

Departamento de Genética Humana do INSA pioneiro na caracterização molecular de patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias na população portuguesa

Department of Human Genetics of INSA, a pioneer in the molecular characterization of inherited bleeding and thrombotic disorders in the Portuguese population

Isabel Moreira^{1,2}, Célia Ventura^{1,3}, Rita Certã², João Gonçalves², Dezsó David^{1,3}

isabel.moreira@insa.min-saude.pt

(1) Sector de Trombose e Hemostase. Laboratório de Biologia Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Reconhecendo a importância e o impacto das patologias hemorrágicas hereditárias na saúde humana, o Departamento de Genética Humana (DGH) do INSA foi o primeiro laboratório em Portugal a realizar a abordagem molecular destas doenças, com o objetivo inicial de identificar portadoras e possibilitar a realização de diagnósticos pré-natais (DPNs) em famílias com hemofilias A e B. Desde os primeiros estudos dedicados à identificação do alelo de risco, passando pela caracterização de variantes patogénicas através da análise exaustiva dos genes, pelo estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo e pelo esclarecimento de mecanismos patogénicos, a investigação tem acompanhado os avanços metodológicos. Concomitantemente, o âmbito das patologias estudadas foi alargado à doença de von Willebrand e às deficiências dos fatores VII, XI e, mais tarde, à deficiência de fator V. A investigação passou também a abranger trombofilias hereditárias, nomeadamente as deficiências de proteína C, proteína S e antitrombina III, incluindo ainda os fatores genéticos de predisposição para trombose.

O trabalho desenvolvido no DGH nesta área foi pioneiro na caracterização molecular de patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias na população portuguesa, tendo permitido a determinação da etiologia e caracterização molecular destas patologias em cerca de 1.000 famílias da nossa população, bem como o conhecimento do espectro de variantes nos diferentes genes e a adoção, em cada caso, das estratégias de análise mais adequadas. Foi determinado o estado de portador em mais de 1.600 familiares e realizaram-se 75 DPNs. Com o constante acompanhamento dos avanços científicos e tecnológicos, incluindo o recurso à sequenciação de nova geração, alargamento das patologias e respetivos genes, bem como das famílias estudadas, o DGH continua a ser uma referência nacional nesta área.

_Abstract

Recognising the importance and impact of hereditary bleeding disorders on human health, the Department of Human Genetics (DGH) of INSA was the first laboratory in Portugal to undertake the molecular approach to these diseases, with the initial objective of identifying carriers and enabling the performance of prenatal diagnoses (PNDs) in families with haemophilia A and B. From the earliest studies dedicated to identifying the risk allele, through the characterisation of pathogenic variants via exhaustive gene analysis, the establishment of genotype-phenotype correlations, and the elucidation of pathogenic mechanisms, the research has accompanied the methodological advances. Concurrently, the scope of studied pathologies

was expanded to include von Willebrand disease and deficiencies of factors VII, XI, and later, factor V deficiency. Research also came to encompass hereditary thrombophilias, namely deficiencies of protein C, protein S, and antithrombin III, as well as genetic factors predisposing to thrombosis.

The work carried out by the DGH in this field was pioneering in the molecular characterisation of hereditary bleeding and thrombotic disorders within the Portuguese population, enabling the determination of the aetiology and molecular characterisation of these conditions in around 1,000 families from our population, as well as providing knowledge of the spectrum of variants across different genes and the adoption, in each case, of the most appropriate analytical strategies. Carrier status was determined in more than 1,600 relatives, and 75 PNDs were performed. With constant monitoring of scientific and technological advances, including the use of next-generation sequencing, expansion of the range of disorders and their respective genes, as well as the families studied, the DGH continues to be a national reference in this area.

_Introdução

As doenças hemorrágicas e trombóticas hereditárias, ainda que raras, representam um desafio clínico e de saúde pública devido ao risco de complicações graves e à necessidade de tratamento especializado e prolongado. De entre as doenças hemorrágicas, destacam-se as deficiências de Fator VIII (hemofilia A) e de Fator IX (hemofilia B), associadas, respetivamente, aos genes *F8* e *F9*. A hemofilia A apresenta uma incidência de cerca de 1/5.000 indivíduos do sexo masculino, enquanto a hemofilia B ocorre em aproximadamente 1/25.000. A doença de von Willebrand, associada ao gene *VWF*, ainda que mais frequente, manifesta-se muitas vezes de forma ligeira e é subdiagnosticada. Outras deficiências hemorrágicas, mais raras, incluem as dos fatores VII e XI (genes *F7* e *F11*, respetivamente). No grupo das trombofilias hereditárias, salientam-se as deficiências de Antitrombina III

(*SERPINC1*), Proteína C (*PROC*) e Proteína S (*PROS1*), com prevalência inferior a 0,5%. As variantes FVLeiden (NM_000130.4:c.1601G>A, p.(Arg534Gln)) e Protrombina G20210A (NM_000506.5:c.*97G>A), mais comuns na população, estão ambas associadas a um risco aumentado de eventos trombóticos.

O diagnóstico precoce destas patologias é essencial para prevenir complicações, como hemorragias espontâneas ou trombozes recorrentes. Neste contexto, o diagnóstico molecular assume um papel determinante, permitindo a identificação das variantes genéticas associadas a cada quadro clínico, orientando a estratégia terapêutica e permitindo a identificação de portadoras e um aconselhamento genético mais preciso às famílias em risco. O diagnóstico pré-natal (DPN), quando clinicamente indicado, representa um recurso valioso para famílias com estas patologias, permitindo decisões informadas e um planeamento atempado dos cuidados médicos.

Desde 1987, o Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), através da implementação de diversas metodologias de diagnóstico e de investigação molecular aplicada, incluindo a abordagem inovadora da sequenciação de nova geração (NGS), e em estreita colaboração com centros clínicos de referência, tem possibilitado a identificação da base genética e da patologia molecular destas doenças na população portuguesa, bem como a melhoria dos cuidados de saúde prestados a doentes com patologias trombo-hemorrágicas.

_Objetivos

Este trabalho teve como objetivos principais: i) a revisão dos estudos moleculares desenvolvidos no Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge no âmbito da identificação da base e da patogénese molecular das patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias da população portuguesa; ii) a análise do impacto dos resultados nos cuidados de saúde e na prevenção da doença; e iii) a identificação das especificidades de cada patologia, sempre num contexto de investigação aplicada e na perspetiva de alargamento ao estudo de outras patologias.

_Materiais e métodos

A extração de DNA genómico a partir de amostras de sangue, de líquido amniótico ou de vilosidades coriônicas foi realizada por métodos manuais ou automatizados.

A identificação da base molecular das patologias acompanhou a evolução tecnológica. Nos primeiros estudos, a restrição enzimática e o *Southern blotting* foram as metodologias mais usadas para os estudos de *linkage* e estabelecimento de estados de portadora, tendo sido também a primeira metodologia utilizada na deteção das inversões envolvendo o intrão 22 do gene *F8* (INV22).

Até à automatização da sequenciação de Sanger, a análise de conformação de DNA em cadeia simples (SSCP) (1) foi utilizada em larga escala como método de rastreio de variantes, e constituiu-se como método de diagnóstico direto no caso de variantes conhecidas; a análise por DHPLC foi também utilizada nalguns casos como método de rastreio.

A amplificação enzimática de DNA (PCR) das regiões codificantes, intrónicas adjacentes e reguladoras relevantes dos genes, seguida de sequenciação de Sanger, tem sido o método mais utilizado na identificação e confirmação de variantes de nucleótido único (SNVs) e pequenas inserções/deleções (indels), continuando como *gold standard*. A PCR é usada na pesquisa das inversões INV22 (PCR longo) e INV1 do *F8* (2,3). A PCR específica de alelo (ARMS, *amplification refractory mutation system*) é utilizada em contextos específicos para deteção de variantes, incluindo a versão ARMS fluorescente.

A *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) é utilizada para identificação e confirmação de deleções ou duplicações.

Recentemente, foi desenvolvido e validado um painel customizado de sequenciação de nova geração (NGS) permitindo de forma mais célere e com custos inferiores, a análise simultânea de vários genes, incluindo os associados a patologias hemorrágicas e trombóticas.

Resultados e discussão

No seguimento da publicação da estrutura dos genes *F8* e *F9* (4,5), o Centro de Genética Humana (atual DGH) foi o primeiro laboratório, a nível nacional, a realizar estudos moleculares em famílias com hemofilia A, inicialmente efetuando a genotipagem de polimorfismos extragénicos e, posteriormente, intragénicos (6). Esta abordagem permitiu a determinação do alelo de risco, a identificação de portadoras em familiares de casos índice e a realização dos primeiros DPNs. Dadas as limitações metodológicas de então, o desconhecimento das sequências intrónicas e a grande extensão das regiões funcionalmente importantes do gene *F8* (constituído por 26 exões, sendo que o maior, exão 14, tem mais de 3000 nucleótidos), só após a identificação das sequências dos intrões adjacentes, realizada em colaboração internacional, foi possível o desenvolvimento de *primers* para amplificação das sequências essenciais do *F8*, incluindo as junções exões/intrões, tendo então sido publicados os primeiros diagnósticos diretos em famílias de hemofilia A, com análise por SSCP (7). Foram também identificadas as primeiras variantes do *F9* em famílias com hemofilia B (8,9).

Uma das primeiras confirmações do efeito molecular de uma variante de splicing no *F8*, utilizando RNA de expressão ectópica de sangue total, foi realizada por nós (10).

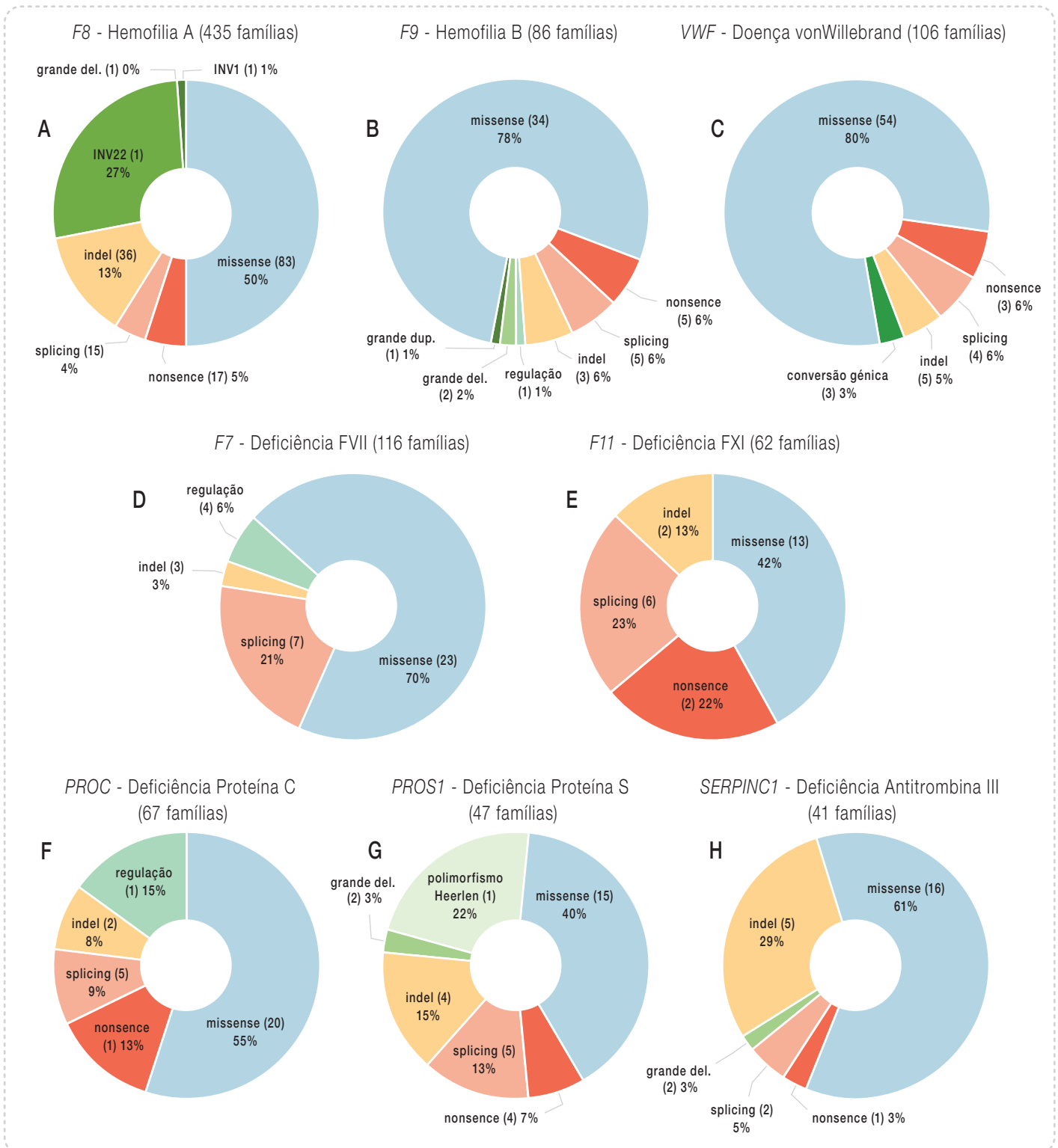
A introdução da pesquisa das inversões INV22 e INV1 do *F8*, a primeira associada a cerca de 50% dos casos graves de hemofilia A, permitiu identificar a base molecular num número significativo de famílias. Em 2006, o laboratório publicou o seu primeiro grande estudo descrevendo o espectro de variantes e a patogénese molecular num número relevante de doentes com hemofilia A, correlações genótipo-fenótipo, incluindo a associação de variantes aos diferentes fenótipos CRM (*cross-reacting material-negative*) e à presença de inibidores, bem como especificidades da patologia na população portuguesa (11). A **gráfico 1A** mostra a distribuição de variantes do *F8* identificadas em 435 famílias da população portuguesa estudadas até ao presente.

Progressivamente, alargou-se o diagnóstico molecular a outras patologias hemorrágicas hereditárias relevantes, nomeadamente doença de von Willebrand (o tipo 2 foi o primeiro alvo de estudo, associado a um número limitado de exões do VWF, de um total de 52), bem como deficiências de Fator VII e de Fator XI da coagulação (12). Observam-se diferenças notórias na distribuição do tipo de variantes genéticas associadas a cada patologia (**gráfico 1, B-E**), implicando a adoção de estratégias analíticas particulares em cada caso.

A distribuição dos pedidos de análise molecular para as principais patologias hemorrágicas e trombóticas mostra-se na **gráfico 2**. Os estudos moleculares das principais trombofilias hereditárias, nomeadamente, deficiências de Proteína S (13), Antitrombina III (14) e Proteína C (15), foram iniciados em 1993, sendo fundamentais para o estabelecimento da sua etiologia em cada família e contribuindo também para a caracterização molecular destas patologias na população portuguesa (**gráfico 1, F-H**).

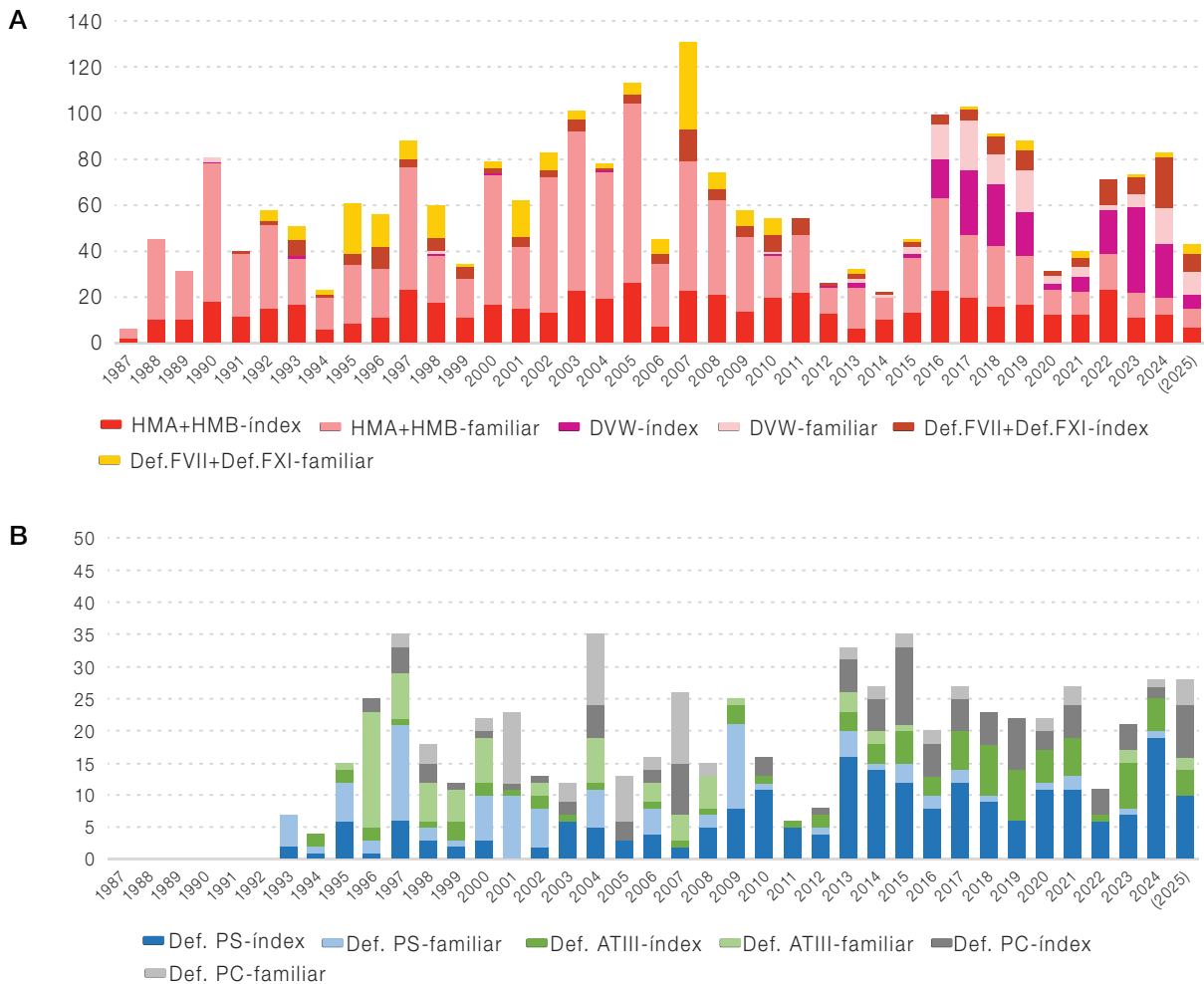
Em 1999, foi iniciada a pesquisa de FVLeiden em famílias com história de patologia trombótica sem causa aparente, tendo-se confirmado esta variante como fator genético predisponente a trombose na nossa população, tal como a variante Protrombina G20210A (16). Atualmente, são também pesquisadas as variantes MTHFR 677T e 1298A (NM_005957.5:c.677C>T, p.(Ala222Val); NM_005957.5:c.1298A>C, p.(Glu433Ala)) e a variante SERPINE1 5G/4G (NM_000602.5:c.-675_676insG (5G) / c.-675delG (4G)). Dada a elevada frequência das patologias trombóticas na nossa população e o facto destas variantes estarem também descritas em associação a outras condições clínicas, foram analisadas até agora cerca de 10.000 amostras neste âmbito.

Gráfico 1: Representação das variantes genéticas consideradas patogénicas identificadas em famílias portuguesas com patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias.



Indicam-se: número de famílias aparentemente não relacionadas, tipo e número de variantes únicas; percentagem das famílias com um tipo de variante. indel – inserção/deleção até 50 nucleótidos; grande del./ grande dup. – deleção/duplicação >50 nucleótidos, podendo envolver um a vários exões, ou a totalidade do gene; regulação – variante em região reguladora; INV1 e INV22 – inversões envolvendo o intrão 1 e o intrão 22 do *F8*, respetivamente; conversão génica – variante resultante de conversão génica do *VWF* com o seu pseudogene; polimorfismo Heerlen – variante NM_000313.4(*PROS*):c.1501T>C, p.(Ser501Pro).

Gráfico 2: Número de testes genéticos solicitados ao DGH-INSA para estudo de casos índice e de familiares para as principais (A) Patologias hemorrágicas hereditárias; (B) Trombofilias hereditárias.



Os dados de 2025 são uma estimativa, com base nas amostras recebidas de janeiro a junho. Para facilitar a análise da figura, agruparam-se os dados das patologias Hemofilia A e Hemofilia B (HMA + HMB), Deficiência de Fator VII e Deficiência de Fator XI (Def. FVII + Def. FXI); Def. PS – Deficiência de Proteína S; Def. ATIII – Deficiência de Antitrombina III. Def. PC – Deficiência de Proteína C.

O registo das variantes identificadas em bases de dados internacionais contribuiu para a partilha global de conhecimento, permitindo uma melhor caracterização destas patologias. O DGH tem também acompanhado a harmonização internacional da nomenclatura (20) e a classificação de variantes, nomeadamente através de aplicação dos critérios ACMG/AMP (*American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*) (21), e participa em programas internacionais de avaliação externa de qualidade relativamente a estes grupos de patologias, os quais têm comprovado a fiabilidade e qualidade dos resultados obtidos.

Globalmente, foram analisadas um total de cerca de 13.000 amostras, incluindo cerca de 1.000 doentes com patologias hemorrágicas e trombofilias hereditárias e mais de 1.600 familiares, tendo sido realizados 75 DPNs, demonstrando o impacto relevante destes estudos no diagnóstico e prevenção destas doenças. Os resultados obtidos têm contribuído significativamente para aprofundar o conhecimento da base molecular e especificidades das patologias estudadas, não apenas através da identificação das variantes genéticas causais, mas também com o esclarecimento dos mecanismos patogénicos subjacentes (10,17-19).

O desenvolvimento de um painel NGS customizado permitiu o estudo simultâneo de vários genes, simplificando a análise molecular, reduzindo custos e tempos de resposta. Com esta metodologia, passou a realizar-se o estudo de todos os exões e regiões intrónicas adjacentes do *VWF*, tendo também iniciado o estudo completo do *F5* em famílias com deficiência de Fator V. O DGH encontra-se na fase final de validação da metodologia de sequenciação de Exoma, o que permitirá o alargamento da investigação e do diagnóstico molecular a todos os genes relevantes na área da trombose e hemostase.

_Conclusões

No balanço dos 50 anos de atividade do DGH do INSA, a análise retrospectiva realizada no presente estudo ilustra o papel pioneiro deste laboratório na caracterização molecular das patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias em Portugal. Com o constante acompanhamento dos avanços científicos e metodológicos, o DGH tem contribuído de forma significativa para o esclarecimento da etiologia e patogénese molecular destas patologias, possibilitando o acompanhamento clínico e aconselhamento genético mais adequados, fundamentais na prevenção e na personalização dos cuidados de saúde, com reflexo na saúde pública, continuando uma referência nacional nesta área.

Agradecimentos:

Os autores agradecem ao Doutor João Lavinha, que deu início ao Laboratório de Biologia Molecular do atual DGH; aos doentes e seus familiares; a todos os colaboradores que no âmbito das suas funções contribuíram para os resultados; aos clínicos que conosco colaboraram ao longo dos anos; e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia e ao INSA, pelo financiamento de alguns projetos de investigação.

Referências bibliográficas:

- (1) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989 Nov;5(4):874-9. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90129-8)
- (2) Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92(4):1458-9. Erratum in: *Blood* 1999; 93(6):2141. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.4.1458>
- (3) Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):168-74. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.168>
- (4) Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984 Nov 22-28;312(5992):326-30. <https://doi.org/10.1038/312326a0>
- (5) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry*. 1985 Jul 2;24(14):3736-50. <https://doi.org/10.1021/bi00335a049>
- (6) David D, Mergulhão C, Capucho I, et al. DNA polymorphisms associated with the factor VIII:C gene in the Portuguese population. *Gene Geogr*. 1992 Apr-Aug;6(1-2):79-84.
- (7) David D, Moreira I, Lalloz MR, Rosa HA, et al. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Apr;5(2):257-64. <https://doi.org/10.1097/00001721-199404000-00016>
- (8) David D, Rosa HA, Pemberton S, et al. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the molecular pathology of hemophilia B. *Hum Mutat*. 1993;2(5):355-61. <https://doi.org/10.1002/humu.1380020506>
- (9) David D, Moreira I, Morais S, et al. Five novel factor IX mutations in unrelated hemophilia B patients. *Hum Mutat*. 1998;(Suppl 1):S301-3. <https://doi.org/10.1002/humu.1380110194>
- (10) David D, Tavares A, Lavinha J. Characterization of a splicing mutation in the factor VIII gene at the RNA level. *Hum Genet*. 1995 Jan;95(1):109-11. <https://doi.org/10.1007/BF00225086>
- (11) David D, Ventura C, Moreira I, et al. The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6):840-3
- (12) Ventura C, Santos AI, Tavares A, et al. Molecular genetic analysis of factor XI deficiency: identification of five novel gene alterations and the origin of type II mutation in Portuguese families. *Thromb Haemost*. 2000 Nov;84(5):833-40. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1614125>
- (13) Bustorff TC, Freire I, Gago T, Crespo F, et al. Identification of three novel mutations in hereditary protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 1997 Jan;77(1):21-5. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1655730>
- (14) David D, Ribeiro S, Ferrão L, Gago T, et al. Molecular basis of inherited antithrombin deficiency in Portuguese families: identification of genetic alterations and screening for additional thrombotic risk factors. *Am J Hematol*. 2004 Jun;76(2):163-71. <https://doi.org/10.1002/ajh.20067>
- (15) David D, Ferreira C, Ventura C, et al. Genetic defects in Portuguese families with inherited protein C deficiency. *Thromb Res*. 2011 Sep;128(3):299-302. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.05.001>
- (16) Araújo F, Santos A, Araújo V, et al. Genetic risk factors in acute coronary disease. *Haemostasis*. 1999;29(4):212-8. <https://doi.org/10.1159/000022504>
- (17) David D, Santos IM, Johnson K, et al. Analysis of the consequences of premature termination codons within factor VIII coding sequences. *J Thromb Haemost*. 2003 Jan;1(1):139-46. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00013.x>
- (18) David D, Saenko EL, Santos IM, et al. Stable recombinant expression and characterization of the two haemophilic factor VIII variants C329S (CRM(-)) and G1948D (CRM(r)). *Br J Haematol*. 2001 Jun;113(3):604-15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02399.x>
- (19) David D, Morais S, Ventura C, et al. Female haemophilic homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia*. 2003 Jan;9(1):125-30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00704.x>
- (20) den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. ; on behalf of the Human Genome Variation Society (HGVS), the Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organisation (HUGO). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016 Jun;37(6):564-9. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- (21) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>