



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia de Almeida Pinto da Cunha Leal

ELUCIDAÇÃO DA CORRELAÇÃO GENÓTIPO-
FENÓTIPO EM PATOLOGIAS
SUBDIAGNOSTICADAS:
HIPOFIBRINOGENEMIA, DISFIBRINOGENEMIA E
TENDÊNCIA TROMBÓTICA POR NÍVEIS ELEVADOS
DE FVIII

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia
Farmacêutica orientada pela Doutora Teresa de Jesus Semedo
Fidalgo e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida
Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade
de Coimbra.

setembro de 2022

Declaração

Eu, Ana Sofia de Almeida Pinto da Cunha Leal, estudante do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica com o nº2017248130, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Projeto.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Dissertação, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 06 de setembro 2022.

Ana Sofia de Almeida Pinto da Cunha Leal

AGRADECIMENTOS

Devo confessar que estando prestes a terminar esta significativa etapa da minha vida académica aflora em mim uma infinidade de sentimentos que, embora pareçam à primeira vista não fazer qualquer sentido, se examinados mais cuidadosamente, estou certa de que farão todo o sentido para aqueles que passaram, ou estão a passar, por esta fase de conclusão.

O cansaço e a fadiga combinados com uma enorme vontade de seguir em frente e abraçar uma carreira profissional; o alívio e a felicidade pelos resultados conseguidos aliados ao receio do que o mundo “lá fora” reserva. Certo é que poderia continuar com o rol de sentimentos e dramas vividos ao longo desta experiência, mas tal não me parece necessário pois julgo já me ter feito entender...

Assim, é chegada a altura de, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me acompanharam ao longo do meu trajeto académico deixar um voto profundo de gratidão pela ajuda, pelo carinho, pelo apoio e incentivo, pela compreensão que conduziu até este momento.

À Doutora Teresa Fidalgo, minha orientadora de estágio no Laboratório de Hematologia Molecular do Hospital Pediátrico de Coimbra, pela excelente profissional e ser humano que demonstrou ser tornando-se, inequivocamente, um exemplo a seguir, pelo seu apoio, ajuda, compreensão e ensinamentos; igualmente à Dra. Catarina Silva Pinto e Dra. Patrícia Martinho com quem tive o enorme prazer de trabalhar.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira por ter aceitado a função de orientador interno da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Às minhas amigas e colegas que comigo percorreram e partilharam estes anos de estudo, rindo ou chorando, sofrendo ou comemorando... Conseguimos Amigas!

Gostaria ainda de deixar expresso um carinhoso agradecimento e reconhecimento, a título póstumo, a uma grande Senhora com quem tive a sorte de me iniciar na escola primária a qual, com os seus preceitos irrepreensíveis e ensinamentos valiosos, me instruiu nos métodos que me permitiram chegar onde estou hoje: obrigada Professora Elisinha (Maria Elisa Oliveira).

Finalmente à minha família: avós, pais, irmão, tios e primos; cada um, do seu jeito e maneira, deram o seu contributo e ajuda. Sei o quanto gostam de mim, sei que estarão sempre do meu lado para tudo o que der e vier, sei também que estão felizes e orgulhosos da minha pessoa. O vosso carinho, apoio e ânimo foi fundamental; os vossos ensinamentos e exemplo de vida também. Muito obrigada a todos!

ÍNDICE

Capítulo I - Introdução	1
1- Introdução	3
1.1- Hemostase Primária	3
1.2 - Hemostase Secundária	4
1.3- Hemostase Terciária.....	5
2- Anomalias no sistema hemostático.....	7
3- Anomalias associadas a défices de fibrinogénio	7
3.1- Estrutura e função do fibrinogénio.....	8
3.2- Síntese do Fibrinogénio	10
3.3-Afibrinogenemia e Hipofibrinogenemia	11
3.4- Disfibrinogenemia e Hipodisfibrinogenemia.....	12
3.5- Classificação das doenças de fibrinogénio - ISTH.....	12
4- FVIII	13
4.1- FVIII e eventos trombóticos.....	13
5- Estratégias de diagnóstico destas anomalias	14
6- Objetivos	15
Capítulo II – Material e Métodos	17
1- População em estudo.....	19
1.1- Grupo de doentes com hipo/disfibrinogenemia.....	19
1.2- Grupo de doentes com trombose venosa e níveis elevados de FVIII	20
2- Diagnóstico Laboratorial	21
2.1- Estudos funcionais.....	21
2.2- Estudos moleculares	22
2.2.1- Extração de DNA.....	22
2.2.2- Procedimento de Next Generation Sequencing (NGS)	22
2.2.2.1 – Estudos efetuados por NGS	24

2.2.3- Procedimento Multiplex Ligantion-dependent Probe Amplification (MLPA).....	24
2.2.3.1 – Estudos efetuados por MLPA.....	26
2.2.4- Implementação do estudo de hipo/Disfibrinogenemia por MLPA.....	27
2.2.4.1 – Desenho de sondas para os genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i>	27
2.2.4.2 – Preparação das sondas para os genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i>	29
2.2.4.3 – Otimização e validação do procedimento MLPA com as sondas <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i>	30
Capítulo III – Resultados.....	35
1- Grupo de doentes com hipo/disfibrinogenemia.....	37
2- Grupo de doentes com trombose venosa e níveis elevados de FVIII.....	41
Capítulo IV – Discussão de Resultados.....	43
1- Grupo de doentes com hipo/disfibrinogenemia.....	45
2- Grupo de doentes com trombose venosa e níveis elevados de FVIII.....	47
Capítulo V – Conclusão.....	49
Referências Bibliográficas.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da Cascata de Coagulação.....	6
Figura 2: Distribuição pelos genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i> das 1215 variantes reportadas na base de dados GEHT.....	8
Figura 3: Estrutura molecular do fibrinogénio.....	9
Figura 4: A trombina cliva os fibrinopeptídeos A e B das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$, respetivamente, produzindo monómeros de fibrina insolúveis que formam redes de fibrina.....	10
Figura 5: Síntese do Fibrinogénio nos hepatócitos.....	11
Figura 6: Representação do <i>F8</i> constituído por 26 exões e da duplicação em tandem (da região promotora, exão 1 e grande parte do intrão 1) identificada por Simioni et al.	14
Figura 7: Visão geral dos diversos passos envolvidos no workflow do NGS.....	24
Figura 8: Representação esquemática da técnica de MLPA.	26
Figura 9: Constituição de uma sonda de MLPA..	27
Figura 10: Workflow seguido para a preparação da Probemix Final que contém as sondas sintéticas para os genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i> para estudo das amostras dos doentes com hipo/desfibrinogénemia pela técnica de MLPA.....	30
Figura 11: Eletroferograma que representa o resultado onde os picos das sondas <i>FGG</i> se encontram mais elevados.....	31
Figura 12: Eletroferograma da 1ª otimização das sondas sintéticas desenhadas onde os picos do <i>FGG</i> se mantiveram quando comparados com as restantes	32
Figura 13: Otimização da Probemix Básica Sintética, composta por 0,7 μ L das sondas <i>FGG</i> e 0,8 μ L das sondas <i>FGA</i> e <i>FGB</i> .).....	33
Figura 14: Eletroferograma obtido após a 2ª otimização das sondas sintéticas.....	33
Figura 15: Distribuição das 14 variantes identificadas nos genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i> – “cluster” fibrinogénio.....	37
Figura 16: Estudos familiares e identificação dos portadores.....	38
Figura 17: Localização das 14 variantes encontradas nos genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i> e com rebate no cluster fibrinogénio.	39
Figura 18: A- Resultado da análise MLPA obtido pelo programa Coffalyser.Net indicando uma deleção em homozigotia do gene <i>FGA</i>	41
Figura 19: Exemplos de resultados obtidos com base no programa Coffalyser.Net dos doentes de sexo masculino (A) e feminino (B) estudados por MLPA..	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de classificação das doenças congénitas do fibrinogénio estabelecidas pelo ISTH	12
Tabela 2: Dados demográficos e laboratoriais do grupo de indivíduos com hipo/disfibringenémia	20
Tabela 3: Dados demográficos e laboratoriais do grupo de doentes com trombose venosa (TV) e níveis elevados de FVIII	21
Tabela 4: 6 sondas sintéticas - genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i>	28
Tabela 5: Sequências selecionadas para as 6 sondas sintéticas - genes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> e <i>FGG</i>	29
Tabela 6: Descrição das etapas seguidas e quantidades de reagentes usados na realização e otimização das sondas	31
Tabela 7: Catorze variantes diferentes identificadas em 14 famílias (21 indivíduos) com deficiência de fibrinogénio.	38
Tabela 8: Genótipo - fenótipo: correlação por domínios do cluster fibrinogénio, patogenicidade e níveis de FVIII.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ADP	Adenosina difosfato
AT	Antitrombina
BPL	Boas Práticas Laboratoriais
CNV's	Copy Number Variation
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>F8</i>	Gene do Fator VIII
<i>FGA</i>	Gene do fibrinogénio
<i>FGB</i>	Gene do fibrinogénio
<i>FGG</i>	Gene do fibrinogénio
FII	Fator II
FIIa	Fator II ativado
FIX	Fator IX
FIXa	Fator IX ativado
FIXa /FVIIIa	Complexo fator FIXa - factor VII ativado (tenase)
FpA	Fibrinopeptídeo A
FpB	Fibrinopeptídeo B
FT	Fator Tecidual
FT-FVIIa	Complexo fator tecidual - factor VII ativado
FV	Fator V
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII
FVIII/FVW	Complexo do FVIII com o Factor von Willebrand
FVIII:C	Fator VIII plasmático
FVIIIa	Fator VIII ativado
FvW	Fator von Willebrand
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXa /FVa	Complexo fator FXa - factor V ativado(protrombinase)
FXI	Fator XI
FXII	Fator XII

HA	Hemofilia A
HGMD	Human Gene Mutation Database
K ₃ EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
kDa	Kilo Daltons
LHS	Sequência Hibridização da Esquerda
LPO	Sonda Oligonucleotídica da Esquerda
MAF	Minor Allele Frequency
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
NGS	Next Generation Sequencing
Nt	Nucleótido
PAI	Inibidor do Ativador do Plasminogénio
PC	Proteína C
PC-PS	Complexo proteína C-proteína S
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PS	Proteína S
RHS	Sequência de Hibridização da Direita
RPO	Sonda Oligonucleotídica da Direita
RT-PCR	Reação da polimerase em cadeia em tempo real
SNP	Single-nucleotide Polymorphism
TEV	Tromboembolismo Venoso
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TP	Tempo de protrombina
tPA	Ativador tecidual do plasminogénio
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP	Trombose Venosa Profunda
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UFHM	Unidade Funcional de Hematologia Molecular
uPA	Ativador do plasminogénio do tipo uroquinase

RESUMO

Elucidação da correlação genótipo-fenótipo em patologias subdiagnosticadas: Hipofibrinogenemia, Disfibrinogenemia e tendência trombótica por níveis elevados de FVIII

O estudo molecular de doenças hemorrágicas/trombóticas subdiagnosticadas tem sido um desafio muito complexo onde, muitas vezes, não se consegue obter um diagnóstico final. A evolução de metodologias como o MLPA e o NGS vieram introduzir benefícios substanciais na prática clínica no que concerne ao diagnóstico de doenças hematológicas, especialmente em patologias em que existe uma grande heterogeneidade genética por função pleiotrópica das proteínas envolvidas.

Neste estudo pretende-se identificar genótipos associados quer a défices de fibrinogénio quer a eventos trombóticos em idade jovem associados a níveis elevados de FVIII. Recorrendo às mais recentes tecnologias de NGS e MLPA, pretendem-se detetar variantes nos genes, *FGA*, *FGB*, *FGG* e *F8* permitindo uma melhoria na análise da correlação genótipo-fenótipo.

Estudaram-se dois grupos distintos de doentes: um grupo com patologia hemorrágica e/ou trombótica associado a défice de fibrinogénio e outro grupo com história de trombose e níveis elevados de FVIII.

Para o estudo dos genes do fibrinogénio: *FGA*, *FGB* e *FGG*, as amostras de 16 propósitos, e 7 familiares foram analisadas por NGS e MLPA. Os 16 propósitos (8 mulheres, 8 homens), mediana de idade 28 anos (3-58 anos) que apresentavam níveis de fibrinogénio baixo com mediana de 145 mg/dl (intervalo 46-203 mg/dl) ou com suspeita de disfibrinogenémia.

Para o gene *F8* foram estudados pela técnica de MLPA, 30 indivíduos (7 homens e 23 mulheres), mediana de idade 34.5 anos, com história clínica ou familiar de trombose e níveis elevados de FVIII: $176\% \pm 39.5$ (176 - 305%). Estudou-se em simultâneo um grupo controlo de 25 indivíduos com as mesmas características, FVIII $186\% \pm 69$ (150 - 469%) mas com idade superior a 50 anos, mediana 62 (51 - 89 anos).

Através do método de NGS, em 11 dos 16 propósitos (68,75%) foram identificadas variantes que justificavam os fenótipos de hipofibrinogenemia (ligeira, moderada e severa) e disfibrinogenemia. No total, detetaram-se 14 variantes diferentes que apresentavam a seguinte distribuição pelos 3 genes do fibrinogénio: 7 no gene *FGA* (50%); 4 no *FGB* (29%) e 3 no *FGG* (21%). Todas as variantes estavam em heterozigotia sendo a maioria missense: 12 missense (86%), 1 nonsense (7%) e 1 sinónima (7%). De acordo com a literatura, a maioria das variantes patogénicas foram identificadas no gene *FGA* e domínio E do cluster fibrinogénio, tendo sido também neste domínio que se identificaram fenótipos mais severos.

As amostras de 5 propósitos que não apresentaram variantes que justificassem o fenótipo apresentado foram estudadas pela metodologia de MLPA (utilizando-se sondas sintéticas desenhadas e otimizadas neste estudo) para a presença de grandes deleções ou duplicações. No entanto, não foram identificadas deleções/duplicações nos genes *FGA*, *FGB* e *FGG*. Os doentes estudados para a duplicação parcial do gene *F8*, não apresentaram alterações moleculares por MLPA. Contudo, esta estratégia ficou implementada no algoritmo de estudo destas patologias no laboratório.

Este estudo permitiu concluir que embora seja necessário estudar um maior número de indivíduos e famílias os estudos moleculares nos genes do fibrinogénio (*FGA*, *FGB* e *FGG*) e *F8* permitem identificar subgrupos de doentes que se encontram em maior risco de desenvolver eventos hemorrágicos/trombóticos associados a deficiências de fibrinogénio e a níveis elevados de FVIII e, deste modo, permitir medidas profiláticas e um tratamento mais eficaz.

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular; Correlação Genótipo-Fenótipo; MLPA; Deficiências de Fibrinogénio; Níveis elevados de FVIII;

ABSTRACT

Elucidation of genotype-phenotype correlation in underdiagnosed pathologies: Hypofibrinogenemia, Dysfibrinogenemia and thrombotic tendency by increased FVIII levels

The molecular study of underdiagnosed haemorrhagic/thrombotic diseases has been a very complex challenge where a final diagnosis is often not achieved. The development of methodologies such as MLPA and NGS have introduced substantial benefits in clinical practice regarding the diagnosis of haematological diseases, especially in pathologies where there is a great genetic heterogeneity due to the pleiotropic function of the proteins involved.

This study aims to identify genotypes associated with both fibrinogen deficits and thrombotic events at a young age associated with high levels of FVIII. Using the most recent technologies NGS and MLPA, we intend to detect variants in genes, *FGA*, *FGB*, *FGG* and *F8* allowing an improvement in the analysis of the genotype-phenotype correlation.

Two distinct groups of patients were studied: one group with haemorrhagic and/or thrombotic pathology associated with fibrinogen deficit and another group with a history of thrombosis and high levels of FVIII.

For the study of the fibrinogen genes: *FGA*, *FGB* and *FGG*, the samples of 16 probands, and 7 relatives were analysed by NGS and MLPA. The 16 probands (8 women, 8 men), median age 28 years (3-58 years) who had low fibrinogen levels with a median of 145 mg/dl (range 46-203 mg/dl) or suspected dysfibrinogenemia.

For the *F8* gene, 30 individuals (7 men and 23 women) were studied by MLPA technique, median age 34.5 years, with clinical or family history of thrombosis and high levels of FVIII: $176\% \pm 39.5$ (176 - 305%). Simultaneously were studied a control group of 25 individuals with the same characteristics, FVIII $186\% \pm 69$ (150 - 469%) but aged over 50 years, median 62 (51- 89 years).

Using the NGS method, in 11 out of 16 probands (68.75%) variants were identified that accounted for the phenotypes of hypofibrinogenemia (mild, moderate and severe) and dysfibrinogenemia. A total of 14 different variants were detected, distributed among the 3 fibrinogen genes as follows: 7 in the *FGA* gene (50%); 4 in *FGB* (29%) and 3 in *FGG* (21%). All variants were heterozygous and most were missense: 12 missense (86%), 1 nonsense (7%) and 1 synonymous (7%). According to the literature, most pathogenic variants were identified in the *FGA* gene and domain E of the fibrinogen cluster, and it was also in this domain that the most severe phenotypes were identified.

The samples of 5 propensities that did not present variants justifying the phenotype presented were studied by MLPA methodology (using synthetic probes designed and optimised in this study) for the presence of large deletions or duplications. However, deletions/duplications in *FGA*, *FGB* and *FGG* genes were not identified. Patients studied for the partial duplication of the *F8* gene did not show molecular alterations by MLPA. However, this strategy was implemented in the laboratory's algorithm for the study of these pathologies.

This study concluded that although it is necessary to study a larger number of individuals and families, molecular studies in fibrinogen genes (*FGA*, *FGB* and *FGG*) and *F8* allow the identification of subgroups of patients who are at greater risk of developing hemorrhagic/thrombotic events associated with fibrinogen deficiencies and high levels of FVIII and, thus, allow prophylactic measures and more effective treatment.

Keywords: Molecular Diagnosis; Genotype-Phenotype Correlation; MLPA; Fibrinogen Deficiency; High Levels of FVIII;

Capítulo I- Introdução

I - Introdução

A hemostase é um mecanismo de defesa dinâmico, complexo e equilibrado, responsável pelo impedimento da perda sanguínea através da formação de um coágulo nos vasos sanguíneos quando ocorrem lesões endoteliais. Para que tal aconteça, é necessária uma ação conjunta e coordenada dos vasos sanguíneos, plaquetas, células endoteliais e proteínas plasmáticas. (1, 2) O endotélio é uma superfície anticoagulante que reveste o interior dos vasos sanguíneos, mantendo o sangue no seu estado fluido. No entanto, se o vaso sanguíneo for danificado, os componentes da matriz subendotelial são expostos. O equilíbrio funcional da hemostase é garantido por uma variedade de mecanismos, que envolvem interações entre proteínas, respostas celulares complexas e regulação do fluxo sanguíneo.

Desta forma, se alguma das proteínas envolvidas neste processo sofrer uma alteração na sua conformação o sistema fica, desde logo, comprometido.

Este mecanismo divide-se em 3 etapas: hemostase primária, hemostase secundária, ou coagulação, e hemostase terciária, ou fibrinólise. (3)

1.1- Hemostase Primária

Quando ocorre uma lesão vascular, e os componentes da matriz subendotelial ficam expostos, verifica-se numa primeira fase um processo de vasoconstrição que leva a uma redução do fluxo sanguíneo no local lesado. Quando há uma lesão extensa, esta reação vascular impede a exsanguinação. (3)

A diminuição do fluxo sanguíneo permite o contacto das plaquetas e das proteínas plasmáticas procoagulantes. As aminas vasoativas e o tromboxano A₂ (TXA₂) libertado pelas plaquetas são componentes que contribuem para a vasoconstrição.

Assim, neste processo o elemento mais importante são as plaquetas – células pequenas, anucleadas que na sua superfície possuem glicoproteínas essenciais para a ocorrência da sua adesão à matriz subendotelial exposta, e a libertação dos organitos no seu interior permite a ativação e posterior agregação com formação um tampão hemostático primário e instável. (4)

Este processo ocorre através de interações com colagénio, GPIa, GPIb α , GPIIb/GPIIIa, fator von Willebrand (FVW), fibronectina, prostaglandinas, serotonina, ADP, integrinas, e vários outros fatores de ativação. (3,5)

A primeira fase, a adesão plaquetar, caracteriza-se pela ligação das plaquetas às proteínas da matriz subendotelial, incluindo o colagénio, GPIb α e FVW. (3,5)

Numa fase seguinte, ou seja, na fase de ativação plaquetar, ocorre a exposição dos fosfolípidos da superfície celular, o que permite a ativação das proteínas pró-coagulantes. (4)

Por fim, na fase de agregação plaquetar, os recetores GPIIb/GPIIIa da superfície das plaquetas alteram-se, permitindo a ligação do fibrinogénio para o estabelecimento de uma ponte de ligação entre as plaquetas. Para além disso, o ADP libertado do interior das plaquetas promove uma agregação contínua aumentando o tampão hemostático primário instável. (4, 3, 5,6)

Este tampão produzido é consolidado por hemostase secundária que é gerada pela cascata de coagulação proteolítica que consiste numa ativação sequencial por proteólise de vários fatores de coagulação (serinoproteases), que culminam na conversão do fibrinogénio em fibrina pela ação da trombina ativada. (3,5,6)

1.2- Hemostase Secundária

A cascata de coagulação é um conjunto de reações bioquímicas de proteases e cofatores de plasma, que caracteriza a hemostase secundária. Por sua vez, este processo pode ser representado pelo modelo "clássico" das vias extrínsecas e intrínsecas ou pelo modelo atual caracterizado pelas fases de iniciação, amplificação, e propagação da coagulação.

A hemostase secundária foi durante muito tempo representada por um modelo que se designou por “modelo clássico da cascata de coagulação”. Neste modelo, os fatores são ativados sequencialmente por proteólise até que se forme um coágulo de fibrina estável existindo, para tal, duas vias: a Via Intrínseca (ou via de ativação por contacto) e a Via Extrínseca que, quando estimulada, culmina na ativação de uma terceira via – Via Comum. (7)

Apesar, deste modelo suportar muitos estudos laboratoriais e ter ajudado a entender os processos de hemostase secundária, muitos estudos demonstraram que ambas as vias - intrínseca e extrínseca - não funcionam de modo independente, acabando este modelo por não explicar adequadamente como os mecanismos da hemostase *in vivo* ocorrem. (7)

O modelo atual da hemostase secundária, que traduz os mecanismos *in vivo*, consiste em reações reguladas com grande precisão que têm lugar em diferentes superfícies celulares demonstrando como as células são os principais participantes neste processo, dividindo-se em três fases: iniciação, amplificação e propagação. (8, 9)

Neste modelo celular aceita-se que os mecanismos hemostáticos estão associados a três complexos enzimáticos procoagulantes, que envolvem proteínas dependentes de vitamina K (Fatores II, VII, IX e X) associados a dois cofatores (FV e FVIII), todos localizados numa superfície membranar que contém fosfolípidos. (8)

Uma lesão no endotélio vascular permite que ocorra a fase de iniciação deste processo, através da exposição do FT (fator tecidual ou tromboplastina) sintetizado pelas células endoteliais e que atua com o cofator do FVII, ativando-o. (3, 8, 9)

A formação do complexo FT-FVIIa ocorre numa superfície fosfolipídica sendo responsável pelo desencadeamento da ativação dos FIX e do FX.

O FXa une-se ao FII para permitir a formação de trombina (FIIa). O elevado número de plaquetas no local da lesão vascular proporciona uma superfície necessária para a geração de trombina em grandes quantidades. (3, 8, 9)

Para tal, ocorre uma fase de amplificação, onde a trombina produzida durante a primeira fase ativa o FV, que leva ao aumento da atividade da protrombina, e ativa também o FVIII, que é um cofator do FIX. (8, 9)

A ativação destes cofatores permite a formação do complexo protrombinase (constituído pelo FXa em conjunto com o FVa), o qual é responsável pela produção de grandes quantidades de trombina que hidrolisam o fibrinogénio libertando os fibrinopeptídeos A e B. Esta ação permite a formação de monómeros de fibrina e, subsequentemente, através da ativação do FXIII pela trombina, a estabilização dos polímeros de fibrina. (3, 5, 10, 11)

Na fase de propagação é gerado maior quantidade de FIXa que se liga à superfície das plaquetas. O FIXa, na presença de cálcio, liga-se ao cofator FVIIIa formando o complexo tenase. Este é responsável pela acumulação de FX na superfície das plaquetas, ativando-o. (9,12)

Os complexos FIXa/FVIIIa (tenase) e FXa/FVa (protrombinase) acumulados na superfície das plaquetas garantem a produção contínua de grandes quantidades de trombina e, consequentemente, a conversão do fibrinogénio em fibrina, para formar um coágulo sanguíneo. (3, 5, 8)

1.3- Hemostase Terciária

Como foi supramencionado, é importante haver um equilíbrio durante a formação do coágulo de fibrina, de maneira que este não se forme em excesso. A fim de evitar o excesso de trombina e fibrina, os anticoagulantes naturais são ativados durante a geração de trombina e desempenham um papel importante no controlo da cascata de coagulação. A antitrombina, proteína C (PC), e proteína S (PS) são os principais anticoagulantes naturais. (3, 5, 8)

A antitrombina (AT) (responsável pela inativação da trombina através do seu cofator heparina) e a proteína C e o seu cofator proteína S (que através da formação de um complexo PC-PS, induz a fibrinólise através da inativação dos cofatores FV e FVIII). A ação destes

anticoagulantes permite o controlo da produção de trombina, levando a uma redução na formação de polímeros de fibrina. O complexo PC-PS induz a fibrinólise e também evita a acumulação do excesso de fibrina na região lesada. (13, 14)

A fibrinólise é um mecanismo para dissolver a fibrina e reativar o fluxo sanguíneo. Este processo consiste na degradação de polímeros de fibrina através de mecanismos enzimáticos e regulados, que impedem a acumulação dos coágulos nos vasos sanguíneos lesados e a formação de trombos. (15, 16)

Para além disso, destaca-se ainda a principal via proteolítica da fibrinólise – o sistema plasminogénio.

O plasminogénio é uma proenzima inativa precursora da enzima plasmina, catalisadora primária da degradação da fibrina. (17)

A conversão do plasminogénio em plasmina ativa ocorre através dos seus dois ativadores naturais, o Ativador do Plasminogénio Tecidual (tPA) e o Ativador do Plasminogénio do Tipo-Uroquinase (uPA). (6, 18)

A ativação do primeiro leva a uma lise dos coágulos de fibrina, enquanto a ativação do uPA está envolvida em processos de migração celular e oncogénicos.

Para além disso, a proteína C estimula a fibrinólise ao destruir os inibidores plasmáticos de tPA.

No entanto, é necessário um controlo da atividade da plasmina e, para tal, exercem funções o Inibidor do Ativador do Plasminogénio (PAI) e a Antiplasmina, que se ligam ao tPA, impedindo a conversão do plasmingénio em plasmina. (19, 20) (**Figura 1**)

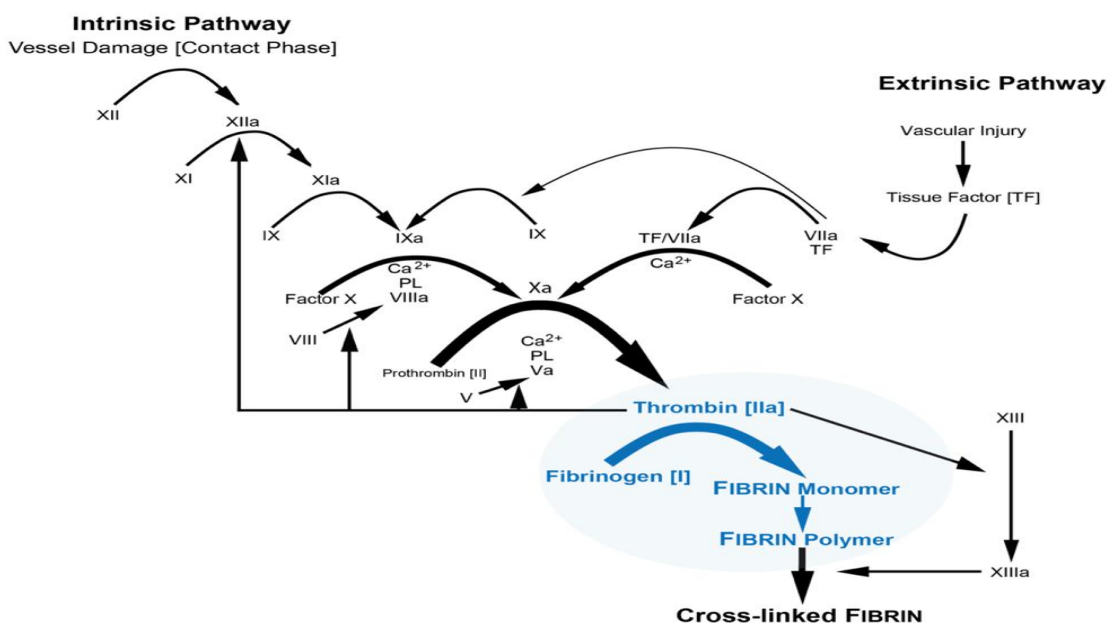


Figura 1: Esquema representativo da Cascata de Coagulação. Retirado de: Sang Medicine (21)

2. Anomalias no sistema hemostático

O sistema hemostático desempenha um papel relevante no equilíbrio entre os mecanismos procoagulante, anticoagulante e fibrinolítico. Anomalias ou défices em cada um destes processos podem desencadear manifestações clínicas caracterizadas por hemorragias de diferentes intensidades e casos de tromboembolismo venoso (TEV). (3, 5, 6, 13)

As manifestações hemorrágicas devem-se, sobretudo, a uma deficiência ou ausência das proteínas de coagulação específicas ou quando as plaquetas se encontram em número reduzido ou num estado anormal, podendo levar ao aumento do tempo de coagulação após uma lesão vascular e, daí, a hemorragias excessivas que possuem gravidade variável. (22)

Por outro lado, o fenótipo trombótico encontra-se associado a deficiências nos anticoagulantes naturais e/ou proteínas envolvidas no processo da fibrinólise, que levam à oclusão dos vasos sanguíneos devido à formação de trombos, a nível arterial ou venoso. Atualmente, estudos demonstram que pode haver uma associação entre níveis elevados de FVIII e FVW e o risco de desenvolver trombozes venosas ou arteriais. Em ambos os fenótipos as doenças podem ser adquiridas ou hereditárias. (23)

No entanto, são vários os casos onde as doenças genéticas são subdiagnosticadas devido ao facto de, por vezes os sintomas se sobreporem a outras doenças, levando a um diagnóstico equivocado, como é o caso das deficiências do fibrinogénio. Por sua vez, o estudo do FVIII é maioritariamente realizado na identificação da Hemofilia A associada a uma escassez nos seus níveis. Por esta razão torna-se parco o número de estudos focados no excesso dos níveis de FVIII.

3. Anomalias associadas a défices de fibrinogénio

As deficiências congénitas do fibrinogénio são muito raras e podem estar associadas a alterações na síntese de proteínas, conformação, estabilidade e/ou moléculas disfuncionais. O fibrinogénio é um hexâmero composto por dois conjuntos de três cadeias homólogas de polipéptidos ($A\alpha$, $B\beta$ e γ) que são codificadas pelos genes *FGA* (NM_000508.3), *FGB* (NM_005141.4) e *FGG* (NM_021870.2), localizados no cromossoma 4. (24, 25, 26)

Consultando a *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/>) e a base de dados *Groupe d'Etude sur l'Hémostase de la Thrombose* (GEHT) (<https://site.geht.org/base-fibrinogene/>), constatamos as variantes heterozigóticas e homozigóticas que se encontram associadas a estes distúrbios hereditários, refletindo a função pleiotrópica do fibrinogénio. (27, 28, 29, 30) Um total de 1215 variantes foram reportadas nos

genes do fibrinogénio, entre os quais 626 se encontram localizadas no gene *FGA*, 154 no *FGB* e 435 no *FGG*, como indicado na Figura 2. (30)

As deficiências congénitas de fibrinogénio são classificadas com base na concentração plasmática como défices quantitativos (tipo I) ou qualitativos (tipo II). O tipo I inclui afibrinogenemia/hipofibrinogenemia grave e hipofibrinogenemia que estão associadas a manifestações hemorrágicas, e que podem variar de leves a muito graves, podendo ser mesmo letais. O tipo II compreende a disfibrinogenemia e a hipodisfibrinogenemia, e os doentes com este tipo de deficiência são assintomáticos ou podem apresentar sintomas hemorrágicos, trombose ou até ambos. (25, 31, 32, 33)

Distribuição Variantes Reportadas

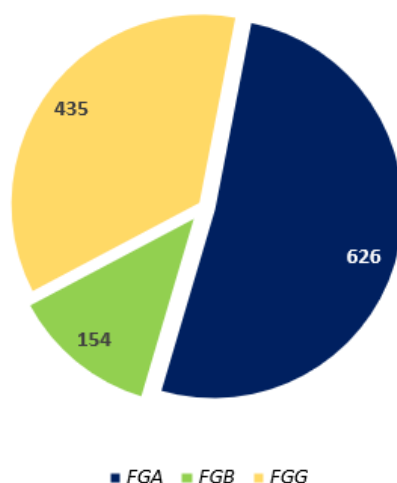


Figura 2: Distribuição pelos genes *FGA*, *FGB* e *FGG* das 1215 variantes reportadas na base de dados GEHT

3.1- Estrutura e função do fibrinogénio

O fibrinogénio é uma glicoproteína plasmática de 340 kDa sintetizada pelo fígado.

Estruturalmente é constituído por 2 monómeros idênticos, cada um constituído por 3 cadeias polipeptídicas: $A\alpha$, $B\beta$ e γ , ligadas entre si através de ligações dissulfeto, que garantem a estabilidade estrutural da molécula. (10, 11, 24, 26, 34, 35, 36, 37)

As letras “A” e “B” das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ designam os fibrinopeptídeos A (FpA) e B (FpB), respetivamente, presentes nas regiões terminais das cadeias. Esta proteína caracteriza-se, ainda, pela sua estrutura simétrica, possuindo uma organização trinodal composta por um domínio central E, que se dimeriza e liga através de um arranjo em superhélice a dois domínios distais D. No domínio central encontram-se localizados os N-terminais das seis cadeias polipeptídicas, incluindo os fibrinopeptídeos A e B, enquanto nos distais se encontram os C-

terminais das cadeias β e γ . É importante mencionar que o C-terminal da cadeia α também se encontra localizado no Domínio E. (10, 11, 34, 35, 36, 37) (Figura 3)

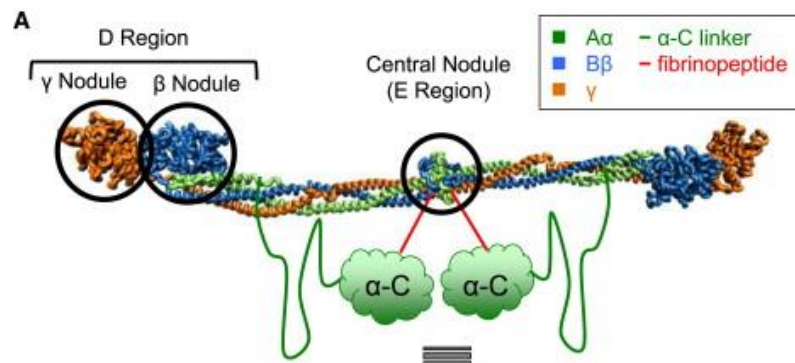


Figura 3: Estrutura molecular do fibrinogênio. Retirado de Guthold et al (38)

Após a clivagem mediada pela trombina do FpA e do FpB dos N-terminais das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$, respectivamente, ocorre a exposição dos locais de polimerização “A” e “B”, que interagem com os seus complementares presentes nos domínios D. (10, 35, 36, 37)

- “A” interage com o seu complementar “a” na cadeia γ ;
- “B” interage com o seu complementar “b” no terminal C da cadeia $B\beta$, levando à formação de fibras associadas lateralmente;

Após a clivagem do FpB e a formação de protofibrilas agregadas lateralmente, os domínios αC dissociam-se um do outro e do domínio central, libertando novos locais críticos para a ligação posterior do plasminogênio e do Fator Ativador do Plasminogênio do tipo tecidual (t-PA). (34)

Os domínios αC ficam livres para formarem associações intermoleculares, os quais melhoram a agregação lateral durante a polimerização da fibrina. (Figura 4)

Assim, durante a polimerização da fibrina, a libertação do FpA ocorre mais rapidamente do que a libertação do FpB, atingindo o seu máximo quando a formação de fibrina está quase completa. Esta diferença resulta na libertação e ativação sequencial dos locais de polimerização, que são necessários para a montagem normal de fibrina. Após a conversão do fibrinogênio em fibrina insolúvel, a estabilização do coágulo ocorre pela atividade do FXIII na presença de cálcio. (10)

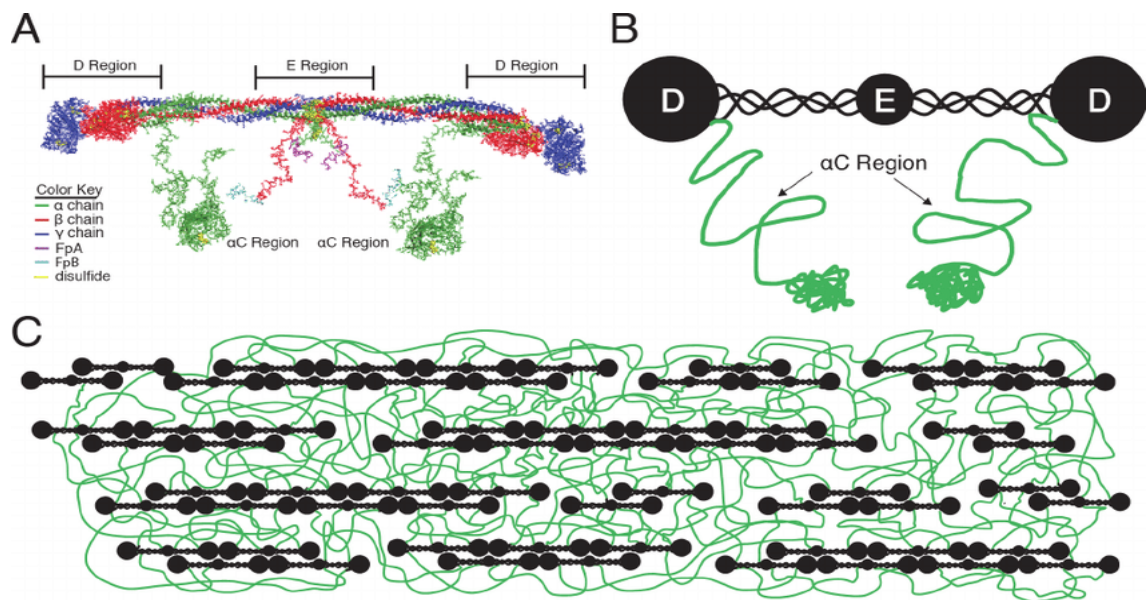


Figura 4: A trombina cliva os fibrinopeptídeos A e B das cadeias A α e B β , respectivamente, produzindo monómeros de fibrina insolúveis que formam redes de fibrina. A região α C (cor verde) é responsável pela formação do polímero de fibrina. Retirado de Bucay et al (34)

3.2 - Síntese do fibrinogénio

A biossíntese do fibrinogénio ocorre principalmente a nível dos hepatócitos. Para tal, no núcleo destas células inicia-se a transcrição das três cadeias polipeptídicas do Fibrinogénio: A α , B β e γ . (39,40)

Já no Retículo Endoplasmático ocorre a formação da molécula hexamérica do fibrinogénio de uma forma coordenada (primeiro formam-se os dímeros A $\alpha\gamma$ e B $\beta\gamma$ e, de seguida, para os trímeros A α B $\beta\gamma$. Por fim, forma-se a estrutura hexamérica (A α B $\beta\gamma$)₂. (39,40)

Posteriormente, este hexâmero migra para o Complexo de Golgi, onde após ocorrerem processos de maturação da proteína esta é libertada para a corrente sanguínea. (39,40) O Fibrinogénio circula no plasma a níveis de 213-422 mg/dl.

Quando existem alterações moleculares nos genes que codificam o fibrinogénio podem resultar em diminuição de síntese ou formação de proteína anómala, ambos os processos conduzem a diminuição dos níveis plasmáticos. Nos défices de proteína anómala, onde estão incluídos os défices conformacionais, a proteína pode ficar retida e não ser secretada para o plasma. Na figura 5 encontra-se representada o processo de biossíntese do fibrinogénio.

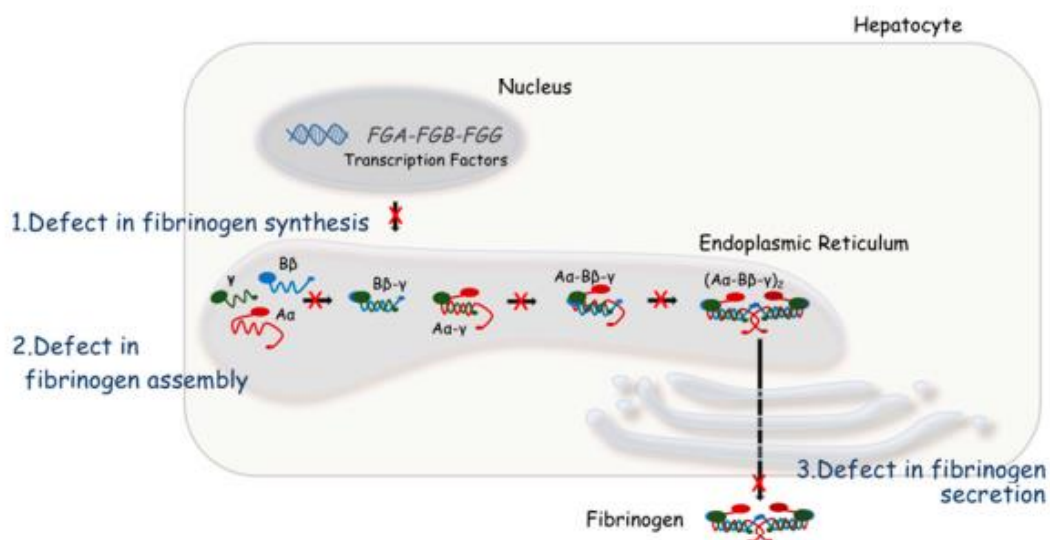


Figura 5: Síntese do Fibrinogénio nos hepatócitos. Retirado de Neerman-Arbez (44)

3.3 - Afibrinogenemia e Hipofibrinogenemia

As manifestações clínicas dos distúrbios quantitativos raros associados ao fibrinogénio são muito heterogéneas. A grande diferença entre estas doenças reside no facto de que, enquanto a afibrinogenemia (OMIM#202400) se trata de uma doença hereditária autossómica recessiva, a hipofibrinogenemia (OMIM#202400) é uma doença dominante. (25, 39, 41, 42)

A afibrinogenemia, caracterizada pela total ausência de fibrinogénio, é a forma mais severa e possui como principais sintomas os episódios hemorrágicos, sendo em 85% dos casos detetada à nascença, devido à hemorragia leve a moderada resultante do corte do cordão umbilical. (25, 38, 39, 41, 42)

Por sua vez, na hipofibrinogenemia, apesar de se caracterizar por baixos níveis de fibrinogénio, o fenótipo é, na sua maioria das vezes, assintomático. (25, 39, 41, 42)

Pese embora estas doenças estarem principalmente associadas a fenótipos hemorrágicos, nos casos de afibrinogenemia e hipofibrinogenemia severa foram relatados eventos trombóticos, descritos tanto a nível arterial como venoso. (42, 43)

3.4 - Disfibrinogenemia e Hipodisfibrinogenemia

A disfibrinogenemia (OMIM#616004) e a hipodisfibrinogenemia (OMIM#616004) são ambas doenças hereditárias autossômicas dominantes. (25, 43, 44, 45,46)

Em qualquer um destes dois distúrbios a maioria dos doentes são assintomáticos podendo, no entanto, as manifestações clínicas ser muito variáveis envolvendo hemorragias, como epistaxis ou hemorragias das mucosas e, no caso da hipodisfibrinogenemia, a ocorrência de hemorragias espontâneas. (25, 36, 42, 44)

No entanto, a estas duas condições também lhes é associada um fenótipo trombótico bem estabelecido e recorrente, tanto a nível arterial como venoso. (35, 42, 44)

3.5- Classificação das doenças do fibrinogénio – ISTH

A *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) reclassificou os critérios para a identificação do tipo e severidade das doenças do fibrinogénio (indicados na Tabela 1), de acordo com o fenótipo clínico e os níveis de fibrinogénio apresentados pelos doentes, permitindo identificar aqueles que se encontram em risco de sofrer complicações quer hemorrágicas quer trombóticas.

Tabela 1: Critérios de classificação das doenças congénitas do fibrinogénio estabelecidas pelo ISTH (47)

Tipos e Subtipos	Descrição
1- Afibrinogenemia	
IA	fenótipo hemorrágico e/ou assintomáticos
IB	fenótipo trombótico
2- Hipofibrinogenemia	
2A. Severa	Níveis de fibrinogénio funcional <0,5 g/L
2B. Moderada	Níveis de fibrinogénio funcional entre 0,5 - 0,9 g/L
2C. Ligeira	Níveis de fibrinogénio funcional entre 1 g/L e abaixo do valor normal
2D. Armazenamento Hepático	Hipofibrinogenemia familiar com acumulação histologicamente comprovada de fibrina nos hepatócitos
3- Disfibrinogenemia	
3A	fenótipo hemorrágico, trombótico ou indivíduos assintomáticos
3B	variante trombótica do fibrinogénio ou sofrem de episódios trombóticos com história trombótica familiar de primeiro grau (familiares com o mesmo genótipo) sem outras consequências trombofílicas
4- Hipodisfibrinogenemia	
4A. Severa	Níveis de antigénio do fibrinogénio < 0,5 g/L
4B. Moderada	Níveis de antigénio do fibrinogénio entre 0,5 - 0,9 g/L
4C. Ligeira	Níveis de antigénio do fibrinogénio entre 1 g/L e abaixo do valor normal limite

4. FVIII

O fator VIII é sintetizado no fígado pelas células endoteliais sinusoidais e circula no sangue com níveis de atividade (FVIII:C) entre 50% e 150%, em conjunto com FVW quando não se encontra na sua forma ativa. Esta associação é importante porque o FVW permite que o tempo de meia vida do FVIII aumente, mantendo-o durante mais tempo na circulação, protegendo-o da proteólise. (23, 48, 49)

Em resposta a uma lesão, o FVIII é ativado e separa-se do FVW. A proteína ativa, o FVIIIa, interage com outro fator de coagulação chamado fator IX, potenciando a sua atividade. Esta interação desencadeia uma cadeia de reações químicas adicionais que culminam com a formação de um coágulo sanguíneo.

O FVIII é codificado pelo gene *F8*, o qual é constituído por 26 exões e se encontra localizado no cromossoma X. (23)

Normalmente, um défice nos níveis de FVIII (FVIII:C <50%) está associado à Hemofilia A (OMIM #306700), um distúrbio hemorrágico hereditário recessivo raro que afeta homens e, muito raramente, mulheres. (23, 50)

4.1. FVIII e eventos trombóticos

Os níveis elevados de FVIII (FVIII:C >150%) têm sido associados a um elevado risco de trombose, podendo estar associadas tanto a trombose venosa como a trombose arterial. (23, 51, 52, 53)

O conceito de estudo de trombofilia foi considerado como a tendência para trombose venosa em idade jovem. Assim, deve ser efetuado o estudo de *screening* de trombofilia em condições específicas que sejam muito sugestivas de hipercoagulabilidade de acordo com as *guidelines* internacionais de consenso propostas pelas várias identidades: *European Genetics Foundation; Cardiovascular Educational and Research Trust; International Union of Angiology e Mediterranean League on Thromboembolism*. (54)

Estas as condições consistem em idade jovem (≤ 50 anos), Trombose Venosa Profunda (TVP) espontânea e recorrente, história familiar de tromboembolismo venoso (TEV), contraceptivos orais e tratamento estroprogestativo, viagens de avião de longo curso, gravidez e resistência à anticoagulação (55)

Num artigo recente, Simioni, P. et al, identificaram uma grande duplicação com ganho de função no gene *F8* (representada na Figura 6), onde os doentes tinham elevados níveis de FVIII e que se encontrava relacionada com a ocorrência de eventos trombóticos, entre os quais, Tromboembolismo Venoso (TEV) e Trombose Venosa Profunda (TVP). (23)

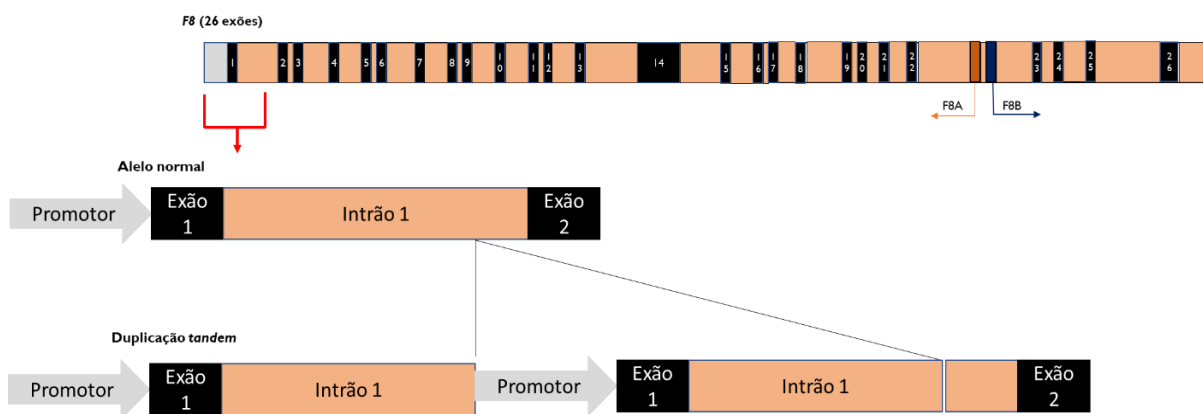


Figura 6: Representação do F8 constituído por 26 exões e da duplicação em tandem (da região promotora, exão 1 e grande parte do intrão 1) identificada por Simioni et al. (23)

5. Estratégias de diagnóstico destas anomalias

As deficiências do fibrinogénio constituem um grupo de doenças hereditárias raras e/ou subdiagnosticadas.

Outra anomalia subdiagnosticada é a duplicação *tandem* identificada por Simioni, P. et al. (23) em doentes que possuem FVIII:C elevados, ou uma história clínica de trombose.

Para se obter um diagnóstico clínico preciso nestes doentes e se conseguir estabelecer uma relação genótipo-fenótipo adequada, é importante compreender a sua base molecular.

Tanto no gene *F8* como nos genes *FGA*, *FGB* e *FGG* existe uma heterogeneidade molecular sendo, por vezes, difícil estabelecer uma relação fenótipo-genótipo.

O desenvolvimento de novas tecnologias ao longo dos últimos anos, a Sequenciação de Sanger, o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e finalmente a *Next Generation Sequencing* (NGS) representam um avanço significativo na elucidação das alterações nestes genes. (56, 57)

O NGS é uma técnica que permitiu a melhoria do diagnóstico das doenças hereditárias, através da sequenciação em simultâneo de painéis de genes selecionados. (56, 57) Esta técnica demonstrou, desde logo, uma mudança de paradigma permitindo, não só, uma melhoria no custo aplicado às técnicas de sequenciação, como também na produção de dados de sequenciação maciços, levando a uma transformação na prática do diagnóstico molecular. (56)

O MLPA consiste numa técnica semi-quantitativa de PCR multiplex, onde se recorre ao uso de uma mistura de sondas, caracterizadas por um alvo e comprimentos únicos, que permite a deteção de grandes *Copy Number Variation* (CNV's), grandes deleções e/ou duplicações parciais de genes em diferentes zonas do genoma. (58, 59)

6. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi em dois grupos de doentes, elucidar a presença de duas anomalias subdiagnosticadas: i) défice de fibrinogénio associado a história clínica de hemorragia e/ou trombose; ii) aumento dos níveis de FVIII associado a história clínica de trombose.

Os objetivos específicos foram detetar variantes nos genes *F8*, *FGA*, *FGB* e *FGG*, associadas a estas anomalias, através do recurso às metodologias de NGS e MLPA. Deste modo, melhorar a análise genótipo-fenótipo, e consequentemente o diagnóstico dos doentes e contribuir para um tratamento mais eficaz.

Capítulo II – Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Toda a componente prática deste trabalho foi realizada na Unidade Funcional de Hematologia Molecular (UFHM), no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

Este trabalho englobou: i) a aprendizagem e execução dos procedimentos de NGS, MLPA e outras metodologias complementares; ii) desenho e otimização de sondas para MLPA; iii) a análise de todas as amostras estudadas e a respetiva correlação genótipo-fenótipo.

I - População em estudo

Este estudo englobou 71 indivíduos não relacionados que foram estudados em 2 grupos distintos: i) 16 indivíduos com suspeita de hipo/disfibrinogenemia que apresentavam história hemorrágica e/ou trombótica ii) 30 indivíduos com trombose venosa em idade jovem e níveis elevados de FVIII.

Este estudo assegura as Boas Práticas Laboratoriais (BPL) e a confidencialidade dos dados obtidos, respeitando os princípios éticos da Declaração de Helsínquia.

I.1 - Grupo de doentes com hipo/disfibrinogenémia

Para este estudo foram selecionados entre janeiro de 2021 e julho de 2022, 23 indivíduos, 16 propósitos e 7 familiares referenciados à UFHM. O grupo de 16 propósitos incluía 8 homens e 8 mulheres, média de idade foi de 28 anos (intervalo de 3-58 anos).

Estes doentes tinham história pessoal e/ou familiar de hemorragia e/ou trombose e apresentavam níveis de fibrinogénio baixo com mediana de 145 mg/dl (intervalo 46-203 mg/dl) ou com suspeita de disfibrinogenémia. As características dos doentes encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Dados demográficos e laboratoriais do grupo de indivíduos com hipo/disfibrinogenemia

ID DOENTE	Sexo	Idade (Anos)	Níveis Fibrinogénio (mg/dL)	Dados Clínicos
P1	M	3	-	Hipofibrinogenemia
P2	F	51	150	Hipofibrinogenemia
P3	M	40	193	Disfibrinogenemia
P4	M	8	125	Hipofibrinogenemia; Trombose antebraço
P5	F	37	185	Disfibrinogenemia; Trombofilia
P6	M	58	46	Hipofibrinogenemia
*P6.1	F	56	65	-
*P6.2	F	53	48	-
P7	F	37	195	Hipofibrinogenemia
P8	F	20	-	Hipo/ Disfibrinogenemia; TVP, sem história de hemorragias anormais
*P8.1	M	26	-	Dificuldade de cicatrização pós-cirurgia, sem outros antecedentes relevantes
*P8.2	F	29	-	Sem antecedentes relevantes
P9	M	16	79	Deficiência de fibrinogénio
*P9.1	F	20	-	-
*P9.2	F	56	-	-
*P9.3	F	22	-	-
P10	F	29	182	Hipofibrinogenemia; Deficiência FXII
P11	F	19	203	Estudo de tendência trombótica
P12	M	44	-	Deficiência de fibrinogénio
P13	M	27	140	Hipofibrinogenemia
P14	F	43	-	Deficiência FVII, PFA prolongado (>200)
P15	M	8	56	Disfibrinogenemia ?
P16	F	24	198	Hipofibrinogenemia

*Estudos familiares; Intervalo normal Fibrinogénio: 213-422 mg/dl; TVP – Trombose Venosa Profunda; PFA – Platelet Function Analyzer

1.2 - Grupo de doentes com trombose venosa e níveis elevados de FVIII

Entre agosto de 2019 e janeiro de 2022 foram selecionados, na UFHM, 30 doentes referenciados com níveis elevados de FVIII.

Foram aplicados os seguintes critérios de inclusão para este estudo:

- i) História pessoal e/ou familiar de trombose venosa
- ii) Idade \leq 50 anos
- iii) FVIII \geq 150 %

O grupo de 30 doentes incluía 7 homens e 23 mulheres, média de idade foi de 34.5 anos (intervalo de 12-49 anos).

O grupo de controlo incluía 25 doentes (11 homens e 14 mulheres) com mais de 50 anos de idade, média de idade foi de 62 anos (intervalo de 51-89 anos).

As características dos doentes para a realização deste estudo retrospectivo encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Dados demográficos e laboratoriais do grupo de doentes com trombose venosa (TV) e níveis elevados de FVIII

ID Doente	Sexo	Idade (anos)	Idade do 1º episódio	História familiar de trombose	FVIII:C (%)	Outros fatores risco de TV relevantes
P1	F	41	35	Sim	172	abortos de repetição
P2	F	75	47		262	
P3	F	37	37	Sim	164	
P4	F	33	19		180	
P5	F	62	25	Sim	165	Htz FV Leiden
P6	F	42	42	Sim	237	
P7	F	28	18	Sim	177	
P8	F	34	29	Sim	174	
P9	F	34	34		191	Htz FV Leiden
P10	M	42	42		305	Htz FV Leiden; doença arterial
P11	F	13	12		180	
P12	F	49	49		167	
P13	F	46	20	Sim	163	Htz FV Leiden
P14	F	36	36	Sim	163	
P15	M	42	41	Sim	166	
P16	F	35	35		186	
P17	M	16	16		156	
P18	F	36	34		155	
P19	F	61	20	Sim	160	
P20	F	43	34	Sim	215	
P21	M	50	49	Sim	180	TA aos 50 anos
P22	F	47	47		199	
P23	M	49	49		158	
P24	M	46	46		180	
P25	F	24	23		156	Htz FV Leiden
P26	F	40	37		175	
P27	F	20	20		250	
P28	M	44	28		170	
P29	F	63	23	Sim	204	
P30	F	38	38		285	

Htz FV Leiden – heterozigótico FV Leiden, polimorfismo associado a trombose venosa em idade jovem; TA- trombose arterial

2 - Diagnóstico laboratorial

2.1- Estudos funcionais

Os testes funcionais de coagulação foram previamente disponibilizados, i.e., já existentes nos processos dos doentes e serviram de suporte para a seleção dos doentes deste estudo.

Os testes de coagulação baseiam-se no tempo que o plasma demora a coagular, permitindo a avaliação a atividade dos diversos fatores de coagulação. Desta forma, consegue-se determinar se um indivíduo possui alterações nos níveis de fibrinogénio e de FVIII.

Para o doseamento dos níveis de FVIII (FVIII:C) recorre-se ao Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (aPTT) onde, através da adição de um ativador de contato, que substitui o fosfolípido necessário da membrana plaquetar, é possível verificar alterações neste fator.

Para o diagnóstico funcional das deficiências de fibrinogénio existem vários métodos que permitem o seu doseamento: Método de Clauss, Ensaio Imunológico e o Tempo de Trombina baseado no fibrinogénio. (42, 46, 60, 61)) No entanto, o primeiro é o mais utilizado por ser considerado o mais sensível. O Método de Clauss é um método quantitativo e funcional, que

utiliza quantidades excessivas de trombina para medir o tempo que demora a conversão do fibrinogénio em fibrina. (61)

2.2- Estudos moleculares

2.2.1- Extração de DNA

Para a realização destes estudos, foram colhidas amostras de sangue total por punção venosa para tubos com ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (K_3EDTA), congeladas a $-20^\circ C$ até se proceder ao isolamento do DNA genómico, no equipamento QIASymphony (QIAGEN).

2.2.2- Procedimento de Next Generation Sequencing (NGS)

A UFHM, utiliza a mais recente tecnologia, o NGS, para o diagnóstico e pesquisa de diversas patologias. O procedimento de NGS (Figura 7) já implementado na UFHM tem as seguintes etapas:

- **Preparação das bibliotecas de DNA**

Quantificação de amostras de DNA com *Qubit™*

- **Amplificação do DNA alvo**

Kit AmpliSeq Library 2.0 (*ThermoFisher Scientific*) (Ion AmpliSeq Hi Fi Mix, Ion AmpliSeq Primer Pool e *Nuclease Free Water*), de forma a preparar pools de primers. (62)

- **Digestão parcial dos primers**

Adição de Enzima FuPa (IonAmpliSeq Library Kit 2.0) - fosforilação dos amplicons (62)

- **Ligação dos amplicons aos adaptadores**

Adição do adaptador PI, o Ion Xpress Barcode, selecionado especificamente para cada amostra estudada e a *nuclease free water*. (62)

Reação de Ligação, a utilização da *Switch Solution* e DNA Ligase fornecidos permitem a Ligação do adaptador PI e dos *barcodes* às amostras em estudo. Os *barcodes* fornecem identidade a cada amostra, permitindo distingui-las aquando do seu agrupamento em pool para a fase do PCR de emulsão.

- **Purificação das bibliotecas**

Purificação da biblioteca não amplificada- adiciona-se o reagente Agencourt AMPure XP (*Beckman Coulter*) a cada biblioteca, homogeneizando no vortex para dispersar as *beads*. Com o auxílio de uma *rack* magnética – *DynaMag* – os *ependorfs* foram incubados até a solução ficar límpida e lavadas em etanol 70% duas vezes.

- **Quantificação das bibliotecas purificadas por qPCR**

Terminada a fase de preparação das bibliotecas, passamos para a sua quantificação, onde se adiciona o tampão *Low TE* (10 mM Tris-HCL, pH=8.0, 1mM EDTA) (*IonTorrent, ThermoFisher Scientific*) às amostras, para dispersar as *beads*, homogeneizando a solução no vortex e colocando os tubos no *DynaMag*. Cuidadosamente é retirado o sobrenadante (bibliotecas) para um novo tubo, diluindo-se com os reagentes fornecidos pelo *Ion Library TaqMan Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific)*, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Cada biblioteca é quantificada em duplicado por Real Time PCR (RT-PCR), no equipamento *QuantStudio5 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific)*. (63)

- **Carregamento dos chips com Ion Chef™ System e Sequenciação massiva no Ion S5™ System**

Após a reação de RT-PCR, as reações de enriquecimento e a carga do chip são efetuadas no *Ion Chef System* e depois sequenciados no *Ion S5 Semiconductor Sequencer*, de acordo com as instruções do fabricante, *ThermoFisher Scientific*.

- **Análise de dados e alinhamento com genoma humano (hg19)**

De seguida, procedeu-se à análise das sequências no *software Ion Reporter* e ao alinhamento das mesmas com o genoma de referência humano.

Da análise dos dados gerados na sequenciação, obteve-se um ficheiro denominado BAM (*Binary Alignment Map*), que continha as sequências alinhadas com a sequência do genoma humano de referência (hg19). Este, foi posteriormente analisado pelo *software Ion Reporter™ Server System*, que permitiu a interpretação dos resultados.

- **Análise *in silico* e critérios de validação ACMG**

A comparação das sequências obtidas com o genoma de referência permite, com o auxílio dos softwares *Varsome, Clinvar* e *Franklin*, classificar as variantes, de acordo com as guidelines internacionais do *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* quanto ao seu valor preditivo de patogenicidade em: 1) patogénica; 2) provavelmente patogénica; 3) significado incerto; 4) provavelmente benigna; 5) benigna. (64)

De forma a poder classificar-se estas variantes são aplicados os seguintes critérios: 1) se se tratar de variante nonsense “stop/frameshift”, é considerada como provável causadora de doença; 2) a existência de cossegregação familiar; 3) se a variante já se encontra previamente identificada em bases de dados internacionais populacionais, e/ ou bases de dados relacionadas com a doença (HGMD); 4) avaliação *in silico* para variantes “missense”. (64)

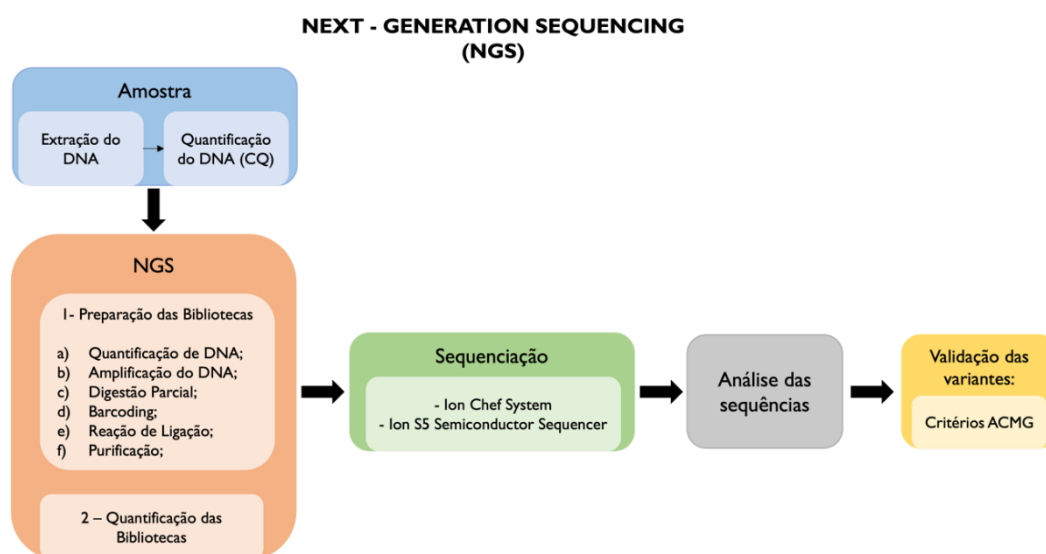


Figura 7: Visão geral dos diversos passos envolvidos no workflow do NGS

2.2.2.1- Estudos efetuados por NGS

Para este estudo recorreremos a um painel de 43 genes, Trombose e Hemostase (TH) que inclui os genes que codificam o fibrinogénio - *FGA*, *FGB*, *FGG* e com o qual se estudou os 16 propósitos com deficiência com suspeita de hipo/disfibrinogenemia.

- Genes associados a anomalias de fatores procoagulantes: *F2*, *F3*, *F5*, *F7*, *F8*, *F9*, *F10*, *F11*, *F13A1*, *F13B*, *LMANI*, *MCFD2*, ***FGA***, ***FGB***, ***FGG***, *GGCX*, *VKORC1*, *VWF*
- Genes associados a trombose: *PROC*, *PROS1*, *SERPINC1*, *SERPINE1*, *SERPINF2*, *THBD*, *PLAT*, *PLG*, *ANXA5*, *PLAU*, *F12*
- Genes associados a anomalias plaquetares: *GPIBB*, *GPIBA*, *GP9*, *ITGA2B*, *ITGB3*, *NBEAL2*, *NBEA*, *GP6*, *TBXA2R*, *P2RY12*, *ANKRD26*, *CYCS*, *PLA2G4A* e *TUBB1*

2.2.3 - Procedimento *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

Sendo considerada uma técnica “gold standard” na genotipagem de doenças, esta consiste na realização de seis etapas: Desnaturação, Hibridização, Ligação, Amplificação, Separação de Fragmentos e Análise de Resultados, realizando-se a partir de uma mistura de sondas específicas (*probemix*), de acordo com o gene que se pretende analisar (Figura 8). (49, 65)

Antes de se iniciar a reação de MLPA, o DNA é quantificado recorrendo ao equipamento Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

- **Desnaturação, Hibridização e Fase de Ligação**

Segundo o protocolo fornecido pela MRC Holland, na primeira fase, o DNA, após ser dissolvido em *Low TE* (10 mM Tris-HCL, pH=8.0, 1mM EDTA) (Ion Torrent, *ThermoFisher Scientific*), é separado em cadeias simples através de elevadas temperaturas. Cada sonda irá hibridizar posteriormente com a sua sequência adjacente, num processo que ocorre durante 16-20 horas. De seguida, as sondas ligam-se enzimaticamente por ação de uma ligase termoestável.

- **Amplificação e análise de sequências**

É nesta fase que se encontra a peculiaridade da técnica, onde o fragmento alvo de amplificação pelo PCR serão as sondas que hibridizam com o DNA. Assim, cada sonda origina um produto amplificado que se pode distinguir através do seu tamanho. Os fragmentos são então separados por Eletroforese Capilar e, numa fase final, analisados com recurso ao programa *Coffalyser.Net*. em que se visualizam o tamanho dos fragmentos por picos cuja altura é proporcional à intensidade de hibridização das sondas (Figura 8).

Nesta última etapa, é feito um controlo de qualidade através de uma normalização das amostras, onde os picos das sondas específicas dos genes de interesse são comparados com os picos das sondas de referência. Esta etapa é realizada porque as condições de hibridização têm que ser favoráveis a todas as sondas para minorar possíveis reações de competição entre elas e os picos de intensidade normalizados. Para além disso, os picos obtidos nas amostras de interesse são, também eles, comparados com os picos obtidos nas amostras controlo (pertencentes a indivíduos saudáveis) estudados na mesma experiência. (65)

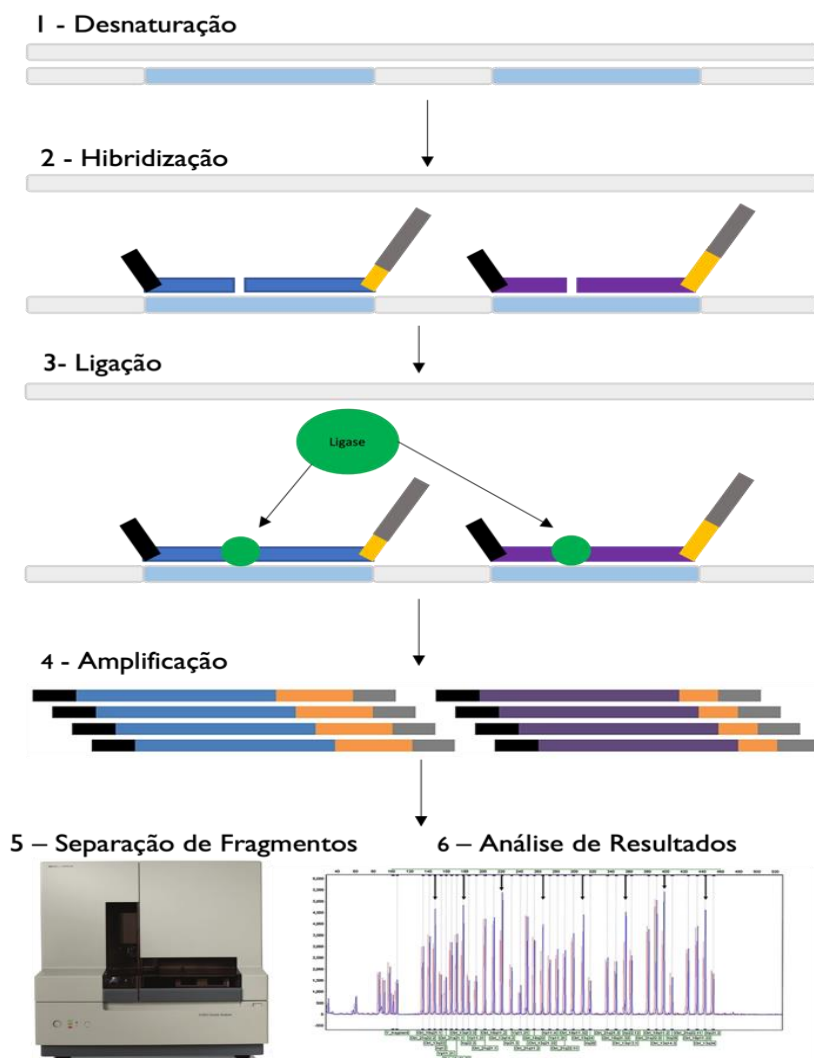


Figura 8: Representação esquemática da técnica de MLPA. Numa primeira fase ocorre a desnaturação do DNA, seguindo-se uma etapa de Hibridização da sonda com o alvo na sequência de DNA. A enzima Ligase, liga cada sonda, levando depois à amplificação destas por PCR. Por fim segue-se a etapa de separação dos fragmentos por eletroforese capilar, sendo as sequências analisadas recorrendo ao programa *Coffalyser.Net*. Adaptado de: Willis et al (2012) (67)

2.2.3.1- Estudos efetuados por MLPA

Esta metodologia foi usada para o estudo dos indivíduos com níveis elevados de FVIII com o kit *probemix P-178 – B4* (Lote B4- 1119) para o gene *F8*, já desenvolvido e disponibilizado pela empresa *MRC Holland* que contém sondas para os 26 exões do gene e 10 sondas de referência dirigidas a outros genes no cromossoma X. (66).

Apesar dos vários kits de sondas que se encontram disponíveis por parte da empresa *MRC Holland*, quando não existem sondas disponíveis para determinados genes que se pretendam estudar, é necessário desenhar sondas sintéticas, como é o caso, por exemplo, dos genes que codificam o fibrinogénio: *FGA*, *FGB* e *FGG*.

2.2.4- Implementação do estudo de hipo/disfibrinogemias por MLPA

2.2.4.1- Desenho de Sondas para os genes *FGA*, *FGB*, *FGG*

Cada sonda é constituída por dois oligonucleótidos- Sonda Oligonucleotídica da Esquerda (LPO) e Sonda Oligonucleotídica da Direita (RPO)- que se encontram adjacentes uma á outra onde cada uma contém uma sequência de hibridização de DNA – Sequência de Hibridização da Esquerda (LHS) e Sequência de Hibridização da Direita (RHS), respetivamente - e uma sequência de *primers* universais em cada extremo. (Figura 9)

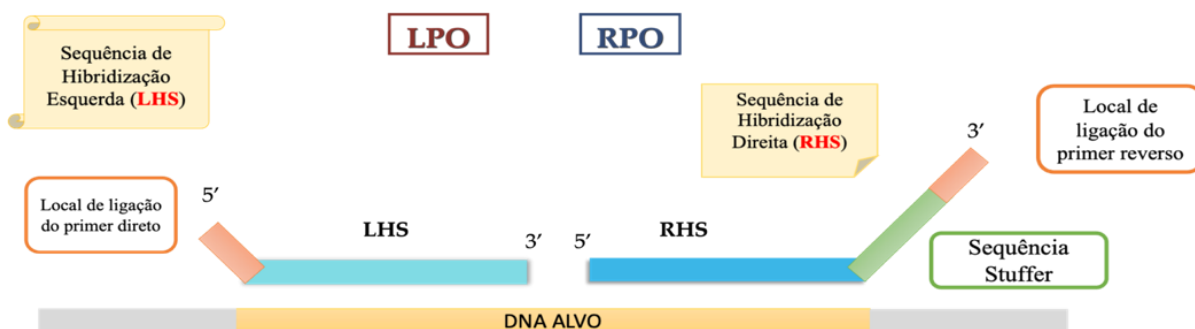


Figura 9: Constituição de uma sonda de MLPA. Adaptado de MRC Holland.

Para além disso, uma das sondas é ainda constituída por uma sequência *stuffer*, que permite tornar as sondas mais longas, fazendo com que se consiga observar a separação dos diferentes fragmentos por Eletroforese Capilar. (68)

Como já foi atrás mencionado, as sondas são constituídas por duas semi sondas LPO e RPO, de tamanho único e diretamente adjacentes uma à outra, cuja função principal é a de hibridizar com o DNA alvo. O LPO é composto por uma Sequência de Hibridização (LHS) e na sua extremidade 5' por uma sequência complementar de pares de *primers* universais LPO: 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'. Por sua vez, o RPO é formado também por uma sequência de hibridização (RHS) e na sua extremidade 3' pela sequência de pares de *primers* comuns RPO: 5' -TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC -3'. De notar que a extremidade 5' da RHS deve encontrar-se fosforilada, de modo a permitir a ação da enzima ligase, que irá conectar as sondas LPO e RPO uma à outra. (68)

Deste modo, somente as sondas que se encontrarem ligadas serão amplificadas via PCR.

Não sendo recomendado o uso das sequências *stuffer* no desenho de sondas sintéticas, o tamanho total do LPO e do RPO, ou seja, o tamanho das sequências de LHS e RHS, juntamente com o comprimento de ambas as sequências de *primers* universais encontra-se limitado, podendo ter um comprimento máximo de 168 nt, mas devendo estar idealmente entre 100 e 140 nt, com uma diferença de tamanho entre cada uma de, pelo menos, 4 nt. (58)

A *probemix* P200-B1, disponibilizada pela mesma empresa compreende, preferencialmente 11 sondas sintéticas podendo, no entanto, ser composta por um máximo de 21 sondas sintéticas. (68,69)

Uma vez que a nossa seleção dos três genes (*FGA*, *FGB* e *FGG*) do fibrinogénio em conjunto continham 23 exões, aplicaram-se determinados critérios para selecionar as sondas que mais nos interessariam desenhar. Dentre os critérios seguidos destacam-se: a sequência alvo deveria, preferencialmente, estar em região codificada, com conteúdo Guanina-Citosina (%GC) aproximadamente de 50%; a temperatura de *melting* (T_m (°C)) de cada sequência deveria ser superior ou igual a 71°C; as sequências deveriam ser preferencialmente únicas para evitar hibridização cruzada e dever-se-iam evitar sequências que contivessem *single-nucleotide polymorphism* (SNP's), em especial na região de ligação, pois a sua presença pode levar à ocorrência de falsos-positivos para deleção. (68)

O Kit SALSA MLPA reagentes EK (constituído pelo SALSA MLPA Buffer, SALSA Ligase-65, SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA PCR Primer MIX e SALSA polymerase), fornece os restantes reagentes necessários para a realização da reação de MLPA. (70)

Cada gene teve exões selecionados com o auxílio de bases de dados disponíveis como o Ensembl 37, o Genome Data Viewer, o Genome Blast, o UNAFold-Mfold-DNA Folding Form e o UCSC Genome Browser.

Na Tabela 4 estão descritas as sondas sintéticas selecionadas, após aplicação dos critérios, e sua localização nos respetivos genes (exões), e na Tabela 5 as sequências escolhidas de cada uma das sondas.

Tabela 4: 6 sondas sintéticas - genes *FGA*, *FGB* e *FGG*

TAMANHO (nt)	GENE	EXÃO
122	<i>FGA</i>	5
126	<i>FGG</i>	1
134	<i>FGG</i>	8
142	<i>FGA</i>	2
154	<i>FGB</i>	3
162	<i>FGB</i>	8

Tabela 5: Sequências selecionadas para as 6 sondas sintéticas - genes *FGA*, *FGB* e *FGG*

GENE	REGIÃO	EXÃO	SEQUÊNCIAS PARA HIBRIDIZAÇÃO	
			ESQUERDA	DIREITA
<i>FGA</i>	04q31.3	2	GCAGATAGTGGTGAAGGTGACTTTCT AGCTGAAGGAGGAGGCGTGCGTGGC	CCAAGGGTTGTGGAAAGACATCAA TCTGCCTGCAAAGATTCCAGACTGGC
<i>FGA</i>	04q31.3	5	CCTGATGGTCACAAAGAAGTT ACCAAAGAAGTGGTGACCTCC	GAAGATGGTTCTGACTGTC CCGAGGCAATGGATTTAGG
<i>FGB</i>	04q31.3	3	GCCAATCAGAAATAGTGTTGATGAGTTAA ATAACAATGTGGAAGCTGTTTCCAGACC	TCCTCTTCTTCTTTCAGTACATGTATT TGCTGAAAGACCTGTGGCAAAAGAGG
<i>FGB</i>	04q31.3	8	GGTGGTATAATAGATGTCATGCAGCCAATCC AAACGGCAGATACTACTGGGGTGGACAGTAC	ACCTGGGACATGGCAAAGCATGGCACAGA TGATGGTGTAGTATGGATGAATTGGAAGG
<i>FGG</i>	04q32.1	1	CGTGATCAGCTCCAGCCATTTG CAGTCCTGGCTATCCCAGGAGC	TTACATAAAGGGACAATTGG AGCCTGAGAGGTGACAGTGC
<i>FGG</i>	04q32.1	8	CCTGAAGCTGACAAGTACCGCCTA ACATATGCCTACTTCGCTGGTGGG	GATGCTGGAGATGCCTTTGATG GCTTTGATTTTGGCGATGATCC

2.2.4.2- Preparação das sondas para os genes *FGA*, *FGB*, *FGG*

Seguindo as instruções indicadas no protocolo disponibilizado pela empresa MRC Holland, procedeu-se à preparação destas para se poderem testar em indivíduos saudáveis e, posteriormente, nos doentes selecionados.

Num primeiro passo, as 6 sondas para os genes *FGA*, *FGB* e *FGG* foram centrifugadas e dissolvidas em *Low TE* (10 mM Tris-HCL, pH=8.0, 1mM EDTA) (Ion Torrent, *ThermoFisher Scientific*) para uma concentração de 100 µM, sendo colocadas de seguida no agitador durante aproximadamente 3h. Posto isto, voltou-se a realizar uma dissolução com *Low TE* (10 mM Tris-HCL, pH=8.0, 1mM EDTA) (Ion Torrent, *ThermoFisher Scientific*), para se obter uma solução de 500 µL com uma concentração de 1 µM.

De seguida, preparou-se a *Probemix* Básica Sintética uma solução de 200 µL, onde se adicionou **0,8 µL de cada uma das sondas** e se fez com *Low TE* (10 mM Tris-HCL, pH=8.0, 1mM EDTA) (Ion Torrent, *ThermoFisher Scientific*) até ao volume pretendido.

Por fim, preparou-se a *Probemix* Final, onde por cada reação se combinou 0,5µL da *Probemix* Básica Sintética, com 1 µL da *Probemix* P200. Um esquema dos passos seguidos para a preparação da *Probemix* Final encontra-se representado na Figura 10.

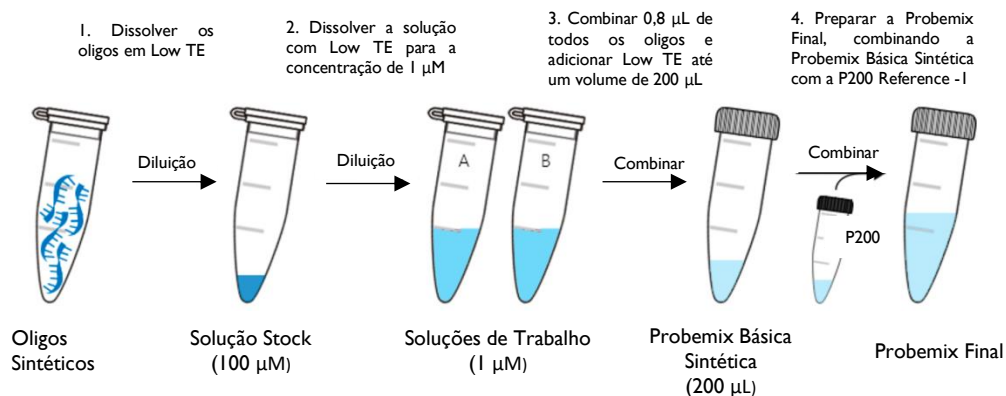


Figura 10: Workflow seguido para a preparação da *Probemix Final* que contém as sondas sintéticas para os genes *FGA*, *FGB* e *FGG* para estudo das amostras dos doentes com hipo/disfibrinogénia pela técnica de MLPA. Retirado e adaptado de MRC Holland (68)

2.2.4.3- Otimização e validação do procedimento MLPA com as sondas *FGA*, *FGB* e *FGG*

Uma primeira etapa de aplicação das sondas consistiu na num ensaio de MLPA em indivíduos fenotipicamente saudáveis.

As quantidades usadas foram as mencionadas no protocolo fornecido pela empresa *MRC Holland* (65) para se obter um volume final de 50 µL, de acordo com a Tabela 6.

Relativamente ao programa utilizado para análise dos resultados (*Coffalyser.Net*) foi necessário acrescentar à folha da referência da P200 fornecida pela *MRC Holland*, os dados relativos às 6 sondas sintéticas com o gene, exão, localização do gene e tamanho da sonda desenhada.

Tendo as sondas sintéticas hibridizado, ligado e amplificado com o DNA dos indivíduos saudáveis, constatou-se que o procedimento de MLPA com estas sondas estava implementado. No entanto, tal como indicado na Figura I I, as sondas relativas ao gene *FGG* encontravam-se com picos com uma altura mais elevada quando comparadas com as sondas desenhadas para o gene *FGA* e *FGB*, e foi necessário efetuar a otimização deste procedimento.

Tabela 6: Descrição das etapas seguidas e quantidades de reagentes usados na realização e otimização das sondas

Etapa	Procedimento de acordo com o protocolo	1ª Otimização – alterações quantidades reagentes	Programas
	Descrição	Descrição	
1- Desnaturação	Dissolver o DNA quantificado em Low TE;		Colocar no termociclador a 98°C durante 7 min;
2- Hibridização	Adicionar 3 µL da solução composta por: 0,5 µL da <i>Probemix</i> Básica Sintética; 1 µL da <i>Probemix</i> P200; 1,5 µL de <i>MLPA Buffer</i> , por reação;	1,5 µL da solução composta por: 0,25 µL da <i>Probemix</i> Básica Sintética; 0,5 µL da <i>Probemix</i> P200; 0,75 µL de <i>MLPA Buffer</i>	Incubar 1 min a 95°C e hibridizar durante 17h30min a 60°C;
3- Ligação	A uma temperatura de 54°C adicionar 32 µL da solução constituída por: 3 µL de <i>Ligase Buffer A</i> , 3 µL <i>Ligase Buffer B</i> ; 25 µL água ultrapura e 1 µL da enzima <i>Ligase 65</i> , por reação;	16 µL da solução constituída por: 1,5 µL de <i>Ligase Buffer A</i> , 1,5 µL <i>Ligase Buffer B</i> ; 12,5 µL água ultrapura e 0,5 µL da enzima <i>Ligase 65</i>	Incubar durante 15 min a 54°C, e aquecer durante 5 min a 98°C;
4- Amplificação	Adicionar 10 µL, por reação, da Mistura Polimerase composta por: 7,5 µL água ultrapura, 2 µL <i>Primer PCR</i> e 0,5 µL de <i>SALSA Polimerase</i> ;	5 µL , por reação, da Mistura Polimerase: 3,25 µL água ultrapura, 1 µL <i>Primer PCR</i> e 0,25 µL de <i>SALSA Polimerase</i> ;	35 ciclos: 95°C - 30 seg; 60°C - 30 seg; 72°C- 1 min; Após os 35 ciclos: 72°C - 20 min; diminuindo depois para 15°C;
5- Separação de Fragmentos	Pipetar para uma placa de 96 poços 0,7 µL do produto PCR		
	Adicionar a cada produto PCR 9,1 µL de Formamida e 0,2 µL de <i>Gene Scan Size Standard 500 LIZ</i> (<i>AppliedBiosystems, ThermoFisher Scientific</i>),		
	Centrifugar a placa e desnaturar durante 10 min;		
6- Análise de Dados	Analisar os resultados com recurso ao programa <i>Coffalyser.Net</i> (<i>MRC Holland, Amsterdam, Holland</i>);		

Etapas com alteração de quantidade reagentes diminuídos a 50% assinaladas a cinza; numa segunda alteração foram efetuadas alterações das quantidades relativas da sonda *FGG* na mistura *Probemix* Básica Sintética*.

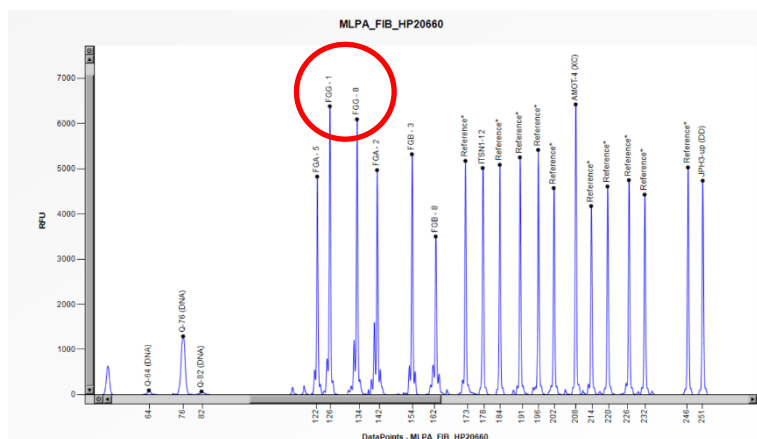


Figura 11: Eletoferograma que representa o resultado onde os picos das sondas *FGG* se encontram mais elevados

Dada as alturas das sondas *FGG* serem mais elevadas, numa primeira tentativa de otimização reduziram-se para metade as quantidades (indicadas no protocolo de MLPA fornecido pela empresa MRC Holland) dos reagentes fornecidos pelo KIT SALSA MLPA EK (Tabela 6).

Verificou-se que os picos relativos às sondas do gene *FGG* continuaram elevados relativamente às duas sondas sintéticas do gene *FGA* e às duas sondas sintéticas do gene *FGB*. (Figura 12)

Dessa forma, foi necessário recorrer a uma segunda otimização por forma a tentar reduzir a altura dos picos sondas *FGG*, e obter uma uniformização de todas as sondas como é indicação do procedimento MLPA.

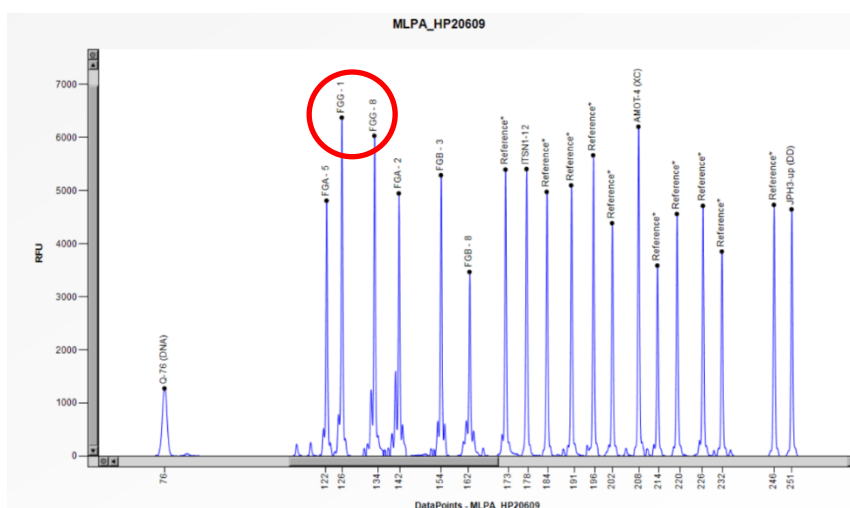


Figura 12: Eletroferograma da 1ª otimização das sondas sintéticas desenhadas onde os picos do *FGG* se mantiveram quando comparados com as restantes

A 2ª otimização, introduziu-se uma segunda alteração que consistiu na redução relativa da quantidade de sondas *FGG* utilizadas na preparação da *Probemix* Básica Sintética. (tabela 6 e Figura 13)

Após a preparação da solução de *Probemix* Final, voltou-se a realizar a reação de MLPA nos mesmos indivíduos saudáveis.

Capítulo III - Resultados

I- Grupo de doentes com hipo/disfibrinogenémia

O presente estudo incluiu um grupo de 16 indivíduos com deficiência de fibrinogénio de diferentes regiões de Portugal. No total foram estudados, 23 indivíduos pertencentes a 16 famílias (7 familiares).

O método NGS detetou 14 variantes diferentes cuja frequência em diferentes populações estudadas apresentaram uma *Minor Allele Frequency* (MAF) <0.01 (tabela 7).

As 14 variantes encontradas apresentavam a seguinte distribuição pelos 3 genes do fibrinogénio: 7 no gene *FGA* (50%); 4 no *FGB* (29%) e 3 no *FGG* (21%) (Figura 15). Todas as variantes estão em heterozigotia sendo a maioria *missense*: 12 *missense* (86%), 1 *nonsense* (7%) e 1 sinónima (7%).

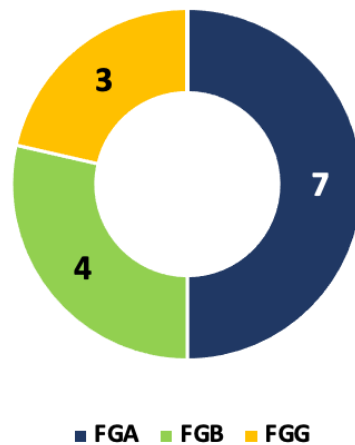


Figura 15: Distribuição das 14 variantes identificadas nos genes *FGA*, *FGB* e *FGG* – “cluster” fibrinogénio

O valor preditivo de patogenicidade, segundo os critérios ACMG, obtido da consulta das várias plataformas *in silico* (Varsome, ClinVar, Franklin) e na base de dados ligadas à patologia, Human Gene Mutation Database (HGMD) (27,28, 29) foi o seguinte: 6 (42,8%) patogénicas; 2 (14,2%) prováveis patogénicas; 2 (14,2%) de significado incerto e 4 (28,5%) benignas.

Sete das 14 variantes (50%) não se encontravam referenciadas nas bases de dados populacionais, HGMD ou publicações e foram definidas como “novas” (tabela 7).

Tabela 7: Catorze variantes diferentes identificadas em 14 famílias (21 indivíduos) com deficiência de fibrinogênio. Distribuição pelos genes do fibrinogênio (*FGA*, *FGB* e *FGG*), tipo de variante com avaliação da patogenicidade utilizando a classificação ACMG e segregação familiar

Doentes	Gene	Exão	Alteração Nucleótido	Alteração Aminoácido	Domínio	Zigotia	Classificação ACMG	Propósito/familiares	Descrita/nova
P12	<i>FGA</i>	2	c.103C>T	p.Arg35Cys	E	HTZ	P	1/0	Galanakis et al (71)
P15	<i>FGA</i>	2	c.104G>A	p.Arg35His	E	HTZ	P	1/0	Higgins et al (72)
P6	<i>FGA</i>	3	c.191G>A	p.Cys64Tyr	E	HTZ	P	1/2	Hanss et al (73)
P9	<i>FGA</i>	5	c.544G>C	p.Gly182Arg	α C	HTZ	P	1/2	Nova
P10	<i>FGA</i>	5	c.633C>G	p.Asp211Glu	α C	HTZ	PP	1/0	Nova
P1, P7	<i>FGA</i>	5	c.991A>G	p.Thr331Ala	α C	HTZ	B	2/0	Carter et al (74)
P16	<i>FGA</i>	5	c.1025G>A	p.Gly342Glu	α C	HTZ	VSI	1/0	Nova
P2	<i>FGB</i>	4	c.567C>T	p.Ser189=	E	HTZ	B	1/0	Nova
P14	<i>FGB</i>	6	c.931G>T	p.Asp311Tyr	D	HTZ	VSI	1/0	Nova
P13	<i>FGB</i>	7	c.1104C>G	p.Tyr368*	D	HTZ	P	1/0	Nova
P2	<i>FGB</i>	8	c.1433G>A	p.Arg478Lys	D	HTZ	B	1/0	Ajjan et al (75)
P5	<i>FGG</i>	4	c.323C>G	p.Ala108Gly	E	HTZ	PP ^{a)}	1/0	Brennan et al (76)
P11	<i>FGG</i>	6	c.571G>A	p.Gly191Arg	D	HTZ	B ^{b)}	1/0	Chinni et al (77)
P8	<i>FGG</i>	8	c.952G>A	p.Gly318Ser	D	HTZ	P	1/3	Nova

P- Patogénica, PP- Provável Patogénica; VUS – Variante Significado Incerto; B- Benigna;

^{a)} A Variante *FGG* p. Ala108Gly está descrita como Significado Incerto no Varsome, mas no Franklin é descrita como Provavelmente Patogénica.

^{b)} A variante *FGG* p. Gly191Arg, apesar de classificada como Benigna pelas bases de dados Varsome e Franklin (considerada como polimorfismo funcional), tem sido identificada em indivíduos com tendência trombótica.

Em 3 famílias, (P6, P8 e P9) foi possível evidenciar a segregação destas variantes em 7 familiares portadores (Figura 16)

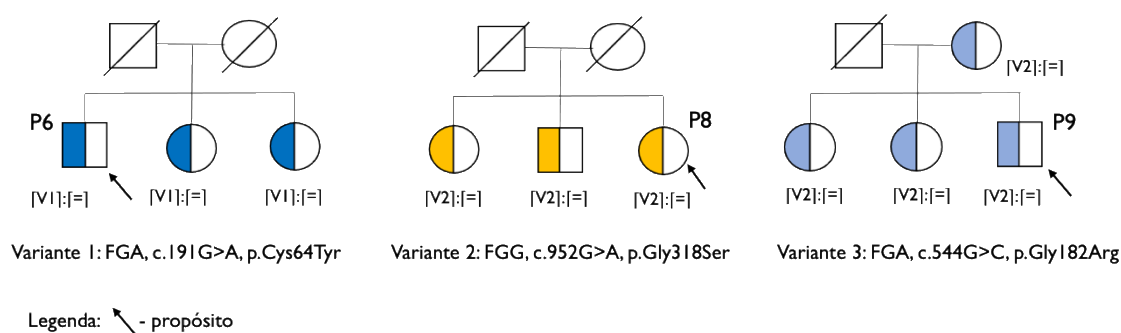


Figura 16: Estudos familiares e identificação dos portadores.

A distribuição das variantes encontradas pelos exões dos respetivos genes *FGA*, *FGB* e *FGG* está representada na Figura 17A. No gene *FGA* das 7 variantes detetadas, 5 (71%) estão localizadas no exão 5. Nos outros genes não se verificou um *hotspot* de variantes.

Também foi possível observar que as variantes encontradas codificam aminoácidos que estão distribuídos pelos três domínios do *cluster* fibrinogénio (Figura 17B). As alterações com rebote no domínio α C estão todas localizadas no exão 5 do gene *FGA*.

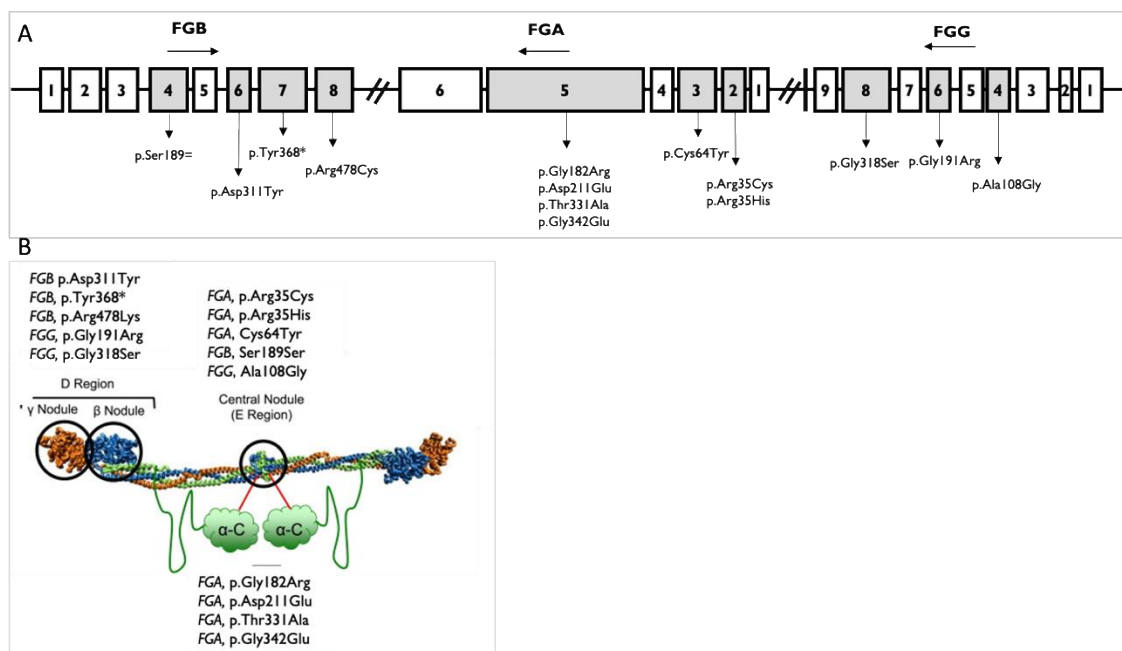


Figura 17: Localização das 14 variantes encontradas nos genes *FGA*, *FGB* e *FGG* e com rebote no cluster fibrinogénio. A - Os genes encontram-se representados por ordem do centrómero para o telómero, com o *FGB* a ser transcrito no sentido direto e o *FGA* e *FGG* no sentido reverso. Os exões sombreados a cinza representam os locais onde foram detetadas variantes. **B** - Distribuição das 14 diferentes variantes encontradas pelos 3 domínios do cluster do fibrinogénio (D, E, α C). Dependendo da localização e do tipo de variante encontrada, as deficiências do fibrinogénio podem resultar em diversas manifestações clínicas. Adaptado de De Moerloose et al (45) e Guthold et al (38)

A análise da correlação por domínios do cluster fibrinogénio, patogenicidade e níveis de fibrinogénio revelou: as variantes patogénicas estão maioritariamente no domínio E e os níveis de fibrinogénio observados são os mais baixos. (Tabela 8)

Tabela 8: Genótipo - fenótipo: correlação por domínios do cluster fibrinogénio, patogenicidade e níveis de Fibrinogénio.

Doentes	Gene	Exão	Alteração Nucleótido	Alteração Aminoácido	Domínio	Clas. ACMG	Fib. mg/dl	Fib. mg/dl SD, intervalo
P12	<i>FGA</i>	2	c.103C>T	p.Arg35Cys	E	P	180	150±67.5 (46-182)
P15	<i>FGA</i>	2	c.104G>A	p.Arg35His	E	P	56	
P6	<i>FGA</i>	3	c.191G>A	p.Cys64Tyr	E	P	46	
P2	<i>FGB</i>	4	c.567C>T	p.Ser189=	E	B	150	
P5	<i>FGG</i>	4	c.323C>G	p.Ala108Gly	E	PP	185	182±49.7 (79-198)
P9	<i>FGA</i>	5	c.544G>C	p.Gly182Arg	αC	P	79	
P10	<i>FGA</i>	5	c.633C>G	p.Asp211Glu	αC	PP	182	
P1, P7	<i>FGA</i>	5	c.991A>G	p.Thr331Ala	αC	B	180, 195	
P16	<i>FGA</i>	5	c.1025G>A	p.Gly342Glu	αC	VSI	198	
P14	<i>FGB</i>	6	c.931G>T	p.Asp311Tyr	D	VSI	180	180±25 (140-203)
P13	<i>FGB</i>	7	c.1104C>G	p.Tyr368*	D	P	140	
P2	<i>FGB</i>	8	c.1433G>A	p.Arg478Lys	D	B	150	
P11	<i>FGG</i>	6	c.571G>A	p.Gly191Arg	D	B	203	
P8	<i>FGG</i>	8	c.952G>A	p.Gly318Ser	D	P	180	

Clas. – classificação; Fib.- Fibrinogénio; SD- Desvio padrão; Intervalo normal Fibrinogénio:213-422 mg/dl;

Nos doentes P3 e P4, não foram encontradas alterações moleculares que justificassem os níveis diminuídos de fibrinogénio e a patologia associada. Nos doentes P1, P2 e P7 embora fossem detetadas variantes, estas são benignas e, deste modo, não justificam o fenótipo.

Desta forma, as amostras destes 5 doentes foram estudadas por metodologia MLPA, para detetar possíveis deleções ou duplicações nos genes *FGA*, *FGB* e *FGG*.

Assim, foram usadas as sondas sintéticas desenhadas especificamente e otimizadas neste estudo para os genes do fibrinogénio juntamente com a *Probemix P200* (que contém sondas de referência). Usaram-se os seguintes controlos: i) como controlo positivo a amostra conhecida de um indivíduo com afibrinogénemia, deleção total do gene *FGA*; ii) controlos para normalização, quer intra, quer inter-amostra, o DNA genómico de 3 indivíduos sem história trombótica e/ou hemorrágica.

Após análise dos dados obtidos com recurso ao programa *Coffalyser.Net*, não se encontraram alterações moleculares, i.e, deleções ou duplicações nos genes *FGA*, *FGB* e *FGG*. (Figura 18A e 18B)

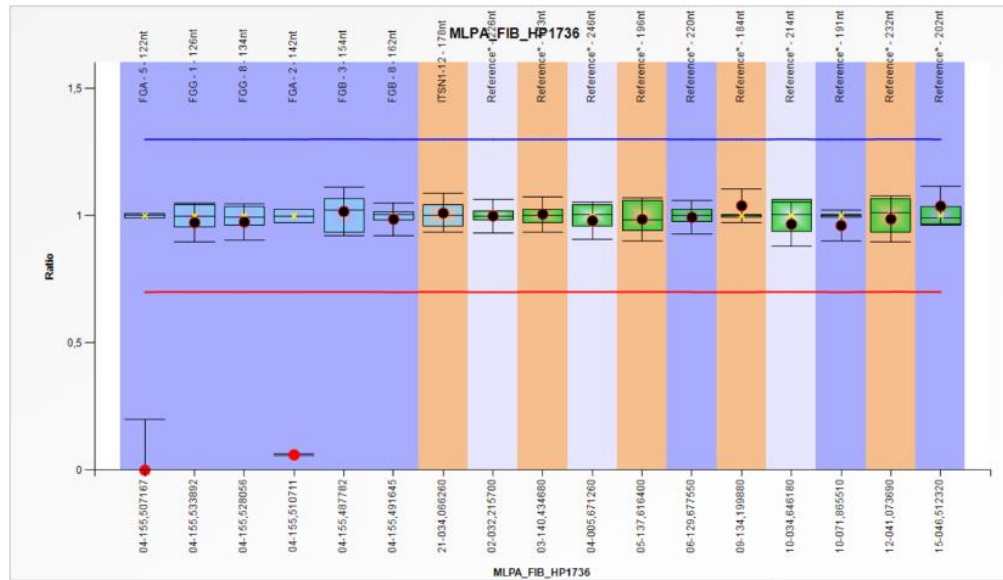
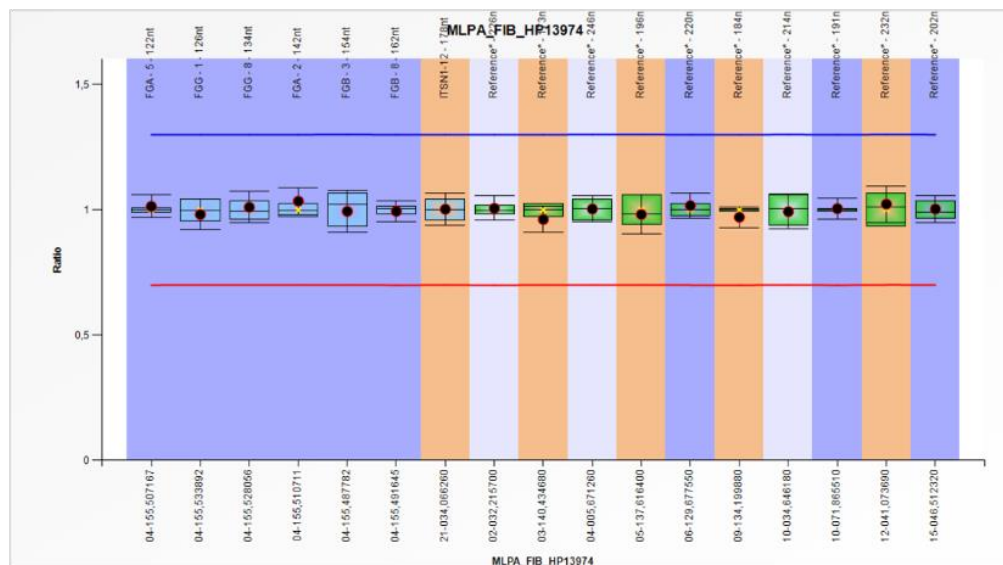
A**B**

Figura 18: A- Resultado da análise MLPA obtido pelo programa *Coffalyser.Net* indicando uma deleção em homozigotia do gene *FGA*.

B - Resultado obtido para os 5 doentes referenciados com défice de fibrinogénio. Todos os indivíduos estudados apresentam um padrão normal ($1 \pm 0,5$);

2- Grupo de doentes com trombose venosa e níveis elevados de FVIII

Este estudo efetuou-se para avaliar se num grupo de doentes os níveis de FVIII elevados, seriam fator de risco para trombose venosa em idade jovem e eventualmente associados a duplicações da região promotora do gene *F8*. O estudo molecular foi realizado em 30 indivíduos, com história pessoal e/ou familiar de trombose, com uma média de idades ao primeiro episódio de 34.5 anos, que possuíam níveis elevados de FVIII $176\% \pm 39.5(176 - 305\%)$.

Estudou-se em simultâneo um grupo controlo de 25 indivíduos com as mesmas características, FVIII 186% \pm 69 (150 – 469%) mas com idade superior a 50 anos, mediana 62 (51- 89 anos).

Foi utilizada a *probemix* SALSA P178 - B4 1119 (*MRC Holland*) do FVIII que contém sondas para os 26 exões do gene e 10 sondas de referência dirigidas a outros genes no cromossoma X. (66)

Caso os picos obtidos nos doentes em estudo, normalizados com as sondas de referência, se encontrem na razão 1.0 significa que estes possuem uma cópia normal, enquanto se apresentarem a razão 1.5 (em indivíduos do sexo feminino) e 2.0 (em indivíduos do sexo masculino) indicam a existência de uma duplicação. (Figura 19A e Figura 19B) (23, 78)

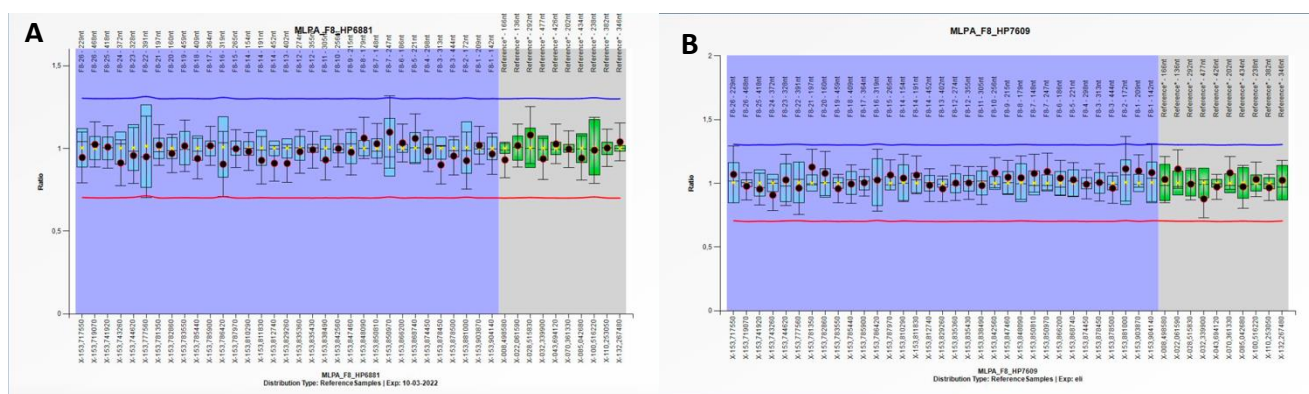


Figura 19: Exemplos de resultados obtidos com base no programa *Coffalyser.Net* dos doentes de sexo masculino (A) e feminino (B) estudados por MLPA. Todos os indivíduos são normais, tendo em conta que os picos se encontram na sua totalidade a 1,0 (razão controlo/amostra 1,0 +- 0,5). Caso houvesse duplicação o pico dos indivíduos de sexo masculino encontrar-se-ia a 1,5, enquanto o pico das doentes de sexo feminino se encontraria a 2,0.

Após análise dos dados obtidos com recurso ao programa *Coffalyser.Net*, não se encontraram alterações moleculares, i.e., duplicações na região promotora do gene do *F8*.

Capítulo IV – Discussão de Resultados

I- Grupo de doentes com hipo/disfibrinogenémia

As doenças associadas a défices de fibrinogénio são consideradas raras e subdiagnosticadas. Estas podem ser do tipo quantitativo (afibrinogenemia/hipofibrinogenemia grave e hipofibrinogenemia) ou qualitativo (disfibrinogenemia e hipodisfibrinogenemia). (25, 31, 32, 33)

O presente estudo teve como objetivo identificar variantes nos vários genes que codificam o fibrinogénio: *FGA*, *FGB* e *FGG*, num grupo de 23 indivíduos, pertencentes a 16 famílias não relacionadas, de forma a permitir uma melhoria na correlação genótipo-fenótipo.

As 14 variantes identificadas encontravam-se todas em heterozigotia e, tal como estabelecido na literatura, a maioria era do tipo *missense* (86%) e localizava-se no gene *FGA* (50%).

Para além disso, metade das variantes identificadas nos indivíduos estudados não se encontravam previamente descritas nas bases de dados GEHT e HGMD confirmando, deste modo, a heterogeneidade existente nas alterações moleculares das doenças associadas à deficiência de fibrinogénio.

Segundo a classificação ACMG e, em 3 casos, de acordo com a segregação familiar, 42,8% das variantes identificadas eram patogénicas, demonstrando não só a importância das diversas funções do fibrinogénio, mas também das interações complexas do fibrinogénio com outras moléculas. (40)

De acordo com Casini et al (79), variantes associadas a casos de hipofibrinogenemia encontram-se localizadas, na sua maioria, nos domínios D.

A variante recorrente p.Cys64Tyr (*FGA* exão 3), localizada no domínio E e identificada no propósito e nos 2 familiares estudados, é responsável por uma alteração da conformação e secreção da proteína, causando um decréscimo nos níveis de fibrinogénio e estando, por este motivo, associada a casos de hipofibrinogenemia severa.

O exão 5 do gene *FGA* encontra-se localizado no domínio α C, importante na agregação lateral dos monómeros de fibrina. Variantes descritas neste domínio ocorrem, principalmente, em locais de ligação do FXIII, responsável pela estabilidade do coágulo sanguíneo. As novas variantes identificadas p.Asp211Gly (provável patogénica) e p.Gly342Glu (significado incerto) descrevem fenótipos de hipofibrinogenemia ligeira. Por sua vez, a variante patogénica p.Gly182Arg, identificada no propósito e nos 3 familiares estudados, está associada a casos de hipofibrinogenemia moderada.

Entre as variantes identificadas no gene *FGB*, a nova variante *missense* p.Asp311Tyr (exão 6), classificada como significado incerto, e a nova variante *nonsense* p.Tyr368* patogénica e localizada no exão 7 alteram a estrutura do domínio D, levando a uma redução da secreção

da molécula de fibrinogénio. Desta forma, estas variantes encontram-se associadas a casos de hipofibrinogenemia ligeira.

A variante recorrente identificada no exão 4 do gene *FGG* (p.Ala108Gly), classificada como provável patogénica, e localizada no domínio E, representa casos de hipofibrinogenemia ligeira a moderada. De acordo com Zdziarska et al (80), esta variante situa-se no local de ligação do domínio E aos domínios D, levando a que a troca da glicina por um aminoácido alanina altere a estrutura molecular do fibrinogénio.

Apesar da variante p.Gly191Arg (*FGG* exão 6) se encontrar classificada como benigna pelas bases de dados consultadas (GEHT e HGMD), esta tem sido identificada em indivíduos com tendência trombótica. Este resíduo é responsável pelas características conformacionais do fibrinogénio, principalmente na estrutura do domínio D. Outras variantes descritas neste aminoácido estão associadas a casos de hipofibrinogenemia. (77)

Com base nestes dados, a maioria das variantes patogénicas foram identificadas no domínio E, tendo sido também neste domínio que se identificaram fenótipos mais severos.

Vários estudos reportam que aproximadamente 85% dos casos de disfibrinogenemia dizem respeito a variantes que se encontram localizados no exão 2 do gene *FGA* e no exão 8 do gene *FGG*. Segundo Richard et al (60), o exão 8 do gene *FGG* codifica os resíduos do local complementar "a" (Phe314-Thr324, Trp334-Trp349, e Trp354-Asn384), os quais têm uma importância primordial na polimerização da fibrina.

Os hotspots patogénicos p.Arg35Cys e p.Arg35His localizados no gene *FGA* exão 2 - domínio E - correspondem a variantes que afetam o local de clivagem do FpA pela trombina, enquanto que a nova variante patogénica p.Gly318Ser, identificada no propósito e nos dois familiares estudados, e localizada no exão 8 do gene *FGG* – domínio D - afeta as interações entre os domínios D e o domínio E. Deste modo, estas variantes estão associadas a casos de disfibrinogenemia. (36,46,81)

As diferentes variantes identificadas nos genes *FGA*, *FGB* e *FGG* demonstram que estas se encontram associadas a diferentes fenótipos, refletindo assim, a função pleiotrópica desta proteína (82)

Dois dos doentes estudados não apresentaram variantes que justifiquem o fenótipo apresentado. Para além disso, as variantes *missense* p.Arg478Lys, p.Thr331Ala e a variante sinónima p.Ser189=, identificadas em três indivíduos e classificadas como benignas, não explicam os baixos níveis de fibrinogénio apresentados por estes doentes.

Assim, utilizando a metodologia MLPA e as sondas sintéticas desenhadas e otimizadas neste estudo para os genes *FGA*, *FGB* e *FGG*, as amostras destes 5 doentes foram estudadas para detetar possíveis grandes deleções ou duplicações.

Todos os doentes apresentaram uma razão de $1.0 \pm 0,5$, não tendo sido identificadas alterações moleculares. Este resultado pode dever-se ao facto de as sondas sintéticas utilizadas não cobrirem todos os exões dos genes *FGA*, *FGB* e *FGG*. Dado que o desenho das sondas se mostrou eficaz é necessário prosseguir e desenhar as restantes de modo a cobrir toda a extensão dos 3 genes.

Na amostra do doente com afibrinogenemia, utilizado como controlo positivo, foi possível observar-se a deleção do gene *FGA* esperada. A presença desta deleção indica que as sondas funcionam e permitem a identificação de grandes deleções associadas aos genes *FGA*, *FGB* e *FGG*.

Desta forma, para futuros estudos é necessário alargar o número de sondas de maneira que todos os exões dos genes *FGA*, *FGB* e *FGG* fiquem cobertos por esta metodologia.

2- Grupo de doentes com trombose venosa e níveis elevados de FVIII

Os elevados níveis de FVIII (>150%) correspondem a um fator de risco bem estabelecido para TEV. Apesar disto, as bases moleculares relativas ao aumento destes níveis não se encontram estabelecidas, pensando-se que exista uma influência tanto de fatores hereditários como adquiridos. (23,83,84)

Simioni et al (23) identificou uma duplicação *em tandem* da porção proximal do gene *F8* (região promotora, exão 1 e grande parte do intrão 1) responsável pelos níveis elevados de FVIII.

Neste estudo retrospectivo, foram estudadas 30 amostras de doentes caracterizados com idade jovem, FVIII:C elevados (>150%) e história pessoal ou familiar de trombose.

Para além disso, foi estudado um grupo controlo constituído por doentes com idade superior a 50 anos e FVIII:C elevados, tendo, por este motivo, uma maior predisposição para a ocorrência de eventos trombóticos.

Todas as amostras dos indivíduos estudados (quer doentes quer grupo controlo) apresentaram uma cópia normal do gene *F8*, uma vez que na análise MLPA se observou uma razão de $1,0 \pm 0,5$, não apresentando duplicações na região promotora.

Catorze dos doentes estudados apresentavam história familiar de trombose. Desta forma, pode encontrar-se associado um carácter hereditário para a ocorrência dos eventos trombóticos apresentados por estes em idade jovem.

Para além disso, cinco doentes eram portadores da heterozigotia para FV Leiden, polimorfismo responsável pelo aumento do risco de trombose em idade jovem (85).

Vários estudos salientam o facto de indivíduos do sexo feminino, terem uma maior incidência de níveis de FVIII e, conseqüentemente, uma maior probabilidade de TEV. (86,87) Tal, também se constata nesta coorte, uma vez que mais de metade (~77%) é do género feminino.

Para se conseguir caraterizar a possível correlação entre os níveis elevados de FVIII, o risco de trombose venosa em idade jovem e a eventual duplicação parcial do gene *F8* identificada por Simioni et al., (23) a realização de investigações posteriores com um maior número de doentes e famílias são necessárias.

CAPÍTULO V - CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O estudo molecular de doenças hemorrágicas/trombóticas subdiagnosticadas tem sido um desafio muito complexo, moroso e dispendioso, não se conseguindo obter, nalguns casos, um diagnóstico final. A implementação das técnicas de NGS e MLPA permitiu a resolução de limitações associadas a metodologias já existentes.

Contudo, quando o diagnóstico molecular é realizado, os fenótipos dos doentes podem ser extremamente variáveis, abrangendo desde a ausência de sintomas até eventos hemorrágicos/trombóticos severos.

Neste estudo foram caracterizadas as alterações moleculares de 23 indivíduos pertencentes a 16 famílias não relacionadas, com défices de fibrinogénio. Em 18 doentes foi possível identificar, pela metodologia NGS, variantes que justificam o fenótipo associado. Tal como descrito na literatura, a maioria das variantes identificadas localizava-se no gene *FGA* e era do tipo *missense*. Relativamente às variantes patogénicas, estas foram identificadas em maior número no domínio E, tendo sido também neste domínio que se identificaram os fenótipos mais severos.

Apesar de nas amostras dos 5 doentes estudados por MLPA com a aplicação de sondas sintéticas desenhadas e otimizadas não terem sido detetadas alterações, este estudo permitiu otimizar uma técnica que fica disponível no algoritmo de estudo do laboratório.

Para além disso, estudou-se um segundo grupo de 30 doentes com níveis elevados de FVIII, na tentativa de se estabelecer uma correlação com eventos trombóticos e a possível existência de uma duplicação. Pela metodologia MLPA, não foi possível identificar nenhuma alteração molecular associada ao fenótipo apresentado pelos doentes, i.e., não foi identificada nenhuma duplicação da região promotora do *F8*.

A realização de estudos moleculares num maior número de indivíduos e famílias é necessário, podendo auxiliar na identificação de subgrupos de doentes que se encontram em maior risco de desenvolver eventos hemorrágicos/trombóticos associados a deficiências de fibrinogénio e a níveis elevados de FVIII e, deste modo, permitir medidas profiláticas e um tratamento mais eficaz.

Referências bibliográficas

1. SHAPIRO, A. D. - Platelet function disorders. *Haemophilia*, 6(s1) (2000) 120–127.
2. KICKLER, T. S. - Platelet biology an overview. *Tranfusion Alternatives in Transfusion Medicine*, 8 (2) (2006) 79-85.
3. HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. - Fundamentos de hematologia. Artmed Editora, 2018, ISBN:9788582714508. p. 265-275.
4. PERIAYAH M.; HALIM A.; MAT SAAD, A. - Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* (2017)11:319–327.
5. BROSS, K. et al. - Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 25, (2011) 155-167
6. GALE, A. - Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol. Pathol.* 39 (2011), 273-280.
7. O'DONNELL, J.; O'SULLIVAN, J.; PRESTON, R. - Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *British Journal of Haematology.* (2019)
8. MACKMAN, N.; TILLEY, R.; KEY, N. - Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8) (2007), 1687–1693.
9. VERSTEEG, H. et al - New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*, 93(1), (2013). 327–358.
10. MOSESSON, M. W. - Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8) (2005) 1894–1904.
11. SORIA, J. et al - Fibrinogen α C domain: Its importance in physiopathology. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 3(2), (2019) 173–183.
12. HOFFMAN, M. - Platelet-dependent action of high-dose factor VIIa. *Blood*, 100(1), (2002), 364a–366.
13. GOMEZ, K. - Tissue Factor Initiated Blood Coagulation. *Frontiers in Bioscience*, 11(1), (2006) 1349.
14. DAHLBÄCK, B.; VILLOUTREIX, B. O. - The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Letters*, 579(15), (2005) 3310–3316.
15. LASNE, D.; JUDE, B.; SUSEN, S. - From normal to pathological hemostasis. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien D'anesthésie*, 53(S2), (2006) S2–S11.
16. HOOVER-PLOW. - Does plasmin have anticoagulant activity? *Vascular Health and Risk Management*, 199. (2010).

17. ROMÁN, Á. M. T.; ORTEGA, S. I. - Hemostasia y trombosis en la práctica clínica (Spanish Edition) (1st ed.). Ergón Creación, S.A. (2018).
18. CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. - Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*, 29(1), (2015) 17–24.
19. CESARMAN-MAUS, G., & HAJJAR, K. - Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*, 129(3), (2005) 307–321.
20. NAPOLITANO, F.; MONTUORI, N - The Role of the Plasminogen Activation System in Angioedema: Novel Insights on the Pathogenesis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(3), (2021) 518.
21. SANG MEDICINE - A Practical Guide to Hemostasis. <https://practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/fibrinogen.html> (Acedido em: Novembro 2021)
22. AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY - Bleeding Disorders. <https://www.hematology.org/education/patients/bleeding-disorders> (Acedido em: Fevereiro 2022)
23. SIMIONI, P. et al - Partial *F8* gene duplication (Factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia. *Blood*. (2020)
24. RIEDEL, T. et al - Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood*, 117(5), (2010) 1700–1706.
25. DORGALALEH, A.; CASINI, A.; RAHMANI, P. - Congenital Fibrinogen Disorders. *Congenital Bleeding Disorders*, 163–181. (2018).
26. NEERMAN-ARBEZ, M. - Molecular Basis of Fibrinogen Deficiency. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 35(1-2), (2006) 187–198.
27. HGMD® gene result. - The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Retrieved 2022, from <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=FGA> (2020).
28. HGMD® gene result. - The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Retrieved 2022, from <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=FGB> (2020).
29. HGMD® gene result. - The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Retrieved 2022, from <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=FGG> (2020).
30. GROUPE D'ETUDE SUR L'HÉMOSTASE DE LA THROMBOSE (GEHT).- Human fibrinogen database. (<https://site.geht.org/base-fibrinogene/>) (2021).

31. VILAR, R. et al - Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica*, haematol. 2019.23690 (2020).
32. ASSELTA, R.; DUGA; S.TENCHINI, M. L.- The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(10), (2006) 2115–2129.
33. NEERMAN-ARBEZ, M., DE MOERLOOSE, P., & CASINI, A. - Laboratory and Genetic Investigation of Mutations Accounting for Congenital Fibrinogen Disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(04), (2016) 356–365.
34. BUCAY, I. et al - Physical Determinants of Fibrinolysis in Single Fibrin Fibers. *PLOS ONE*, 10(2), (2015) e0116350.
35. MIESBACH, W., et al - Inherited dysfibrinogenemia: clinical phenotypes associated with five different fibrinogen structure defects. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 21(1), (2010) 35–40.
36. SHAPIRO, S. et al - Clinical phenotype, laboratory features and genotype of 35 patients with heritable dysfibrinogenaemia. *British Journal of Haematology*, 160(2), (2012) 220–227. DOI:10.1111/bjh.12085
37. SUGO, T., et al. - A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(8), (2006) 1738–1746.
38. GUTHOLD, M.; CHO, S. - Fibrinogen unfolding mechanisms are not too much of a stretch. *Structure*, 19(11), (2011) 1536–1538.
39. DE MOERLOOSE, P.; NEERMAN-ARBEZ, M.; CASINI, A. - Clinical Features and Management of Congenital Fibrinogen Deficiencies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(04), (2016) 366–374.
40. SIMURDA, T., et al - Genetic Variants in the FGB and FGG Genes Mapping in the B and F Nodules of the Fibrinogen Molecule in Congenital Quantitative Fibrinogen Disorders Associated with a Thrombotic Phenotype. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), (2020) 4616.
41. STANG, L. J.; MITCHELL, L. G. - Fibrinogen. *Methods in Molecular Biology*, (2013) 181–192.
42. TISCIA, G., & MARGAGLIONE, M. - Human Fibrinogen: Molecular and Genetic Aspects of Congenital Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), (2018). 1597.
43. DE MOERLOOSE, P.; NEERMAN-ARBEZ, M.; CASINI, A. - Clinical Features and Management of Congenital Fibrinogen Deficiencies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(04), (2016) 366–374.
44. NEERMAN-ARBEZ, M.; CASINI, A. - Clinical Consequences and Molecular Bases of Low Fibrinogen Levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), (2018) 192.

45. DE MOERLOOSE, P.; CASINI, A.; NEERMAN-ARBEZ, M. - Congenital Fibrinogen Disorders: An Update. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39(06), (2013). 585–595.
46. CASINI, A., et al - Dysfibrinogenemia: from molecular anomalies to clinical manifestations and management. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(6), (2015) 909–919.
47. CASINI, A. et al - Diagnosis and Classification of Congenital Fibrinogen Disorders: Communication From the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2018, 16, 1887–1890.
48. PAN, J. et al. - Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood*, 128(1), (2016) 104–109.
49. SHAHANI, T. et al - Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(1), (2014) 36–42.
50. NATIONAL HEMOPHILIA FOUNDATION - Hemophilia A. <https://www.hemophilia.org/bleeding-disorders-a-z/types/hemophilia-a>. (Acedido em: Fevereiro 2022)
51. JENKINS, P. et al - Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. *British Journal of Haematology*, 157(6), (2012) 653–663.
52. SHEN, W. et al - Copy number variations of the F8 gene are associated with venous thromboembolism. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(4), (2013) 259–262.
53. OTA, S. et al - High Plasma Level of Factor VIII. *Circulation Journal*, 75(6), (2011). 1472–1475.
54. NICOLAIDES, AN et al. - Thrombophilia and venous thromboembolism. International Consensus Statement. Guidelines according to scientific evidence. *Int Angiol.* (2005) ;24(1):1–26.
55. KREIDY, R.; SALAMEH, P.; WAKED, M. - Lower extremity venous thrombosis in patients younger than 50 years of age. *Vascular Health and Risk Management*, 8(1), (2012) 161–167.
56. WANG, D. et al - Molecular Genetics Analysis of 70 Chinese Families With Muscular Dystrophy Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Next-Generation Sequencing. *Frontiers in Pharmacology*, 10. (2019).
57. MUZZEY, D.; EVANS, E. A.; LIEBER, C. - Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Current Genetic Medicine Reports*, 3(4), (2015) 158–165.
58. MRC HOLLAND (2022). MLPA General Protocol. Versão 008- 6 de Maio 2022 (Acedido em: Maio 2022). Disponível na Internet: <https://support.mrcholland.com/downloads/files/mlpa-general-protocol-one-tube/download>

59. STUPPIA, L. et al - Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), (2012). 3245–3276.
60. RICHARD, M.; CELENY, D.; NEERMAN-ARBEZ, M. - Mutations Accounting for Congenital Fibrinogen Disorders: An Update. *Semin Thromb Hemost.* Jan 24 (2022)
61. STANG, L. J.; MITCHELL, L. G. - Fibrinogen. *Methods in Molecular Biology.* (2013) 181–192.
62. THERMOFISHER SCIENTIFIC - Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 User Guide. (Acedido em: junho 2022). Disponível na Internet: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0006735_AmpliSeq_DNA_RNA_LibPrep_UG.pdf
63. THERMOFISHER SCIENTIFIC - Ion Library Taqman Quantitation Kit 2.0 User Guide. (Acedido em: junho 2022). Disponível na Internet: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0015802_IonLibrary_Taqman_Quantitation_Kit_UG.pdf
64. RICHARDS, S.; et al - Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), (2015) 405–424.
65. MRC HOLLAND (2022). - MLPA General Protocol. Versão 008- 6 de Maio 2022 (Acedido em: Maio 2022). Disponível na Internet: <https://support.mrcholland.com/downloads/files/mlpa-general-protocol-one-tube/download>
66. MRC HOLLAND (2022) - Product Description SALSA MLPA Probemix P178 – F8. (Acedido em: Março 2022). Disponível na Internet: <https://www.mrcholland.com/products/31475/Product%20description%20P178-B4%20F8-v02.pdf>
67. WILLIS, A.; VEYVER, I.; ENG, C. - Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 32(4), (2012) 315–320.
68. MRC HOLLAND. (2018).- Designing Synthetic MLPA Probes and Probemixes. Versão 4 – Novembro 2018 (Acedido em: Dezembro 2021). Disponível na Internet: <https://support.mrcholland.com/downloads/files/designing-synthetic-mlpa-probes/download>
69. MRC HOLLAND. (2020) - Product Description SALSA MLPA Probemix P200- B1 Reference-I. (Acedido em: Dezembro 2021). Disponível na Internet: <https://www.mrcholland.com/products/26495/Product%20description%20P200-B1%20Reference-I-v01.pdf>

70. MRC HOLLAND. (2021) - Product Description SALSA MLPA Reagent Kit. (Acedido em: dezembro 2021). Disponível na Internet: <https://www.mrcholland.com/files/products/reagents/Product%20description%20SALSA%20MLPA%20Reagent%20Kit-v06.pdf>
71. GALANAKIS DK; SPITZER S; SCHARRER I. - An unique dysfibrinogenemic family: Aa 16Arg- Cys accompanied by lack of normal Aa chains in fibrinogen from two of the four probands. *Blood Coagul Fibrinolysis* (1993) 4:67–71.
72. HIGGINS, D; SHAFER J - Fibrinogen Petoskey, a dysfibrinogenemia characterized by replacement of Arg-A alpha 16 by a histidyl residue. Evidence for thrombin-catalyzed hydrolysis at a histidyl residue. *J Biol Chem* (1981)
73. HANSS M et al. - The natural occurrence of human fibrinogen variants disrupting inter-chain disulfide bonds (AalphaCys36Gly, AalphaCys36Arg and AalphaCys45Tyr) confirms the role of N-terminal Aalpha disulfide bonds in protein assembly and secretion. *Haematologica* (2011);96(08):1226–1230
74. CARTER, A. M.; CATTO, A. J.; & GRANT, P. J. - Association of the -Fibrinogen Thr312Ala Polymorphism With Poststroke Mortality in Subjects With Atrial Fibrillation. *Circulation*, 99(18), (1999) 2423–2426.
75. AJJAN, R et al - Common variation in the C-terminal region of the fibrinogen -chain: effects on fibrin structure, fibrinolysis and clot rigidity. *Blood*, 111(2), (2008) 643–650.
76. BRENNAN, S. O. et al - Hypofibrinogenemia in an individual with 2 coding (γ 82 A→G and B β 235 P→L) and 2 noncoding mutations. *Blood*, 95(5), (2000). 1709–1713.
77. CHINNI, E. et al - Identification of novel mutations in patients with fibrinogen disorders and genotype/phenotype correlations. *Blood Transfus.* (2018). 17(3): 247–254.
78. ROST, S. et al - Detection of large duplications within the α Ctor VIII gene by MLPA. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(11), (2008) 1996–1999.
79. CASINI, A. et al – Mutational epidemiology of congenital fibrinogen disorders. *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 118, no. 11 (2018) p. 1867-1874
80. ZDZIARSKA, J. et al - Severe bleeding and miscarriages in a hypofibrinogenemic woman heterozygous for the γ Ala82Gly mutation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 20(5), (2009) 374–376.
81. SMITH, N. et al - Identification and characterization of novel mutations implicated in congenital fibrinogen disorders. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. (2018)

82. PARABOSCHI, E.; DUGA, S.; & ASSELTA, R. - Fibrinogen as a Pleiotropic Protein Causing Human Diseases: The Mutational Burden of A α , B β , and γ Chains. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), (2017) 2711
83. BERGER, M. - High factor VIII levels in venous thromboembolism show linkage to imprinted loci on chromosomes 5 and 11. *Blood*, 105(2), (2005). 638–644.
84. ALBERT NE; HAMARICH AY; JOSHI A. - Elevated factor VIII: an unfamiliar risk factor for cerebral venous thrombosis. *J Am Osteopath Assoc*; (2012) 112 (3) 140-141
85. KUJOVICH JL. - Factor V Leiden Thrombophilia. 1999 May 14 [Updated 2018 Jan 4]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/>
86. KHANDELWAL, D., et al - Elevated factor VIII levels and arterial stroke: a review of literature with a case report. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 57(1). (2021).
87. BIGUZZI, E. et al - Increasing levels of von Willebrand Factor and factor VIII with age in patients affected by von Willebrand disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. (2020).