



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL**

**PATRÍCIA DA SILVA MATIAS**

***Caracterização do fenótipo e genótipo em doentes pediátricos com  
distúrbios da hemostase***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE PEDIATRIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DR<sup>a</sup> TERESA SEARA SEVIVAS

PROFESSOR DOUTOR JORGE MANUEL TAVARES LOPES DE ANDRADE SARAIVA

MARÇO/2024



## **Caracterização do fenótipo e genótipo em doentes pediátricos com distúrbios da hemostase**

PATRÍCIA DA SILVA MATIAS <sup>1</sup>

Dr<sup>a</sup> TERESA SEARA SEVIVAS <sup>2</sup>

PROFESSOR DOUTOR JORGE MANUEL TAVARES LOPES DE ANDRADE SARAIVA <sup>1, 3-5</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>2</sup> Serviço de Sangue e Medicina Transfusional, Hospital Pediátrico, Unidade Local de Saúde de Coimbra, Portugal

<sup>3</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital Pediátrico, Unidade Local de Saúde de Coimbra, Portugal

<sup>4</sup> Clínica Universitária de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>5</sup> Clinical Academic Center of Coimbra, Hospital Pediátrico de Coimbra, Unidade Local de Saúde de Coimbra, Coimbra, Portugal

Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – Avenida Afonso Romão, 3000-602 Coimbra, Portugal

Endereço de correio eletrónico: [patriciamatias.ticha06@gmail.com](mailto:patriciamatias.ticha06@gmail.com)

# Índice

Lista de Abreviaturas .....	6
Resumo .....	7
Palavras-chave: Fenótipo; Genótipo; Trombose; Hemostase; Pediatria.....	8
Abstract .....	9
Keywords: Phenotype; Genotype; Thrombosis; Hemostasis; Pediatrics.....	10
Introdução .....	11
Material e Métodos.....	16
1.    Desenho de Estudo.....	16
2.    Seleção dos Participantes.....	16
3.    Recolha dos dados.....	17
3.1.    Instrumentos .....	17
4.    Análise dos Dados.....	19
Resultados .....	20
Caracterização da Amostra.....	20
Grupo de Hemorragia .....	22
Grupo de Trombose .....	25
Correlações fenótipo-genótipo nos grupos de Hemorragia e Trombose.....	27
Variantes de significado incerto (VUS) .....	29
Alterações moleculares previsivelmente associadas a patologia plaquetar congénita.....	30
Discussão .....	31
Conclusão .....	42
Agradecimentos .....	43
Anexos.....	49

## Índice de Tabelas

Tabela 1   Caracterização da Amostra.....	20
Tabela 2   Frequência em que os estudos funcionais e estudo molecular foram aplicados nos grupos de estudo .....	21
Tabela 3   Análise comparativa de variáveis entre indivíduos com alteração molecular nos genes VWF e F5 e indivíduos com variantes noutros genes .....	24
Tabela 4   Correlações fenótipo-genótipo nos grupos de Hemorragia e Trombose .....	28

## Índice de Gráficos

Gráfico 1   Grupos de Doença em Hemorragia .....	23
Gráfico 2   Doenças familiares do grupo de Trombose .....	26

## **Lista de Abreviaturas**

ULS – Unidade Local de Saúde

HP – Hospital Pediátrico

ISTH – Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase

MCG – Motivo de Consulta Geral

MCE – Motivo de Consulta Específico

SNC – Sistema Nervoso Central

TVS – Trombose venosa superficial

MSD – Membro superior direito

TEP – Tromboembolismo pulmonar

BAT-ISTH – Bleeding Assessment Tool da ISTH

TP – Tempo de Protrombina

TTPa – Tempo de Tromboplastina parcial ativada

TT – Tempo de Trombina

FvW – Fator de von Willebrand

FvW: RC – Fator de von Willebrand ligado ao cofator ristocetina

PAI-1 – Inibidor 1 do ativador do plasminogénio

PC – Proteína C

PS – Proteína S

TGT – Teste de Geração de Trombina

LTA – Teste de Agregação Plaquetar

PFA – Teste de Função plaquetar

DvW – Doença de von Willebrand

PRT 20210GA – Protrombina 20210GA

VUS – Variante de Significado Incerto

## Resumo

**Introdução:** Os distúrbios da hemostase compreendem qualquer anomalia nos processos de hemostase primária (distúrbios plaquetares), hemostase secundária (défice de fatores de coagulação) ou ainda fenômenos de tromboembolismo. A prevalência de eventos hemorrágicos e trombóticos em idade pediátrica vem apresentando um aumento gradual na sua incidência e morbidade. A heterogeneidade com que se apresentam as doenças hemorrágicas ou trombóticas aumenta a dificuldade na sua compreensão, diagnóstico e o tratamento destas crianças.

**Objetivo:** Caracterizar as alterações hemostáticas presentes em crianças com quadros hemorrágicos e trombóticos, seguidos em consulta de Hemostase do polo Hospital Pediátrico da ULS de Coimbra.

**Material e Métodos:** Estudo do tipo retrospectivo, não interventivo e unicêntrico, desenvolvido no serviço de Sangue e Medicina Transfusional do polo Hospital Pediátrico da ULS de Coimbra. Incluiu a aplicação de scores de análise de clínica hemorrágica (BAT-ISTH) e trombótica (IMPROVE), técnicas laboratoriais de hemostase de rotina e testes específicos – PFA, LTA, Citometria de Fluxo, TGT, Rotem, Quantra – e estudo molecular utilizando um painel de genes personalizado em Hemostase. A análise estatística foi feita através do *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 29).

**Resultados:** O presente estudo contou com 103 participantes (31 casos-índice). No grupo de hemorragia, foram incluídos 81 participantes, destes 24 casos-índice com idades entre os 6M-17A. A principal doença familiar diagnosticada foi a DvW tipo 1 em 57,58% dos casos (31,6% de casos-índice). Indivíduos com alteração no gene *VWF* mostraram ter um score BAT-ISTH superior e níveis de FvW:RC diminuídos, em relação aos indivíduos com alteração noutros genes ( $p < 0.05$ ). No grupo de Trombose, foram incluídos 22 participantes, 7 casos-índice com idades entre os 14M-15A. A trombofilia mais frequente neste grupo foi a Deficiência de Proteína S em 31,81% dos casos (9,09% de casos-índice).

**Discussão:** O estudo das doenças da hemostase congénitas em idade pediátrica exige uma avaliação clínica cuidada e o uso de testes laboratoriais funcionais e moleculares altamente específicos, não acessíveis em todos os laboratórios. Neste estudo, foi possível reconhecer diversas formas de apresentação clínica destas patologias, bem como a dificuldade em estabelecer uma relação entre a clínica e os estudos funcionais laboratoriais, que em muitos casos tornam o seu diagnóstico um enorme desafio.

**Conclusão:** A correlação dos estudos laboratoriais em hemostase com o estudo molecular permite a confirmação diagnóstica ou o diagnóstico *de novo* de doenças da hemostase congénitas em idade pediátrica e amplia a perceção que temos da clínica do doente durante o seu acompanhamento.

**Palavras-chave:** Fenótipo; Genótipo; Trombose; Hemostase; Pediatria.



## **Abstract**

**Introduction:** Hemostasis disorders include any anomaly in the processes of primary hemostasis (platelet disorders), secondary hemostasis (deficiency of coagulation factors) or even thromboembolism phenomena. The prevalence of hemorrhagic and thrombotic events in pediatrics has shown a gradual increase in incidence and morbidity. The diversity with which hemorrhagic or thrombotic diseases present increases the difficulty in understanding, diagnosing, and treating these children.

**Objective:** To characterize the hemostatic changes, present in children with hemorrhagic and thrombotic conditions, followed in the Hemostasis consult of the Pediatric Hospital hub of the Local Health Unit of Coimbra.

**Material and Methods:** This was a retrospective, non-interventional and single-centre study, developed at the Blood and Transfusion Medicine service of the Pediatric Hospital hub of the Local Health Unit of Coimbra. The study included the application of hemorrhagic and thrombotic clinical analysis scores (BAT-ISTH and IMPROVE, respectively), routine hemostasis laboratory techniques and specific tests – PFA, LTA, Flow cytometry, TGT, Rotem, Quantra – and molecular study using a personalized gene panel in Hemostasis. A statistical analysis was carried out using the *Statistical Package for the Social Sciences* (version 29).

**Results:** The present study had 103 participants (31 index-cases). The hemorrhage group consisted of 81 participants, of these 24 index-cases aged between 6M-17Y. The main familial disease diagnosed was type 1 von Willebrand disease (vWD) in 57.58% of cases (31.6% of index-cases). Participants with molecular variants in the *VWF* gene showed a higher BAT-ISTH score and decreased von Willebrand factor (vWF:RC) levels, compared to those with molecular variants in other genes ( $p < 0.05$ ). The thrombosis group consisted of 22 participants, of these 7 index-cases aged between 14M-15Y. The major thrombophilia found in this group was Protein S Deficiency in 31.81% of cases (9.09% of index-cases).

**Discussion:** The study of congenital hemostasis diseases in pediatrics requires careful clinical evaluation and the use of highly specific functional and molecular laboratory tests that are not accessible in all laboratories. In this study, we recognized different forms of clinical presentation of these pathologies, as well as the difficulty within the establishment of a relationship between the clinical presentation and the functional laboratory studies, which in many cases make their diagnosis an enormous challenge.

**Conclusion:** The correlation of laboratory studies on hemostasis with the molecular study allows the diagnostic confirmation or new diagnosis (*de novo*) of congenital hemostasis diseases in pediatric age, and it expands our perception on the patient's clinical condition during their follow-up.

**Keywords:** Phenotype; Genotype; Thrombosis; Hemostasis; Pediatrics.

## Introdução

A Hemostase é um mecanismo fisiológico vital e necessário sempre que ocorre uma lesão endotelial com perda da integridade do vaso e a possibilidade de evento hemorrágico importante. É composta por três fases principais, a hemostase primária ou formação do trombo plaquetário, hemostase secundária ou cascata de coagulação e a fibrinólise. <sup>1</sup>

A hemostase primária inicia-se logo após o dano vascular com uma vasoconstrição imediata provocada pela contração do tecido muscular liso endotelial. É nesta fase que o fator de von Willebrand se liga às fibras de colagénio expostas no local da lesão e só depois às plaquetas através da sua interação com glicoproteínas da superfície plaquetar- glicoproteína IB. As plaquetas, por sua vez também se ligam ao colagénio endotelial através de outras glicoproteínas de superfície- glicoproteína VI e glicoproteína Ia. O trombo plaquetário que se forma no fim, apesar de instável, assegura numa primeira instância a homeostasia local. <sup>2</sup>

A hemostase secundária é responsável por formar o coágulo de fibrina insolúvel capaz de estabilizar o trombo plaquetário e inicia-se precisamente na superfície da plaqueta (camada fosfolipídica). No modelo da cascata de coagulação, o mais consensual em termos académicos para explicar o sistema hemostático, destacam-se três complexos enzimáticos responsáveis pela formação de trombina e fibrina: a via extrínseca, a via intrínseca e a via comum ou via da protrombinase.

Inicialmente formam-se pequenas quantidades de trombina através de uma fase de iniciação. Esta trombina potencializa as vias extrínseca (via do fator tecidual) e intrínseca (via dos fatores plasmáticos) numa fase de amplificação da quantidade de trombina gerada e necessária à formação do coágulo de fibrina.

A via extrínseca inicia a fase de amplificação com a formação do complexo entre o fator tecidual e o fator VII (FT-FVII), cuja função recai na ativação do fator X. Na via intrínseca participam fatores de ativação procoagulantes, como o fator XII, e os fatores XI, IX e VIII. O fator VIII tem a função de cofator na ativação do fator X pelo fator IX ativado. O fator X ativado possibilita que na via da protrombinase a protrombina forme trombina e, em consequência disso, ocorra a transformação de fibrinogénio em fibrina.

O conceito de homeostasia não existe sem o mecanismo de anticoagulação fisiológico. A via da fibrinólise é responsável pela dissolução do coágulo de fibrina nos seus produtos de degradação, impedindo estados de hipercoagulabilidade patológica para o sistema vascular. <sup>3</sup> A hemostase é um mecanismo fisiológico vital sobre o qual recaem duas funções importantes: parar a hemorragia na sequência da lesão endotelial e, ao mesmo tempo, assegurar a patência do vaso e a perfusão sanguínea em todo o corpo <sup>4</sup>, impedindo fenómenos de trombose.

É fundamental que a função plaquetar e a cascata de coagulação se encontrem em perfeito equilíbrio para que tenhamos uma circulação sanguínea estável e funcional. <sup>5</sup> Qualquer distúrbio patológico deste sistema poderá levar tanto a fenômenos hemorrágicos como trombóticos. <sup>4</sup>

Os distúrbios da hemostase compreendem qualquer anomalia nos processos de hemostase primária (distúrbios plaquetares), hemostase secundária (défice de fatores de coagulação) ou ainda fenômenos de tromboembolismo.<sup>6</sup> Tanto as patologias trombóticas como as hemorrágicas podem associar-se a quadros clínicos com taxas associadas de grande morbidade e mortalidade. Um evento hemorrágico causado por um déficit de fator procoagulante ou por um aumento da atividade antitrombótica pode evoluir para uma hemorragia fatal ou ser acompanhada de sequelas graves. Também um evento trombótico representa uma causa frequente de mortalidade em todo o mundo. <sup>4</sup>

A prevalência de eventos hemorrágicos e trombóticos em idade pediátrica é considerada reduzida <sup>7</sup> comparativamente com os eventos hemorrágicos e trombóticos em adultos. Vários estudos relatam os eventos tromboembólicos em crianças como uma doença heterogênea e que, apesar de pouco prevalente, apresenta um aumento gradual na sua incidência e morbidade.<sup>8,9</sup> Na população pediátrica, o tromboembolismo venoso é um exemplo de coagulopatia com dois picos de incidência, um na infância precoce e outro na adolescência. <sup>8,9</sup>

A heterogeneidade de apresentação de quadros hemorrágicos e trombóticos em idade pediátrica é apresentada em estudos recentes como uma dificuldade na melhor compreensão e tratamento dos mesmos. Em ambos os casos existem causas adquiridas e causas hereditárias descritas na literatura.

As anomalias da função plaquetar, os défices de fatores de coagulação e as alterações pró-trombóticas são grupos de patologias que exigem uma investigação clínica e laboratorial complexa na busca do diagnóstico etiológico. A importância de um diagnóstico clínico e laboratorial é fundamental para o adequado seguimento e o melhor tratamento destes doentes. Dentro deste grupo de patologias, é de notar que os distúrbios plaquetares hereditários, pela típica dificuldade diagnóstica que lhes é inerente, têm sido alvo de vários estudos, nomeadamente na área da Biologia Molecular, e são muitos os progressos feitos na obtenção de respostas. <sup>10</sup>

Em qualquer distúrbio da coagulação, o primeiro passo na direção do diagnóstico é a avaliação clínica e cuidada do doente. Uma história clínica completa e a caracterização do padrão hemorrágico ou trombótico do doente é fundamental. <sup>11,12</sup>

Os sintomas hemorrágicos são muitas vezes subjetivos. Para uma melhor caracterização da gravidade destes sintomas, existem scores hemorrágicos que podem ser aplicados.<sup>11-13</sup> A ISTH dispõe do seu próprio score hemorrágico (ISTH Bleeding Assessment

Tool) que funciona como uma ferramenta diagnóstica para doenças hemorrágicas ligeiras a moderadas e que inclui parâmetros de frequência e gravidade dos sintomas apresentados. <sup>14</sup>

Existem também scores de risco tromboembólico que se mostram igualmente úteis na caracterização e previsão do risco de trombose de qualquer doente em seguimento.

Após a história clínica pormenorizada, deve ser feito um exame físico completo para avaliar a presença de sinais de hemorragia ou trombose e ainda qualquer sinal característico de patologia congénita. <sup>11</sup>

Perante uma história clínica suspeita, deve ser iniciada a avaliação diagnóstica laboratorial. <sup>11,15</sup> Numa primeira fase procede-se a um estudo analítico com testes de rotina/rastreio. Os testes de rastreio em hemostase permitem uma melhor orientação do estudo. Um hemograma com contagem plaquetar, a avaliação da morfologia plaquetar e o teste de função plaquetar (PFA) iniciam esta investigação. A determinação do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), tempo de reptilase e o doseamento de fibrinogénio fazem também parte dos testes de rotina. Todos estes parâmetros permitem uma avaliação do funcionamento das vias extrínseca (TP), intrínseca (TTPa) e via comum (TT, TR, fibrinogénio). <sup>11,15</sup>

Os resultados obtidos nos testes de primeira linha orientam o avanço, ou não, do estudo para testes mais direcionados e específicos em hemostase. <sup>16</sup> Neste grupo incluem-se os doseamentos dos diversos fatores de coagulação que participam em cada um dos complexos enzimáticos da cascata de coagulação. O doseamento do fator de Von Willebrand faz parte deste conjunto. Pode ainda interessar fazer estudos de agregação plaquetar, como testes de Agregação Plaquetar- LTA (Light Transmission Aggregometry), e aplicar técnicas de citometria de fluxo.

O teste de LTA é o teste de avaliação da função plaquetar considerado referência padrão. O princípio passa pela avaliação da ativação plaquetar *in vivo* através dos seus agonistas e das mudanças na densidade óptica por eles provocadas. Exemplos de agonistas plaquetares são o ADP, o colagénio, a epinefrina, o ácido araquidónico e a ristocetina. Dependendo do tipo de interação entre as plaquetas e os seus agonistas e as alterações na agregação plaquetar poderemos pensar numa patologia mais provável como hipótese diagnóstica. <sup>16</sup>

A citometria de fluxo é outro teste específico para o estudo das plaquetas que permite, por exemplo, avaliar a expressão das glicoproteínas de superfície plaquetar, através do uso de anticorpos monoclonais específicos. <sup>11,12</sup>

O teste de geração de trombina é outra ferramenta que desde a década de 50 ajuda na melhor compreensão dos fenómenos de coagulação sanguínea. <sup>17</sup> Os testes mais recentes fornecem vários parâmetros de informação importante no trombograma. <sup>18</sup> A área debaixo da curva permite-nos avaliar o potencial de geração de trombina e o pico máximo da curva, a

concentração máxima de trombina obtida na amostra de sangue em análise.<sup>19</sup> A aplicação destes testes tem permitido associar estados de hipocoagulabilidade a picos de trombina e potenciais de geração de trombina mais baixos, enquanto cenários de hipercoagulabilidade se associam a picos de concentração e a potenciais de geração de trombina no sangue mais elevados.<sup>20</sup>

Existem, ainda, os testes viscoelásticos que na sua análise hemostática permitem uma avaliação global da cinética de ação de todas as etapas de formação do coágulo de fibrina na cascata de coagulação.<sup>21,22</sup> Estes testes têm múltiplas vantagens em relação aos testes de rastreio. Nenhum dos testes de rotina é projetado para a avaliação do risco hemorrágico ou para monitorizar e controlar o estado de coagulação em contextos de necessidade imediata como os atos cirúrgicos.<sup>21</sup> Os testes viscoelásticos como o tromboelastograma (TEG) ou tromboelastograma rotacional (ROTEM) produzem uma rápida construção gráfica e fornecem dados objetivos relativos ao estado hemostático do doente em tempo real.<sup>23</sup>

Apesar de todos os testes e técnicas laboratoriais, o diagnóstico dos distúrbios da hemostase, sejam distúrbios plaquetares, hemorrágicos ou de trombose, não deixa de ser um desafio.<sup>24</sup> O recurso a testes genéticos é ainda uma ferramenta de última linha quando nenhuma conclusão é retirada da investigação laboratorial, mas em que a suspeita clínica se mantém.

Desde a descoberta da estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA) por Watson, Crick e Park na década de 50<sup>25</sup>, a sequenciação desta tem sofrido vários avanços.<sup>26</sup> Os métodos de sequenciação de bases do DNA por Maxam e Gilbert, na década de 70, foram pioneiros neste processo juntamente com a sequenciação de Sanger proposta por Sanger na mesma década.<sup>27</sup>

Três décadas depois, em meados de 2006, surgiram as sequenciações de segunda e terceira geração.<sup>26</sup> Estas novas tecnologias de biologia molecular são também a evolução uma da outra, tendo a sequenciação de terceira geração nascido de uma necessidade de sequenciação cada vez mais custo-efetiva e informativa numa única análise. As vantagens e desvantagens apresentadas pelas duas formas de sequenciação fazem com que ambas sejam usadas em função da aplicabilidade clínica ou objeto de investigação.<sup>28</sup> Estas tecnologias são hoje conhecidas como a sequenciação de nova geração (NGS).

A sequenciação de nova geração (NGS) é um método de sequenciação massiva e em paralelo de milhões de fragmentos de DNA. A sua capacidade de analisar simultaneamente vários genes num único teste torna-a hoje a tecnologia de biologia molecular a adotar na investigação clínica de diversas patologias.<sup>29</sup>

O estudo molecular de distúrbios da hemostase e coagulação permite a diferenciação entre distúrbios de causa adquirida ou de causa congénita. A baixa prevalência de distúrbios hemorrágicos congénitos faz com que a investigação laboratorial seja por vezes difícil,

principalmente em patologias raras com possíveis diagnósticos diferenciais.<sup>30</sup> O diagnóstico molecular torna-se vantajoso não só por motivos de esclarecimento etiológico, confirmando o diagnóstico laboratorial e a clínica que levou à investigação, como para aconselhamento genético familiar, se necessário.<sup>30</sup>

A decisão de fazer testes genéticos a um doente é, na maioria das vezes, determinada pela história clínica e pelo facto de os achados laboratoriais de rotina não darem resposta conclusiva. Além disso, é também a história do doente, bem como os resultados dos testes de rotina, ainda que não conclusivos, que muitas vezes ditam a decisão sobre que genes queremos estudar e, no limite, essa decisão acaba por levar ao desenho de painéis de genes de potencial interesse.<sup>31</sup> Não obstante, esta prática, apesar de orientar o estudo molecular para aquilo que à partida será relevante para o caso em estudo, pode, ainda assim, não permitir o diagnóstico definitivo.

Os distúrbios plaquetares são muitas vezes causados por alterações qualitativas da função plaquetar, muitas vezes não identificadas nos testes de rastreio que iniciam o estudo laboratorial. A identificação de variantes patogénicas em genes associados à função plaquetar permite, *a posteriori (from forward to reverse)* a escolha de testes que possibilitem quantificar a gravidade clínica da patologia e a necessidade de tratamento ou prevenção em situações com potencial pro-hemorrágico.

Mesmo em distúrbios hemorrágicos não considerados raros os estudos genéticos têm importância. A oscilação biológica dos níveis de fator de von Willebrand, por exemplo, pode dificultar a distinção entre doença de von Willebrand propriamente dita e um estado de níveis reduzidos de von Willebrand.<sup>30</sup>

Outro exemplo são os distúrbios do fibrinogénio, em que a heterogeneidade genética por detrás dos mesmos, torna o fenótipo clínico imprevisível e apenas passível de se conhecer através da biologia molecular.<sup>30</sup>

Cada vez mais se torna evidente a importância de aliar o estudo genético a estudos funcionais e à clínica do doente. O nível diferenciado de informação dada pelo estudo genético não só contribui para o objetivo clínico da investigação como para efeitos de pesquisa e conhecimento científico no que respeita às doenças da hemostase.

O presente estudo tem como objetivo avaliar as alterações hemostáticas presentes em crianças com quadros hemorrágicos e trombóticos seguidos em consulta de Hemostase do Hospital Pediátrico da Unidade Local de Saúde de Coimbra. Aliada à investigação laboratorial e ao cálculo dos scores hemorrágico e trombótico, a caracterização do genótipo permitirá a melhor compreensão clínica destes eventos e por sua vez, um seguimento e tratamento adequados destas crianças e das suas famílias.

## **Material e Métodos**

### **1. Desenho de Estudo**

Estudo do tipo retrospectivo, não interventivo e unicêntrico, desenvolvido no serviço de Sangue e Medicina Transfusional no pólo Hospital Pediátrico da Unidade Local de Saúde de Coimbra. A sua realização decorreu nos meses de outubro de 2023 a março de 2024, após aprovação pela Comissão de Ética para a Saúde (CES) da Unidade Local de Saúde de Coimbra e com obtenção de consentimento informado de todos os participantes selecionados e recrutados.

A amostra populacional recrutada para o estudo encontra-se dividida em dois grupos de estudo consoante o motivo de consulta geral (MCG) dos casos-índice (MCG “Hemorragia” ou MCG “Trombose”). Os grupos de estudo são compostos pelos casos índice de idades compreendidas entre RN e 17 anos, seguidos em consulta de hemostase do HP-ULS, e os familiares diretos também avaliados. O estudo incluiu a aplicação de scores de análise clínica - Bleeding Assessment Tool (BAT-ISTH) e IMPROVE Risk Score for Venous Thromboembolism – análise de estudos funcionais em hemostase e/ou estudo molecular de todos os participantes.

Todos os dados de carácter pessoal, laboratorial e molecular foram obtidos através da consulta retrospectiva dos processos clínicos (SClínico ®), pela investigadora coordenadora do estudo, dos participantes recrutados.

### **2. Seleção dos Participantes**

Os participantes foram selecionados a partir dos doentes da consulta de hemostase com idade inferior a 18 anos, referenciados por clínica hemorrágica ou trombótica, e que realizaram estudos de hemostase e/ou estudo molecular para melhor caracterização do seu fenótipo clínico. Foram ainda incluídos no estudo os familiares diretos dos casos-índice de qualquer idade, que tenham feito estudos funcionais em hemostase e/ou estudo molecular. Foram excluídos grávidas e doentes que reportaram a toma de fármacos potencialmente modificadores dos resultados laboratoriais aquando da sua realização.

Todo o recrutamento dos doentes foi feito pela investigadora coordenadora, com o auxílio da investigadora principal, reservando-se o contacto direto com os doentes para a primeira. Nos doentes com agendamentos de consulta previstos até um mês desde a data de início do estudo, procedeu-se ao seu recrutamento com recolha dos consentimentos informados no dia previsto de consulta. Nos doentes com agendamento de consulta num período superior a um mês, procedeu-se ao seu recrutamento via telefone com posterior envio dos consentimentos informados (via correio eletrónico ou postal).



### 3. Recolha dos dados

A recolha dos dados ocorreu após obtenção dos consentimentos informados. A consulta do processo clínico constituiu a fonte integral de todos os dados recolhidos, incluindo dados de estudos funcionais em hemostase e os resultados do estudo molecular. Os diários da consulta externa de hemostase permitiram ainda conhecer a clínica do participante e aplicação dos scores de análise clínica. Todos os dados foram recolhidos pela investigadora coordenadora, compilados e armazenados numa base codificada (Excel®) e protegida por palavra-passe, assegurando a privacidade dos participantes e o cumprimento das normas éticas. Concluído este processo, a base codificada foi passada à investigadora principal para posterior análise e tratamento estatístico.

#### 3.1. Instrumentos

**Bleeding Assessment Tool (BAT-ISTH):** score que avalia a presença e gravidade de clínica hemorrágica em doentes com suspeita de distúrbios da hemostase. É calculado na primeira consulta e avalia a ocorrência de eventos hemorrágicos, a sua frequência e a necessidade de aconselhamento médico, pontuados de maneira diferente. Um score  $\geq 3$  é considerado significativo na criança,  $\geq 4$  no homem adulto e  $\geq 6$  na mulher adulta.<sup>32</sup>

**IMPROVE Risk Score for Venous Thromboembolism:** score que avalia o risco tromboembólico de doentes através de perguntas que procuram determinar fatores de risco, pontuados em função da contribuição isolada para um maior ou menor risco tromboembólico. Somadas as pontuações teremos um valor de score que se insere numa escala de gravidade do risco trombótico daquele doente. Um score  $\geq 3$  é considerado significativo.<sup>33</sup>

**Sysmex XN-1000-S™:** analisador de identificação e contagem de células componentes no sangue para uso diagnóstico *in vitro*. Permite a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas através do método de focagem hidrodinâmica. A componente associada de citometria de fluxo reforça a contagem de células no sangue, em particular de plaquetas em baixo número.

**ACL TOP® 550 (Werfen®):** equipamento usado para análise de tempos de coagulação e quantificação de fatores de coagulação. Através do método foto-óptico coagulimétrico é possível medir os tempos de coagulação e os fatores de coagulação. Ainda pelo método cromogénico obteve-se a medição do fator VIII cromogénico.

**Sistema INNOVANCE® PFA-200 (Siemens®):** permite a avaliação rápida da função plaquetar em pequenas quantidades de sangue total. Esta tecnologia simula *in vitro* o processo de adesão e agregação plaquetar no seguimento de uma lesão vascular, permitindo desta forma detetar disfunções plaquetárias.

**Tromboelastometria Rotem® (Werfen®):** sistema de diagnóstico rápido de patologia hemorrágica aguda. Dentro dos seus ensaios é possível avaliar o tempo de formação, firmeza e estabilidade do coágulo sanguíneo através da ativação da via extrínseca (EXTEM) ou da via intrínseca (INTEM). O ensaio FIBTEM avalia a contribuição do fibrinogénio para o coágulo e a polimerização da fibrina. O ensaio APTEM avalia a estabilidade do coágulo após o início da fibrinólise.

**Quantra® Hemostasis Analyzer (HemoSonics- Biometa®):** tecnologia que usa ultrassons para atestar as propriedades viscoelásticas de uma amostra de sangue total durante o processo de coagulação e a lise do coágulo no período de fibrinólise.

**Citometria de Fluxo, citómetro FACSCalibur® (da BD Biosciences®)** - trata-se de uma técnica útil na investigação das anomalias plaquetares. O seu método foca-se na análise do nº e tamanho plaquetar, medição do nº e tipo de glicoproteínas de membrana e na avaliação da capacidade funcional das plaquetas, medindo marcadores de ativação no estado basal e após estimulação com agonistas. Desta forma permite identificar deficiências de glicoproteínas de membrana, associadas a doenças já conhecidas, e a determinação do nº e composição do conteúdo de grânulos das plaquetas, bem como inferir o curso normal ou anómalo das vias de ativação celular.

**Agregação Plaquetar (LTA) (Sysmex®)** – técnica que avalia disfunções plaquetares através da ativação plaquetar *in vitro*. Como substrato é usado plasma rico em plaquetas (PRP) ao qual são adicionados diversos agonistas plaquetares (Ácido araquidónico, Epinefrina, ADP, TRAP6, Colagénio, Ristocetina). Após ativação da amostra com os agonistas procede-se a leitura por turbidimetria/transmitância de luz do PRP ativado - método Born. A leitura por turbidimetria gera um gráfico em que vários parâmetros são avaliados - % de agregação máxima, % de agregação final, fase de latência, o declive do gráfico e a área debaixo da curva (AUC). Este é método de referência (gold standard) da análise da função plaquetar.

**Teste de Geração de Trombina (TGT)- ST Genesis® (Stago®)** - através do analisador ST Genesis® é possível medir as propriedades hemostáticas de uma amostra de plasma através do sinal de fluorescência de um substrato fluorogénico adicionado e que será convertido pela

trombina. Esta análise permite conhecer o potencial de geração de trombina e é representado pela curva de geração de trombina (Trombograma®). Vários kits são usados, consoante a análise que queremos fazer relativamente à geração de trombina, o STG® Tromboscreen – avalia o risco trombótico e é feito em doentes com alterações do espectro das trombofilias – e o STG® Bleedscreen – permite avaliar o risco hemorrágico.

**Ion GeneStudio S5 (Termo Fisher Scientific®):** tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) usada para o diagnóstico molecular das alterações encontradas no estudo. O estudo molecular incluiu a sequência de um painel personalizado de 43 genes (Anexo I). As variantes encontradas foram analisadas pelo software Clinvar e Varsome e classificadas através das recomendações internacionais da ACMG/AMP.

#### **4. Análise dos Dados**

O tratamento estatístico dos dados foi feito no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 29 para Windows. As análises de frequência foram feitas em diversos pontos do estudo tanto para variáveis qualitativas nominais como quantitativas contínuas.

As variáveis contínuas apresentam-se sob a forma de média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude interquartil.

Análises de comparação foram também efetuadas. Para análise do comportamento das variáveis e sua distribuição foi usado o *Teste Kolmogorov-Smirnov* ( $N > 50$ ). Nas variáveis com distribuição não-normal foi usado o *Teste U de Mann-Whiney*, não paramétrico, com um nível de significância definido em 0.05.

## **Resultados**

### **Caracterização da Amostra**

Este estudo incluiu a participação de 31 doentes (casos-índice) da consulta de Hemostase do Hospital Pediátrico de Coimbra, em representação de 31 famílias. Participaram ainda 72 familiares diretos dos casos-índice, totalizando 103 participantes.

Dois grupos de estudo foram criados em função da clínica hemorrágica ou trombótica que motivou a referenciação dos casos-índice à consulta. A média de idades dos casos-índice foi de  $8,23 \pm 5,20$  anos (máx = 17A; mín = 6M) no grupo de hemorragia e de  $10,19 \pm 5,94$  anos (máx = 15A; mín = 14M) no grupo de trombose.

No grupo de hemorragia, num total de 81 participantes, 44 (54,3%) eram do sexo feminino, entre eles 14 casos-índice, e 37 (45,7%) do sexo masculino, incluindo 10 casos-índice. No grupo de trombose, dos 22 participantes, 10 (45,5%) eram do sexo feminino, entre eles 3 casos-índice, e 12 (54,5%) do sexo masculino, incluindo 4 casos-índice (Tabela 1).

**Tabela 1** | Caracterização da Amostra

<b>Amostra</b>	<b>Grupo de Hemorragia</b>	<b>Grupo de Trombose</b>
Número de indivíduos	81	22
Número de famílias	24	7
Sexo		
Feminino Casos-índice (N)	44 (54,3%) (14)	10 (45,5%) (3)
Masculino Casos-índice (N)	37 (45,7%) (10)	12 (54,5%) (4)
Idade, média $\pm$ desvio padrão (em anos)		
Casos índice	$8,23 \pm 5,20$	$10,19 \pm 5,94$
Familiares	$24,69 \pm 17,55$	$28,42 \pm 16,81$

Aplicados os scores de análise clínica, no grupo de hemorragia, 65 (80,2%) indivíduos apresentam um score BAT-ISTH  $<3$ , enquanto 16 (19,8%) têm um score BAT-ISTH  $\geq 3$ . No grupo de trombose, 18 (81,8%) apresentam um score IMPROVE  $<3$  enquanto 4 (18,2%) têm um score IMPROVE  $\geq 3$ .

Todos os participantes realizaram estudos funcionais de rotina em hemostase e estudos específicos de hemostase, escolhidos em função dos resultados dos testes de rotina feitos previamente. A frequência em que os testes de rotina e os testes específicos em hemostase foram aplicados nos grupos de estudo encontra-se explanada na Tabela 2.

A avaliação do genótipo constituiu também uma variável neste estudo. O estudo molecular assumiu não só um papel diagnóstico como um papel de reorientação dos estudos funcionais inicialmente focados em patologias mais frequentes, sem considerar outros distúrbios por vezes menos relacionáveis com a clínica. A Tabela 2 inclui a frequência percentual em que o estudo molecular fez parte das ferramentas diagnósticas instituídas.

**Tabela 2 |** Frequência em que os estudos funcionais e estudo molecular foram aplicados nos grupos de estudo

	<b>Grupo de Hemorragia (N = 81)</b>		<b>Grupo de Trombose (N = 22)</b>	
Testes de rastreio (rotina)	TP	100%	TT	13,6%
	TTPa	100%	Fibrinogénio	22,7%
	TT	21,0%	FVIII	9,1%
	Plaquetas	92,6%	A2 Antiplasmina	4,5%
	Fibrinogénio	42,0%	PAI-1	4,5%
	FvW: RC	67,9%	Plasminogénio	18,2%
	Fator V	24,7%	Antitrombina	18,2%
	Fator VII	16,0%	Proteína C: funcional	40,9%
	Fator VIII	69,1%	Proteína S: livre	54,5%
	Fator IX	7,4%	Homocisteína	4,5%
	Fator X	6,2%		
	Fator XI	9,9%		
	Fator XII	4,9%		
	Fator XIII	11,1%		
Testes Específicos	Rotem	3,7%	TGT Thrombo Screen	9,1%
	Quantra	2,5%		
	TGT Bleed Screen	7,4%		
	LTA	11,1%		
	Citometria de fluxo	9,9%		
	PFA (colagénio/epinefrina)	49,4%		
	PFA (colagénio/ADP)	46,9%		
Estudo molecular	Casos-índice (N = 24)	100%	Casos-índice (N = 7)	100%
	Familiares (N = 57)	75,4%	Familiares (N = 15)	93,3%

**Legenda:** TP – Tempo de protrombina; TTPa – Tempo de Tromboplastina parcial ativada; TT – Tempo de Trombina; FvW: RC – Fator de von Willebrand: cofator ristocetina; PAI-1 – Inibidor 1 do ativador do plasminogénio; ROTEM – Tromboelastograma rotacional; TGT – Tromboelastograma; LTA – Teste de agregação plaquetar; PFA – Teste de função plaquetar;

## Grupo de Hemorragia

Neste grupo incluíram-se todos os participantes chegados à consulta de hemostase por clínica hemorrágica ou alterações analíticas “de novo” que configuravam um risco hemorrágico previsível aumentado. Dentro dos motivos de consulta específicos (MCE) em hemorragia, 55 (67,9%) dos indivíduos foram selecionados para **estudos familiares**, 8 (9,9%) foram incluídos no estudo por **alteração dos tempos de coagulação** e 4 (4,9%) por **epistáxis**. Outros MCE apresentados foram petéquias em 3,7% dos casos, história familiar sugestiva de tendência hemorrágica, hemorragia do SNC e DvW tipo 1 em 2,5% dos casos cada um respetivamente e equimoses, hematomas, gengivorragias, menorragias e coagulopatia refratária a vitamina K e Hipofibrinogenemia em 1,2% dos casos, cada um respetivamente (Anexo II).

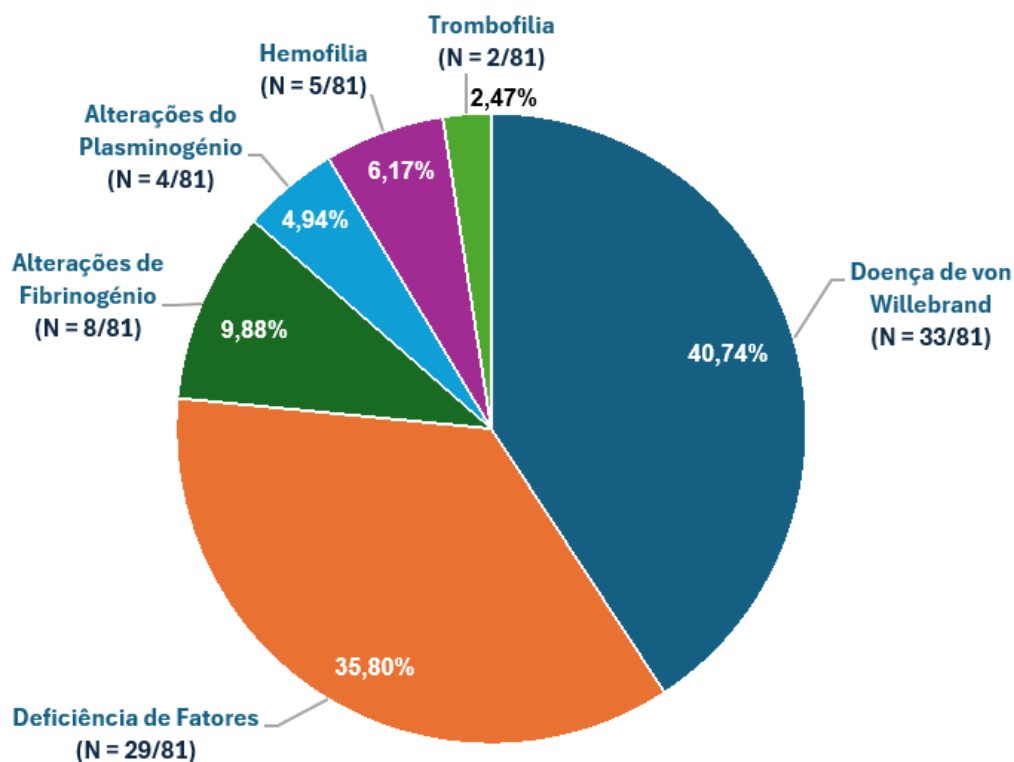
O estudo iniciou-se com o cálculo do score de análise clínica (BAT-ISTH) e um estudo analítico de primeira fase, a incluir hemograma, contagem de plaquetas, tempos de coagulação (TP, TTPa, TT) e fibrinogénio. Incluiu também o doseamento de alguns fatores procoagulantes nos casos em que a clínica era muito sugestiva. Nesta análise, em 75 indivíduos, 1,3% apresentou número de plaquetas diminuído, sendo que o valor mínimo foi de  $28,3 \times 10^9/L$ . Nos tempos de coagulação 4,9% e 9,9% dos 81 indivíduos, apresentaram respetivamente TP e TTPa prolongados, sendo que o valor máximo de TTPa foi de 65,8 segundos. O fibrinogénio, medido em 34 participantes, revelou-se diminuído em 14,7% dos casos, com um mínimo de 96 mg/dL (Anexo III).

A segunda fase de estudo incluiu a realização dos testes de rotina em hemostase e dos testes específicos muitas vezes pedidos em simultâneo ou subsequencialmente usando a mesma amostra sanguínea. No grupo de hemorragia, o teste de rotina mais frequentemente alterado foi o FvW:RC, em 18,5% dos casos. Dos testes específicos realizados, o teste mais frequentemente alterado foi o PFA (colagénio/ADP) em 32,1% dos casos (prolongado em 28,4% dos casos).

Dos indivíduos que fizeram estudo molecular em hemorragia (Tabela 1), 80 alterações moleculares foram encontradas. O gene em que se detetaram mais alterações foi o gene *VWF*, onde se observaram 31,25% das variantes encontradas. Todos os genes nos quais se encontraram alterações moleculares estão descritos no Anexo IV. De todas as alterações moleculares encontradas, 46 (57,5%) foram classificadas como patogénicas, 13 (16,25%) como variantes de significado incerto (VUS) e 9 (11,25%) como provavelmente patogénicas (Anexo V).

Pela realização de testes funcionais em hemostase e do estudo molecular foi possível encontrar, na maioria dos casos, uma explicação para a clínica apresentada pelos doentes.

Vários diagnósticos foram atribuídos aos casos-índice e várias doenças familiares foram estabelecidas após estudadas as famílias. Como forma de categorizar as doenças familiares encontradas na amostra de hemorragia, grupos de doenças foram estabelecidos (Gráfico 1).



**Gráfico 1 | Grupos de Doença em Hemorragia**

No grupo **Doença de von Willebrand** (DvW) (N = 33), 19 indivíduos (57,58%), num total de 6 famílias, tiveram o diagnóstico de DvW tipo 1. Dos restantes, 4 indivíduos (12,12%) de uma família tiveram o diagnóstico de DvW tipo 2B, deficiência de fator V e alteração no gene NBEAL2 e os restantes tiveram diagnósticos de DvW tipo 1 e outras alterações moleculares noutros genes de hemostase (Anexos VI, VII).

No grupo **Deficiência de Fatores** (N = 29), 6 indivíduos (20,69%) de uma única família, obtiveram o diagnóstico de deficiência de fator V. Em 9 indivíduos, de 3 famílias diferentes, a deficiência de fator V foi descoberta em associação com outras alterações moleculares que também configuram risco hemorrágico (Anexo VI, VIII). Outras deficiências de fatores (fator VII, X, XI) foram também encontradas em menor número (Anexo VI, VIII).

Dentro das **Alterações de Fibrinogénio**, foram diagnosticados 3 casos de Hipodisfibrinogenemia, numa família, e 5 casos de Hipofibrinogenemia, noutra família (Anexos VI, IX). As **Alterações do Plasminogénio**, em particular do ativador de plasminogénio

tecidual (t-PA), verificaram-se em 4 participantes de uma mesma família (Anexos VI, X). Foram ainda registados 5 casos de **Hemofilia A**, todos dentro da mesma família (Anexos VI, XI). Ainda no grupo de hemorragia registaram-se 1 caso de deficiência de antitrombina e 1 caso em que o participante é portador da variante PRT 20210GA, ambas as situações consideradas trombofilias (Anexo VI).

Dentro das doenças familiares acima descritas, a *DvW* e a deficiência de fator V assumem a maioria dos casos. Análises estatísticas das variáveis, score de hemorragia e níveis de FvW:RC nos indivíduos com alteração no gene *VWF* e das variáveis score de hemorragia e níveis de fator V nos indivíduos com alteração no gene *F5* foram feitas. Em ambas as análises, as comparações foram feitas relativamente aos indivíduos do grupo de hemorragia que não apresentavam alteração nos genes mencionados.

Nos indivíduos com alteração molecular no gene *VWF* foi possível perceber uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), relativamente ao facto de estes terem um score de hemorragia mais elevado e níveis de FvW:RC mais baixos, em comparação com os indivíduos do grupo de hemorragia sem alteração no gene *VWF* (Tabela 3).

Nos indivíduos com alteração molecular no gene *F5*, tais diferenças estatisticamente significativas não se verificaram em nenhuma das variáveis estudadas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** | Análise comparativa de variáveis entre indivíduos com alteração molecular nos genes *VWF* e *F5* e indivíduos com variantes noutros genes

Variáveis	Mediana (AIQ)		U	Valor p
	Gene <i>VWF</i>	Outros genes		
Score de Hemorragia	2,0 (1,0)	1,0 (3,0)	476,0	<b>0.036</b>
FvW: RC (%)	41,0 (32,1)	78,2 (39,1)	129,0	<b>&lt; 0.001</b>
Variáveis	Mediana (AIQ)		U	Valor p
	Gene <i>F5</i>	Outros genes		
Score de Hemorragia	1,0 (2,0)	0,0 (2,0)	296,0	0,659
Fator V (%)	60,80 (34,2)	76,0 (50,6)	39,5	0,447

**Legenda:** U – Teste U de Mann-Whitney; AIQ – Amplitude Interquartil; FvW: RC – Fator de von Willebrand: cofator ristocetina;



## Grupo de Trombose

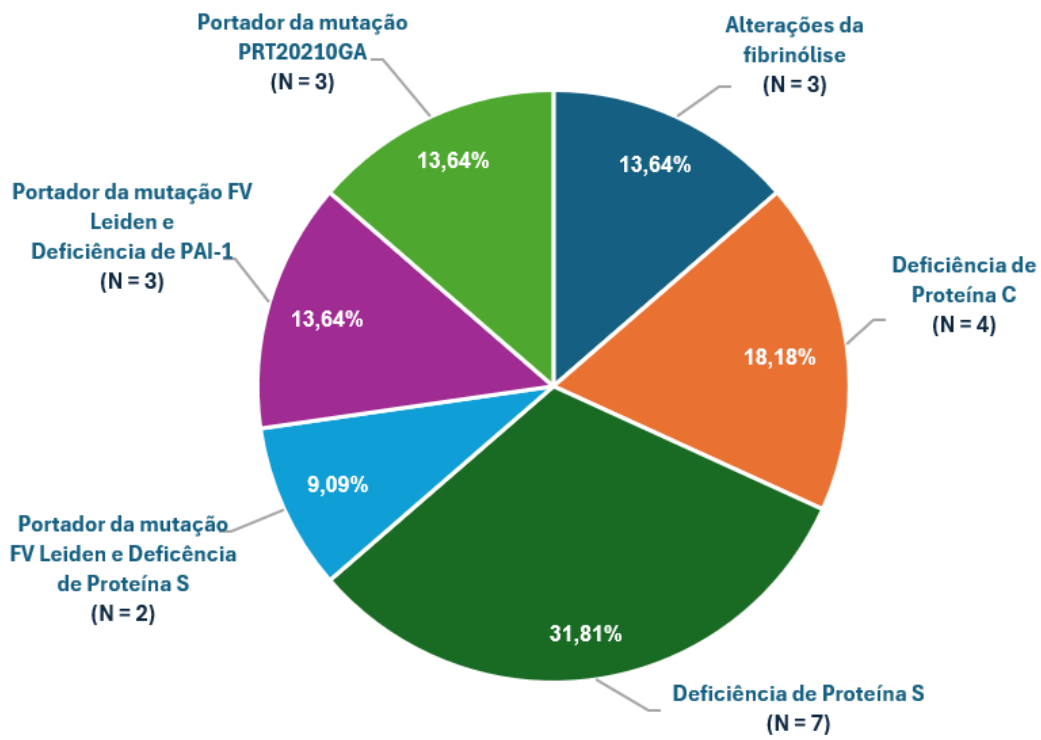
No grupo de trombose foram incluídos os participantes vindos à consulta de hemostase por antecedentes pessoais (casos-índice) ou familiares de eventos trombóticos não explicados ou alterações analíticas compatíveis com maior risco protrombótico. Dentro dos MCE em trombose, dos 22 indivíduos incluídos, 13 (59,1%) vieram por estudos familiares, 4 (18,2%) por história familiar de evento trombótico suspeito, 1 (4,5%) por síndrome de Budd-Chiari, 1 (4,5%) por enfarte cerebral, 1 (4,5%) por FV Leiden, 1 (4,5%) por trombose venosa superficial do membro superior direito (TVS do MSD) e, por fim, 1 (4,5%) por tromboembolismo pulmonar (TEP) (Anexo II).

Tendo em conta a especificidade dos motivos de consulta em trombose, o estudo destes doentes iniciou-se em todos os casos com o cálculo do score de análise clínica (IMPROVE), prosseguindo para a realização dos testes de rotina em hemostase, com a realização simultânea ou subsequente dos testes específicos de coagulação para estudo de tendência trombótica. Dos testes de rotina realizados, o que se revelou mais vezes alterado neste grupo foi os níveis de Proteína C funcional em 18,2% dos casos.

Dos indivíduos que fizeram estudo molecular em trombose (Tabela 1), 20 alterações moleculares foram encontradas. O gene em que foram mais frequentemente encontradas alterações foi o *PROS1*, em 30,00% das variantes encontradas. Os restantes genes alterados neste grupo encontram-se em Anexo XI. De todas as alterações moleculares encontradas, 11 (55,0%) foram classificadas como patogénicas, 7 (35,0%) como provavelmente patogénicas, 1 (5,00%) como polimorfismo funcional e 1 (5,00%) como variante de significado incerto (Anexo XIII).

Através das alterações encontradas nos testes funcionais de coagulação e dos resultados dos estudos moleculares foi possível atribuir um diagnóstico aos casos-índice. O diagnóstico molecular per si levou à necessidade de estudar as famílias dos propósitos. A descoberta das mesmas alterações funcionais e moleculares nos seios familiares levou a que os diagnósticos iniciais dos casos-índice fossem considerados doenças familiares (Gráfico 2).

Dos 22 indivíduos incluídos neste grupo, 7 (31,81%), em duas famílias diferentes, apresentaram **Deficiência de Proteína S**. Nas restantes 5 famílias foram feitos 5 diagnósticos, um para cada uma delas. Em 4 (18,18%) indivíduos foi descoberto **Deficiência de Proteína C**, 3 (13,64%) tinham **Alterações da fibrinólise**, outros 3 (13,64%) indivíduos são **Portadores da variante PRT20210GA**, 3 (13,64%) são **Portadores da variante FV Leiden e deficiência de PAI-1** e 2 (9,09%) indivíduos são **Portadores da variante FV Leiden e Deficiência de Proteína S** (Gráfico 2, Anexo XIV).



**Gráfico 2 |** Doenças familiares do grupo de Trombose

## Correlações fenótipo-genótipo nos grupos de Hemorragia e Trombose

Terminado o estudo laboratorial e molecular e aferidas as doenças familiares que podem justificar a clínica apresentada pelos indivíduos, procedeu-se ao estudo da correlação fenótipo-genótipo nos grupos de hemorragia e trombose.

Como **fenótipo** entende-se o **fenótipo clínico** (“Clínica”), avaliado pelo valor do score de análise clínica, e o **fenótipo laboratorial** (“Estudos funcionais”). A clínica foi considerada significativa nos casos em que o score de análise clínica foi  $\geq 3$  nas crianças,  $\geq 6$  nas mulheres adultas e  $\geq 4$  nos homens adultos. O fenótipo laboratorial foi inferido pelos resultados e alterações detetadas nos estudos funcionais previamente feitos.

O **genótipo** (“Estudo molecular”) foi determinado pela existência de alterações em genes de hemostase/ trombose.

O objetivo desta análise passou por tentar perceber de que forma os estudos funcionais ou o estudo molecular se podiam associar e justificar a clínica apresentada pelo doente e se o estudo molecular previsivelmente se associava às alterações detetadas nos estudos funcionais. Esta análise foi feita de forma individual, para cada participante, no entanto, os dados foram organizados por grupos de doença.

A análise incluiu as correlações parciais entre as variáveis “Clínica” e “Estudos funcionais”, “Clínica” e “Estudo Molecular”, “Estudos funcionais” e “Estudo molecular” e ainda a correlação total Fenótipo-Genótipo, determinada pela existência de pelo menos uma correlação parcial positiva a envolver o estudo molecular (Tabela 4).

**Tabela 4 |** Correlações fenótipo-genótipo nos grupos de Hemorragia e Trombose

Correlações parciais	Grupo de Hemorragia					Grupo de Trombose				
	DvW (N=33)	Deficiência de Fatores (N=29)	Alterações de Fibrinogénio (N=8)	Alterações do Plasminogénio (N=4)	Hemofilia (N=5)	Alterações da Fibrinólise (N=3)	Deficiência de Proteína C (N=4)	Deficiência de Proteína S (N=7)	Fator V Leiden (N=5)	PRT 20210GA (N=3)
<b>Clínica «» Estudos funcionais</b> <sup>b, c</sup>	5 (15,2%)	4 (13,8%)	1 (12,5%)	2 (50,0%)	2 (40,0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	2 (40,0%)	0 (0%)
<b>Clínica «» Estudo molecular</b> <sup>a, b, c, d</sup>	5 (16,1%)	3 (18,8%)	1 (14,3%)	<b>2 (50,0%)</b>	1 (25,0%)	<b>1 (33,3%)</b>	0 (0%)	1 (16,7%)	2 (40,0%)	0 (0%)
<b>Estudos funcionais «» Estudo molecular</b> <sup>a, b, c, d</sup>	<b>24 (77,4%)</b>	<b>12 (75,0%)</b>	<b>5 (71,4%)</b>	0 (0,0%)	<b>3 (75,0%)</b>	0 (0%)	<b>3 (75,0%)</b>	<b>2 (33,3%)</b>	<b>3 (60,0%)</b>	0 (0%)
<b>Correlação Fenótipo «» Genótipo</b> <sup>a, b, c, d</sup>	<b>24 (77,4%)</b>	<b>12 (75,0%)</b>	<b>5 (71,4%)</b>	<b>3 (75,0%)</b>	<b>4 (100,0%)</b>	<b>1 (33,3%)</b>	<b>3 (75,0%)</b>	<b>2 (33,3%)</b>	<b>3 (60,0%)</b>	<b>0 (0%)</b>

**Legenda:** DvW – Doença de von Willebrand; PRT 20210GA – Proteína 20210GA

<sup>a</sup> No grupo DvW a amostra considerada foi de 31 indivíduos, menos 2 indivíduos que na correlação clínica «» estudos funcionais; no grupo Deficiência de Fatores a amostra considerada foi de 16 indivíduos, menos 13 indivíduos que na correlação clínica «» estudos funcionais; no grupo Alterações de Fibrinogénio a amostra considerada foi de 7 indivíduos, menos 1 indivíduo que na correlação clínica «» estudos funcionais; no grupo Hemofilias a amostra considerada foi de 4 indivíduos, menos 1 indivíduo que na correlação clínica «» estudos funcionais;

<sup>b</sup> No grupo Alterações do plasminogénio a amostra considerada foi sempre de 4 indivíduos;

<sup>c</sup> No grupo Alterações da Fibrinólise a amostra considerada foi sempre de 3 indivíduos, no grupo Deficiência de Proteína C, 4 indivíduos, no grupo FV Leiden, 5 indivíduos e no grupo PRT 20210GA a amostra considerada foi sempre 3 indivíduos;

<sup>d</sup> No grupo Deficiência de Proteína S a amostra considerada foi de 6 indivíduos, menos 1 indivíduo que na correlação clínica «» estudos funcionais;

## **Variantes de significado incerto (VUS)**

De todas as alterações moleculares encontradas no estudo, 14 foram classificadas como variantes de significado incerto (VUS), 13 (16,25%) no grupo de hemorragia e 1 (5,00%) no grupo de trombose (Anexos V e XIII).

Estudadas as suas correlações parciais verificou-se que 5 VUS apresentavam uma correlação positiva entre a clínica e os estudos funcionais, 5 uma correlação positiva entre a clínica e o estudo molecular e 10 uma correlação positiva entre os estudos funcionais e o estudo molecular. A correlação entre o fenótipo e o genótipo verificou-se em 12 dos 14 indivíduos. Não obstante, é importante mencionar que 8 dos 12 indivíduos com correlação fenótipo-genótipo tinham, além destas variantes, outras classificadas como patogénicas.

Neste sentido, há a destacar 4 indivíduos, todos pertencentes ao grupo de hemorragia, ainda que associadas a doenças familiares já descritas.

## **Alterações moleculares previsivelmente associadas a patologia plaquetar congénita**

Analisados os genes alterados nos grupos de hemorragia e trombose (Anexos IV e XII), não obstante os resultados já apresentados, alterações moleculares previsivelmente associadas a patologia plaquetar congénita foram encontradas em indivíduos do grupo de hemorragia, em associação a DvW, deficiência de fator V e deficiência de plasminogénio (Anexos VII e VIII).

De um total de 7 indivíduos com alterações moleculares associadas a patologia plaquetar, 3 apresentaram variantes nos genes *ITGA2B* e *ITGB3*. Estes 3 indivíduos, todos da mesma família, realizaram testes específicos adicionais - PFA, LTA e citometria de fluxo, que se revelaram alterados (Anexo XV). Em outros 2 indivíduos pertencentes a outra família, verificou-se também uma alteração no gene *TUBB1*. Por fim, numa 3ª família, 2 indivíduos apresentaram uma variante no gene *NBEAL2* posteriormente funcionalmente investigada e corroborada por alterações compatíveis com tendência hemorrágica nos testes LTA e citometria de fluxo (Anexo XV).

## **Discussão**

O estudo das doenças da coagulação em Pediatria, quer trombóticas, quer hemorrágicas, reveste-se de desafios particulares, não só pelo pequeno número de desafios hemostáticos, reveladores de sintomas, como também pela dificuldade de obtenção de grandes quantidades de amostra para estudos laboratoriais, que, adicionalmente, são difíceis de interpretar devido à escassez de parâmetros de normalidade em indivíduos pediátricos saudáveis.

O esclarecimento destas patologias requer uma avaliação clínica pormenorizada e a utilização de testes laboratoriais funcionais e moleculares altamente específicos, não disponíveis em todos os laboratórios de rotina, e que muitas vezes geram resultados que não são totalmente congruentes entre si, ou com a clínica, tornando o diagnóstico de coagulopatias em idade pediátrica difícil e complexo.

Foi neste sentido que 103 doentes da consulta de Hemostase do Hospital Pediátrico foram recrutados para este trabalho. No grupo de hemorragia foram incluídos 81 participantes (24 famílias), nos quais 44 (54,3%) eram do sexo feminino e 37 (45,7%) do sexo masculino, verificando-se assim uma homogeneidade na distribuição relativamente ao sexo. No grupo de trombose, com 22 indivíduos (7 famílias), verificou-se essa mesma homogeneidade, 10 (45,5%) indivíduos eram do sexo feminino e 12 (54,5%) indivíduos eram do sexo masculino. A idade média dos casos-índice no grupo de hemorragia ( $8,23 \pm 5,20$  anos) revelou-se inferior à idade média dos casos-índice do grupo de trombose ( $10,19 \pm 5,94$  anos), o que em acordo com a literatura, indica maior prevalência de fenómenos trombóticos na adolescência.<sup>8</sup> Tal poderá estar associado ao facto de os eventos trombóticos serem multifatoriais, nomeadamente com os fatores de risco ambientais a serem mais frequentes com o aumento da idade.

### **Motivos de Consulta Específicos (MCE)**

No grupo de hemorragia (GH), o MCE mais frequente foram os estudos familiares, em 67,9% dos casos, uma vez que a maioria da amostra é constituída pelos familiares dos casos-índice. Em 9,9% dos casos a alteração dos tempos de coagulação foi o motivo de pedido de consulta, seguindo-se as epistáxis frequentes e de difícil controlo em 4,9% dos indivíduos, o que corresponde a 33,3% e a 16,7% dos casos-índice incluídos no GH, respetivamente.

De acordo com a literatura, existem sintomas hemorrágicos cuja presença é mais sugestiva de, ou está mais associada a distúrbios da hemostase primária e outros a distúrbios da hemostase secundária.<sup>2,3</sup> As hemorragias cutâneo-mucosas, de que são exemplo frequente as epistáxis, são muito sugestivas de alterações da hemostase primária, em muitos

casos, doença de von Willebrand, que se mostrou precisamente a patologia predominante no nosso estudo (40,74%), sendo também uma das doenças hemorrágicas congénitas mais frequentes.

No grupo de trombose (GT), o motivo de consulta específico mais frequente foram, de igual forma, os estudos familiares, em 59,1% dos casos, pelo mesmo motivo apresentado no grupo de hemorragia. Em 18,2% dos casos, a história familiar de evento trombótico foi o motivo de referência à consulta, o que corresponde a 57,1% dos casos-índice incluídos no GT. Não obstante este ser um motivo frequente para estudos da coagulação em idade adulta, em Pediatria, a indicação para estes estudos é mais restrita. Na criança, tais estudos apenas se aplicam aos indivíduos que já tiveram trombose, com o objetivo principal de avaliar qual o risco previsível de recidiva no próprio. No adulto os estudos podem ser feitos a indivíduos com e sem doença, neste último caso, também para tornar possível a prevenção de novos episódios trombóticos e o controlo dos riscos nos familiares assintomáticos.

### **Scores de Análise Clínica**

Os scores de análise clínica têm valores de corte claros relativamente aos quais os devemos considerar significativos.<sup>32,33</sup> A utilização de scores de análise clínica é uma das preocupações da comunidade científica, no sentido de homogeneizar a avaliação de doentes. Exemplo disso é o BAT-ISTH usado neste estudo.

O BAT-ISTH é um score de análise clínica que, aquando da primeira avaliação do doente, apenas considera as situações de desequilíbrio hemostático ocorridas até então. Não obstante, o BAT-ISTH deve ser atualizado ao longo da vida do doente. O mesmo acontece com o score de clínica trombótica IMPROVE.

Na nossa amostra, um número reduzido de indivíduos apresenta scores significativos, facto que, sobretudo no que diz respeito ao score de hemorragia, se justificará pelos poucos desafios hemostáticos (cirurgia, procedimentos invasivos) a que uma população pediátrica/jovem habitualmente é submetida. As patologias em questão, sejam patologias de plaqueta, défices de fatores de coagulação ou défices de anticoagulantes naturais, estão muitas vezes dependentes de contextos de stress hemostático para que se venham a manifestar. Por esta razão, a ausência de clínica significativa, dentro dos *cutoffs* do score, pode não ser sinónimo de ausência de doença.

### **Estudos Funcionais em Hemostase**

A decisão de progredir para o estudo laboratorial foi tomada, em primeiro lugar, em função da clínica do doente (score obtido), mas também em função dos seus antecedentes



patológicos pessoais, da possibilidade de um contexto premente de procedimento invasivo ou cirurgia e, ainda dos antecedentes familiares.

Em doentes em que se acaba por diagnosticar uma doença hemorrágica é comum o motivo inicial de referenciação à consulta ser o apresentar tempos de coagulação prolongados. O mesmo não sucede nos doentes com patologia trombótica, em que o motivo inicial de referenciação será a história pessoal ou familiar positiva, e não um encurtamento dos tempos de coagulação, algo que não corresponde diretamente a um aumento do risco trombótico.<sup>34</sup> Por esta razão, os tempos de coagulação não são considerados testes de rastreio no grupo de trombose.

Os testes usados para o estudo de clínica hemorrágica são diferentes, numa fase inicial, dos testes usados para clínica trombótica, avaliando atores distintos do modelo celular da hemostase – 1) Testes de rastreio gerais: TP, TTPa, TT, plaquetas e fibrinogénio, 2) Testes específicos comuns a trombose e hemorragia: A2-antiplasmina, PAI-1, plasminogénio, 3) Testes específicos de hemorragia: Doseamento de fatores, FVIII, FvW, 4) Testes específicos de trombose: Antitrombina, PC, PS, homocisteína.

No entanto, as reações da hemostase são geradas por inúmeros sinais proteicos e elevado número de mecanismos de feedback positivo e negativo. Assim, muitas das proteínas envolvidas no fenómeno da hemostase têm dupla função, quer procoagulante, quer anticoagulante, pelo que, em fases mais avançadas da investigação, os estudos de doença hemorrágica e protrombótica podem ser exatamente os mesmos, ainda que interpretados duplamente - aumento de quantidade/ aumento de função vs diminuição de quantidade/ diminuição de função da proteína estudada.

No grupo de hemorragia o teste de rastreio mais frequentemente alterado foram os níveis de FvW:RC. O FvW é avaliado de forma quantitativa e qualitativa. Através do teste de atividade do cofator da ristocetina (níveis de FvW: RC) conseguimos avaliar a capacidade de ligação do antigénio do FvW às plaquetas (glicoproteína Ib). O facto de ser necessária uma quantidade e atividade normais do FvW para que o teste se apresente normal, torna a medição do FvW:RC o teste padrão inicial (teste de rastreio) quando a suspeita é a doença de von Willebrand.

Dos testes específicos em hemorragia, o mais frequentemente alterado foi o PFA (colagénio/ADP) em 32,1% dos casos, sendo que em 28,4% se encontrava prolongado. A técnica de PFA-200 é usada para avaliar a funcionalidade plaquetar, nas etapas de adesão e agregação, na qual participa também o fator de von Willebrand. O PFA é, assim, um teste adequado sobretudo para o rastreio de Doença de von Willebrand e disfunções plaquetares graves, sendo clara nos dias de hoje a sua utilidade como técnica de rastreio da doença de von Willebrand, mas de baixa capacidade discriminatória para alterações plaquetares ligeiras.<sup>35,36</sup>

No grupo de trombose, o teste de rotina mais frequentemente alterado foram os níveis de Proteína C: funcional - diminuídos em 18,2% dos casos - contrariamente ao que seria de esperar, tendo em conta que a doença familiar mais prevalente no grupo de trombose foi a deficiência de proteína S, facto que pode estar relacionado com a não deteção de mutação no gene *PROC* no estudo molecular em alguns indivíduos com deficiência laboratorial de proteína C. Nenhum participante apresentou alteração no teste TGT Thrombo Screen, um dos testes específicos em hemostase usado para avaliar risco trombótico.

### **Estudo molecular e Variantes de Significado Incerto**

Todos os casos-índice fizeram estudo molecular, e em todos esses casos foram identificadas alterações moleculares em genes de hemostase. A seleção dos familiares para estudo molecular foi feita em função dos resultados dos seus estudos funcionais. Na maioria dos casos, o primeiro selecionado foi o progenitor com os resultados laboratoriais funcionais mais concordantes com o diagnóstico molecular do caso-índice. Nos grupos de hemorragia e trombose, 75,4% e 93,3% dos familiares, respetivamente, fizeram estudo molecular, isto porque, se avançou para o estudo do 2º progenitor sempre que no 1º não se detetou a alteração molecular. Isto significa que por vezes os estudos funcionais não permitem imediatamente prever se o indivíduo é ou não portador de alterações moleculares que os expliquem e, ainda, que essa dificuldade pode ser maior em patologia protrombótica.

Algumas variantes de significado incerto (VUS) foram encontradas e a dúvida relativamente ao seu contributo para o fenótipo clínico preocupa os clínicos no que respeita à orientação dos seus doentes. A literatura considera os estudos familiares uma mais-valia para o melhor entendimento da expressão fenotípica destas variantes.<sup>37</sup> Por outro lado, a mesma fonte refere que não é incomum a sua reclassificação se novas análises forem feitas,<sup>37</sup> pelo que se sugere a sua reavaliação em estudos futuros.

Neste estudo, das 14 VUS encontradas 3 foram no gene *PLAT* em elementos da mesma família. O gene *PLAT* codifica o ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) que é responsável pela conversão do plasminogénio em plasmina, sendo, portanto, um ativador da fibrinólise.<sup>38</sup> As variantes patogénicas neste gene originam uma diminuição dos níveis de plasminogénio o que constitui uma alteração molecular de caris protrombótico. No entanto, o caso-índice desta família, referenciado à consulta por hemorragia do SNC à nascença, apresentando um BAT-ISTH = 4, não apresentava outras alterações nos estudos funcionais além de um prolongamento do PFA (col/ADP), nem mesmo outras alterações moleculares que expliquem a clínica apresentada. Perante estes resultados fica a dúvida relativamente à influência da alteração no gene *PLAT* na clínica do doente – teria o doente uma clínica ainda mais exuberante, não fosse a tendência protrombótica conferida por essa alteração? Não só

por esta questão, mas também pelo antecedente hemorrágico grave do doente, considera-se importante o estudo mais aprofundado e o acompanhamento desta família.

Outras VUS foram reconhecidas em genes como *F10* (N=1), *NBEAL2* (N=2; 1 família), *ITGB3* (N=3; 1 família), *PROC* (N=2; 2 famílias), *SERPINF2* (N=3; 1 família). No caso do gene *PROC*, numa das famílias, o caso-índice apresentava uma clínica trombótica significativa (IMPROVE = 3) e apesar dos baixos níveis de proteína C, é importante referir que o caso-índice vem à consulta por clínica hemorrágica significativa (BAT-ISTH = 4). Além do gene *PROC*, neste doente também o gene *F11* se encontra alterado com uma variante classificada como patogénica. Os níveis diminuídos de FXI corroboram a alteração molecular encontrada e explicam a clínica do doente, que é aliás o motivo de consulta, não havendo outras alterações laboratoriais. No entanto, e mais uma vez, levanta-se a possibilidade de o doente poder ter uma clínica hemorrágica ainda mais grave, não fosse a tendência protrombótica acrescentada pela VUS encontrada.

Relativamente ao gene *SERPINF2*, este é um gene codificador da proteína A2 Antiplasmina, o principal inativador da plasmina na fase fibrinolítica e, portanto, uma alteração neste gene resulta numa tendência hemorrágica.<sup>39</sup> O doente em que se detetou a alteração molecular neste gene, apresentou clínica hemorrágica, ainda que não significativa (BAT-ISTH <3), explicada, eventualmente, pela compensação “negativa” na fibrinólise associada a esta alteração e pela compensação “positiva” consequência de outras alterações que o doente também tinha nos genes *VWF* e *F10*. O facto das alterações laboratoriais nos permitirem diagnosticar tanto a Deficiência de A2 Antiplasmina, como a DvW e a Deficiência de fator X, levam a supor uma de duas coisas – o doente ainda não foi sujeito a situações de desafio hemostático suficientes para ter uma clínica hemorrágica significativa ou então, o score BAT-ISTH é mais uma vez insuficiente na forma como nos permite perceber a clínica do doente.

## **Doenças Familiares**

Das doenças familiares encontradas no grupo de hemorragia, há a destacar a doença de von Willebrand em 40,74% dos participantes incluídos no grupo, sendo a sua maioria casos de DvW tipo 1 (57,58%), a forma mais frequente da doença. No grupo de DvW, 30,3% dos participantes são casos-índice, sendo que dos casos com DvW tipo 1, 31,6% correspondem também a casos-índice.

Várias deficiências de fatores e outras alterações da hemostase, como alterações de plaqueta, estão descritas em associação à doença de von Willebrand. Tal como a literatura aponta,<sup>40</sup> também no nosso estudo, a deficiência de fator XII foi a deficiência de fator associada à DvW mais frequentemente encontrada. Esta associação está descrita

principalmente na presença de níveis de fator VIII normais e TTPa prolongado,<sup>40</sup> algo que de facto se verifica nos nossos participantes.

Tendo em conta a elevada prevalência da DvW no nosso estudo, e em geral nos estudos sobre doenças da hemostase, achámos pertinente tentar perceber se algum dos nossos achados teria significado estatístico.

Da análise comparativa, entre os indivíduos com alteração no gene *VWF* e os restantes indivíduos com alterações moleculares em qualquer outro gene, concluiu-se que existem diferenças estatisticamente significativas relativamente ao score de hemorragia e aos níveis de FvW:RC. Indivíduos com alteração no gene *VWF* apresentam scores de hemorragia mais elevados e níveis de FvW:RC diminuídos em comparação com os restantes mencionados. Esta análise faz-nos pensar que a DvW será uma doença com uma clínica mais evidente, em comparação com as outras, e reforça ainda o papel dos níveis de FvW:RC como um bom teste de rastreio para o diagnóstico de DvW e para nos fazer avançar com maior certeza para o estudo molecular.

Ainda no grupo de hemorragia, de forma pouco previsível, foram detetadas alterações moleculares associadas a Trombofilia, como a variante PRT20210GA e alterações no gene *SERPINC1*, sem que se tivesse diagnosticado qualquer doença hemorrágica. As trombofilias como o próprio nome indica são distúrbios da coagulação que configuram um risco trombótico superior ao da população em geral. Em indivíduos cujo motivo de observação em consulta foi a presença de clínica hemorrágica significativa (BAT-ISHT = 3), o diagnóstico de uma doença trombótica surge como algo inesperado e pode levar-nos a tecer considerações sobre a clínica hemorrágica apresentada pelo doente e a influência que esta trombofilia pode ter nesta - provavelmente a clínica hemorrágica estará atenuada pela presença da trombofilia.

A heterozigotia para a variante FV de Leiden é a trombofilia congénita mais frequente, cuja prevalência atinge 3-7% da população europeia, seguida da heterozigotia para a variante Protrombina 20210GA, com uma prevalência de 0.7-4% da população europeia. O risco relativo para o primeiro episódio de tromboembolismo venoso é de 3-5% e 2-3%, respetivamente.<sup>41</sup> No nosso estudo, aproximadamente 50% dos casos de trombofilia congénita no grupo de trombose são deficiências das proteínas S (31,81%) e C (18,18%), diagnosticadas em dois dos casos-índice (2 famílias) e um caso-índice (1 família), respetivamente. Esta prevalência pode estar relacionada com o facto de estas serem trombofilias mais graves, passíveis de causarem trombose em idades mais jovens. Na população europeia, a sua prevalência é de 0.03-0.5% no caso da deficiência de proteína S e 0.2-0.4% no caso da deficiência de proteína C. Os seus riscos relativos para o primeiro episódio de tromboembolismo venoso são de 1-10% e 4-6%, respetivamente.<sup>41</sup>

O FV de Leiden foi também uma das trombofilias encontradas no grupo de trombose, em associação com a deficiência de PAI-1 em 13,64% dos casos e com deficiência de

proteína S em 9,09% dos casos. A respeito da primeira associação, surge a dúvida relativamente à influência da deficiência do PAI-1 no risco trombótico aumentado provocado pelo FV Leiden. Vários estudos existem sobre o aumento dos níveis de PAI-1 e a sua contribuição para o tromboembolismo venoso e arterial.<sup>42</sup> No entanto, há estudos contraditórios e que não conseguem relacionar o aumento de PAI-1 a um maior risco trombótico.<sup>42</sup> Da mesma forma, a literatura falha também em esclarecer a influência da deficiência de PAI-1 na ativação da fibrinólise e de que forma isto contraria a tendência trombótica de um indivíduo que associadamente tem FV de Leiden. Posto isto, torna-se evidente a necessidade de mais estudos, relativamente a estas questões, sugerindo-se a realização de testes globais de hemostase, a incluir o teste de geração de trombina (TGT). O TGT é um teste capaz de reproduzir *in vitro* o processo de geração de trombina que fisiologicamente ocorre na fase de hemostase secundária.<sup>43</sup> A trombina é uma proteína com um papel central na cascata de coagulação que inclusive pode tanto assumir um papel procoagulante como anticoagulante, também avaliado no TGT. Por estas razões, a literatura considera este teste uma mais-valia, sendo usado na prática clínica com o intuito de prever o risco trombótico ou hemorrágico de doentes com patologia da hemostase.<sup>43</sup>

### **Correlações Fenótipo-Genótipo**

Este foi o objetivo principal do estudo: correlacionar o fenótipo clínico e/ou laboratorial do doente com o seu genótipo, ou seja, a alteração molecular encontrada no painel de genes de trombose e hemostase. O objetivo secundário do estudo passou por tentar perceber qual a variante fenotípica (clínica ou estudos funcionais) contribui mais para a existência da correlação fenótipo-genótipo, ainda que um diagnóstico global deva ser feito com base no “todo” e não apenas em partes do achado.

Esta análise foi feita de forma individual, contudo, os resultados foram apresentados por grupos de doença para que também nesse sentido se pudesse avaliar o contributo da clínica e dos estudos laboratoriais para o diagnóstico. Será de notar que o estabelecimento das correlações parciais com o estudo molecular e a correlação total fenótipo-genótipo apenas foi possível nos participantes que fizeram estudo molecular, razão pela qual, amostras de distintas dimensões foram usadas nas diferentes correlações, como consta na apresentação dos dados.

Nos grupos DvW, Deficiência de Fatores, Alterações de Fibrinogénio e Hemofilia, verificou-se uma correlação total em 77,4% (N=24), 75,0% (N=12), 71,4% (N=5) e 100,0% (N=4) dos indivíduos, respetivamente, sendo evidente que nos quatro grupos, as variáveis que mais se correlacionaram foram os estudos funcionais e o estudo molecular.

No grupo Alterações do Plasminogénio, verificou-se uma correlação fenótipo-genótipo em 3 (75,0%) indivíduos, em boa parte à conta da clínica e do estudo molecular. Inclusive, neste grupo, os indivíduos que apresentavam clínica, obtiveram um BAT-ISTH score de 4, o que demonstra o contributo da clínica para o diagnóstico. Ainda neste grupo, um indivíduo não apresentava clínica, alteração nos testes funcionais e também não tinha a variante familiar do gene implicado. Neste caso em particular, consideramos haver uma correlação fenótipo-genótipo, no entanto, pela negativa, sendo que este seria considerado um indivíduo “saudável” no nosso estudo.

No grupo Alterações da Fibrinólise apenas 1 indivíduo, que não é um caso-índice, tem correlação fenótipo-genótipo. Neste caso a correlação deve-se à correspondência entre a clínica (antecedentes de TEP) e o genótipo (alteração no gene *PLG*). Os restantes indivíduos do grupo não apresentavam clínica significativa (BAT-ISTH score < 3), nem estudos funcionais com alterações que pareçam ser reflexo da variante molecular (gene *PLG*) encontrada em todos os elementos da família.

No grupo Deficiência de Proteína C, composto por uma única família, a correlação fenótipo-genótipo verificou-se em 3 (75,0%) indivíduos, em todos devido à correlação entre os estudos funcionais e o estudo molecular. Nesta família, apesar do MCE do caso-índice ser Síndrome de Budd-Chiari, o score IMPROVE não se mostrou significativo, razão pela qual a clínica não teve um peso significativo no diagnóstico, e que também demonstra que se trata de um score com algumas limitações para pontuar antecedentes de trombose.

No grupo Deficiência de Proteína S e FV Leiden, as correlações fenótipo-genótipo dos 2 (33,3%) e 3 (60,0%) indivíduos, respetivamente, existem sobretudo à conta da associação entre os estudos funcionais e o genótipo.

O último grupo, com a variante PRT 20210GA, trata-se de uma família com antecedentes familiares de trombose de causa não esclarecida. O caso-índice, referenciado à consulta pelos antecedentes familiares mencionados apresenta, no entanto, um estudo laboratorial com resultados compatíveis com um estado pró-hemorrágico (défice de fatores VII e X). Com o intuito de esclarecer a disparidade dos factos, foi feito o estudo molecular ao caso-índice que revelou a variante familiar descrita. Feito o estudo familiar, também o pai do caso-índice apresentou a variante no gene *F2* e a PRT 20210GA, contudo, a ausência de clínica ou estudos funcionais que corroborassem o genótipo, levou a que se concluísse pela ausência de correlação fenótipo-genótipo em todos os indivíduos estudados. A variante PRT 20210GA é por si só definidora de um risco protrombótico superior ao da população geral, contudo, a questão que se levanta é se a sua coexistência com o défice de fatores de coagulação influencia de alguma forma esse risco ou será a protrombina 20210GA protetora relativamente à tendência hemorrágica que o caso-índice teria com os fatores VII e X em défice. Nestes casos, apesar do acompanhamento clínico adquirir um papel muito importante,

seria fundamental ter respostas para estas questões, para que o próprio acompanhamento fosse guiado por orientações apoiadas na evidência científica. Deverá planejar-se no futuro a realização de testes globais de hemostase, a incluir o teste de geração de trombina (TGT) já referido.

Em todos os grupos o estudo molecular contribui para o estabelecimento de uma associação entre fenótipo-genótipo, em associação sobretudo com os estudos funcionais, e menos com a clínica, quer em patologias hemorrágicas, quer em patologias trombóticas. Isto pode dever-se, como já referido, ao facto de em idade pediátrica os doentes terem ainda sofrido poucos desafios hemostáticos que possibilitem apurar mais objetivamente a clínica. Isto é mais compreensível em patologia ligeira do que em patologia grave, e, efetivamente no nosso estudo temos sobretudo indivíduos com patologia ligeira/moderada ou, eventualmente, alguns cuja clínica se encontra modulada pela presença de alterações adicionais da hemostase (simultaneidade de alterações pró-trombóticas com alterações pró-hemorrágicas).

Nos grupos Alterações do Plasminogénio e Alterações da Fibrinólise, particularmente falando, a clínica parece ter mais peso no estabelecimento de uma associação entre fenótipo e genótipo, o que pode dever-se ao facto de, até à data da 1ª consulta, ter havido já intercorrências/sintomas suficientemente graves para condicionarem scores significativos, nos nossos casos um BAT-ISTH score de 4, no grupo Alterações do Plasminogénio e a ocorrência prévia de um episódio de Tromboembolismo pulmonar, no grupo Alterações da Fibrinólise.

### **Alterações moleculares previsivelmente associadas a patologia plaquetar congénita**

Na nossa amostra, foram detetadas várias alterações em diferentes genes associados a patologia plaquetar congénita (*ITGAB2*, *ITGB3*, *TUBB1*, *NBEAL2*), muitas vezes em associação com outras, na sua maioria, já classificadas como patogénicas.

No caso dos genes *ITGAB2* e *ITGB3*, a literatura é consensual na associação entre as suas alterações moleculares e a patologia Trombastenia de Glanzman (TG), em homozigotia ou dupla heterozigotia.<sup>44</sup> As variantes encontradas nestes genes no nosso estudo foram ambas associadas a um possível fenótipo de Macrotrombocitopenia do tipo-Trombastenia de Glanzman, não sendo assumido o seu diagnóstico formal, por se encontrarem em heterozigotia. As variantes foram classificadas como provavelmente benigna e VUS, respetivamente. Por outro lado, os testes de função plaquetar realizados – PFA, LTA, citometria de fluxo – mostraram alterações compatíveis com uma TG – diminuição global da agregação plaquetar no teste LTA.<sup>44</sup> Apesar de não se ter assumido um diagnóstico definitivo de TG, na medida em que esta é considerada uma patologia de clínica hemorrágica grave,<sup>44</sup>

considerou-se ser prudente uma vigilância regular da clínica desta família e o seu acompanhamento em consulta.

Na família com alteração do gene *TUBB1*, os estudos funcionais realizados *a posteriori* não revelaram alterações sugestivas de patologia plaquetar. A alteração molecular presente neste gene, foi classificada como patogénica e está normalmente associada a Macrotrombocitopenia autossómica dominante. Esta é considerada uma patologia rara, com uma apresentação heterogénea e de difícil diagnóstico, sendo muitas vezes confundida com trombocitopenias de causa imune, essas muito mais frequentes.<sup>45</sup> Inclusive são poucos os casos de famílias com Macrotrombocitopenia associada a variantes do gene *TUBB1*.<sup>46</sup> Avaliada a clínica hemorrágica dos dois elementos da família, ambos apresentaram clínica significativa (BAT-ISTH >3). No entanto, é importante referir que os dois indivíduos portadores apresentavam também deficiência de plasminogénio, sendo que um deles tinha, ainda, deficiência de fator V. Inclusive, neste último, o score BAT-ISTH foi 5, comparado com o primeiro que tem um score BAT-ISTH = 3. Tanto a deficiência de plasminogénio como a deficiência de fator V são diagnósticos laboratoriais e moleculares, com variantes consideradas patogénicas. No entanto, tendo em conta que ambos os indivíduos têm scores hemorrágicos significativos, que até poderiam ser mais elevados, não fosse o facto de, concomitantemente, serem portadores de uma deficiência de plasminogénio, que será acompanhada de alguma tendência trombótica, será lícito admitir a alteração molecular no gene *TUBB1* como uma causa importante de clínica nesta família.

Por fim, em outra família foi identificada uma alteração no gene *NBEAL2*, classificada como VUS e que habitualmente se associa a Síndrome da Plaqueta Cinzenta (SPC). Associadamente nesta família foi diagnosticada DvW tipo 2B e Deficiência de Fator V. A DvW tipo 2B é caracterizada por uma alteração do tipo qualitativa, associada a um aumento de afinidade do FvW às plaquetas, cursando com trombocitopenia.<sup>47</sup> A SPC, é uma patologia qualitativa dos grânulos alfa das plaquetas, onde são armazenadas diferentes proteínas, incluindo FvW.<sup>48</sup> Nesta família os testes de função plaquetar – LTA e Citometria de fluxo – mostraram-se alterados, nomeadamente a citometria mostrando alteração da exposição de conteúdo de grânulos alfa e, portanto, pode haver nestes doentes duas patologias que dentro dos seus mecanismos fisiopatológicos se influenciam mutuamente e que, por essa razão, seria interessante explorar em estudos adicionais futuros, com microscopia eletrónica ou testes de secreção plaquetar.



## **Pontos Fortes e Limitações do estudo**

Terminada a discussão dos resultados, torna-se importante reforçar alguns pontos fortes e também limitações sentidas neste estudo, para que em estudos futuros ambos sejam considerados.

Iniciando pelos pontos fortes, o estudo realizado contou com a participação de um número de doentes, mais especificamente, com um número de casos-índice e suas famílias, que considerámos adequado àquilo que o estudo se propôs avaliar. Além disso, a oportunidade de estudar 31 famílias da consulta de hemostase do Hospital Pediátrico, tornou possível que diversas doenças familiares, dentro da enorme variedade de patologias da hemostase, fossem apresentadas. A multiplicidade de técnicas laboratoriais de rastreio e diagnóstico que existe na área da hemostase, e de que dispõe o laboratório do HP, é também uma mais-valia no estudo do fenótipo laboratorial destes doentes e consequentemente para este estudo. Por outro lado, a discordância (real ou aparente) não tão infrequente de resultados, nomeadamente das alterações moleculares encontradas, traduz o facto de estes quadros serem, em muitos casos, pouco lineares, razão pela qual novos estudos podem auxiliar no seu esclarecimento e ser uma mais-valia.

Algumas limitações devem também ser apontadas, com o intuito de serem consideradas e acuteladas em estudos futuros. Mesmo com uma amostra suficiente em número, é importante admitir a sua distribuição pouco homogénea no que respeita ao número de casos de hemorragia (N=81) e número de casos de trombose (N=22). Por outro lado, a não existência de escalas de análise clínica exclusivas para a idade pediátrica, foi também uma condicionante neste estudo e com certeza é na prática clínica. Por fim, o facto de a manifestação clínica destas patologias ser muitas vezes dependente da exposição a situações de *stress* - desafio hemostático, principalmente em idade pediátrica, acaba por limitar a nossa percepção de clínica significativa.

## **Conclusão**

Este trabalho teve como objetivo a caracterização do fenótipo (clínico ou laboratorial) e genótipo de doentes em idade pediátrica com doenças congénitas da hemostase.

Cumprindo com o proposto foi possível reconhecer diversas formas de apresentação clínica destas patologias e perceber as dificuldades em estabelecer relações entre a clínica e os estudos funcionais laboratoriais, algo que em muitos casos torna o seu diagnóstico um enorme desafio.

Os estudos funcionais laboratoriais são a principal ferramenta de estudo das doenças da hemostase, na medida em que funcionam como testes de rastreio e são aqueles mais frequentemente disponíveis e de mais fácil acesso aos clínicos. Contudo, por vezes, os seus dados são insuficientes ou a sua interpretação é demasiado difícil para que se possa alcançar um diagnóstico concreto. Assim, conjugar esses dados com os estudos moleculares mostrou ser uma mais-valia no esclarecimento da clínica apresentada pelos doentes, mostrando que não existe, em hemostase, nenhum ensaio simples que permita um diagnóstico definitivo, uma avaliação global da hemostase ou uma predição de risco hemorrágico ou trombótico.

Por fim, a principal aprendizagem a retirar deste estudo são as evidentes particularidades dos desafios encontrados no diagnóstico destas doenças em idade pediátrica e na sua orientação, que muitas vezes passa pela necessidade de manter uma vigilância clínica regular dos doentes e de ir, ao longo do tempo, estabelecendo relações e interpretações da informação obtida pelos testes inicialmente disponíveis, com eventuais novos estudos mais globais e abrangentes.

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho contou com inúmeros apoios, que ao longo do processo se tornaram imprescindíveis e a quem também dedico o esforço e o sentimento de realização pessoal que carrego por finalizar este projeto.

À Dr<sup>a</sup> Teresa Seivas, o meu enorme agradecimento pela sua orientação, por todo o tempo disponibilizado e dedicação demonstrada neste projeto e por sempre se fazer presente ao longo do processo.

Ao Professor Jorge Saraiva, pela simpatia de ter aceitado participar neste projeto e pelas boas sugestões e disponibilidade mostrada ao longo do processo.

À Dr<sup>a</sup> Margarida Marques pela simpatia demonstrada e disponibilidade em ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas.

A todos os participantes, o meu profundo agradecimento por terem prontamente aceitado o convite de participar neste estudo.

Aos meus pais, Paulo e Noémia, por partilharem do meu sonho desde o primeiro dia, pelo apoio constante e pelas longas conversas cheias de ensinamentos.

Ao André, por ser um porto-seguro, por trazer a calma quando ela é mais necessária, pelo apoio e incentivo constantes em seguir firme naquilo que me faz feliz.

À Raquel e Mariana, por todos os momentos partilhados, pela amizade genuína, por darem tanto significado a um novo lar que certamente deixa saudades.

À Rita, por ter sido a amiga que apoia, mas acima de tudo entende, sente e vive junto comigo todos os momentos, os menos bons, mas acima de tudo os momentos felizes e de conquista.

À minha restante família, pelo interesse, apoio e carinho constantes ao longo dos anos.

A todos o meu profundo agradecimento!

## **Referências Bibliográficas**

1. Kriz N, Rinder CS, Rinder HM. Physiology of Hemostasis: With Relevance to Current and Future Laboratory Testing. Vol. 29, Clinics in Laboratory Medicine. 2009. p. 159–74.
2. Van Ommen CH, Peters M. Clinical practice: The bleeding child. Part I: Primary hemostatic disorders. Vol. 171, European Journal of Pediatrics. 2012. p. 1–10.
3. Van Herrewegen F, Meijers JCM, Peters M, Van Ommen CH. Clinical practice: The bleeding child. Part II: Disorders of secondary hemostasis and fibrinolysis. Vol. 171, European Journal of Pediatrics. 2012. p. 207–14.
4. Mutch NJ, Walters S, Gardiner EE, McCarty OJT, De Meyer SF, Schroeder V, et al. Basic science research opportunities in thrombosis and hemostasis: Communication from the SSC of the ISTH. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 1 de Junho de 2022;20(6):1496–506.
5. Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. Vol. 46, Blood Reviews. Churchill Livingstone; 2021.
6. Woods GM, Raffini L, Brandão LR, Jaffray J, Branchford BR, Ng CJ, et al. Practical considerations and consensus opinion for children’s hospital–based inpatient hemostasis and thrombosis (HAT) consultative services: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Pediatric/Neonatal Thrombosis and Hemostasis. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 1 de Setembro de 2022;20(9):2151–8.
7. van Ommen CH, Albisetti M, Bhatt M, Bonduel M, Branchford B, Chalmers E, et al. International pediatric thrombosis network to advance pediatric thrombosis research: Communication from the ISTH SSC subcommittee on pediatric and neonatal thrombosis and hemostasis. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 1 de Abril de 2021;19(4):1123–9.
8. Andrew M, David M, Adams M, Ali K, Anderson R, Barnard D, et al. Venous Thromboembolic Complications (VTE) in Children: First Analyses of the Canadian Registry of VTE [Internet]. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/83/5/1251/613723/1251.pdf>
9. Chalmers EA. Epidemiology of venous thromboembolism in neonates and children. Vol. 118, Thrombosis Research. 2006. p. 3–12.
10. Balduini CL, Melazzini F, Pecci A. Inherited thrombocytopenias—recent advances in clinical and molecular aspects. Vol. 28, Platelets. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 3–13.

11. Gresele P, Harrison P, Gachet C, Hayward C, Kenny D, Mezzano D, et al. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 de Fevereiro de 2015;13(2):314–22.
12. Perez Botero J, Di Paola J. Diagnostic approach to the patient with a suspected inherited platelet disorder: Who and how to test. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 de Setembro de 2021;19(9):2127–36.
13. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: A standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. Vol. 8, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010. p. 2063–5.
14. Rodeghiero F, Pabinger I, Ragni M, Abdul-Kadir R, Berntorp E, Blanchette V, et al. Fundamentals for a Systematic Approach to Mild and Moderate Inherited Bleeding Disorders: An EHA Consensus Report. *Hemasphere*. 1 de Outubro de 2019;3(5).
15. Park ES. When to suspect inherited platelet disorders and how to diagnose them. Vol. 63, *Clinical and Experimental Pediatrics*. 2020. p. 98–9.
16. Kim B. Diagnostic workup of inherited platelet disorders. Vol. 57, *Blood Research*. Korean Society of Hematology; 2022. p. 11–9.
17. Macfarlane RG, Biggs R. A THROMBIN GENERATION TEST THE APPLICATION IN HAEMOPHILIA AND THROMBOCYTOPENIA. Vol. 6, *J. clin. Path.* 1953.
18. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, Regnault V, Spronk H, Baglin T, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: An international multicentre study. *Thromb Res*. Dezembro de 2012;130(6):929–34.
19. Van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: Are we there yet? Vol. 142, *British Journal of Haematology*. 2008. p. 889–903.
20. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi A, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica* 2003; 88: 547-554.
21. Benes J, Zatloukal J, Kletecka J. Viscoelastic methods of blood clotting assessment - a multidisciplinary review. Vol. 2, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2015.
22. LUDDINGTON RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clinical and Laboratory Haematology*. 2005 Apr;27(2):81–90.

23. Wikkelsø A, Wetterslev J, Møller AM, Afshari A. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. Vol. 2016, Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2016.
24. Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Platelet function assays in diagnosis: an update. Vol. 12, Expert Review of Hematology. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 29–46.
25. WATSON JD, CRICK FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature [Internet]. 1953 Apr 25;171(4356):737–8.
26. Levy SE, Boone BE. Next-generation sequencing strategies. Cold Spring Harb Perspect Med. 1 de Julho de 2019;9(7).
27. Sanger F, Coulson AR. A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. Vol. 94, J. Mol. Biol. 1976.
28. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. Hum Immunol. 1 de Novembro de 2021;82(11):801–11.
29. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing. Vol. 141, Archives of Pathology and Laboratory Medicine. College of American Pathologists; 2017. p. 1544–57.
30. Gindele R, Kerényi A, Kállai J, Pfliegler G, Schlamadinger Á, Szegedi I, et al. Resolving differential diagnostic problems in von willebrand disease, in fibrinogen disorders, in prekallikrein deficiency and in hereditary hemorrhagic telangiectasia by next-generation sequencing. Life. 1 de Março de 2021;11(3):1–23.
31. Ver Donck F, Labarque V, Freson K. Hemostatic phenotypes and genetic disorders. Res Pract Thromb Haemost. 1 de Dezembro de 2021;5(8).
32. RODEGHIERO F, TOSETTO A, ABSHIRE T, ARNOLD DM, COLLIER B, JAMES P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2010 Sep;8(9):2063–5.
33. Gibson C, Spyropoulos A, Cohen A, Hull R, Goldhaber S, Yusen R, et al. The IMPROVEDD VTE Risk Score: Incorporation of D-Dimer into the IMPROVE Score to Improve Venous Thromboembolism Risk Stratification. TH Open. Junho de 2017;01(01):e56–65.

34. Sørensen B, Ingerslev J. Dynamic APTT parameters: Applications in thrombophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Fevereiro de 2012;10(2):244–50.
35. Naik S, Teruya J, Dietrich JE, Jariwala P, Soundar E, Venkateswaran L. Utility of platelet function analyzer as a screening tool for the diagnosis of Von Willebrand disease in adolescents with menorrhagia. *Pediatr Blood Cancer*. Julho de 2013;60(7):1184–7.
36. Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, Cattaneo M. Usefulness of PFA-100® testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: Comparison with the bleeding time. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Dezembro de 2007;5(12):2393–8.
37. Makhnoon S, Garrett LT, Burke W, Bowen DJ, Shirts BH. Experiences of patients seeking to participate in variant of uncertain significance reclassification research. *J Community Genet*. 4 de Abril de 2019;10(2):189–96.
38. Tao Y, Ma J, Feng Y, Gao C, Wu T, Xia Y, et al. Tissue-type plasminogen activator (tPA) homozygous Tyr471His mutation associates with thromboembolic disease. *MedComm (Beijing)*. 1 de Outubro de 2023;4(5).
39. Viganò S, D'Andrea G, Valle P Della, Santacroce R, Margaglione M, D'Angelo A. A novel allele variant of the SERPINF2 gene responsible for severe plasmin inhibitor ( $\alpha$ 2-antiplasmin) deficiency in an Italian patient. Vol. 166, *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 60–2.
40. Zeitler P, Meissner N, Kreth HW. Combination of von Willebrand disease type 1 and partial factor XII deficiency in children: clinical evidence for a diminished bleeding tendency. 1999.
41. Khider L, Gendron N, Mauge L. Inherited Thrombophilia in the Era of Direct Oral Anticoagulants. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
42. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. Vol. 122, *Thrombosis Research*. 2008. p. 736–42.
43. Depasse F, Binder NB, Mueller J, Wissel T, Schwers S, Germer M, et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. Vol. 19, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 2907–17.
44. Franchini M, Favaloro EJ, Lippi G. Glanzmann thrombasthenia: An update. Vol. 411, *Clinica Chimica Acta*. 2010. p. 1–6.

45. Ghosh K, Bhattacharya M, Chowdhury R, Mishra K, Ghosh M. Inherited Macrothrombocytopenia: Correlating Morphology, Epidemiology, Molecular Pathology and Clinical Features. Vol. 34, Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion. Springer; 2018. p. 387–97.
46. Hou Y, Shao L, Zhou H, Liu Y, Fisk DG, Spiteri E, et al. Identification of a pathogenic TUBB1 variant in a Chinese family with congenital macrothrombocytopenia through whole genome sequencing. Platelets. 2021;32(8):1108–12.
47. Weyand AC, Flood VH. Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. Vol. 35, Hematology/Oncology Clinics of North America. W.B. Saunders; 2021. p. 1085–101.
48. Mohan G, Malayala S V, Mehta P, Balla M. A Comprehensive Review of Congenital Platelet Disorders, Thrombocytopenias and Thrombocytopathies. Cureus. 31 de Outubro de 2020;



## Anexos

### Anexo I. Painel de Genes em Hemostase

<p><b>Ion GeneStudio S5</b> <b>(Termo Fisher Scientific®)</b></p> <p>Painel de 43 genes</p>	<p><b>Genes associados a anomalias de fatores da coagulação:</b></p> <p><i>F2, F3, F5, F7, F8, F9, F10, F11, F13A1, F13B</i></p> <p><i>LMAN1, MCFD2</i></p> <p><i>FGA, FGB, FGG</i></p> <p><i>GGCX, VKORC1</i></p> <p><i>VWF</i></p> <p><b>Genes associados a anomalias plaquetares:</b></p> <p><i>GP1BB, GP1BA, GP9</i></p> <p><i>ITGA2B, ITGB3</i></p> <p><i>NBEAL2, NBEA</i></p> <p><i>GP6</i></p> <p><i>TBXA2R, P2RY12, ANKRD26</i></p> <p><i>CYCS, PLA2G4A, TUBB1</i></p> <p><b>Genes associados a trombose:</b></p> <p><i>PROC, PROS1</i></p> <p><i>SERPINC1, SERPINE1, SERPINF2</i></p> <p><i>THBD</i></p> <p><i>PLAT, PLG</i></p> <p><i>ANXA5, PLAU</i></p> <p><i>F12</i></p>
---	---

## Anexo II. Motivos de consulta específicos no estudo

MCE em Hemorragia (N = 81)		MCE em Trombose (N = 22)	
Estudos familiares	55 (67,9%)	Estudos familiares	13 (59,1%)
Alteração dos tempos de coagulação	8 (9,9%)	História familiar	4 (18,2%)
Epistáxis	4 (4,9%)	Síndrome de Budd-Chiari	1 (4,5%)
Petéquias	3 (3,7%)	Enfarte cerebral	1 (4,5%)
História familiar	2 (2,5%)	FV de Leiden	1 (4,5%)
Hemorragia do SNC	2 (2,5%)	TVS do MSD	1 (4,5%)
DvW tipo 1	2 (2,5%)	TEP	1 (4,5%)
Equimoses	1 (1,2%)		
Hematomas	1 (1,2%)		
Gengivorragias	1 (1,2%)		
Menorragias	1 (1,2%)		
Coagulopatia refratária a vitamina K e Hipofibrinogenemia	1 (1,2%)		

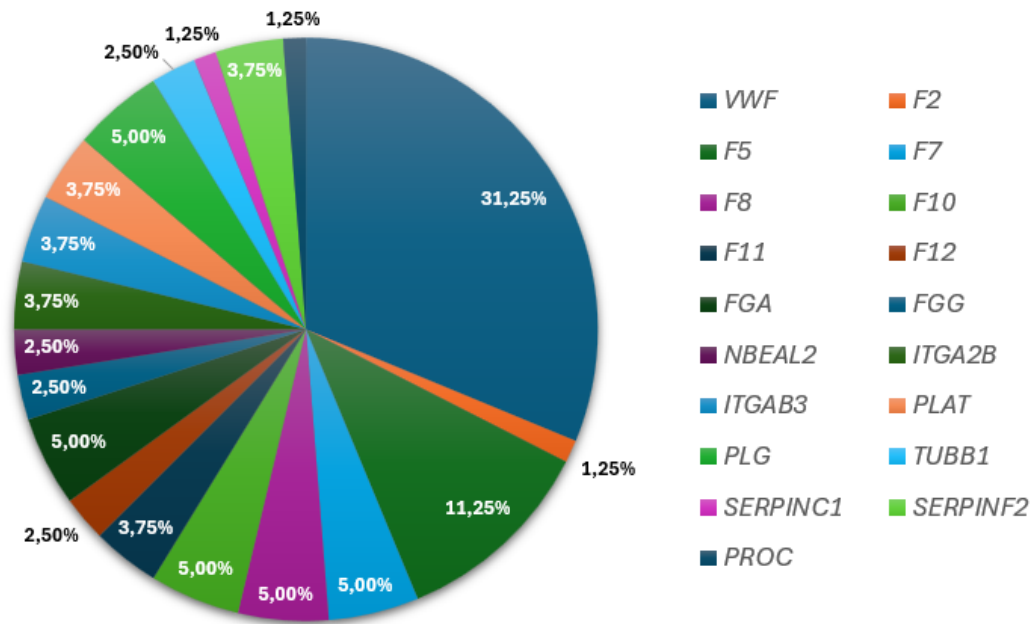
**Legenda:** MCE – Motivos de Consulta Específicos; SNC – Sistema Nervoso Central; DvW – Doença de von Willebrand; TVS – Trombose Venosa Superficial; MSD – Membro superior direito; TEP – Tromboembolismo pulmonar.

### Anexo III. Testes laboratoriais de primeira fase em hemostase

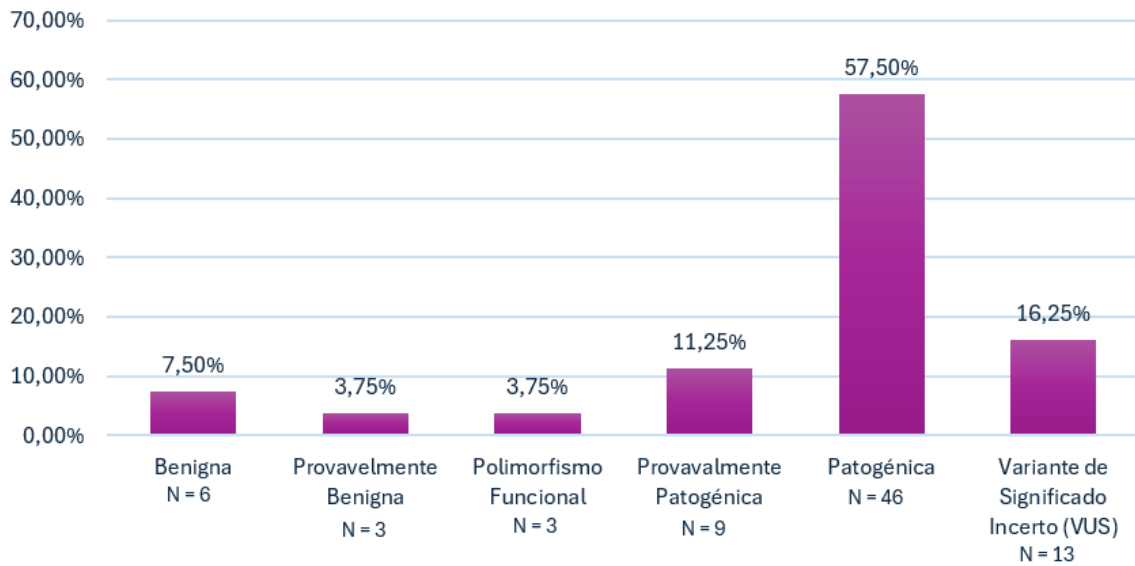
<b>Grupo de Hemorragia (N=81)</b>		
<b>Plaquetas</b> (1x10 <sup>9</sup> /L)  N = 150-400x10 <sup>9</sup> /L (IA) 189-401x10 <sup>9</sup> /L (IP) *	Valor Máx. 485,0 Mín. 28,3  % de doentes com valor de plaquetas (N = 75) Normal 97,1% Diminuído 1,3%	
<b>Tempo de Protrombina (TP)</b> (segundos)  N = 10,0-14,0 s (IA) 9,5-14,6 s (IP) *	Valor Máx. 19,6 Min. 9,9  % de doentes com valor de TP (N = 81) Normal 95,1% Prolongado 4,9%	
<b>Tempo de Tromboplastina parcial ativada (TTPa)</b> (segundos)  N = 25,0-35,0 s (IA) 24,0-45,6 s (IP) *	Valor Máx. 65,8 Min. 24,8  % de doentes com valor de TTPa (N = 81) Normal 87,7% Prolongado 9,9%	
<b>Tempo de Trombina (TT)</b> (segundos)  N = 18,5-24,0 s (IA) 15,8-24,9 s (IP) *	Valor Máx. 24,2 Min. 13,6  % de doentes com valor de TT (N = 17) Normal 76,5% Prolongado 17,6%	
<b>Fibrinogénio</b> (mg/dL)  N = 200-400 mg/dL (IA) 136-537 mg/dL (IP) *	Valor Máx. 436 Mín. 96  % de doentes com valor de Fibrinogénio (N = 34) Normal 85,3% Diminuído 14,7%	
<b>Grupo de Trombose (N=22)</b>		
<b>Tempo de Trombina (TT)</b> (segundos)  N = 18,5-24,0 s (IA) 15,8-24,9 s (IP) *	Valor Máx. 19,2 Min. 16,0  % de doentes com valor de TT (N = 3) Normal 100% Prolongado 0%	
<b>Fibrinogénio</b> (mg/dL)  N = 200-400 mg/dL (IA) 136-537 mg/dL (IP) *	Valor Máx. 369 Min. 227  % de doentes com valor de Fibrinogénio (N = 5) Normal 100% Dim. 0%	

**Legenda:** Máx – valor máximo; Mín – valor mínimo; IP – Idade Pediátrica; IA – Idade Adulta;

\* De lembrar que em todo o caso os valores de referência sofrem ligeiras adaptações consoante a faixa etária dentro da idade pediátrica.



**Anexo IV. Genes alterados no grupo de Hemorragia**



**Anexo V. Classificação das alterações moleculares encontradas no grupo de Hemorragia**

**Anexo VI.** Distribuição percentual das doenças familiares no grupo de hemorragia

<b>Grupo de Doença</b>	<b>Doença familiar</b>	
Doença de von Willebrand (N = 33)	DvW tipo 1 (N = 19/33)	57,58%
	DvW tipo 1 e Macrotrombocitopenia (N = 4/33)	12,12%
	DvW tipo 1 e Deficiência de FXII (N = 3/33)	9,09%
	DvW tipo 1 e Deficiência de FX e Deficiência de A2-antiplasmina (N = 3/33)	9,09%
	DvW tipo 2B e Deficiência de FV e Portador da alteração no gene NBEAL2 (N = 4/33)	12,12%
Deficiência de fatores (N = 29)	Deficiência de FV (N = 6/29)	20,69%
	Deficiência de FV e Deficiência de FVII (N = 3/29)	10,34%
	Deficiência de FV e Deficiência de plasminogénio (N = 4/29)	13,79%
	Deficiência de FV e Macrotrombocitopenia e Deficiência de plasminogénio (N = 2/29)	6,90%
	Deficiência de FVII (N = 4/29)	13,79%
	Deficiência de FX (N = 3/29)	10,34%
	Deficiência de FXI (N = 4/29)	13,79%
	Deficiência de FXI e Deficiência de proteína C (N = 3/29)	10,34%
Alterações do fibrinogénio (N = 8)	Hipodisfibrinogenemia (N = 3/8)	37,5%
	Hipofibrinogenemia (N = 5/8)	62,5%
Alterações do plasminogénio (N = 4)	Alterações do t-PA (N = 4)	100%
Hemofilia (N = 5)	Hemofilia A (N = 5)	100%
Trombofilia (N = 2)	Deficiência de Antitrombina (N = 1/2)	50,0%
	Portador da variante PRT 20210GA (N = 1/2)	50,0%

**Legenda:** DvW – Doença de von Willebrand; t-PA – Ativador do plasminogénio tecidual.

## Anexo VII. Doença de von Willebrand e alterações associadas no grupo de Hemorragia

Doença de von Willebrand	
<b>DvW tipo 1</b>	
6 famílias (F1, F4, F8, F11, F12, F21) 19 indivíduos Score de hemorragia: máx = 3 e mín = 0 FvW:RC: máx = 114,0% e mín = 9,4%	<b>Estudo molecular</b> 18 indivíduos fizeram estudo molecular: - 12 indivíduos têm alteração no gene <i>VWF</i> - 1 indivíduo não apresenta alterações moleculares
<b>DvW tipo 1 e Macrotrombocitopenia</b>	
1 família (F15) 4 indivíduos Score de hemorragia: máx = 6 e mín = 2 FvW:RC: máx = 50,0% e mín = 23,0% Plaquetas: máx = 324,0x10 <sup>9</sup> /L e mín = 171,0x10 <sup>9</sup> /L Volume plaquetar médio: máx = 12,8fL e mín = 10,2fL  <b>LTA »</b> Diminuída com 1 agonista (colagénio) em 1 indivíduo  <b>Citometria »</b> Alterações da ativação em 2 indivíduos (CD62-P diminuído com ADP)	<b>Estudo molecular</b> 3 indivíduos fizeram estudo molecular. Todos apresentam alteração nos genes <i>VWF</i> , <i>ITGA2B</i> , <i>ITGB3</i> .
<b>DvW tipo 1 e Deficiência de FXII</b>	
1 família (F3) 3 indivíduos Score de hemorragia: máx = 3 e mín = 0 TTPa: máx = 42,8s e mín = 33s FvW:RC: máx = 67,1% e mín = 46,5% Fator XII: máx = 64,9% e mín = 26,0%	<b>Estudo molecular</b> Os 3 elementos da família fizeram estudo molecular: - 2 indivíduos têm alteração nos genes <i>VWF</i> e <i>F12</i> - 1 indivíduo tem apenas alteração no gene <i>VWF</i>
<b>DvW tipo 1 e Deficiência de FX e Deficiência de A2-Antiplasmina</b>	
1 família (F5) 3 indivíduos Score de hemorragia: máx = 2 e mín = 1 FvW:RC: máx = 35,4% e mín = 26,0% Fator X: máx = 64,0% e mín = 57,9% A2-Antiplasmina: máx = 106 mg/dL e mín = 84 mg/dL	<b>Estudo molecular</b> Os 3 elementos da família fizeram estudo molecular. Todos apresentam variantes nos genes <i>VWF</i> , <i>F10</i> e <i>SERPINF2</i> .
<b>DvW tipo 2B e Deficiência de FV e Portador da alteração NBEAL2</b>	
1 família (F18) 4 indivíduos Score de hemorragia: máx = 2 e mín = 0 Plaquetas: máx = 445,0x10 <sup>9</sup> /L e mín = 232,0x10 <sup>9</sup> /L FvW:RC: máx = 128,8% e mín = 77,0% Fator V: máx = 91,0% e mín = 41,0%  <b>LTA »</b> Diminuída com 2 agonistas (ADP/Epinefrina) em 1 indivíduo  <b>Citometria »</b> Alterações da ativação em 1 indivíduo (CD62-P diminuído com AA)	<b>Estudo molecular</b> Os 4 elementos da família fizeram estudo molecular: - 1 indivíduo tem alterações nos genes <i>VWF</i> , <i>F5</i> e <i>NBEAL2</i> - 1 indivíduo tem alterações nos genes <i>VWF</i> e <i>F5</i> - 1 indivíduo tem alteração no gene <i>F5</i> - 1 indivíduo tem alteração no gene <i>NBEAL2</i>

**Legenda:** Máx – valor máximo; Mín – valor mínimo; FvW: RC – Fator de von Willebrand: cofator de ristocetina; LTA – Teste de agregação plaquetar; TTPa – Tempo de Tromboplastina parcial ativada; AA – Ácido araquidónico;

## Anexo VIII. Deficiências de Fatores encontradas no grupo de Hemorragia

Deficiências de Fatores	
<b>Deficiência de Fator V</b>	
1 família (F23) 6 indivíduos Score de hemorragia: máx = 2 e mín = 0 Fator V: máx = 78,0% e mín = 38,0%	<b>Estudo molecular</b>  3 elementos da família fizeram estudo molecular: - 1 indivíduo tem alteração no gene <i>F5</i> - 2 indivíduos não apresentam a variante familiar
<b>Deficiência de Fator V e Deficiência de FVII</b>	
1 família (F6) 3 indivíduos Score de hemorragia: máx = 1 e mín = 0 Fator V: máx = 89,6% e mín = 31,6% Fator VII: máx = 84,6% e mín = 49,7%	<b>Estudo molecular</b>  2 elementos da família fizeram estudo molecular, ambos com alteração nos genes <i>F5</i> e <i>F7</i>
<b>Deficiência de FV e Deficiência de Plasminogénio</b>	
1 família (F16) 4 indivíduos Score de hemorragia: máx = 1 e mín = 0 Fator V: máx = 96,1% e mín = 74,4% Plasminogénio: máx = 85,0% e mín = 38,0% TGT Bleed Screen: máx = mín = 75% TGT Thrombo Screen: máx = 66% e mín = 24% PFA (col/epi): máx = 164s e mín = 113s PFA (col/ADP): máx = mín = 61s	<b>Estudo molecular</b>  Os 4 elementos da família fizeram estudo molecular: - 1 indivíduo tem alteração nos genes <i>F5</i> e <i>PLG</i> - 1 indivíduo tem alteração no gene <i>F5</i> - 1 indivíduo tem alteração no gene <i>PLG</i> - 1 indivíduo não tem nenhuma das variantes familiares
<b>Deficiência de FV e Macrotrombocitopenia e Deficiência de Plasminogénio</b>	
1 família (F17) 2 indivíduos Score de hemorragia: máx = 5 e mín = 3 Fator V: máx = 72,2% e mín = 42,0% Plaquetas: máx = $234 \times 10^9/L$ e mín = $208 \times 10^9/L$ Plasminogénio: máx = 63,0% e mín = 59,0% TGT Bleed Screen: máx = mín = 65% TGT Thrombo Screen: máx = mín = 55% PFA (col/epi): máx = 103s e mín = 82s PFA (col/ADP): máx = 99s e mín = 65s	<b>Estudo molecular</b>  Os 2 elementos da família fizeram estudo molecular: - 1 indivíduo tem alteração nos genes <i>F5</i> , <i>TUBB1</i> e <i>PLG</i> - 1 indivíduo tem alteração nos genes <i>TUBB1</i> e <i>PLG</i>
<b>Deficiência de FVII</b>	
1 família (F22) 4 indivíduos Score de hemorragia: máx = mín = 0 Fator VII: máx = 95,0% e mín = 26,3%	<b>Estudo molecular</b>  Os 2 elementos da família fizeram estudo molecular e ambos têm a variante no gene <i>F7</i>
<b>Deficiência de FX</b>	
1 família (F10) 3 indivíduos Score de hemorragia: máx = 5 e mín = 1 Fator X: máx = mín = 98,5%	<b>Estudo molecular</b>  2 elementos da família fizeram estudo molecular: - 1 indivíduo tem alteração no gene <i>F10</i> - 1 indivíduo não tem a variante familiar

Deficiência de FXI	
1 família (F7) 4 indivíduos Score de hemorragia: máx = 1 e mín = 0 Fator XI: máx = 93,0% e mín = 34,0%	Estudo molecular
	2 elementos da família fizeram estudo molecular e ambos têm alteração no gene <i>F11</i>
Deficiência de FXI e Deficiência de PROC	
1 família (F13) 3 indivíduos Score de hemorragia: máx = 4 e mín = 0 Fator XI: máx = 93,0% e mín = 34,0% Proteína C funcional: máx = 80,0% e mín = 64,0%	Estudo molecular
	1 elemento da família fez estudo molecular e apresenta variantes nos genes <i>F11</i> e <i>PROC</i>

**Legenda:** Máx – valor máximo; Mín – valor mínimo; TGT – Tromboelastograma; PFA (col/epi) – Teste de função plaquetar (colagênio/epinefrina); PFA (col/ADP) – Teste de função plaquetar (colagênio/ADP).

#### Anexo IX. Alterações de Fibrinogênio no grupo de Hemorragia

Alterações do Fibrinogênio	
Hipodisfibrinogenemia	
1 família (F19) 3 indivíduos Score de hemorragia: máx = 3 e mín = 0 Tempo de Trombina: máx = 19,4s e mín = 15,7s Fibrinogênio: máx = 217,0 mg/dL e mín = 129,0 mg/dL TGT Bleed Screen: máx = 108% e mín = 49,0% TGT Thrombo Screen: máx = 61% e mín = 37%  <b>Quantra »</b> Contribuição do fibrinogênio para a firmeza do coágulo diminuída em 2 indivíduos	Estudo molecular
	2 elementos da família fizeram estudo molecular. Ambos têm alteração no gene <i>FGG</i> .
Hipofibrinogenemia	
1 família (F24) 5 indivíduos Score de hemorragia: máx = mín = 0 Tempo de Trombina: máx = 24,2s e mín = 14,8s Fibrinogênio: máx = 288,0 mg/dL e mín = 96,0 mg/dL TGT Bleed Screen: máx = mín = 82,0% TGT Thrombo Screen: máx = mín = 5,0%  <b>ROTEM »</b> Contribuição do fibrinogênio para o coágulo diminuída em 1 indivíduo	Estudo molecular
	Os 5 elementos da família fizeram estudo molecular: - 4 indivíduos têm alteração no gene <i>FGA</i>

**Legenda:** Máx – valor máximo; Mín – valor mínimo; TGT – Tromboelastograma; ROTEM – Tromboelastograma Rotacional;



## Anexo X. Alterações do Plasminogénio no grupo de Hemorragia

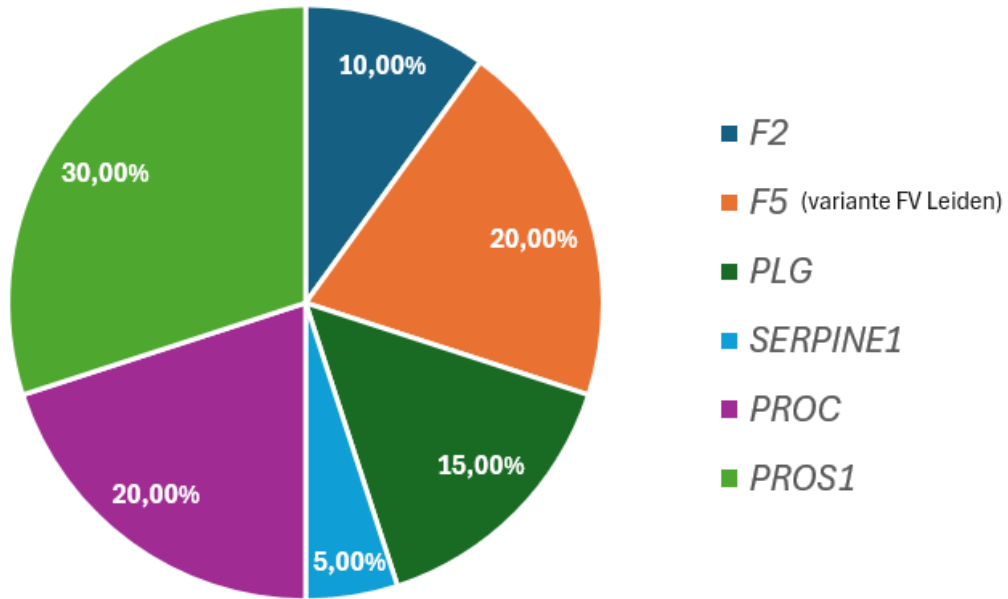
Alterações do Plasminogénio	
Alterações do t-PA	
<p>1 família (F9) 4 indivíduos Score de hemorragia: máx = 4 e mín = 0 Plasminogénio: máx = 99,0% e mín = 94,0%</p> <p><b>LTA »</b> Diminuída com 2 agonistas (AA) em 1 indivíduo</p> <p><b>Citometria »</b> Alterações da ativação em 1 indivíduo (CD62-P/CD63 diminuído com AA e com Epinefrina)</p>	<p><b>Estudo molecular</b></p> <p>Os 4 elementos da família fizeram estudo molecular: - 3 indivíduos têm alteração no gene <i>PLAT</i> - 1 indivíduo não tem a variante familiar</p>

**Legenda:** t-PA – Ativador do plasminogénio tecidual; Máx – valor máximo; Mín – valor mínimo; LTA – Teste de agregação plaquetar; AA – Ácido araquidónico.

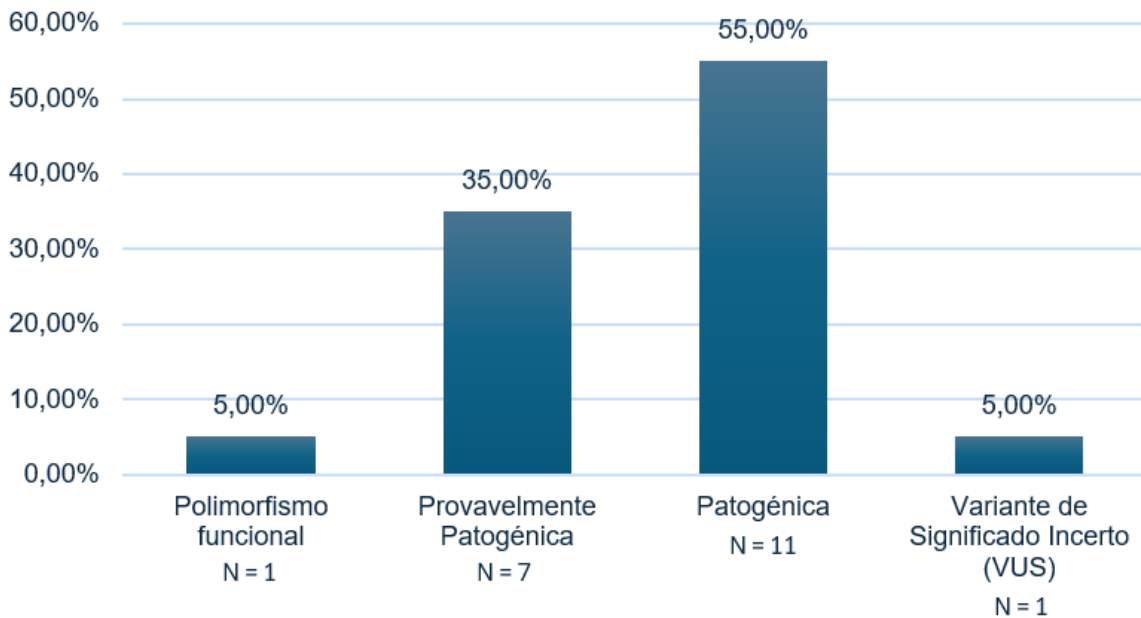
## Anexo XI. Hemofilia no grupo de Hemorragia

Hemofilia	
Hemofilia A	
<p>1 família (F2) 5 indivíduos Score de hemorragia: máx = 5 e mín = 0 Fator VIII: máx = 97,0% e mín = 19,0%</p>	<p><b>Estudo molecular</b></p> <p>Os 5 elementos da família fizeram estudo molecular: - 4 indivíduos têm alteração no gene <i>F8</i></p>

**Legenda:** Máx – valor máximo; Mín – valor mínimo.



**Anexo XII.** Genes alterados no grupo de Trombose



**Anexo XIII.** Classificação das alterações moleculares encontradas no grupo de Trombose

## Anexo XIV. Doenças familiares no grupo de Trombose

Doenças familiares	
<b>Alterações da fibrinólise</b>	
1 família (F27) 3 indivíduos Score de trombose: máx = 3 e mín = 0 Plasminogénio: máx = 94,0% e mín = 82,0% TGT Thrombo Screen: máx = mín = 29,0%	<b>Estudo molecular</b>  Os 3 elementos da família fizeram estudo molecular. Todos apresentam alteração no gene <i>PLG</i> .
<b>Deficiência de Proteína C</b>	
1 família (F31) 4 indivíduos Score de trombose: máx = 2 e mín = 0 Proteína C funcional: máx = 124% e mín = 23,0%	<b>Estudo molecular</b>  Os 4 elementos da família fizeram estudo molecular: - 3 indivíduos têm alteração no gene <i>PROC</i> - 1 indivíduo não tem a variante familiar
<b>Deficiência de Proteína S</b>	
2 famílias (F25, F29) 7 indivíduos Score de trombose: máx = 3 e mín = 0 Proteína S livre: máx = 95,0% e mín = 45,0% TGT Thrombo Screen: máx = mín = 50,0%	<b>Estudo molecular</b>  6 indivíduos fizeram estudo molecular: - 4 indivíduos têm alteração no gene <i>PROS1</i> - 2 indivíduos não têm a variante
<b>Portador da variante FV Leiden e Deficiência de Proteína S</b>	
1 família (F28) 2 indivíduos Score de trombose: máx = 5 e mín = 0 Proteína S livre: máx = 72,0% e mín = 60,0%	<b>Estudo molecular</b>  Os 2 elementos da família fizeram estudo molecular. Ambos têm variantes nos genes <i>PROS1</i> e <i>F5</i> (variante FV Leiden).
<b>Portador da variante FV Leiden e Deficiência de Proteína C e Deficiência de PAI-1</b>	
1 família (F30) 3 indivíduos Score de trombose: máx = 3 e mín = 0 Proteína C funcional: máx = 93% e mín = 52,0% PAI-1: máx = mín = 32,2 ng/mL	<b>Estudo molecular</b>  Os 3 elementos da família fizeram estudo molecular: - 1 indivíduo tem alteração nos genes <i>F5</i> (variante FV Leiden), <i>PROC</i> e <i>SERPINE1</i> - 1 indivíduo tem alteração no gene <i>F5</i> (variante FV Leiden) - 1 indivíduo não tem as variantes familiares
<b>Portador da variante PRT 20210GA</b>	
1 família (F26) 3 indivíduos Score de trombose: máx = 2 e mín = 0	<b>Estudo molecular</b>  Os 3 elementos da família fizeram estudo molecular. - 2 indivíduos têm alteração no gene <i>F2</i> - 1 indivíduo não tem a variante familiar

**Legenda:** Máx – valor máximo; Mín – valor mínimo; TGT – Tromboelastograma; PAI-1 – Inibidor 1 do Ativador do Plasminogénio;

**Anexo XV.** Alterações moleculares previsivelmente associadas a patologia plaquetar congénita

<b>Gene alterado</b>	<b>Informações adicionais</b>	<b>Classificação da alteração molecular</b>	<b>Provável Fenótipo</b>
<b>ITGAB2</b>	<p>1 família (F15) 3 indivíduos PFA (col/epi e col/ADP) prolongados</p> <p><b>LTA »</b> Diminuída com 1 agonista (colagénio)</p> <p><b>Citometria »</b> Alteração da ativação (CD62-P diminuído com ADP)</p>	Provavelmente Benigna	Macrotrombocitopenia (Trombastenia de Glanzman – like)
<b>ITGB3</b>	<p>1 família (F15) 3 indivíduos PFA (col/epi e col/ADP) prolongados</p> <p><b>LTA »</b> Diminuída com 1 agonista (colagénio)</p> <p><b>Citometria »</b> Alteração da ativação (CD62-P diminuído com ADP)</p>	VUS	Macrotrombocitopenia (Trombastenia de Glanzman – like)
<b>TUBB1</b>	<p>1 família (F17) 2 indivíduos Sem alteração nos estudos funcionais</p>	Patogénica	Macrotrombocitopenia autossómica dominante
<b>NBEAL2</b>	<p>1 família (F18) 2 indivíduos</p> <p><b>LTA »</b> Diminuída com 2 agonistas (ADP e epinefrina)</p> <p><b>Citometria »</b> Alteração da ativação (CD62-P diminuído com AA)</p>	VUS	Síndrome da Plaqueta Cinzenta

**Legenda:** PFA (col/epi e col/ADP) – Teste de função plaquetar (colagénio/epinefrina e colagénio/ADP); LTA – Teste de agregação plaquetar; AA – Ácido araquidónico; VUS – Variante de significado incerto;