maioria das alterações moleculares nos pacientes hemofílicos B, seguida da análise de SSCP radioativo nos casos que permanecerem indeterminados.

Deteção das Mutações nos 29 Pacientes Hemofílicos B

Além de possibilitar a identificação de portadoras e o diagnóstico pré-natal, a identificação de mutações relacionadas com os casos de hemofilia B é importante no sentido de definir as regiões do fator IX que são essenciais para a manutenção de sua estrutura e função. Inicialmente, várias metodologias foram empregadas para a detecção de mutações no gene do fator IX, tais como a análise de "Southern blot" para determinação de grandes deleções ou alterações de sítios de restrição para endonucleases (Giannelli *et al.*, 1983) e a clonagem e seqüenciamento do gene afetado (Rees *et al.*, 1985). Estes métodos apresentam baixa sensibilidade e exigem muito tempo para a obtenção de resultados e aquisição da informação disponível na população altamente heterogênea de mutações no gene do fator IX (Green *et al.*, 1989). A análise de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) também é utilizada no diagnóstico da portadora e, conforme discutido anteriormente, apresenta limitações na determinação da portadora e diagnóstico pré-natal. A identificação da mutação por seqüenciamento de fragmentos de amplificação do DNA genômico apresenta-se como a estratégia mais eficiente na determinação da portadora (Green *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 1991). Mais recentemente, foram desenvolvidas técnicas para o rastreamento de alterações nucleotídicas em seqüências de DNA baseadas na combinação da técnica de amplificação de segmentos de DNA (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) com técnicas de análise de estrutura secundária de fragmentos de DNA, como o DGGE ("Denaturing Gradient Gel Electrophoresis"), o SSCP ("Single Strand Conformation Polymorphism"), clivagem química de pareamentos imperfeitos e análise de formação heteroduplex (Grompe, 1993; Thompson e Chen, 1993; Chen *et al.*, 1995).

Neste estudo foi demonstrada a utilidade do emprego da técnica de SSCP não-radioativo e radioativo no rastreamento de mutações em pacientes com

hemofilia B. O método se mostrou eficiente na detecção de alterações nucleotídicas nos fragmentos de DNA correspondentes às regiões de importância funcional no gene do fator IX. A análise de SSCP não-radioativo de produtos de PCR dos oito exons, sítios de excisão de íntrons e suposta região promotora dos 29 pacientes permitiu a identificação do padrão de corrida eletroforética anormal de um fragmento de DNA em cada um de 25 pacientes. A análise de SSCP radioativo possibilitou a observação de padrão de migração anormal em 5 fragmentos que não haviam sido detectados pela técnica não-radiativa. Este resultado indica que a técnica de SSCP a partir de PCR marcado radioativamente apresenta-se eficaz no rastreamento dos fragmentos de DNA com alteração da sequência nucleotídica. Por outro lado, a técnica de SSCP não-radioativo em sistema de eletroforese automático *Phastsystem® Pharmacia* produz resultados reprodutíveis em um curto período de tempo (cerca de 2 horas) possibilitando um rastreamento rápido de vários fragmentos de DNA. Além disto, esta técnica dispensa o uso de isótopos radioativos e requer apenas a coloração com nitrato de prata para visualização dos fragmentos, o que representa uma vantagem na sua utilização.

O seqüenciamento dos 31 fragmentos com padrão anormal de migração eletroforética permitiu a identificação de 31 mutações de ponto nos 29 pacientes estudados nesta amostra. O paciente HB31 mostrou-se portador de três alterações nucleotídicas, uma das quais silenciosa.

As mutações nos sítios de excisão de íntrons que alteram a fase de leitura do gene, bem como as mutações "nonsense" que resultam em proteínas truncadas, são claramente alterações moleculares que geram distúrbios de função no fator IX e levam ao aparecimento do quadro clínico que caracteriza a hemofilia B. Por sua vez, é possível supor que as mutações "missense" identificadas neste trabalho estão relacionadas com o aparecimento da doença uma vez que: 1) não foram detectadas outras alterações de sequência nas regiões de provável significância funcional nos 29 pacientes analisados, 2) há uma baixa frequência de polimorfismos nas regiões seqüenciadas (Koeberl *et al.*, 1989), e 3) as mutações "missense" identificadas neste estudo ocorrem em sítios conservados evolutivamente (Bottema *et al.*, 1991).

Mutações nos Diferentes Domínios do Fator IX

Mutações “nonsense”

Nos pacientes HB1, HB35 (Figura 9) e HB12 foram identificadas transições C→T nos códons CGA de arginina nas posições Arg²⁹, Arg²⁴⁸ e Arg³³³ que dão origem ao códon de terminação de tradução TGA. Nestes casos, o processo de tradução é interrompido nos novos sítios de terminação, resultando na síntese de proteínas truncadas que podem ser secretadas ou degradadas em função da estabilidade do fragmento do fator IX gerado. As mudanças na sequência nucleotídica do gene que levam à formação de um códon de terminação são conhecidas como mutações “nonsense”. Muitas das mutações “nonsense” identificadas no gene do fator IX envolvem as alterações nos códons CGA de arginina, levando ao aparecimento de códons de terminação precoce TGA (Broze e Miletich, 1987). As mutações “nonsense” identificadas nos três pacientes já haviam sido descritas em vários trabalhos anteriores (Arg²⁹ - 34 casos, Arg²⁴⁸ - 31 casos e Arg³³³ - 23 casos) (Giannelli *et al.*, 1996) o que pode ser explicado pelo fato de que as mesmas são observadas em dinucleotídeos CpG que correspondem a sítios sujeitos à alta frequência de transições e transversões no gene do fator IX (Cooper e Krawczak, 1996). Nos três pacientes a atividade coagulante do fator IX plasmático apresentou-se muito reduzida (<1%, <1% e 1,6%, respectivamente), como o observado em todos os casos de mutações “nonsense” identificadas no gene do fator IX.

Mutações afetando sítios de excisão de íntrons

As sequências consenso do sítio de excisão de íntrons são 1) “donor splice junction” AGgtaagt e 2) “acceptor splice junction” y_n ≥ ₁₁xagG, onde y representa pirimidinas e x indica um nucleotídeo qualquer (Mount, 1982). As letras maiúsculas indicam a sequência no exon e as letras minúsculas correspondem à sequência do íntron (Jacob e Gallinaro, 1989). Os nucleotídeos essencialmente invariáveis estão sublinhados.

As mutações de ponto nas posições 6.325 e 10.506 identificadas nos pacientes HB40 (**Figura 4**) e HB19 (**Figura 12**) respectivamente, afetam nucleotídeos essencialmente invariáveis que compõem os sítios de excisão dos íntrons 1 ("acceptor junction") e 4 ("donor junction"). Os dois pacientes apresentam quadro clínico de hemofilia B grave com atividade coagulante do fator IX (FIX:C) menor que 1% (**Tabela III**). Nenhuma outra alteração molecular foi detectada nas outras regiões de importância funcional do gene do fator IX nestes dois casos. Tais evidências sugerem que as alterações nucleotídicas observadas nos pacientes HB40 e HB19 estão relacionadas com a expressão da doença. A prova final da presença de defeitos no processo de excisão dos íntrons decorrentes da substituição dos nucleotídeos depende da análise do mRNA destes indivíduos. A transversão G→C na posição 6.325 já foi identificada previamente (Figueiredo, 1995) em um paciente hemofílico B do Brasil e outras mutações neste mesmo nucleotídeo foram caracterizadas e estão associadas à uma baixa atividade de fator IX (Giannelli *et al.*, 1996), reforçando as evidências de que esta transversão causa a deficiência da atividade coagulante do fator IX. A transição G→A na posição 10.506 não foi descrita previamente.

A mutação de ponto na posição 10.512 identificada no paciente HB31 afeta o sétimo nucleotídeo do íntron 4. Este nucleotídeo não faz parte da sequência consenso determinada, que inclui até o sexto nucleotídeo do íntron, e parece não ser a causa da hemofilia B, uma vez que outra mutação de ponto foi identificada no domínio catalítico do fator IX deste paciente (abaixo). Além disto, a transição A→G na posição 10.512 foi identificada em outros pacientes hemofílicos B, sempre em associação com uma segunda alteração molecular, fazendo com que os efeitos da substituição do nucleotídeo nesta posição permaneçam indeterminados (Giannelli *et al.*, 1996).

Mutação no peptídeo-sinal

A substituição do resíduo Cys⁻¹⁹ para tirosina no sítio de clivagem do peptídeo-sinal, decorrente da transição G→A na posição 112, foi identificada no paciente hemofílico B catalogado como HB32 (**Figura 11**). Esta alteração molecular não havia sido observada em estudos anteriores, embora tenham sido identificadas

substituições do resíduo Cys⁻¹⁹ por resíduos Arg e Trp, decorrentes de mutações nos nucleotídeos de posição 111 e 113, respectivamente. Além disto, estão descritas pequenas deleções nesta região, incluindo a deleção do nucleotídeo 112 que ocasionam erros de quadro de leitura e conseqüente deficiência na atividade do fator IX (Giannelli *et al.*,1996). A atividade do fator IX do paciente HB32 foi determinada e seu valor (4,8%) apresenta-se compatível com o quadro clínico observado de hemofilia B moderada/leve, sugerindo que a secreção do fator IX neste paciente não é completamente interrompida, a despeito da substituição do resíduo de cisteína no sítio de clivagem do peptídeo-sinal. As duas outras substituições descritas também foram identificadas em pacientes com quadro clínico e atividade de fator IX característicos de hemofilia B leve indicando que alterações neste resíduo não comprometem inteiramente a atividade coagulante do fator IX (Bottema *et al.*,1991; Giannelli *et al.*,1996).

Mutação nos domínios do tipo EGF

A alteração do resíduo de Asn na posição 47 para Gly no primeiro domínio do tipo EGF do fator IX, identificada no paciente HB17 (**Figuras 5 e 12**) no presente estudo, foi previamente caracterizada e à esta forma alterada da proteína foi atribuído o nome de Fator IX Alabama (Davis *et al.*,1987). Em ambos os casos, a alteração molecular resultou em um quadro clínico de hemofilia leve, com atividade coagulante do fator IX de 10% e 24% dos níveis normais. O primeiro domínio EGF do fator IX apresenta um sítio de alta afinidade por Ca⁺² constituído supostamente pelos resíduos Asp⁴⁷, Asp⁴⁹, Asp⁶⁴ β-hidroxilado e Asp⁶⁵ (Rees *et al.*,1988; Handford *et al.*,1990). Embora tenha sido demonstrada a existência deste sítio de ligação a íons cálcio, ainda permanece a questão acerca da função do domínio EGF-1 e de seu envolvimento com outras proteínas da coagulação (fatores XIa, X e VIIIa) e fosfolipídios. A análise bioquímica das proteínas variantes resultantes da alteração molecular no gene do fator IX possibilita o estudo e a determinação do papel dos diferentes resíduos de aminoácidos no desempenho das funções do fator IX. A análise do Fator IX Alabama sugere que o resíduo Asp⁴⁷ não representa um requerimento indispensável para a

ligação de Ca^{+2} no domínio EGF-1. Aparentemente a substituição deste resíduo por uma glicina elimina um importante sítio de coordenação de alterações conformacionais na molécula, impedindo a interação correta do fator IX com os fatores X e VIIIa (McCord *et al.*, 1990).

Mutação no peptídeo de ativação

As mutações de ponto identificadas nas posições 20.374 e 20.414 dos pacientes HB34 (**Figura 6**) e HB20 respectivamente, foram descritas anteriormente (Bertina e van der Linden, 1982; Suehiro *et al.*, 1989; Hamaguchi *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995) e levam à substituição dos resíduos Arg^{145} e Arg^{180} nos sítios de clivagem do domínio de ativação do fator IX. O peptídeo de ativação do fator IX é clivado pelo fator XIa e pelo complexo FVIIa/FT e a substituição dos resíduos Arg^{145} para Leu e Arg^{180} para Trp leva a um padrão anormal de clivagem e à deficiência da atividade coagulante do fator IX, característica da hemofilia B. Outra variante do fator IX foi identificada e caracterizada e apresenta substituição do resíduo Arg^{145} por His e é denominado Fator IX Chapel Hill. Este variante é clivado apenas na ligação $\text{Arg}^{180}\text{-Val}^{181}$, resultando na formação do fator IX α , um intermediário do processo de ativação (**Figura 3**) que apresenta apenas 20% da atividade coagulante do fator IXa (Braunstein *et al.*, 1981; Noyes *et al.*, 1983). De maneira semelhante, a substituição do resíduo Arg^{145} por Cys, leva a uma clivagem deficiente do peptídeo sinal no variante denominado Fator IX Cardiff (Liddell *et al.*, 1989). Assim sendo, a substituição Arg^{145} por Leu identificada no presente estudo deve prejudicar a clivagem do peptídeo de ativação e conseqüentemente deve ser responsável pela deficiência na atividade coagulante do fator IX verificada no paciente HB34.

A substituição do resíduo Arg^{180} por Trp, identificada no paciente HB20, é responsável pelo prolongamento do tempo de protrombina quando o exame é realizado com extrato de cérebro bovino como fonte de fator tecidual, que identifica os casos de hemofilia B do tipo B_M (Hougie e Twomey, 1967). Neste estudo não foi possível realizar o teste para confirmação do prolongamento do tempo de protrombina ocasionado pela substituição do resíduo de aminoácido.

A ativação do fator IX pelo fator XI e complexo FVIIa/FT requer a presença do resíduo Arg na posição 180 e a substituição deste aminoácido por Trp (Fator IX Deventer, Fator IX Nagoya 1 e 2) ou por Gln (Fator IX Novara e Fator IX Hilo) prejudica a clivagem do peptídeo de ativação neste sítio. Nestes variantes o produto da reação de ativação é equivalente ao fator IX α (clivagem da ligação Arg¹⁴⁵-Ala) que não apresenta atividade coagulante (Bertina e van der Linden, 1982; Monroe *et al.*, 1989). Este intermediário apresenta o peptídeo de ativação covalentemente ligado ao domínio catalítico, impedindo a exposição do sítio ativo do domínio serina protease e a formação do sítio de ligação do substrato (Bertina *et al.*, 1990).

Mutações no domínio catalítico

A alteração do resíduo Phe³¹⁴ para Ser no sítio catalítico do fator IX, identificada no paciente catalogado como HB2 (**Figura 8**) com hemofilia B leve, não consta do banco de dados das mutações do gene do fator IX descritas previamente (Giannelli *et al.*, 1996). Mudanças no resíduo Val³¹³ para Asn já foram identificadas e caracterizadas (Miyata *et al.*, 1994; Saad *et al.*, 1994) e estão associadas com hemofilia B do tipo B_M (Hougie e Twomey, 1967). A construção de um modelo estrutural do domínio serina protease do fator IXa possibilitou a idealização de uma hipótese que prevê que a substituição do resíduo Val³¹³ para Asp altera a conformação do sítio de reconhecimento e ligação do substrato ou do cofator. Segundo o modelo, os resíduos Arg³¹² até Ala³²⁰ formam um "loop" que se estende até regiões próximas ao sítio ativo do fator IX e são importantes para o reconhecimento macromolecular do substrato ou do cofator (Miyata *et al.*, 1994). A identificação da substituição Gly³¹¹ para Glu associada com hemiofilia B reforça a hipótese de que a manutenção da conformação do "loop" nesta região é importante para a expressão normal da atividade coagulante do fator IX (Miyata *et al.*, 1994).

Estas informações sugerem que uma alteração no resíduo Phe³¹⁴ de caráter hidrofóbico para Ser, um resíduo polar não carregado, poderia ser responsável por uma modificação estrutural no domínio catalítico da fator IXa, de maneira semelhante àquela observada nas substituições Val³¹³→Asp e Gly³¹¹→Glu. A caracterização da

deficiência funcional desta proteína mutante e análise conformacional seriam de grande relevância para a confirmação do modelo proposto.

Uma alteração equivalente à substituição do resíduo Gly³⁸¹ por Ala identificada no domínio catalítico do fator IX do paciente HB16 (**Figura 16**) foi observada em um caso de hemofilia B canina, no qual o resíduo Gly³⁷⁹ apresentou-se substituído por um resíduo Gln (Evans *et al.*, 1989). O aminoácido 379 do fator IX de cachorro corresponde à posição 381 em humanos. Este resíduo apresenta-se altamente conservado nos domínios catalíticos das serina proteases do tipo tripsina (fator IX humano, tripsina, elastase, quimotripsina, calicreína e protease A de *Streptomyces griseus*) e supõe-se que a substituição do mesmo poderia gerar alterações na estrutura terciária do domínio protease do fator IX (Evans *et al.*, 1989). Em humano esta alteração molecular não havia sido descrita em trabalhos anteriores (Giannelli *et al.*, 1996).

A substituição do resíduo Trp⁴⁰⁷ por Arg verificada no paciente HB26 foi identificada anteriormente em pacientes que também apresentavam quadro clínico grave de hemofilia B (Koeberl *et al.*, 1989; Bottema *et al.*, 1991). A mutação de ponto responsável por esta substituição nos casos descritos previamente foi localizada no nucleotídeo de posição 31.340, mas, diferente da alteração observada no presente estudo, caracterizou-se por uma transição T→C. O resíduo de Trp⁴⁰⁷ localiza-se na porção C-terminal da proteína em uma região que se apresenta altamente conservada no fator IX e outras serina proteases de diferentes espécies analisadas (Bottema *et al.*, 1991). Tal constatação sugere que esta região, particularmente entre os resíduos Asp³⁵⁹ e Trp⁴⁰⁷, desempenha papel importante na atividade coagulante do fator IX, evidência esta reforçada pela verificação de que a ocorrência de mutações nestes resíduos está associada com casos graves de hemofilia B.

No paciente HB31 foram identificadas três alterações moleculares. Dentre as mutações, apenas a transversão C→A na posição 31.223 afeta um resíduo de aminoácido conservado evolutivamente e classificado como genérico (Bottema *et al.*, 1991). Neste caso a alteração do nucleotídeo leva à substituição do resíduo Pro³⁶⁸ por Thr no sítio catalítico do fator IX. Esta mutação de ponto já havia sido identificada e caracterizada em trabalho anterior e resulta no prolongamento do tempo de trombina característico do subgrupo de hemofilia B grave denominado B_M (Bertina *et al.*, 1990). O resíduo Pro³⁶⁸ localiza-se próximo ao resíduo Ser³⁶⁵ que compõe o sítio ativo das serina proteases. A análise bioquímica do fator IX mutante indica que a deficiência na atividade catalítica é devida às modificações conformacionais do domínio protease ou no sítio de ligação do substrato (Bertina *et al.*, 1990). O tempo de protrombina do paciente HB31 apresenta-se prolongado (RNI=1,51) o que caracterizaria o subgrupo B_M, mas neste caso os exames não foram realizados com extrato de cérebro bovino como fonte de tromboplastina necessário para confirmação dos resultados obtidos com o extrato de cérebro humano.

A segunda mutação de ponto observada no paciente HB31 foi identificada no nucleotídeo 10.512 na posição +7 do sítio de excisão do íntron 4 ("donor splice"). Esta substituição foi descrita anteriormente sempre em associação com uma ou duas alterações moleculares no gene do fator IX (Giannelli *et al.*, 1996). Tal fato sugere que esta alteração caracteriza um variante raro ou sítio polimórfico de baixa frequência em detrimento da hipótese da ocorrência de mutações simultâneas (Bottema *et al.*, 1991). Entretanto, as transições A→G na posição 10.512 do gene do fator IX, identificadas em trabalhos anteriores, foram consideradas mutações de ponto (Giannelli *et al.*, 1996).

A terceira mudança de sequência foi localizada na posição 31.093 no terceiro nucleotídeo do códon Gln³²⁴. Neste caso, a transição G→A leva a formação do códon CAA que também especifica uma glutamina (mutação silenciosa). Esta alteração pode também representar um variante raro ou sítio polimórfico de baixa frequência no gene do fator IX ou uma mutação silenciosa no paciente HB31. O aparecimento de múltiplas alterações moleculares é comumente observado em células expostas a agentes

mutagênicos que agem na forquilha de replicação ou em células com um “pool” de anormalidades nucleotídicas (Koeberl *et al.*, 1989).

Padrão de Mutação na Amostra Analisada

Apesar da hemofilia B e do gene do fator IX apresentarem vários atributos que fazem com que seu estudo permita a construção de um modelo que explique o padrão das mutações recentes e espontâneas em linhagens de células germinativas, vários problemas são potencialmente decorrentes desta análise. Dentre estes problemas estão (Sommer, 1992): 1) metodologia para a detecção das mutações - a metodologia empregada para o rastreamento de mutações pode detectar preferencialmente alguns tipos de mutações, ou ainda, pode ser ineficaz na detecção de uma fração das mutações responsáveis pela doença, 2) localização das mutações - as regiões normalmente analisadas correspondem à sequência promotora, aos exons e sítios de processamento do RNA (“splice sites”). Assim sendo, a sequência do gene que não é estudada (correspondente aos íntrons) pode apresentar um padrão de mutações diferente daquele verificado nas demais regiões, 3) detecção da deficiência funcional - as únicas alterações moleculares identificadas são aquelas que levam a perdas de atividade da proteína. Deste modo, o tipo de alteração molecular que mais provavelmente levaria a uma deficiência na função da proteína estaria mais representado nas amostras analisadas, 4) Análise de amostras não-aleatórias - pacientes com hemofilia leve procuram assistência médica em uma frequência menor que aqueles com quadro clínico grave, 5) Fertilidade diferencial - apesar da disponibilidade de tratamento para a doença, os pacientes com hemofilia leve, moderada ou grave podem apresentar diferenças na fertilidade (Sommer, 1992; Sommer e Ketterling, 1994).

No presente estudo foi utilizada a técnica do PCR-SSCP seguida do seqüenciamento dos fragmentos de DNA para detecção das diferentes mutações nos pacientes com hemofilia B. Estas técnicas permitiram a identificação de mutações de ponto em sítios que desempenham papel importante para a atividade do fator IX em todos os pacientes analisados. Esta observação nos leva a crer que a técnica utilizada

neste estudo foi adequada para a detecção das mutações na amostra estudada e que a análise das regiões promotora, de excisão de íntrons e região codificadora foi suficiente para a determinação da alteração molecular responsável pela deficiência do fator IX neste indivíduos . Estudos anteriores determinaram que cerca de 95% dos pacientes com hemofilia B apresentam alterações moleculares nos 2,2 kb do gene do fator IX que incluem estas regiões (Sommer, 1992).

Mutações nos Sítios CpG

A partir da análise das 24 mutações identificadas na amostra de pacientes hemofílicos B identificadas neste estudo é possível concluir que o padrão de mutações determinado é similar àquele observado nos estudos das amostras de Caucásios dos Estados Unidos e mexicanos de origem espanhola. As transições são predominantes seguidas das transversões. Nenhum caso de deleção/inserção foi identificado. Como determinado anteriormente nas amostras de Caucásios (Koeberl *et al.*, 1989), os dinucleotídeos CpGs representam pontos sujeitos a alta frequência de transições sendo responsáveis por um terço das alterações moleculares identificadas no gene do fator IX.

Existem apenas 20 sítios CpG nos 1383 pares de base que constituem a sequência codificadora do gene do fator IX. Estes 20 dinucleotídeos CpG correspondem a um total de 40 possíveis sítios de transição C→T ou G→A (Green *et al.*, 1990). Na amostra analisada neste estudo foram identificadas 24 mutações de origem independente das quais 18 eram transições e 6 eram transversões. Das 18 transições identificadas, 8 foram localizadas em dinucleotídeos CpG e 10 foram determinadas nos demais dinucleotídeos (**Tabela V**). Estes dados indicam que, nesta amostra, as transições nos sítios CpG ocorrem em um excesso de 27 vezes em relação às transições em dinucleotídeos não-CpG (8 em 40 sítios CpG contra 10 em 1343 sítios não CpG). Estimativas do aumento da taxa de transição em sítio CpG obtidas a partir da análise de amostras de pacientes hemofílicos B de diferentes raças e localizações geográficas variam de 10 a 38 vezes (Green *et al.*, 1990; Koeberl *et al.*, 1990; Sommer, 1992). A transversão identificada em sítio CpG neste estudo

representa um aumento da taxa de transversão em dinucleotídeos CpG de 6,7 vezes em relação às transversões nos demais dinucleotídeos da região codificadora do gene do fator IX. Este valor mostra-se compatível com aquele obtido em análises anteriores nas quais a taxa relativa de transversões em CpG foi estimada em 7,7 vezes maior que a média de transversões em sítios não CpG (Bottema *et al.*, 1991).

A probabilidade de se detectar uma substituição de um único par de base nas regiões de importância funcional no gene do fator IX está muito relacionada com a deficiência funcional ocasionada pela alteração molecular. Em trabalho anterior (Green *et al.*, 1990) foi determinado que 9 sítios CpG localizados na região codificadora do gene do fator IX possivelmente ocupam posições críticas para o desempenho da atividade coagulante da proteína. Estes dinucleotídeos constituem códons Arg (CGN) e transições nestes sítios podem levar à substituição do resíduo de aminoácido ou formação do códon de terminação TGA, neste último caso com conseqüente produção de proteínas truncadas com atividade coagulante deficiente responsável por um quadro clínico de hemofilia B grave.

Das 8 transições em sítios CpG identificadas neste estudo, 5 levam à alteração dos resíduos Arg com a geração de códons de terminação em 3 casos e à substituição de aminoácidos nos 2 casos restantes (**Tabela III**). As alterações moleculares que afetam os códons arginina representam 20% de todas as mutações de ponto identificadas neste estudo. No fator IX a frequência esperada de mutações que afetam o códon arginina é de 24% do número total dos casos de hemofilia B (Koeberl *et al.*, 1990).

A comparação da seqüência do fator IX com os fatores X, VII e proteína C com suposta origem ancestral comum, mostra que apenas o fator IX apresenta alta proporção de dinucleotídeos CpG em posições críticas, indicando que estes podem ser resultado de pressão seletiva. A força da pressão seletiva é determinada pela probabilidade de uma mutação persistir na população e eventualmente tornar-se parte de uma seqüência funcional aceitável. As mutações no gene do fator IX estão sob forte seleção negativa pois estas substituições levam à deficiência do fator IX caracterizando a hemofilia B. Deste modo, os sítios CpGs localizados em posições

importantes do gene do fator IX parecem estar relativamente “fixos” (Green *et al.*, 1990).

Resíduos Espaçadores no Fator IX

Os fatores IX, X, VII e proteína C são proteínas do tipo serina proteases da coagulação sangüínea que apresentam domínios funcionais e arranjo gênico (exons e íntrons) idênticos (Furie e Furie, 1988). O alinhamento destas proteínas de diferentes espécies permite a definição de quatro classes de resíduos do fator IX com base na extensão da conservação evolucionária: 1) resíduos genéricos; 2) resíduos parcialmente genéricos; 3) resíduos específicos do fator IX e 4) resíduos não conservados (Bottema *et al.*, 1991).

A análise das 18 mutações “missense” de origem independente identificadas nos 29 pacientes hemofílicos B deste estudo mostra que todas as alterações nucleotídicas afetaram resíduos de aminoácidos conservados durante a evolução. A maioria das substituições encontradas ocorreram em resíduos genéricos (61%) e parcialmente genéricos (11%), e o restante foi observado nos resíduos classificados como específicos do fator IX (28%). Nenhuma mutação foi encontrada em sítios que afetam resíduos não conservados.

As alterações moleculares em resíduos conservados apenas no fator IX das diferentes espécies (S) identificadas neste estudo (Cys⁻¹⁹, Thr²⁹⁶, Arg¹⁴⁵ e Phe³¹⁴) parecem desempenhar um papel importante nas interações específicas do fator IX, tais como ligação ao fator VIII ou fator VII (Bottema *et al.*, 1991).

A maior frequência de mutações “missense” identificadas nos resíduos genéricos do fator IX pode ser explicada pelo fato de que estas alterações afetam sítios de grande importância funcional e que sempre são responsáveis por uma deficiência na atividade coagulante do fator IX. É possível supor que um resíduo que permaneça inalterado nos fatores IX, X, VII, e proteína C, a despeito do longo período de tempo evolucionário que os separam (divergência de 450-500 milhões de anos), seja absolutamente essencial para a função destas proteínas. Deste modo, as

substituições dos resíduos genéricos apresentam maior probabilidade de causarem hemofilia B. Mutações que levam à substituição de resíduos parcialmente genéricos são causas menos prováveis de hemofilia B (2 vezes menos), enquanto que mutações em resíduos não conservados são causas ainda menos prováveis (33 vezes menos), de maneira que estes últimos raramente estarão envolvidos com a doença (Bottema *et al.*, 1991).

As alterações “missense” nos resíduos específicos do fator IX também não são observadas em alta frequência nos vários casos de hemofilia B o que pode ser explicado pela hipótese de que apenas 15% dos resíduos desta classe são essenciais para o desempenho da atividade coagulante do fator IX. Nestes casos a substituição por outros resíduos de aminoácidos seria responsável pela deficiência do fator IX característica da hemofilia B, enquanto que substituição dos resíduos específicos do fator IX restantes (85%) não provocariam a doença (Bottema *et al.*, 1991).

Da análise dos resíduos genéricos, parcialmente genéricos, específicos e não conservados do fator IX é possível concluir que somente 40% de todas as mutações “missense” irão causar a doença, uma vez que apenas esta porcentagem dos aminoácidos são importantes para a função desta proteína da coagulação sanguínea.

Assim sendo, as mutações identificadas no fator IX não estarão distribuídas por todos os resíduos de maneira aleatória, mas sim em função da deficiência funcional provocada pela substituição dos resíduos de aminoácidos.

Processo Ambiental Versus Endógeno

Espera-se observar discrepância no padrão de mutação espontânea de duas populações não relacionadas quando estas encontram-se expostas a diferentes mutagênicos ambientais e/ou na ocorrência de diferenças genéticas que possam afetar o processo mutacional, tais como alterações nas enzimas de reparo de DNA. A similaridade no padrão de mutações é esperada se o processo mutacional fundamentar-se em eventos endógenos, caracterizados por um nível constante de

alterações moleculares nos diferentes indivíduos (erros na replicação ou reparo do DNA, mutação devido a radicais livres, despurinação, desaminação, recombinação e transposição), e/ou na presença de um mutagênico ubíquo como raios cósmicos, ou de diferentes mutagênicos que produzam um mesmo padrão mutacional (Thorland *et al.*, 1995).

O padrão de mutação no gene do fator IX determinado neste estudo é semelhante àquele observado nas populações mexicana e de Caucásios dos E.U.A (**Tabelas V e VI**) (Gostout *et al.*, 1993; Thorland *et al.*, 1995). O padrão mutacional uniforme nas diferentes populações (geográficas e raciais) sugere a predominância dos processos endógenos na determinação das mutações espontâneas nas células das linhagens germinativas, de acordo com o proposto em trabalhos anteriores (Bottema *et al.*, 1990; Koeberl *et al.*, 1990; Bottema *et al.*, 1991; Thorland *et al.*, 1995). A existência de um mutagênico onipresente ou de diferentes mutagênicos que originem um mesmo padrão de mutação não pode ser descartada, mas estas hipóteses parecem menos prováveis (os raios cósmicos de alta energia estão associados com uma maior frequência de deleções).

A hipótese da predominância dos processos endógenos na determinação do padrão de mutações do gene do fator IX é reforçada pela observação de que aproximadamente um terço das alterações moleculares identificadas no fator IX ocorrem em dinucleotídeos CpG que correspondem a conhecidos "hot spots" de transições (Koeberl *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1990; Koeberl *et al.*, 1990) e transversões (Bottema *et al.*, 1991) em genomas de vertebrados. A alta frequência de transições em sítios CpG pode ser ocasionada por agentes mutagênicos, tais como bissulfito, que aumenta a taxa de desaminação da 5'-metil-citosina (^{Me}C) (Koeberl *et al.*, 1990). Entretanto, a 5'-metil-citosina é instável e sofre o processo de desaminação espontânea em alta frequência dando origem à timina (Green *et al.*, 1990).

Além disto, a despeito das modificações ambientais que ocorreram ao longo dos anos, o padrão de mutações recentes parece compatível com o padrão mutacional ancestral que teria mantido em 40% o conteúdo de G + C e a distribuição não aleatória

na frequência dos diferentes dinucleotídeos observados no gene do fator IX em humanos (Bottema *et al.*, 1991).

Efeito do Fundador

O seqüenciamento direto dos fragmentos de DNA dos 29 pacientes hemofílicos B analisados no presente estudo permitiu a identificação de 30 alterações moleculares responsáveis pela deficiência na atividade do fator IX. Cinco pacientes (HB36, HB39, HB43, HB45 e HB46) apresentaram a transição C→T na base 31.008, que leva à substituição do resíduo Thr²⁹⁶ para Met (T²⁹⁶→M), no domínio catalítico do fator IX. A análise dos haplótipos destes cinco pacientes indica que quatro deles (HB36, HB39, HB45 e HB46) possivelmente apresentam uma origem ancestral comum uma vez que apresentam o mesmo padrão polimórfico do tipo 3 (**Tabela III**). O paciente HB43, por sua vez, apresenta haplótipo do tipo 5, distinto dos demais, sugerindo que a mutação neste caso tenha se originado em um evento independente do anterior. Embora a transição C→T na posição 31.008 ocorra em um sítio CpG, um "hot spot" de mutações os dados de haplótipos indicam que o efeito do fundador é um importante determinante para a alta frequência desta mutação na amostra analisada neste estudo. Os cinco pacientes nos quais foi identificada esta mutação são provenientes do Estado do Pará e possivelmente apresentam um ancestral comum.

A alteração nucleotídica que leva à troca da Thr²⁹⁶ para Met é comumente observada em hemofílicos B Caucásios dos Estados Unidos e Europa. A maioria dos pacientes analisados apresentam haplótipo idêntico, o que sugere que estes indivíduos aparentemente não-relacionados sejam descendentes de um ancestral comum (Ketterling *et al.*, 1991; Ketterling *et al.*, 1991). Em trabalho recente, foi demonstrado que os hemofílicos B mexicanos de origem hispânica também apresentam alta frequência desta mutação. A análise dos haplótipos indica que as múltiplas ocorrências desta transição estão associadas com um possível efeito do fundador (Thorland *et al.*, 1995).

A alteração nucleotídica de G→A na posição 30.864 que provoca a substituição do resíduo Arg²⁴⁸ para Gln no sítio catalítico do fator IX foi identificada em três

pacientes não relacionados (HB15, HB22 e HB23). Estes indivíduos apresentam um mesmo padrão de polimorfismos (tipo 5) evidenciando uma possível origem ancestral comum da mutação. A análise das amostras da população Caucasóide dos Estados Unidos e da população mexicana de origem hispânica revelou uma alta frequência da mutação $R^{248} \rightarrow Q$ que parece estar associada a um potencial efeito do fundador (Thorland *et al.*, 1995).

Por fim, a transição $A \rightarrow G$ na posição 31.163 com alteração do resíduo Met^{348} para Val, foi identificada nos pacientes HB6, HB9 e HB11. A análise dos dados de haplótipos destes pacientes revelou dois padrões polimórficos distintos (tipos 1 e 6) evidenciando a origem independente da mutação neste caso.

Desta forma, a análise das mutações recorrentes identificadas no presente estudo revela que as alterações $Thr^{296} \rightarrow Met$ e $Arg^{248} \rightarrow Gln$ correspondem a cerca de 25% do total das alterações moleculares determinadas na amostra e estão associadas a um possível efeito do fundador.

CONCLUSÕES

A análise de PCR-SSCP é eficiente no rastreamento de mutações nos diferentes domínios do gene do fator IX de pacientes com hemofilia B.

Nos 29 pacientes hemofílicos B não-relacionados analisados neste estudo foram identificadas 31 mutações de ponto, 22 delas diferentes, das quais 6 não haviam sido descritas anteriormente. As mutações de ponto foram identificadas em diferentes regiões do gene do fator IX, refletindo a heterogeneidade dos defeitos moleculares associados com hemofilia B.

A análise de haplótipos dos 29 pacientes hemofílicos B sugere que pelo menos 24 mutações de ponto foram originadas em eventos moleculares independentes.

A identificação de uma mesma alteração nucleotídica na posição 31.008 em cinco pacientes provenientes do Pará e a observação de que quatro destes pacientes apresentam o mesmo padrão de polimorfismos no gene do fator IX indicam a ocorrência de um possível efeito do fundador.

Os pacientes com hemofilia B brasileiros apresentaram padrão de mutações similar àquele observado nas demais populações analisadas até o presente momento. Estes dados reforçam a hipótese de que a maioria das alterações moleculares em células de linhagem germinativa são decorrentes principalmente de processos endógenos.

SUMMARY

Hemophilia B is a common hereditary bleeding disorder resulting from a deficiency of functional factor IX. The gene of factor IX spans about 33,5 kilobases and is situated on the distal portion of the long arm of X-chromosome at band Xq27.1. The gene is composed of eight exons and seven introns. Around 95% of mutations leading to hemophilia B occur in the 2,2 kilobases of the factor IX gene that included the promotor region, coding sequences, and splice junctions. Most are independent mutations. Point mutations account for about 85% of independent mutations. Deletions, insertions, and more complex gene rearrangements account for the remainder of the molecular mechanisms responsible for hemophilia B. The Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis is a rapid and sensitive technique that can be used to detect single base substitutions. Direct Sequencing of amplified genomic DNA defines the location and nature of any mutation and is a necessary final step of any detection method. The SSCP analysis followed by DNA sequencing allows accurated carrier detection and prenatal diagnosis, eliminating the need for informative segregation of markers.

Hemophilia B is a good model for deducing the underlying pattern of spontaneous germ-line mutation in humans. In addition, the study of naturally occurring mutations, combined with the study of genetically engineered mutant recombinant proteins, has yielded a wealth of information regarding structure-function relationships of factor IX.

The pattern of mutation is similar among Caucasians, Asians, and small groups of Blacks and Hispanics. The ethnic origin of Brazilian population is highly heterogeneous (imigrants from Europe, Africa, Asia and, also, Indigenous) and different from previous populations studied. In order to elucidate the genetic basis of a distinct population and to perform a precise carrier detection, we carried out a study of 29 patients with hemophilia B of Brazilian origin. The screening protocol consisted of amplification of coding and promoter regions of factor IX gene by PCR, followed by a radioactive and non-radioactive analysis of single-strand conformation polymorphisms (SSCP) on the *PhastSystem of Pharmacia*[®]. The confirmation of the molecular defect

was done by sequencing of the exon with abnormal electrophoretic mobility on SSCP. The results of SSCP revealed abnormal mobility in all 29 patients and 31 point mutations were determined by direct sequencing of DNA. Twenty-two different single base pairs were identified: fifteen in exon 8, three in exon 6, and two in exon 4. Six non previously described point mutation were identified. Three point mutations were found in patient HB31, one of them silent. Haplotype analysis determined that at least twenty-four point mutations could be considered of independent origin.

Our results shown that this methodology has the potential of detecting all genetic defects in patients of Brazilian origin with hemophilia B. A large number of recurrent mutations described here is in accordance with data from distinct patients from around world and suggest that the mutation in the factor IX gene is likely the result of endogenous process rather than enviromental mutagens.

BIBLIOGRAFIA

- Aggeler, P.M.; White, S.G.; Glendening, M.B.; Page, E.W. e Leake, T.B. (1952) Plasma Thromboplastin Component (PTC) Deficiency: A New Disease Resembling Haemophilia. *Proc Soc Exp Biol* **79**: 692.
- Astermark, J. e Stenflo, J. (1991) The Epidermal Growth Factor-like Domains of Factor IX. *J Biol Chem* **266**: 2438-2443.
- Bajaj, S.P.; Sabharwal, A.K.; Gorka, J. e Birktoft, J.J. (1992) Antibody-probed Conformational Transitions in the Protease Domain of Factor IX upon Calcium Binding and Zimogen Activation: Putative High-affinity Ca²⁺-binding site in the Protease Domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 152-156.
- Bauer, K.A.; Bryon, L.K.; ten Cate, H.; Hawiger, J.J. e Rosenberg, R.D. (1990) Factor IX Is Activated In Vivo by the Tissue Factor Mechanism. *Blood* **76**: 731-736.
- Bertina, R.M. e van der Linden, I.K. (1982) Factor IX Deventer - Evidence for the Heterogeneity of Hemophilia B_M. *Thromb Haemost* **47**: 136-140.
- Bertina, R.M.; van der Linden, I.K.; Mannucci, P.M.; Reinalda-Poot, H.H.; Cupers, R.; Poort, S.R. e Reitsma, P.H. (1990) Mutations in Hemophilia B_M Occur at the Arg¹⁸⁰-Val Activation or in the Catalytic Domain of Factor IX. *J Biol Chem* **265**: 10876-10883.
- Biggs, R.; Douglas, A.S.; MacFarlane, R.G.; Dacie, J.V.; Pitney, W.R.; Merskey, C. e O'Brien, L.M. (1952) Christmas Disease: a Condition Previously Mistaken for Haemophilia. *Br Med J* **2**: 1378.
- Birnstiel, M.L.; Busslinger, M. and Strub, K. (1985) Transcription Termination and 3' Processing: The End Is in Site! *Cell* **41**: 349-359.
- Bottema, C.D.K.; Bottema, M.J.; Ketterling, R.P.; Yoon, H.-S.; Janco, R.L.; Phillips III, J.A. e Sommer, S.S. (1991) Why Does the Human Factor IX Gene Have a G + C Content of 40%? *Am J Hum Gen* **49**: 839-850.
- Bottema, C.D.K.; Ketterling, R.P.; Li, S.; Yoon, H.-S.; Phillips III, J.A. e Sommer, S.S. (1991) Missense Mutations and Evolutionary Conservation of Amino Acids: Evidence That Many of the Amino Acids in Factor IX Function as "Spacer" Elements. *Am J Hum Gen* **49**: 820-838.
- Bottema, C.D.K.; Ketterling, R.P.; Vielhaber, E.; Yoon, H.-S.; Gostout, B.; Jacobson, D.P.; Shapiro, P.F. e Sommer, S.S. (1993) The Pattern of Spontaneous Germline Mutation: Relative rates of Mutation at or Near CpG Dinucleotides in the Factor IX Gene. *Hum Genet* **91**: 496-503.
- Bottema, C.D.K.; Ketterling, R.P.; Yoon, H.-S. e Sommer, S.S. (1990) The Pattern of Factor IX Germ-Line Mutation in Asians Is Similar to That of Caucasians. *Am J Hum Gen* **47**: 835-841.
- Braunstein, K.M.; Noyes, C.M.; Griffith, M.J. e Lundblad, R.L. (1981) Characterization of Factor IX Chapel Hill. *J Clin Invest* **68**: 1420-1426.

- Brenner, S. (1988) The Molecular Evolution of Genes and Proteins: a Tale of Two Serines. *Nature* **334**: 528-530.
- Briët, E.; Bertina, R.M.; van Tilburg, N.H. e Veltkamp, J.J. (1982) Haemophilia B Leyden: a Sex-linked Hereditary Disorder That Improves After Puberty. *N Engl J Med* **306**: 788-792.
- Bristol, J.A.; Furie, B.C. e Furie, B. (1993) Propeptide Processing During Factor IX Biosynthesis. *J Biol Chem* **268**: 7577-7584.
- Brownlee, G.G. (1988) Hemophilia B: a Review of Patient Defects Diagnosis with Gene Probes and Prospect for Gene Therapy. *Rec Adv Haematol* **5**: 251-264.
- Broze, G.D.; Girard, T.J. e Novotny, W.F. (1990) Regulation of Coagulation by a Multivalent Kunitz-Type Inhibitor. *Biochemistry* **29**: 7539-7546.
- Broze, G.J. e Gailani, D. (1993) The Role of Factor XI in Coagulation. *Thromb Haemost* **70**: 72-74.
- Broze, G.J. e Miletich, J.P. (1987) Isolation of the Tissue Factor Inhibitor Produced by HepG2 Hepatoma Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1886-1890.
- Broze, G.J.; Warren, L.A.; Novotny, W.F.; Higuchi, D.A.; Girard, T.J. e Miletich, J.P. (1988) The Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor that Inhibits Factor VII-Tissue Factor Complex Also Inhibits Xa: Insight into Its Possible Mechanism of Action. *Blood* **71**: 335-343.
- Bröcker-Vriends, A.H.J.T.; Bakker, E.; Kanhai, H.H.H.; van Ommen, G.J.B.; Reitsma, P.H.; van de Kamp, J.J.P. e Briët, E. (1992) The Contribution of DNA Analysis to Carrier Detection and Prenatal Diagnosis of Hemophilia A and B. *Ann Hematol* **64**: 2-11.
- Brunné, T.; La Porta, C.; Reddigari, S.R.; Saterna, V.M.; Kaplan, A.P. e Silverberg, M. (1993) Activation of Factor XI in Plasma Is Dependent on Factor XII. *Blood* **81**: 580-586.
- Bucher, D.; Nebelin, E.; Thomsen, J. e Stenflo, J. (1976) Identification of γ -Carboxyglutamic Acid Residues in Bovine Factors IX and X and in a New Vitamin K-dependent Protein. *FEBS Lett* **68**: 293-296.
- Camerino, G.; Oberlé, I.; Drayna, D. e Mandel, J.L. (1985) A New *Msp* I Restriction Fragment Length Polymorphism in the Hemophilia B Locus. *Hum Genet* **71**: 79-81.
- Chan, V.; Yip, B.; Tong, T.M.F.; Chan, T.P.T.; Lau, K.; Yam, I. e Chan, T.K. (1991) Molecular Defects in Haemophilia B: Detection by Direct Restriction Enzyme Analysis. *Br J Haematol* **79**: 63-69.
- Chance, P.F.; Dyer, K.A.; Kurachi, K.A.; Yoshitake, S.; Roper, H.-H.; Wieacker, P. e Gartner, S.M. (1983) Regional Localization of the Human Factor IX Gene by Molecular Hybridization. *Hum Genet* **65**: 207-208.
- Chen, S.-H.; Schoof, J.M.; Weinmann, A.F. e Thompson, A.R. (1995) Heteroduplex Screening for Molecular Defects in Factor IX Genes from Haemophilia B Families. *Br J Haematol* **89**: 409-412.

- Choo, K.W.; Gould, K.G. e Rees, D.J.G. (1982) Molecular Cloning of the Gene for the Human Anti-haemophilic Factor IX. *Nature* **299**: 178-180.
- Colman, R.W.; Bagdasarian, A. e Talama, R.C. (1975) Williams Trait: Human Kininogen Deficiency with Diminished Levels of Plasminogen Proactivator and Prekallikrein Associated with Abnormalities of the Hageman Factor-dependent Pathways. *J Clin Invest* **56**: 1650-1662.
- Cooke, R.M.; Wilkinson, A.J.; Baron, M.; Harvey, T.S.; Tappin, M.J.; Campbell, I.D.; Gregory, H. e Sheard, B. (1987) The solution Structure of Human Epidermal Growth Factor. *Nature* **327**: 339-341.
- Cooper, D.N. e Krawczak, M. (1996). Single Base-pair Substitutions. em **Human Gene Mutation**. Bios Scientific Publishers - Oxford. pp 109-161.
- Damus, P.S.; Hicks, M. e Rosemberg, R.D. (1973) Anticoagulant Action of Heparin. *Nature* **246**: 355-357.
- David, D.; Rosa, H.A.V.; Pemberton, S.; Diniz, M.J.; Campos, M. e Lavinha, J. (1993) Single Strand Conformation Polymorphysm (SSCP) Analysis of the Molecular Pathology of Hemophilia B. *Human Mutation* **2**: 355-361.
- Davie, E.W. (1995) Biochemical and Molecular Aspects of the Coagulation Cascade. *Thromb Haemost* **74**: 1-6.
- Davie, E.W.; Fujikawa, K. e Kisiel, W. (1991) The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation. *Biochemistry* **30**: 10363-10370.
- Davie, W.E. e Ratnoff, O.D. (1964) Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**: 1310-1312.
- Davis, L.M.; McGraw, R.A.; Ware, J.L.; Roberts, H.R. e Stafford, D.W. (1987) Factor IX Alabama: A Point Mutation in a Clotting Protein Results in Hemophilia B. *Blood* **69**: 140-143.
- DiScipio, R.G.; Kurachi, K. e Davie, E.W. (1978) Activation of Human Factor IX (Christmas Factor). *J Clin Invest* **61**: 1528-1538.
- Driscoll, M.C.; Dispenzieri, A.; Tobias, E.; Miller, C.H. e Aledort, L.M. (1988) A Second *Bam* *HI* DNA polymorphism and Haplotype Association in the Factor IX Gene. *Blood* **72**: 61-65.
- Driscoll, M.C.; Miller, C.H.; Hilgartner, M.W. e Aledort, L.M. (1985) Gene Analysis and DNA Polymorphisms in Hemophilia B. *Blood* **66 Supplement**: 333.
- Eckner, R.; Ellmeier, W. and Birnstiel, M.L. (1991) Mature mRNA 3' End Formation Stimulates RNA Export from the Nucleus. *EMBO J* **10**: 3515-3522.
- Esmon, N.L.; Owen, W.G. e Esmon, C.T. (1982) Isolation of a Membrane-Bound Cofactor for Thrombin-Catalyzed Activation Protein C. *J Biol Chem* **257**: 859-864.

- Evans, D.L.; Marshall, C.J.; Christey, P.B. e Carrel, R.W. (1992) Heparin Binding Site, Conformational Change, and Activation of Antithrombin. *Biochemistry* **31**: 12629-12642.
- Evans, J.P.; Brinkhous, K.M.; Brayer, G.D.; Reisner, H.M. e High, K.A. (1989) Canine Hemophilia B Resulting from a Point Mutation with Unusual Consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 10095-10099.
- Fallaux, F.J.; Hoebe, R.C. e Briët, E. (1995) State and Prospects of Gene Therapy for the Hemophilias. *Thromb Haemost* **74**: 263-273.
- Fernlund, P. e Stenflo, J. (1983) β -Hydroxyaspartic Acid in Vitamin K-dependent Proteins. *J Biol Chem* **258**: 12509-12512.
- Figueiredo, M.S. (1993) Molecular Analysis of Hemophilia B in Brazilian Patients. *Brazilian J Med Biol Res* **26**: 919-931.
- Figueiredo, M.S. (1995). **Os Genes dos Fatores VIII e IX da Coagulação: Mutações, Polimorfismos e Controle da Expressão Gênica. Tese de Livre-docência:**
- Figueiredo, M.S.; Bowen, D.J.; Silva-Jr, W.A. e Zago, M.A. (1994) Factor IX Gene Haplotypes in Brazilian Blacks and Characterization of Unusual Ddel Alleles. *Br J Haematol* **87**: 789-796.
- Foster, D.C.; Rudinski, M.S.; Schach, B.G.; Berkner, K.L.; Kumar, A.A.; Hagen, F.S.; Sprecher, C.A.; Insley, M.Y. e Davie, E.W. (1987) Propeptide of Human Protein C Is Necessary for γ -Carboxylation. *Biochemistry* **26**: 7003-7011.
- Fraser, B.M.; Poon, M.-C. e Hoar, D.I. (1992) Identification of Factor IX Mutations in Haemophilia B: Application of Polymerase Chain Reaction and Single Strand Conformation Analysis. *Hum Genet* **88**: 426-430.
- Fryklund, I.; Borg, H. e Andersson, L.-O. (1976) Amino Terminal Sequence of Human Factor IX: Presence of γ -Carboxyglutamic Acid Residues. *FEBS Lett* **65**: 187-189.
- Fujikawa, K.; Legaz, M.E.; Kato, H. e Davie, E.W. (1974) The Mechanism of Activation of Bovine Factor IX (Christmas Factor) by Bovine Factor XIa (Activated Plasma Thromboplastin Antecedent). *Biochemistry* **13**: 4508-4516.
- Furie, B.; Bing, D.H.; Feldmann, R.J.; Robison, D.J.; Burnier, J.P. e Furie, B.C. (1982) Computer-generated Models of Blood Coagulation Factor Xa, Factor IXa, and Thrombin Based upon Structural Homology with Other Serine Proteases. *J Biol Chem* **257**: 3875-3882.
- Furie, B. e Furie, B.C. (1988) The Molecular Basis of Blood Coagulation. *Cell* **53**: 505-518.
- Furie, B.C. e Furie, B. (1995) Biosynthesis of factor IX: Implications for Gene Therapy. *Thromb Haemost* **74**: 274-277.
- Gailani, D. e Broze, G.J. (1991) Factor XI Activation in a Revised Model of Blood Coagulation. *Science* **253**: 909-912.

- Garrett, R.H. e Grisham, C.M. (1995). Mechanisms of Enzyme Action. em **Biochemistry**. 1ª ed. Saunders College Publishing - Orlando. pp 424-461.
- Gerrard, A.J.; Hudson, D.L.; Brownlee, G.G. e Watt, F.M. (1993) Towards Gene Therapy for Haemophilia B Using Primary Human Keratinocytes. *Nature Genetics* 3: 180-183.
- Giannelli, F.; Choo, K.W.; Rees, D.J.G.; Boyd, Y.; Rizza, C.R. e Brownlee, G.G. (1983) Gene Deletions in Patients with Haemophilia B and Anti-factor IX Antibodies. *Nature* 303: 181-182.
- Giannelli, F.; Green, P.M.; Sommer, S.S.; Poon, M.-C.; Ludwig, M.; Schwaab, R.; Reitsma, P.H.; Goossens, M.; Yoshioka, A. e Brownlee, G.G. (1996) Haemophilia B (sixth edition): a Database of Point Mutations and Short Additions and Deletions. *Nucleic Acids Res* 24: 103-118.
- Giannelli, F.; Saad, S.; Montandon, A.J.; Bentley, D.R. e Green, P.M. (1992) A New Strategy for the Genetic Counselling of Diseases of Marked Mutational Heterogeneity: Haemophilia B as a Model. *J Med Genet* 29: 602-607.
- Gostout, B.; Vielhaber, E.; Ketterling, R.P.; Yoon, H.-S.; Bottema, C.D.K.; Kasper, C.K.; Koerper, M. e Sommer, S.S. (1993) Germline Mutations in the Factor IX Gene: a Comparison of the Pattern in Caucasians and non-Caucasians. *Hum Mol Gen* 2: 293-298.
- Graham, J.B.; Green, P.P.; McGraw, R.A. e Davis, L.M. (1985) Application of Molecular Genetics to Prenatal Diagnosis and Carrier Detection in the Hemophilias: Some Limitations. *Blood* 66: 759-764.
- Graham, J.B.; Kunkel, G.R.; Egilmez, N.K.; Wallmark, A.; Fowlkes, D.M. e Lord, S.T. (1991) The Varying Frequencies of Five DNA Polymorphisms of X-linked Coagulant Factor IX in Eight Ethnic Groups. *Am J Hum Gen* 49: 537-544.
- Graham, J.B.; Lubahn, D.B.; Lord, S.T.; Kirshtein, J.; Nilsson, I.M.; Wallmark, A.; Ljung, R.; Frazier, L.D.; Ware, J.L.; Lin, S.W.; Stafford, D.W. e Bosco, J. (1988) The Malmö Polymorphism of Coagulation Factor IX An Immunologic Polymorphism Due to Dimorphism of Residue 148 that Is in Linkage Disequilibrium with Two Other F.IX Polymorphisms. *Am J Hum Gen* 42: 573-580.
- Green, P.M.; Bentley, D.R.; Mibashan, R.S.; Nilsson, I.M. e Giannelli, F. (1989) Molecular Pathology of Haemophilia B. *EMBO J* 8: 1067-1072.
- Green, P.M.; Montandon, A.J.; Bentley, D.R.; Ljung, R.; Nilsson, I.M. e Giannelli, F. (1990) The Incidence and Distribution of CpG→TpG Transitions in the Coagulation Factor IX Gene. A Fresh Look at CpG Mutational Hotspots. *Nucleic Acids Res* 18: 3227-3231.
- Green, P.M.; Montandon, A.J.; Ljung, R.; Nilsson, I.M. e Giannelli, F. (1992) Haplotype Analysis of Identical Factor IX Mutants Using PCR. *Thromb Haemost* 67: 66-69.
- Grompe, M. (1993) The Rapid Detection of Unknown Mutations in Nucleic Acids. *Nature Genetics* 5: 111-116.

- Hamaguchi, M.; Matsushita, T.; Tanimoto, M.; Takahashi, T.; Yamamoto, K.; Sugiura, I.; Takamatsu, J.; Ogata, K.; Kamiya, K. e Saito, H. (1991) Three Distinct Point Mutations in the Factor IX Gene of Three Japanese CRM⁺ Hemophilia B Patients (Factor IX B_MNagoya, Factor IX Nagoya 3 and 4). *Thromb Haemost* **65**: 514-520.
- Handford, P.; Charifson, P.S.; Pederson, L.G.; Brayer, G.D.; Smith, K.J. e Stafford, D.W. (1991) Expression and Characterization of Human Factor IX. Fator IX Thr-397 and Factor IX Val-397. *J Biol Chem* **266**: 15213-15220.
- Handford, P.A.; Baron, M.; Mayhew, M.; Willis, A.; Beesley, T.; Brownlee, G.G. e Campbell, I.D. (1990) The first EGF-like Domain from Human Factor IX Contains a High-affinity Calcium Binding Site. *EMBO J* **9**: 475-480.
- Harlos, K.; Holland, S.K.; Boys, C.W.G.; Burgers, A.I.; Esnouf, M.P. e Blake, C.C.F. (1987) Vitamin K-dependent Blood Coagulation Proteins Forms Hetero-dimers. *Nature* **330**: 82-84.
- Hathaway, W.E.; Belhasen, L.P. e Hathaway, H.S. (1965) Evidence for a New Plasma Thromboplastin Factor. I. Case Report, Coagulation Studies and Physicochemical Properties. *Blood* **26**: 521-532.
- Hay, C.W.; Robertson, K.A.; Yong, S.-L.; Thompson, A.R.; Growe, G.H. e MacGillivray, R.T.A. (1986) Use of a BamHI Polymorphism in the Factor IX Gene for the Determination of Hemophilia B carrier Status. *Blood* **67**: 1508-1511.
- Hoffman, M.; Monroe, D.M.; Oliver, J.A. e Roberts, H.R. (1986) Factors IXa and Xa Play Distinct Roles in Tissue Factor-Dependent Initiation of Coagulation. *Blood* **5**: 1794-1801.
- Hongyo, T.; Buzard, G.S.; Calvert, R.J. e Weghorst, C.M. (1993) 'Cold SSCP': a Simple, Rapid and Non-Radioactive Method for Optimized Single-strand Conformation Polymorphism Analysis. *Nucleic Acids Res* **21**: 3637-3642.
- Hougie, C. e Twomey, J.J. (1967) Hemophilia Bm: a New Type of Factor IX Deficiency. *Lancet* **i**: 698-700.
- Iwanaga, S. (1993) Primitive Coagulation Systems and Their Message to Modern Biology. *Thromb Haemost* **70**: 48-55.
- Jackson, R.J. and Standart, N. (1990) Do the Poly(A) Tail and 3' Untranslated Region Control mRNA Translation? *Cell* **62**: 15-24.
- Jacob, M. e Gallinaro, H. (1989) The 5' Splice Site: Phylogenetic Evolution and Variable Geometry of Association with U1RNA. *Nucleic Acids Res* **17**: 2159-2177.
- Jacobson, D.P.; Schmeling, P. e Sommer, S.S. (1993) Characterization of the Patterns of Polymorphism in a "Cryptic Repeat" Reveals a Novel Type of Hypervariable Sequence. *Am J Hum Gen* **53**: 443-450.
- Jim, R.T.S. (1957) A Study of the Plasma Thrombin Time. *J Lab Clin Med* **50**: 45-60.

- Jones, M.E.; Griffith, M.J.; Monroe, D.M.; Roberts, H.R. e Lentz, B.R. (1985) Comparison of Lipid Binding and Kinetic Properties of Normal, Variant, and γ -Carboxyglutamic Acid Modified Human factor IX and IXa. *Biochemistry* **24**: 8064-8069.
- Jorgensen, M.J.; Cantor, A.B.; Furie, B.C.; Brown, C.L.; Shoemaker, C.B. e Furie, B. (1987) Recognition Site Directing Vitamin K-Dependent γ -carboxylation Resides on the Propeptide of factor IX. *Cell* **48**: 158-191.
- Katayama, K.; Ericsson, L.H. e Enfield, D.L. (1979) Comparison of Amino Acid Sequence of Bovine Coagulation Factor IX (Christmas Factor) with That of Other Vitamin K-dependent Plasma Proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4990-4994.
- Kenneth, G.M. e Lorand, L. (1993) Introduction: Blood Coagulation. *Method Enzymol* **222**: 1-10.
- Ketterling, R.P.; Bottema, C.D.K.; Koeberl, D.D.; Li, S. e Sommer, S.S. (1991) T²⁹⁶→M a Common Mutation Causing Mild Hemophilia B in the Amish and Others: Founder Effect, Variability in Factor IX activity Assays, and Rapid Carrier Detection. *Hum Genet* **87**: 333-337.
- Ketterling, R.P.; Bottema, C.D.K.; Phillips III, J.A. e Sommer, S.S. (1991) Evidence that Descendants of Three Founders Comprise about 25% of Hemophilia B in the United States. *Genomics* **10**: 1093-1096.
- Ketterling, R.P.; Vielhaber, E. e Sommer, S.S. (1994) The Rates of G:C→T:A and G:C→C:G Transversions at CpG Dinucleotide in the Human Factor IX Gene. *Am J Hum Gen* **54**: 831-834.
- Kisiel, W. (1979) Human Plasma Protein C. Isolation, Characterization, and Mechanism of Activation by α -Thrombin. *J Clin Invest* **64**: 761-769.
- Kisiel, W.; Canfield, W.M.; Ericsson, L.H. e Davie, E.W. (1977) Anticoagulant Properties of Bovine Plasma Protein C Following Activation by Trombin. *Biochemistry* **16**: 5824-5830.
- Koeberl, D.D.; Bottema, C.D.K.; Buerstedde, J.-M. e Sommer, S.S. (1989) Functionally Important Regions of the Factor IX Gene Have a Low Rate of Polymorphism and a High Rate of Mutation in the Dinucleotide CpG. *Am J Hum Gen* **45**: 448-457.
- Koeberl, D.D.; Bottema, C.D.K.; Ketterling, R.P.; Bridge, P.J.; Lillicrap, D.P. e Sommer, S.S. (1990) Mutations Causing Hemophilia B: Direct Estimate of the Underlying Rates of Spontaneous Germ-Line Transitions, Transversions, and Deletions in a Human Gene. *Am J Hum Gen* **47**: 202-217.
- Koeberl, D.D.; Bottema, C.D.K.; Sarkar, G.; Ketterling, R.P.; Chen, S.-H. e Sommer, S.S. (1990) Recurrent Nonsense Mutations at Arginine Residues Cause Severe Hemophilia B in Unrelated Hemophiliacs. *Hum Genet* **84**: 387-390.
- Kojima, T.; Tanimoto, M.; Kamiya, T.; Obata, Y.; Takahashi, T.; Ohno, R.; Kurachi, K. e Saito, H. (1987) Possible Absence of Common Polymorphisms in Coagulation Factor IX Gene in Japanese Subjects. *Blood* **69**: 349-352.

- Kozac, M. (1986) Influences of mRNA Secondary Structure on Initiation by Eukariotic Ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5086-5090.
- Kurachi, K. e Davie, E.W. (1977) Activation of Human Factor XI (Plasma Thromboplastin Antecedent) by Factor XIIa (Activated Hageman Factor). *Biochemistry* **16**: 5831-5839.
- Kurachi, K. e Davie, E.W. (1982) Isolation and Characterization of a cDNA Coding for Human Factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6461-6464.
- Kurachi, K.; Furukawa, M.; Yao, S.-N. e Kurachi, S. (1992) Biology of Factor IX. *Hematol Oncol Clin North Am* **6**: 991-997.
- Kurachi, K. e Yao, S.-N. (1993) Gene therapy of Haemophilia B. *Thromb Haemost* **70**: 193-197.
- Larson, P.J. e High, K.A. (1992) Biology of Inherited Coagulopathies: Factor IX. *Hematol Oncol Clin North Am* **6**: 999-1009.
- Laurell, C.V. (1966) Quantitative Estimation Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. *Anal Biochem* **15**: 45-52.
- Lawson, J.H.; Kalafatis, M.; Stram, S. e Mann, K.G. (1994) A Model for the Tissue factor Pathway to Thrombin. *J Biol Chem* **269**: 23357-23366.
- Lawson, J.H. e Mann, K.G. (1991) Cooperative Activation of Human Factor IX by the Human Extrinsic Pathway of Blood Coagulation. *J Biol Chem* **266**: 11317-11327.
- Lenting, P.J.; ter Maat, H.; Clijsters, P.P.F.M.; Donath, M.-J.S.H.; van Mourik, J.A. e Mertens, K. (1995) Cleavage at Arginine 145 in Human Blood Coagulation Factor IX Converts the Zymogen into a Factor VIII Binding Enzyme. *J Biol Chem* **270**: 14884-14890.
- Liddell, m.B.; Peake, I.R.; Taylor, S.A.M.; Lillicrap, D.P.; Giddings, J.C. e Bloom, A.L. (1989) Factor IX Cardiff: a Variant Factor IX Protein That Shows Abnormal Activation is caused by an Arginine to Cysteine Substitution at position 145. *Br J Haematol* **72**: 556-560.
- Lin, S.W. e Shen, M.-C. (1993) Genetic Basis and Carrier Detection of Hemophilia B of Chinese Origin. *Thromb Haemost* **69**: 247-252.
- Lozier, J.N. e Brinkhous, K.M. (1994) Gene Therapy and the Hemophilias. *JAMA* **271**: 47-51.
- Lusher, J.M. (1995) Considerations for Current and Future Management of Haemophilia and Its Complications. *Haemophilia* **1**: 2-10.
- MacFarlane, R.G. (1964) An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* **202**: 498-499.
- Manley, J.L. and Proudfoot, N.J. (1994) RNA 3'-ends: Formation and Function - Meeting Review. *Genes Dev* **8**: 259-264.
- Mann, K.G. e Laszlo, L. (1993) Introduction: Blood Coagulation. *Method Enzymol* **222**: 1-10.

- Marcum, J.A. e Rosenberg, R.D. (1984) Anticoagulant Active Heparin-like Molecules from Vascular Tissue. *Biochemistry* **23**: 1730-1737.
- McCord, D.M.; Monroe, D.M.; Smith, K.J. e Roberts, H.R. (1990) Characterization of the Functional Defect in Factor IX Alabama. *J Biol Chem* **265**: 10250-10254.
- McGraw, R.A.; Davis, L.M.; Noyes, C.M.; Lundblad, R.L.; Roberts, H.R.; Graham, J.B. e Stafford, D.W. (1985) Evidence for a Prevalent Dimorphism in the Activation Peptide of Human Coagulation Factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 2847-2851.
- Melo, L. (1989) Hemofilias e Outras Coagulopatias Congênitas no Brasil. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter* **11**: 112-121.
- Mibashan, R.S.; Rodeck, C.H.; Thumpston, J.K.; Edwards, R.J.; Singer, J.D.; White, J.M. e Campbell, S. (1979) Plasma Assay of Fetal Factors VIII and IX for Prenatal Diagnosis of Haemophilia. *Lancet* **2**: 1309-1311.
- Miyata, T.; Kuze, K.; Matsusue, T.; Komooka, H.; Kamiya, K.; Umeyama, H.; Matsui, A.; Kato, H. e Yoshioka, A. (1994) Factor IX Bm Kiryu: a Val-313-to-Asp Substitution in the Catalytic Domain Results in Loss of Function Due to a Conformational Change of the Surface Loop: Evidence Obtained By Chimaeric Modelling. *Br J Haematol* **88**: 156-165.
- Monroe, D.M.; McCord, D.M.; Huang, L.H.; High, K.A.; Lundblad, R.L.; Kasper, C.K. e Roberts, H.R. (1989) Functional Consequences of an Arginine 180 to Glutamine Mutation in Factor IX Hilo. *Blood* **73**: 1540-1544.
- Montandon, A.J.; Green, P.M.; Bentley, D.R.; Ljung, R.; Kling, S.; Nilsson, I.M. e Giannelli, F. (1992) Direct Estimate of the Haemophilia B (Factor IX Deficiency) Mutation Rate and of the Ratio of the Sex-specific Mutation Rates in Sweden. *Hum Genet* **89**: 319-322.
- Morita, T.; Isaacs, B.S.; Esmon, C.T. e Johnson, A.E. (1984) Derivatives of Blood Coagulation factor IX Contain High Affinity Ca^{+2} Binding Site that Lacks γ -Carboxyglutamic Acid. *J Biol Chem* **259**: 5698-5704.
- Mount, S.M. (1982) A Catalogue of Splice Junction Sequences. *Nucleic Acids Res* **10**: 459-472.
- Nishimura, H.; Kawabata, S.-I.; Kisiel, W.; Hase, S.; Ikenaka, T.; Takao, T.; Shimonishi, Y. e Iwanaga, S. (1989) Identification of a Disaccharide (Xyl-Glc) and a Trisaccharide (Xyl₂-Glc) O-glycosidically Linked to a Serine Residue In the First Epidermal Growth Fator-like Domain of Human Factors VII and IX and Protein Z and Bovine Protein Z. *J Biol Chem* **264**: 20320-20325.
- Nishimura, H.; Takao, T.; Hase, S.; Shimonishi, Y. e Iwanaga, S. (1992) Human Factor IX Has a Tetrasaccharide O-glycosidically Linked to Serine 61 Through the Fucose Residue. *J Biol Chem* **267**: 17520-17525.
- Noyes, C.M.; Griffith, M.J.; Roberts, H.R. e Lundblad, R.L. (1983) Identification of the Molecular Defect in Factor IX Chapel Hill. Substitution of a Histidine for Arginine at Position 145. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4200-4202.

- O'Brien, L.M.; Medved, L.V. e Fay, P.J. (1995) Localization of Factor IXa and Factor VIIIa Interactive Sites. *J Biol Chem* **270**: 27087-27092.
- Olson, S.T.; Björk, I.; Sheffer, R.; Craig, P.A.; Shore, J.D. e Choay, J. (1992) Role of the Antithrombin-Binding Pentasaccharide in Heparin Acceleration of Antithrombin-Proteinase Reactions. *J Biol Chem* **267**: 12528-12538.
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. e Sekiya, T. (1989) Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766.
- Orstavik, K.H.; Veltkamp, J.J.; Bertina, R.M. e Hermans, J. (1979) Detection of Carriers of Haemophilia B. *Br J Haematol* **42**: 293-301.
- Osterud, B. e Rapaport, S.I. (1977) Activation of Factor IX by the Reaction Product of Tissue Factor and Factor VII: Additional Pathway for Initiating Blood Coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5260-5264.
- Owen, W.G. e Esmon, C.T. (1981) Functional Properties of an Endothelial Cell Cofactor for Thrombin-Catalyzed Activation of Protein C. *J Biol Chem* **256**: 5532-5535.
- Pan, L.C. e Price, P.A. (1985) The Propeptide of Rat Bone γ -Carboxyglutamic Acid Protein Shares Homology With Other Dependent Protein Precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6109-6113.
- Patthy, L. (1985) Evolution of the Proteases of Blood Coagulation and Fibrinolysis by Assembly from Modules. *Cell* **41**: 657-663.
- Pavlovsky, A. (1947) Contribution to the Pathogenesis of Hemophilia. *Blood* **2**: 185-191.
- Peake, I.R.; Lillicrap, D.P.; Boulyjenkov, V.; Briët, E.; Chan, V.; Ginter, E.K.; Kraus, E.M.; Ljung, R.; Mannucci, P.M.; Nicolaidis, K. e Tuddenham, E.G.D. (1993) Report of a Joint WHO/WFH Meeting on the Control of Haemophilia: Carrier Detection and Prenatal Diagnosis. *Blood Coag Fibr* **4**: 313-344.
- Pixley, R.A. e Colman, R.W. (1993) Factor XII: Hageman Factor. *Method Enzymol* **222**: 51-65.
- Pooler, L. (1975) The British System of Anticoagulant Control. *Thromb Diath Haemorrh* **33**: 157-162.
- Poon, M.-C.; Anand, S.; Fraser, B.M.; Hoar, D.I. e Sinclair, G.D. (1993) Hemophilia B Carrier Determination Based on Family-specific Mutation Detection by DNA Single-strand Conformation Analysis. *J Lab Clin Med* **122**: 55-63.
- Proctor, P.R. e Rapaport, S.I. (1961) The Partial Thromboplastin Time with Kaolin. A Simple Screening Test for First stage Plasma Clotting Factor Deficiencies. *Am J Clin Pathol* **36**: 212-219.
- Purrello, M.; Alhadeff, B.; Esposito, D.; Szabo, P.; Rocchi, M.; Truett, M.; Masiarz, F. e Siniscalco, M. (1985) The Human Genes for Hemophilia A and Hemophilia B Flank the X Chromosome Fragile Xq 27.3. *EMBO J* **4**: 725-729.

- Quick, A.J.; Stanley-Brown, M. e Bancroft, F.W. (1935) A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and in Jaundice. *Am J Med Sci* **190**: 501-511.
- Rao, L.V.M. e Rapaport, S.I. (1987) Studies of a Mechanism Inhibiting the Initiation of the Extrinsic Pathway of Coagulation. *Blood* **69**: 645-651.
- Rao, L.V.M. e Rapaport, S.I. (1988) Activation of Factor VII to Tissue Factor: A Key Early Step in the Tissue Factor Pathway of Blood Coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6687-6690.
- Rapaport, S.I. (1989) Inhibition of Factor VIIa/Tissue Factor-Induced Blood Coagulation: With Particular Emphasis Upon a Factor Xa-Dependent Inhibitory Mechanism. *Blood* **73**: 359-365.
- Rapaport, S.I. (1991) The Extrinsic Pathway Inhibitor: A Regulator of Tissue Factor-dependent Blood Coagulation. *Thromb Haemost* **66**: 6-15.
- Rapaport, S.I. e Rao, L.V.M. (1995) The Tissue Factor Pathway: How It Has Become a "Prima Ballerina". *Thromb Haemost* **74**: 7-17.
- Ratnoff, O.D. e Forbes, C.D. (1991). Evolution of Knowledge About Hemostasis. em **Disorders of Hemostasis**. 2ª ed. W. B. Saunders Company - Philadelphia, PA. pp 1-17.
- Ratnoff, O.D. e Forbes, C.D. (1991). Normal Hemostatic Mechanisms. em **Disorders of Hemostasis**. 2ª ed. W.B. Saunders Company - Philadelphia, PA. pp 18-47.
- Rees, D.J.G.; Jones, I.M.; Handford, P.A.; Walter, S.J.; Esnouf, M.P.; Smith, K.J. e Brownlee, G.G. (1988) The Role of β -Hidroxyaspartate and Adjacent Carboxylate Residues in the First EGF Domain of Human Factor IX. *EMBO J* **7**: 2053-2061.
- Rees, D.J.G.; Rizza, C.R. e Brownlee, G.G. (1985) Haemophilia B Caused by a Point Mutation in a Donor Splice Junction of the Human Factor IX Gene. *Nature* **316**: 643-645.
- Roberts, H.R. (1993) Molecular Biology of Hemophilia B. *Thromb Haemost* **70**: 1-9.
- Roberts, H.R. e Eberst, M.E. (1993) Current Management of Hemophilia B. *Hematol Oncol Clin North Am* **7**: 1269-1280.
- Rosemberg, R.D. e Rosemberg, J.S. (1984) Natural Anticoagulant Mechanisms. *J Clin Invest* **74**: 1-6.
- Ryan, J.; Wolitsky, B.; Heimer, E.; Lambrose, T.; Felix, A.; Tam, J.P.; Huang, L.H.; Nawroth, P.; Wilner, G.; Kisiel, W.; Nelsestuen, G.L. e Stern, D.M. (1989) Structural Determinants of the Factor IX Molecule Mediating Interaction with Endothelial Binding Site are Distinct from Those Involved in Phospholipid Binding. *J Biol Chem* **264**: 20283-20287.
- Saad, S.; Rowley, G.; Tagliavacca, L.; Green, P.M. e Giannelli, F. (1994) First Report on UK Database of Haemophilia B Mutations and Pedigrees. *Thromb Haemost* **71**: 563-570.

- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higushi, R.; Horn, G.T. e Erlich, H.A. (1988) Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **139**: 487-491.
- Salier, J.-P.; Hirosawa, S. e Kurachi, K. (1990) Functional Characterization of the 5' Regulating Region of Human Factor IX Gene. *J Biol Chem* **265**: 7062-7068.
- Salvesen, G. e Pizzo, S.V. (1994). Proteinase Inhibitors: α -Macroglobulins, Serpins and Kunins. em **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**. 3ª ed. Colman, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J. and Salzman, E.W.eds. J.B.Lippincott Company - Philadelphia. pp 241-258.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1982). em **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.; Niklen, S. e Coulson, A.R. (1977) DNA Sequencing with Chain Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sarkar, G.; Koeberl, D.D. e Sommer, S.S. (1990) Direct Sequencing of the Activation Peptide and the Catalytic Domain of the Factor IX Gene in Six Species. *Genomics* **6**: 133-143.
- Schulman, I. e Smith, C.H. (1952) Hemorrhagic Disease in an Infant Due to Deficiency of a Previously Undescribed Clotting Factor. *Blood* **7**: 794.
- Sekiya, F.; Yamashita, T.; Atoda, H.; Komiyama, Y. e Morita, T. (1995) Regulation of the Tertiary Structure and Function of Coagulation Factor IX by Magnesium(II) Ions. *J Biol Chem* **270**: 14325-14331.
- Sekiya, F.; Yoshida, M.; Yamashita, T. e Morita, T. (1996) Localization of the Specific Binding Site for Magnesium(II) Ions in Factor IX. *FEBS Lett* **392**: 205-208.
- Sekiya, F.; Yoshida, M.; Yamashita, T. e Morita, T. (1996) Magnesium(II) Is a Crucial Constituent of the Blood Coagulation Cascade. *J Biol Chem* **271**: 8541-8544.
- Sommer, S.S. (1992) Assessing the Underlying Pattern of Human Germline Mutations: Lessons from the Factor IX Gene. *FASEB J* **6**: 2767-2774.
- Sommer, S.S. (1995) Recent Human Germ-line Mutation: Inferences from Patients with Hemophilia B. *Trends in Genetics* **11**: 141-147.
- Sommer, S.S. e Ketterling, R.P. (1994) How Precisely Can Data from Transgenic Mouse Mutation-detection Systems Be Extrapolated to Humans?: Lessons from the Human Factor IX Gene. *Mutation Research* **307**: 517-531.
- Stenflo, J. (1991) Structure-function Relationships of Epidermal Growth Factor Modules in Vitamin K-dependent Clotting Factors. *Blood* **78**: 1637-1651.
- Suehiro, K.; Kawabata, S.-I.; Miyata, T.; Takeya, H.; Takamatsu, J.; Ogata, K.; Kamiya, T.; Saito, H.; Niho, Y. e Iwanaga, S. (1989) Blood Clotting Factor IX B_M Nagoya. *J Biol Chem* **264**: 21257-21265.

- Sunnerhagen, M.S.; Persson, E.; Dahlqvist, I.; Drakenberg, T.; Stenflo, J.; Mayhew, M.; Robin, M.; Handford, P.; Tilley, J.W.; Campbell, I.D. e Brownlee, G.G. (1993) The Effect of Aspartate Hydroxylation on Calcium Binding to Epidermal Growth Factor-like Modules in Coagulation Factors IX and X. *J Biol Chem* **268**: 23339-23344.
- Sussman, I.I. (1992) Introduction: Normal Pathways of Coagulation. *Semin Hematol* **29**: 157-158.
- Suzuki, K.; Nishioka, J. e Hashimoto, S. (1983) Protein C Inhibitor. Purification from Human Plasma and Characterization. *J Biol Chem* **258**: 163-168.
- Tans, G. e Rosing, J. (1987) Structural and Functional Characterization of Factor XII. *Semin Thromb Hemostasis* **13**: 1-14.
- ten Cate, H.; Biemond, B.J.; Levi, M.; Willemin, W.A.; Bauer, K.A.; Barzegar, S.; Buller, H.R.; Hack, C.E.; ten Cate, J.W. e Rosenberg, R.D. (1996) Factor XIa Induced Activation of the Intrinsic Cascade In Vivo. *Thromb Haemost* **75**: 445-449.
- Thompson, A.R. (1986) Structure, Function, and Molecular Defects of Factor IX. *Blood* **67**: 565-572.
- Thompson, A.R. e Chen, S.-H. (1993) Characterization of Factor IX Defects in Hemophilia B Patients. *Method Enzymol* **222**: 143-169.
- Thorland, E.C.; Weinshenker, B.G.; Liu, J.-z.; Ketterling, R.P.; Vielhaber, E.; Kasper, C.K.; Ambriz, R.; Paredes, R. e Sommer, S.S. (1995) Molecular Epidemiology of Factor IX Germline Mutations in Mexican Hispanics: Pattern of Mutation and Potential Founder Effects. *Thromb Haemost* **74**: 1416-1422.
- Toyozumi, H.; Kojima, T.; Matsushita, T.; Hamaguchi, M.; Tanimoto, M. e Saito, H. (1995) Diagnosis of Hemophilia B Carriers Using Two Novel Dinucleotide Polymorphisms and *Hha* I RFLP of the Factor IX Gene in Japanese Subjects. *Thromb Haemost* **74**: 1009-1014.
- Tuddenham, E.G.D. e Cooper, D.N. (1994). Introduction. em **The Molecular Genetics of Haemostasis and Its Inherited Disorders**. 1ª ed. Oxford University Press Inc. - New York. pp 1-18.
- Tuddenham, E.G.D. e Cooper, D.N. (1994). Anthrombin III. em **The Molecular Genetics of Haemostasis and Its Inherited Disorders**. 1ª ed. Oxford University Press Inc. - New York. pp 284-298.
- Tuddenham, E.G.D. e Cooper, D.N. (1994). Factor IX and Haemophilia B. em **The Molecular Genetics of Haemostasis and Its Inherited Disorders**. 1ª ed. Oxford Monographs on Medical Genetics N 25 Oxford University Press - New York. pp 78-111.
- Tulinsky, A. (1991) The Structures of Domains of Blood Proteases. *Thromb Haemost* **66**: 16-31.

- Vulliamy, T.J.; Urso, M.D.; Battistuzzi, G.; Estrada, M.; Foulkes, N.S.; Martini, G. e Calabro, V. (1988) Diverse Point Mutations in the Human Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Gene Cause Enzyme Deficiency and Mild or Severe Hemolytic Anemia. *Proc Soc Exp Biol* **85**: 5171-5175.
- Walker, F.J. (1980) Regulation of Activated Protein C by a New Protein. A Possible Function for Bovine Protein S. *J Biol Chem* **255**: 5521-5524.
- Warn-Cramer, B.J. e Bajaj, S.P. (1986) Intrinsic Versus Extrinsic Coagulation. *Biochem J* **239**: 757-762.
- Wasley, L.C.; Rehemtulla, A.; Bristol, J.A. e Kaufman, R.J. (1993) PACE/Furin Can Process the Vitamin K-dependent Pro-factor IX Precursor within the Secretory Pathway. *J Biol Chem* **268**: 8458-8465.
- Winship, P.R.; Anson, D.S.; Rizza, C.R. e Brownlee, G.G. (1984) Carrier Detection in Haemophilia B Using Two Further Intragenic Restriction Length Polymorphisms. *Nucleic Acids Res* **12**: 8861-8872.
- Winship, P.R. e Brownlee, G.G. (1986) Diagnosis of Haemophilia B Carriers Using Intragenic Oligonucleotides Probes. *Lancet* **ii**: 218-219.
- Winship, P.R. e Dragon, A.C. (1991) Identification of Haemophilia B Patients with Mutations in the Calcium Binding Domains of Factor IX: Importance of β -OH--Asn Change. *Br J Haematol* **77**: 102-109.
- Winship, P.R.; Rees, D.J.G. e Alkan, M. (1989) Detection of Polymorphisms at Cytosine Phosphoguanidine Dinucleotides and Diagnosis of Haemophilia B Carriers. *Lancet* **i**: 631-634.
- Wun, T.C.; Kretzmer, K.K.; Girard, T.J.; Miletich, J.P. e Broze, G.J. (1988) Cloning and Characterization of a cDNA Coding for the Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor Shows That It Consists of a Three Tandem Kunitz-Type Inhibition Domains. *J Biol Chem* **263**: 6001-6004.
- Yoshitake, S.; Schach, B.G.; Foster, D.C.; Davie, E.W. e Kurachi, K. (1985) Nucleotide Sequence of the Gene for Human Factor IX (Antihemophilic Factor B). *Biochemistry* **24**: 3736-3750.
- Youssofian, H.; Kazazian, H.H.; Phillips, D.G.; Aronis, S.; Tsiftis, G.; Brown, V.A. e Antonarakis, S.E. (1986) Recurrent Mutations in Haemophilia A Give Evidence for CpG Mutation Hotspots. *Nature* **324**: 380-382.