

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Características Moleculares de Genes e Proteínas Relacionados à Hemofilia
- ✓ Espectro de Variantes Causadoras de Hemofilia
- ✓ Outros Fenótipos Associados ao Gene F8
- ✓ Outros Fenótipos Associados ao Gene F9
- ✓ Proteção contra Trombose Venosa Profunda (TVP)
- ✓ Espectro de Abordagens Práticas Aplicadas em Testes Genéticos
- ✓ Nomenclatura Padronizada e Potencial Patogênico de Variantes

A análise genética da hemofilia é importante para definir a causa subjacente do distúrbio hemorrágico em indivíduos afetados e seus familiares. A compreensão da variante genética associada ao fenótipo pode ajudar a prever a gravidade do distúrbio, incluindo o risco de desenvolvimento de inibidores. Também auxilia na identificação de mulheres portadoras de hemofilia, às quais pode ser oferecido diagnóstico pré-natal. É importante que os indivíduos submetidos a investigação genética recebam aconselhamento genético adequado antes de qualquer teste. As recentes Diretrizes da WFH para Manejo da Hemofilia (3ª edição) (Srivastava et al, 2019) contêm um capítulo dedicado à avaliação genética de indivíduos com hemofilia A e hemofilia B. Esse capítulo do manual de laboratório descreve a base genética da hemofilia A e B e destaca a heterogeneidade de abordagens práticas atualmente disponíveis em todo o mundo que podem ser utilizadas para investigar as variantes genéticas subjacentes. Também descreve o uso de nomenclatura padronizada para a descrição de variantes genéticas e sua classificação de patogenicidade, além de destacar a importância de um laudo de interpretação claro e conciso que descreva o resultado genético e as implicações para o indivíduo e sua família.

Características Moleculares de Genes e Proteínas Relacionados à Hemofilia: as características moleculares dos genes da hemofilia, FVIII ou F8 de coagulação e FIX ou F9 de coagulação, são apresentadas na Tabela 41. A Tabela 41 mostra as coordenadas genômicas em GRCh38 (hg38), tamanho dos genes e localização citogenética de F8 e F9, sua complexidade de éxons (número de éxons), versões atualizadas e com curadoria de arquivos RefSeq (ou seja, NG..., NM..., NP...) e o tamanho molecular relevante dos principais transcritos de genes e suas isoformas polipeptídicas derivadas.

Tabela 41. Características moleculares dos genes F8 e F9

Símbolo oficial do HGNC	Nome do gene	Localização citogenética	GRCh38 (hg38) (coordenadas) NC_000023.11 (comprimento [pb])	RefSeq genômica (faixa de coordenadas)	Principal transcrito* RefSeq (comprimento [nts]) (éxons)	Principal proteína* RefSeq (comprimento [aa])	Nº OMIM
F8	Fator de coagulação VIII	Xq28	complemento (154.835.792-155.022.723) (186.931)	NG_011403.2 (5.001-191.932)	NM_000132.4 (9032) (26)	NP_000123.1 (2351)	300841
F9	Fator de coagulação IX	Xq27.1	(139.530.739-139.563.459) (32.720)	NG_007994.1 (5.001-37.723)	NM_000133.4 (2800) (8)	NP_000124.1 (461)	300746

HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee [Comitê de Nomenclatura de Genes da HUGO]. Comprimento [unidades]: [pb], pares de bases; [nts], nucleotídeos; [aa]; aminoácidos. *Apenas a variante de transcrição mais longa (mais significativa) e sua principal isoforma derivada são indicadas. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

(<https://omim.org/>); n°, número de acesso. Os dados foram coletados do NCBI (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia), acessado em 18/01/2024 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). RefSeq indica arquivos de Sequência de Referência da plataforma do navegador do NCBI.

Ademais, a Tabela 42 apresenta as características mais relevantes das proteínas de coagulação FVIII e FIX. A Tabela 42 compila dados das principais isoformas das proteínas, da cartografia de aminoácidos (aa) de domínios de proteínas reconhecíveis (especificados pelo banco de dados UNIPROT) e de arquivos do banco de dados de proteínas (PDB) associados a modelos de estrutura 3D (coordenadas tridimensionais dos átomos de FVIIIa e FIXa).

Tabela 42. Características moleculares das proteínas fatores VIII e IX de coagulação

Símbolo da proteína	Nome da Proteína principal isoforma	Isoforma RefSeq (comprimento [aa])	N° UNIPROT*	Domínios de isoformas: UNIPROT (coordenadas de aa)	ID no PDB de estrutura 3D (coordenadas de aa)
FVIII	fator VIII de coagulação isoforma a preproteína	NP_000123.1 (2351)	P00451	Peptídeo sinal: (1-19) A1: F5/8 tipo A 1 (20-348) A2: F5/8 tipo A 2 (399-730) B: região B (760-1667) A3: F5/8 tipo A 3 (1713-2040) C1: F5/8 tipo C 1 (2040-2188) C2: F5/8 tipo C 2 (2193-2345)	Mature FVIIIa 2R7E.pdb** A: Cadeia pesada A1-A2 (Antiga 1-725) B: Cadeia leve A3-C1-C2 (Antiga 1689-2332)
FIX	fator IX de coagulação isoforma 1 preproteína	NP_000124.1 (461)	P00740	Peptídeo sinal: (1-28) – Propeptídeo: (29-46) Gla: rico em γ -carboxiglutamato (47-92) EGF1: EGF-like 1 ligado a Ca^{++} (93-129) EGF2: EGF-like 2 (130-171) Act_peptide: peptídeo de ativação (192-226) Tryp_SPC: serina protease semelhante à tripsina (227-457)	Homology model FIXa.pdb*** L: Cadeia leve Gla-EGF1-EGF2 (47-171) H: Cadeia pesada Tryp_SPC (227-461)

*Navegador para proteínas UNIPROT (URL: <https://www.uniprot.org/>). **Shen et al, 2008. ***Curadores do Projeto de Bancos de Dados de Variantes da EAHAD (Rallapalli et al, 2013; McVey et al, 2020). A maioria dos dados foi coletada dos Bancos de Dados de Variantes de Fatores de Coagulação da EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders* [Associação Europeia para Hemofilia e Distúrbios Associados]) (URL: <https://dbs.eahad.org/>), acessados em 18/01/2024. Códon e aminoácidos (aa) são numerados seguindo as regras da HGVS (ou seja, códon +1 que codifica o primeiro resíduo (Met) do polipeptídeo primário em FVIII e FIX). Na numeração antiga, códon/aminoácido +1 refere-se ao que codifica o primeiro aminoácido da proteína FVIII madura (excluindo 19 aa do peptídeo sinal) e da proteína FIX (excluindo 46 aa do peptídeo sinal e do propeptídeo). Embora a numeração da HGVS seja recomendada, a numeração antiga foi amplamente utilizada em publicações anteriores.

Espectro de Variantes Causadoras de Hemofilia: a maioria das variantes patogênicas que afetam o gene F8 causa hemofilia A, enquanto a maioria das variantes patogênicas de F9 causa hemofilia B. O banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (<https://www.omim.org>) compila um grande conjunto de informações abrangentes sobre genes humanos, indica variantes que afetam sua função e descreve e classifica seus fenótipos associados. O banco de dados OMIM indica que as variantes de F8 estão associadas a dois fenótipos diferentes: hemofilia A (#306700) e trombofilia 13 (ligada ao X, devido a defeito do FVIII) (#301071) (THPH13); enquanto de F9, a quatro fenótipos: hemofilia B (#306900), trombofilia 8 (ligada ao X, devido a defeito do FIX) (#300807) (THPH8), proteção contra trombose venosa profunda (TVP) (#300807) e sensibilidade à varfarina (#301052). A Tabela 43 e a Tabela 44, respectivamente, mostram o espectro de mutações no gene F8 causadoras de hemofilia A de acordo com

os níveis de atividade do FVIII de coagulação (FVIII:C), e mutações no gene F9 causadoras de hemofilia B, associadas aos níveis de FIX (FIX:C). As prevalências mais relevantes das variantes causadoras de hemofilia A e hemofilia B, listadas nas Tabelas 43 e 44, foram extraídas dos bancos de dados da *European Association for Haemophilia and Allied Disorders* (EAHAD). O banco de dados de variantes de F8 da EAHAD exclui inversões prevalentes associadas a hemofilia A grave envolvendo quase metade dos pacientes. Para apresentar uma prevalência imparcial de mutações causadoras de hemofilia A grave, suas frequências relativas foram combinadas levando em consideração as médias mundiais das inversões do íntron 22 (Inv22) de F8 relatadas por Antonarakis et al (1995) e aquelas estimadas para a inversão do íntron 1 (Inv1) de F8 a partir de uma série internacional de pacientes com hemofilia A (Rossetti et al, 2004) (Tabela 43).

Tabela 43. Variantes de F8 causadoras de hemofilia A mais típicas em pacientes hemizigotos a partir de fontes internacionais.

Tipo de variante por efeito	Não inversões Grave Nº casos (%)	Global Grave Nº casos (%)	Moderada Nº casos (%)	Leve Nº casos (%)	Referências
Missense	1418 (30,2)	(16,2)	1340 (79,9)	3048 (95,8)	F8_var_db EAHAD*
Indel in-frame	70 (1,5)	(0,8)	19 (1,1)	32 (1,0)	F8_var_db EAHAD*
Indel frameshift	1487 (31,7)	(17,0)	142 (8,5)	27 (0,9)	F8_var_db EAHAD*
Defeito de splicing	320 (6,8)	(3,7)	98 (5,8)	68 (2,1)	F8_var_db EAHAD*
Nonsense	968 (20,6)	(11,1)	59 (3,5)	4 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
Grande deleção (SV)	426 (9,1)	(4,9)	19 (1,1)	3 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
Total de não inversões	4689 (100)	(53,7)	1677 (100)	3182 (100)	F8_var_db EAHAD*
Inv22 (SV) tipo 1		740 (35,4)			Antonarakis et al, 1995
Inv22 (SV) tipo 2		140 (6,7)			
Inv22 (SV) de outros tipos		25 (1,1)			
Total de Inv22		2093 (43,2)			
Inv1 (SV)		19 (3,1)			Rossetti et al, 2004
Total de Inv1		622 (3,1)			

SV indica variantes estruturais, incluindo variações do número de cópias (CNVs), como grandes deleções de F8 e grandes inversões de F8 (não CNVs), como a inversão do íntron 22 (Inv22) e a inversão do íntron 1 (Inv1). Os dados de pacientes não informativos com inversões de F8 foram obtidos dos bancos de dados da EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) que registram pacientes individuais. *Banco de dados de variantes de F8 (<http://f8-db.eahad.org/>).

A variante causadora de hemofilia A grave mais característica e recorrente em todo o mundo é a inversão do íntron 22 de F8, uma grande inversão perfeita de 600 kb mediada pela recombinação entre repetições invertidas de 10 kb (int22h ou h), que rompe a estrutura do F8 e impede o splicing normal de RNA entre os éxons 22 e 23 (Lakich et al, 1993; Naylor et al, 1993). Há uma cópia intragênica de int22h do F8 dentro do íntron 22 (h1) e duas cópias extragênicas (h2 e h3). Dependendo de qual cópia extragênica se recombina com a intragênica, a Inv22 apresenta padrão tipo 1 (h1/h3) ou padrão tipo 2 (h1/h2). A Inv22 se origina quase exclusivamente de células germinativas masculinas (Rossiter et al, 1995) e, conseqüentemente, a maioria das mães de pacientes com Inv22 é portadora (Tizzano et al, 1995). O mecanismo molecular da recombinação homóloga não alélica entre grandes repetições invertidas na meiose masculina corrobora a recorrência da Inv22 como a causa mais prevalente de hemofilia A grave em todo o mundo (Tabela 43). Da mesma forma, a inversão do íntron 1 (Inv1) de F8 é uma grande inversão perfeita de DNA causada pela recombinação entre repetições invertidas de 1 kb (int1h), que rompe a estrutura do F8 no íntron 1 (Bagnall et al, 2001) e envolve uma média estimada de 3% dos pacientes com hemofilia A grave em todo o mundo (Tabela 43).

O grupo restante de pacientes com hemofilia A grave, moderada ou leve (Tabela 43), não informativos para as inversões de F8, e todos os pacientes com hemofilia B (Tabela 44) mostram um espectro típico de variantes deletérias, incluindo substituições de nucleotídeo único (SNV) prevendo missense, nonsense ou defeitos de splicing; pequenas inserções/deleções (INDEL) prevendo frameshifts ou alterações in-frame; ou, menos frequentemente, grandes variações do número de cópias (CNVs), principalmente grandes deleções.

Tabela 44. Variantes de F9 causadoras de hemofilia B mais típicas em pacientes hemizigotos a partir de fontes internacionais

Tipo de variante por efeito	Grave N° casos (%)	Moderada N° casos (%)	Leve N° casos (%)	Referências
Missense	999 (52,3)	1039 (85,1)	719 (95,0)	F9_var_db EAHAD*
Indel in-frame	27 (1,4)	9 (0,7)	1 (0,1)	F9_var_db EAHAD*
Indel frameshift	185 (9,7)	42 (3,4)	2 (0,3)	F9_var_db EAHAD*
Defeito de splicing	135 (7,1)	66 (5,8)	30 (4,0)	F9_var_db EAHAD*
Nonsense	459 (24,0)	62 (5,1)	5 (0,7)	F9_var_db EAHAD*
Grande deleção (SV)	107 (5,6)	3 (0,3)		F9_var_db EAHAD*
Total	1912 (100)	1221 (100)	757 (100)	F9_var_db EAHAD*

SV indica variantes estruturais como grandes deleções que afetam parcial ou totalmente o gene F9. Os dados de pacientes com HB foram obtidos dos bancos de dados da EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) que registram pacientes individuais. *Banco de dados de variantes de F9 (<https://f9-db.eahad.org/>).

Informações sobre as variantes de F8 e F9 estão compiladas em bancos de dados de acesso público, como os desenvolvidos pelos CDC (*Centers for Disease Control and Prevention* [Centros de Controle e Prevenção de Doenças]), denominados CHAMP e CHBMP para hemofilia A e hemofilia B, respectivamente (<https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>), e pela EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) para F8 (<http://f8-db.eahad.org/>) e F9 (<http://f9-db.eahad.org/>) (Tabelas 43 e 44). Acessados em 18 de janeiro de 2024, os bancos de dados da EAHAD contêm informações de 3052 variantes de F8 únicas que correspondem a 10144 casos individuais e 1244 variantes de F9 únicas que correspondem a 4713 casos individuais. Nas Tabelas 43 e 44, as variantes genéticas são classificadas por seu efeito previsto a partir da evidência observada da sequência de nucleotídeos de DNA (ou seja, missense, indel in-frame, indel frameshift, defeito de splicing, nonsense, grande deleção). As variantes de F8 e F9, respectivamente, listadas nas Tabelas 43 e 44 representam as variantes causadoras de hemofilia com frequências significativas em todo o mundo, em contraposição às variantes prevalentes encontradas em populações específicas tipicamente associadas a fenótipos não graves (por exemplo, duplicação do éxon 13 de F8 prevalente na população italiana com hemofilia A leve (Acquila et al, 2004).

Outros Fenótipos Associados ao Gene F8

Trombofilia 13 (ligada ao X, devido a defeito do FVIII): Shen et al (2013) avaliaram os níveis de atividade de FVIII:C e o número de cópias do gene F8 em pacientes com tromboembolismo venoso (TEV) em comparação a controles saudáveis. Pacientes com TEV apresentaram níveis significativamente mais altos de FVIII:C e maior número de cópias do gene F8. Simioni et al (2021) relataram duas famílias italianas com trombofilia 13 e identificaram uma duplicação parcial do gene F8 em tandem, o que é consistente com o padrão de herança dominante ligada ao cromossomo X, visto que pacientes hemizigotos do sexo masculino são mais gravemente afetados do que as portadoras do sexo feminino.

Outros Fenótipos Associados ao Gene F9

A trombofilia 8 (devido a defeito do FIX) é um fenótipo hereditário recessivo ligado ao X associado a TEV de início precoce causado por um defeito missense de F9, R338L ou variante Padua, relatado por Simioni et al (2009). Foi relatado que FIX-Padua aumenta a resistência fibrinolítica dos coágulos plasmáticos (Ammollo et al, 2014).

Proteção contra Trombose Venosa Profunda (TVP):

A variante polimórfica comum FIX-Mälmo (frequência alélica menor de 0,32), p.(Thr148Ala), causada por uma substituição de nucleotídeo único (SNV) G>A, está associada a proteção contra o risco de TVP com razões de chances (OR) de 0,8 em pacientes do sexo masculino e 0,89 em pacientes do sexo feminino (Bezemer et al, 2008). No entanto, os mecanismos moleculares de proteção contra TVP conferidos pelo polimorfismo FIX-Mälmo permanecem desconhecidos.

A varfarina é um anticoagulante amplamente prescrito para a prevenção de eventos tromboembólicos em pacientes "de risco". Sensibilidade à varfarina (ligada ao X, devido a variantes do FIX) refere-se a uma complicação do fenótipo hemorrágico durante a terapia anticoagulante com antagonistas da vitamina K. Pezeshkpoor et al (2018) relataram uma associação entre variantes missense de F9 que afetam o propeptídeo, como p. (Ala37Thr) e p.(Ala37Val), e a sensibilidade à varfarina, caracterizada por uma redução desproporcional dos níveis de FIX:C durante a terapia anticoagulante.

A relação causal entre uma determinada variante genética (por exemplo, Inv22 de F8) e um fenótipo específico (por exemplo, hemofilia A grave em paciente hemizigoto) pode ser modificada em casos raros pelo envolvimento de um mosaïcismo genético (GM), que é definido como a coexistência de pelo menos dois clones geneticamente diferentes em um indivíduo (por exemplo, células Inv22-positivas e negativas). O GM pode envolver, parcial ou totalmente, alguns ou todos os órgãos/tecidos de um indivíduo afetado, resultando, por exemplo, em fenótipos mais brandos se afetar células somáticas (por exemplo, células produtoras de FVIII/FIX derivadas do endotélio hepático) e na herdabilidade da variante genética se afetar células germinativas (por exemplo, um paciente com hemofilia e mosaico germinativo pode ser pai de filhas não portadoras) (Abelleyro et al, 2018).

Como paradigmas históricos de distúrbios recessivos ligados ao cromossomo X, a hemofilia A (OMIM #306700) e a hemofilia B (OMIM #306900) são tipicamente expressas em pacientes hemizigotos do sexo masculino (46,XY), enquanto as mulheres heterozigotas (46,XX) são geralmente assintomáticas. Segundo um ponto de vista consensual entre hematologistas, uma nova classificação da hemofilia feminina considera os níveis de atividade do fator de coagulação, indicando doença grave quando <1 UI/dL, moderada 1-5 UI/dL e leve 5-40 UI/dL; e quando os níveis do fator são >40 UI/dL, os indivíduos são classificados como portadores sintomáticos e assintomáticos (van Galen et al, 2021). A base molecular da hemofilia feminina envolve expressão prejudicada ou silenciamento dos alelos de F8 ou F9 mediado pelo fenômeno de inativação do cromossomo X (XCI), que silencia a expressão gênica em cis de um X em cada célula para compensar as doses nos homens. A XCI ocorre no início da embriogênese, normalmente de forma aleatória em cada célula, e esse estado é herdado clonalmente na vida adulta das mulheres. Espera-se que uma portadora homozigota e uma heterozigota composta expressem hemofilia, assim como portadoras heterozigotas com XCI desviada silenciando preferivelmente o alelo normal (Radic et al, 2015). Além disso, Garagiola et al (2021) comprovaram uma associação significativa entre os níveis de atividade de coagulação do FVIII/FIX e o padrão de XCI medido em leucócitos do sangue periférico de portadores heterozigotos de hemofilia A com ≤50 UI/dL.

Espectro de Abordagens Práticas Aplicadas em Testes Genéticos: dependendo da disponibilidade de recursos e expertise, há uma variedade de técnicas que podem ser empregadas para a investigação de variantes genéticas associadas a hemofilia A e hemofilia B. Este capítulo fornece exemplos dessas abordagens práticas e referências, quando disponíveis. Diversas técnicas diferentes estão disponíveis para a investigação da inversão do íntron 22 de F8, incluindo Southern blot, reação em cadeia da polimerase (PCR) longa e PCR inversa (Lakich et al, 1993; Liu et al, 1998; Bagnall et al, 2006; Rossetti et al, 2008; Abelleyro et al, 2016; Ding et al, 2016; Hudecova et al, 2017; Pan et al, 2014; Kumar et al, 2015; Edison et al, 2016). A inversão do íntron 1 de F8 pode ser detectada por técnicas como PCR dupla ou PCR inversa (Bagnall et al, 2002; Rossetti et al, 2008). A análise de SNVs nos genes F8 e F9 pode ser realizada por uma variedade de técnicas, incluindo PCR e sequenciamento de Sanger, ou tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, como sequenciamento de última geração (NGS) (Al-Allaf et al, 2019; Li et al, 2014; Lyu et al, 2016; Manderstedt et al, 2019; Edison et al, 2016). Quando os recursos forem limitados, uma abordagem de triagem antes do sequenciamento de Sanger pode ser empregada (Salviato et al, 2019), como a análise heteroduplex usando eletroforese em gel sensível à conformação (CSGE). Para análise de CNVs nos genes F8 e F9 existem várias técnicas, como gap-PCR, amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA), PCR quantitativa em tempo real e NGS (Rossetti et al, 2004; Payne et al, 2012; Costa et al, 2004; Belvini et al, 2017; Kinkle et al, 2017; You et al, 2013; Wu

et al, 2014; Fernandez-Lopez et al, 2007; Tizzano et al, 2005; Johnsen et al, 2017). Nos casos de hemofilia A e hemofilia B em que uma variante genética subjacente não é encontrada nas regiões essenciais dos genes F8 ou F9 por meio das técnicas descritas acima, a análise de regiões intrônicas profundas quanto a possíveis defeitos de splicing pode estar disponível por sequenciamento paralelo em massa (MPS) dirigido ou sequenciamento do genoma completo (WGS) (Jourdy et al, 2018; Jourdy et al, 2020; Bach et al, 2015; Inaba et al, 2017; Castaman et al, (2011; Chang et al, 2019). A análise de ligação também pode ser considerada para estudos familiares em que não há variante de F8 ou F9 identificável (Sun et al, 2015). A investigação de indivíduos com fenótipos atípicos que podem ser decorrentes de rearranjos genômicos complexos pode ser feita por análise de microarranjo citogenético (Jourdy et al, 2016; Jourdy et al, 2017; Janczar et al, 2016; Lannoy et al, 2018). A análise da inativação do cromossomo X pode ser realizada por diversas técnicas, como enzima de restrição específica para metilação, PCR e análise de fragmentos, ou outras técnicas quantitativas (Nisen et al, 1989; Coleman et al, 1993; Johansson et al, 2023; Machado et al, 2014).

Nomenclatura Padronizada e Potencial Patogênico de Variantes: a exatidão na descrição unívoca das variantes genéticas é essencial para a pesquisa e o tratamento clínico. Para atender a essa exigência, o *Variant Nomenclature Committee (HVNC)* [Comitê de Nomenclatura de Variantes] da *Human Genome Variation Society (HGVS)* [Sociedade de Variação do Genoma Humano], com o apoio da *Human Genome Organization (HUGO)* [Organização do Genoma Humano], desenvolveu um conjunto de recomendações. Estas incluem a descrição das variantes genéticas no nível mais básico, o nível do DNA, e descrições no nível de RNA e/ou proteína, geralmente previstas a partir de evidências do DNA, podem também ser fornecidas (<https://hgvs-nomenclature.org/stable/>) (den Dunnen et al, 2016). A nomenclatura da HGVS recomenda uma numeração específica para as posições dos genes, indicando o códon +1 que codifica o primeiro resíduo (Met) do polipeptídeo primário e o nucleotídeo +1 para o A do códon de iniciação AUG. Em algumas publicações anteriores sobre hemofilia, a numeração antiga do códon/aminoácido +1 refere-se à codificação do primeiro aminoácido da proteína madura (ou seja, na numeração da HGVS, códon 20 do FVIII e códon 47 do FIX). Para ajustar e normalizar a nomenclatura das variantes de acordo com a HGVS, o site Mutalyzer oferece algoritmos eficientes para verificar e confirmar a descrição correta a partir das recomendações da HGVS (<https://mutalyzer.nl/>) (Lefter et al, 2021). Todas as variantes detectadas devem ser classificadas de acordo com seu potencial de causar o fenótipo observado, de acordo com as diretrizes elaboradas pelo *American College of Medical Genetics and Genomics/ Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP)* [Colégio Americano de Genética Médica e Genômica/ Associação de Patologia Molecular] (Richards et al, 2015). As recomendações do ACMG podem ser aplicadas a testes genéticos convencionais ou baseados em sequenciamento de última geração utilizados em laboratórios clínicos e compreendem um sistema de classificação de cinco níveis de variantes relevantes para distúrbios mendelianos: (1) patogênicas, (2) provavelmente patogênicas, (3) significância incerta, (4) provavelmente benignas e (5) benignas. Para obter essa categorização, o ACMG/AMP recomenda uma análise completa de (a) dados populacionais, (b) dados computacionais, (c) dados funcionais e (d) dados de segregação.

Por exemplo, a análise das variantes de F8 e F9 envolve:

(a) O estudo da variante genotipada na população geral e sua frequência em indivíduos hemizigotos, heterozigotos, etc., consultando o gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e os bancos de dados específicos dos genes F8/HA e F9/HB, como o da EAHAD e o CHAMP (mencionados acima).

(b) A aplicação de ferramentas bioinformáticas in silico para analisar alterações missense prevendo eventuais alterações estruturais ou funcionais por meio de, por exemplo, PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) e Varsome (<https://varsome.com/>), entre outras; ou para avaliar eventuais defeitos de splicing, como NNSplice (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), NetGene2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGene2-2.42/>) e ESEFinder para pesquisar diferenças em sequências de acentuadores de splicing exônico (esefinder.ahc.umn.edu); e muitas outras ferramentas computacionais para estimar o impacto de variantes no promotor, 5'- ou 3'-UTR, etc.

(c) Dados experimentais obtidos de estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* da versão mutada versus normal a ser testada, ou parte dela, fornecem informações significativas para estabelecer o impacto de uma variante genética.

(d) Dados de segregação associados a um modo de herança recessiva ligada ao cromossomo X e cossegregação com hemofilia em vários membros familiares afetados são indicativos de patogenicidade. Levando em consideração essa análise, o ACMG/AMP indica os critérios para classificar variantes patogênicas que pontuam a evidência como muito forte (PVS), forte (PS), moderada (PM) e de suporte (PP); e os critérios para classificar o impacto benigno ou neutro de variantes que pontuam a evidência como independente (BA), forte (BS) e de suporte (BP). A classificação final em uma categoria para estimar a patogenicidade (1-5) resulta da combinação das pontuações de evidência P_ e B_ (Richards et al, 2015).

Laudos de Interpretação: os laudos de interpretação devem ser claros e concisos e abordar o diagnóstico da pessoa em investigação. Além de seu foco principal, que é declarar a conclusão molecular geral em resposta à questão genética, o laudo de interpretação deve incluir detalhes suficientes para permitir a identificação da variante em outros laboratórios (ou seja, indicar as abordagens práticas utilizadas, as limitações das técnicas, a sequência genômica de referência utilizada e a classificação da patogenicidade de acordo com as diretrizes do ACMG, incluindo as evidências aplicadas para classificação e referências; ACGS reporting guidelines, 2020; Deans et al, 2022; Claustres et al, 2014; Gomez et al, 2019). Os laudos de interpretação devem incluir informações que expliquem a extensão real do diagnóstico molecular em linguagem simples, com indicação clara, por exemplo, dos riscos específicos para o desenvolvimento de fenótipos específicos na família.

Garantia de qualidade: em testes genéticos, a garantia de qualidade abrange todos os aspectos do processo de diagnóstico, desde a extração de ácido nucleico e procedimentos analíticos até a classificação e descrição das variantes detectadas e a produção de um laudo de interpretação. Controle de qualidade interno (CQI) dos testes genéticos deve ser realizado rotineiramente para garantir a validade dos resultados gerados. Existem programas formais de EQA para garantir que o processo de diagnóstico e os procedimentos de relato estejam em conformidade com outros laboratórios (por exemplo, a Avaliação de Qualidade Genômica [GenQA] e, especificamente para a avaliação genética da hemofilia, o Programa de Avaliação Externa de Qualidade Nacional do Reino Unido [NEQAS RU] para Coagulação Sanguínea). Os laboratórios de genética devem passar por acreditação periódica, se disponível, de acordo com normas acordadas internacionalmente, por um organismo aprovado. Isto garante a prestação de serviços de diagnóstico genético de alta qualidade.

Referências

- Abelleyro MM, Rossetti LC, Curto Mde L, Radic CP, Marchione VD, De Brasi CD. F8 intron 22 inversions and SNP rs73563631 in unrelated families with severe haemophilia A: Clinical features and gene testing implications. *Thromb Haemost* 2016; 115(3): 678-681.
- Abelleyro MM, Marchione VD, Elhelou L, Radic CP, Rossetti LC, Neme D, De Brasi CD. Somatic/germline mosaicism of a F8 promoter deletion confounds clinical predictions in a family with haemophilia A: Key role of genotype quantitation. *Thromb Haemost* 2018; 118(3): 617-620.
- Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP. Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy. *Haematologica* 2004; 89(6): 758-759.
- Al-Allaf FA, Abduljaleel Z, Bogari NM, Owaidah TMA, Taher MM, Athar M et al. Identification of six novel factor VIII gene variants using next generation sequencing and molecular dynamics simulation. *Acta Biochim Pol* 2019; 66(1): 23-31.
- Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M, Simioni P. Factor IX-Padua enhances the fibrinolytic resistance of plasma clots. *Thromb Haemost* 2014; 111(2): 226-232.
- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: Results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86(6): 2206-2212.
- Association for Clinical Genomic Science. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease. 2020. <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>.
- Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Müller CR, Rost S. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost* 2015; 114(4): 757-767.

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: A novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(3): 591-598.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99(1): 168-174.

Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D'Andrea G, Santacroce R, Sanna S, Santagostino E, Mannucci PM, Goodeve A, Rodeghiero F. Deep intronic variations may cause mild hemophilia a. *J Thromb Haemost* 2011; 9(8): 1541-1548.

Chang CY, Perng CL, Cheng SN, Hu SH, Wu TY, Lin SY, Chen YC. Deep intronic variant c.5999-277G>A of F8 gene may be a hot spot mutation for mild hemophilia A patients without mutation in exonic DNA. *Eur J Haematol* 2019; 103(1): 47-55.

Claustres M, Kožich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): 160-170.

Coleman R, Genet SA, Harper JI, Wilkie AO. Interaction of incontinentia pigmenti and factor VIII mutations in a female with biased X inactivation, resulting in haemophilia. *J Med Genet* 1993; 30(6): 497-500.

Deans ZC, Ahn JW, Carreira IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, Öunap K, Tabiner M, Treacy R, van Asperen CJ. Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing. *Eur J Hum Genet* 2022; 30(9): 1011-1016.

den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat* 2016; 37(6): 564-569.

Ding Q, Wu X, Lu Y, Chen C, Shen R, Zhang X, Jiang Z, Wang X. AccuCopy quantification combined with pre-amplification of long-distance PCR for fast analysis of intron 22 inversion in haemophilia A. *Clin Chim Acta* 2016; 458: 78-83.

Edison E, Konkole BA, Goodeve AC. Genetic analysis of bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 22 Suppl 5(Suppl 5): 79-83.

Garagiola I, Mortarino M, Siboni SM, Boscarino M, Mancuso ME, Biganzoli M, Santagostino E, Peyvandi F. X chromosome inactivation: A modifier of factor VIII and IX plasma levels and bleeding phenotype in haemophilia carriers. *Eur J Hum Genet* 2021; 29(2): 241-249.

Gomez K, Laffan M, Keeney S, Sutherland M, Curry N, Lunt P. Recommendations for the clinical interpretation of genetic variants and presentation of results to patients with inherited bleeding disorders. A UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Good Practice Paper. *Haemophilia* 2019; 25(1): 116-126.

Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Noninvasive detection of F8 int22h-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers. *Blood* 2017; 130(3): 340-347.

Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1(2): 264-274.

Janczar S, Kosinska J, Ploski R, Pastorczak A, Wegner O, Zalewska-Szewczyk B, Paige AJ, Borowiec M, Mlynarski W. Haemophilia A and cardiovascular morbidity in a female SHAM syndrome carrier due to skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet* 2016; 59(1): 43-47.

Johansson J, Lidéus S, Höijer I, Ameer A, Gudmundsson S, Annerén G, Bondeson ML, Wilbe M. A novel quantitative targeted analysis of X-chromosome inactivation (XCI) using nanopore sequencing. *Sci Rep* 2023; 13(1): 12856.

Jourdy Y, Chatron N, Carage ML, Fretigny M, Meunier S, Zawadzki C, Gay V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Study of six patients with complete F9 deletion characterized by cytogenetic microarray: Role of the SOX3 gene in intellectual disability. *J Thromb Haemost* 2016; 14(10): 1988-1993.

Jourdy Y, Chatron N, Fretigny M, Carage ML, Chambost H, Claeysens-Donadel S, Roussel-Robert V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Molecular cytogenetic characterization of five F8 complex rearrangements: Utility for haemophilia A genetic counselling. *Haemophilia* 2017; 23(4): e316-e323.

Jourdy Y, Fretigny M, Lassalle F, Lillicrap D, Négrier C, Vinciguerra C. The highly prevalent deletions in F8 intron 13 found in French mild hemophilia a patients result from both founder effect and recurrent de novo events. *J Thromb Haemost* 2020; 18(5): 1087-1093.

- Jourdy Y, Janin A, Fretigny M, Lienhart A, Négrier C, Bozon D, Vinciguerra C. Recurrent F8 intronic deletion found in mild hemophilia A causes Alu exonization. *Am J Hum Genet* 2018; 102(2): 199-206.
- Kumar P, Husain N, Soni P, Faridi NJ, Goel SK. New protocol for detection of intron 22 inversion mutation from cases with hemophilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21(3): 255-259.
- Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5(3): 236-241.
- Lannoy N, Hermans C. Review of molecular mechanisms at distal Xq28 leading to balanced or unbalanced genomic rearrangements and their phenotypic impacts on hemophilia. *Haemophilia* 2018; 24(5): 711-719.
- Lefter M, Vis JK, Vermaat M, den Dunnen JT, Taschner PEM, Laros JFJ. Mutalyzer 2: Next generation HGVS nomenclature checker. *Bioinformatics* 2021; 37(18): 2811-2817.
- Li T, Miller CH, Driggers J, Payne AB, Ellingsen D, Hooper WC. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *Am J Hematol* 2014; 89(4): 375-379.
- Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92(4): 1458-1459.
- Lyu C, Xue F, Liu X, Liu W, Fu R, Sun T et al. Identification of mutations in the F8 and F9 gene in families with haemophilia using targeted high-throughput sequencing. *Haemophilia* 2016; 22(5): e427-e434.
- Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves da Silva AF, Radic CP et al. 5mCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. *PLoS One* 2014; 9(7): e103714.
- Manderstedt E, Nilsson R, Lind-Halldén C, Ljung R, Astermark J, Halldén C. Targeted re-sequencing of F8, F9 and VWF: Characterization of Ion Torrent data and clinical implications for mutation screening. *PLoS One* 2019; 14(4): e0216179.
- McVey JH, Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Hampshire DJ, Giansily-Blaizot M, Gomez K, Perkins SJ, Ludlam CA. The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) Coagulation Factor Variant Databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* 2020; 26(2): 306-313.
- Nisen PD, Waber PG. Nonrandom X chromosome DNA methylation patterns in hemophiliac females. *J Clin Invest* 1989; 83(4): 1400-1403.
- Pan TY, Chiou SS, Wang CC, Wu SM. Separation of intron 22 inversion type 1 and 2 of hemophilia A by modified inverse-shifting polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *Talanta* 2014; 130: 328-335.
- Pezeshkpoor B, Czogalla KJ, Caspers M, Berkemeier AC, Liphardt K, Ghosh S, Kellner M, Ulrich S, Pavlova A, Oldenburg J. Variants in FIX propeptide associated with vitamin K antagonist hypersensitivity: Functional analysis and additional data confirming the common founder mutations. *Ann Hematol* 2018; 97(6): 1061-1069.
- Radic CP, Rossetti LC, Abelleiro MM, Tetzlaff T, Candela M, Neme D et al. Phenotype-genotype correlations in hemophilia A carriers are consistent with the binary role of the phase between F8 and X-chromosome inactivation. *J Thromb Haemost* 2015; 13(4): 530-539.
- Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1329-1340.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5): 405-424.
- Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15(7): 569-572.
- Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5): 830-836.

- Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. High resolution melting for F9 gene mutation analysis in patients with haemophilia B. *Blood Transfus* 2019; 17(1): 72-82.
- Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008; 111(3): 1240-1247.
- Shen W, Gu Y, Zhu R, Zhang L, Zhang J, Ying C. Copy number variations of the F8 gene are associated with venous thromboembolism. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(4): 259-262.
- Simioni P, Cagnin S, Sartorello F, Sales G, Pagani L, Bulato C et al. Partial F8 gene duplication (factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia. *Blood* 2021; 137(17): 2383-2393.
- Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, Arruda VR. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361(17): 1671-1675.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.
- Sun P, Ma L, Diao G, Li CQ, Lin FZ. Application of indirect linkage analysis and direct genotyping to hemophilia A carrier detection in Sichuan, China. *Genet Mol Res* 2015; 14(3): 8229-8235.
- van Galen KPM, d'Oiron R, James P, Abdul-Kadir R, Kouides PA, Kulkarni R et al. A new hemophilia carrier nomenclature to define hemophilia in women and girls: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2021; 19(8): 1883-1887.