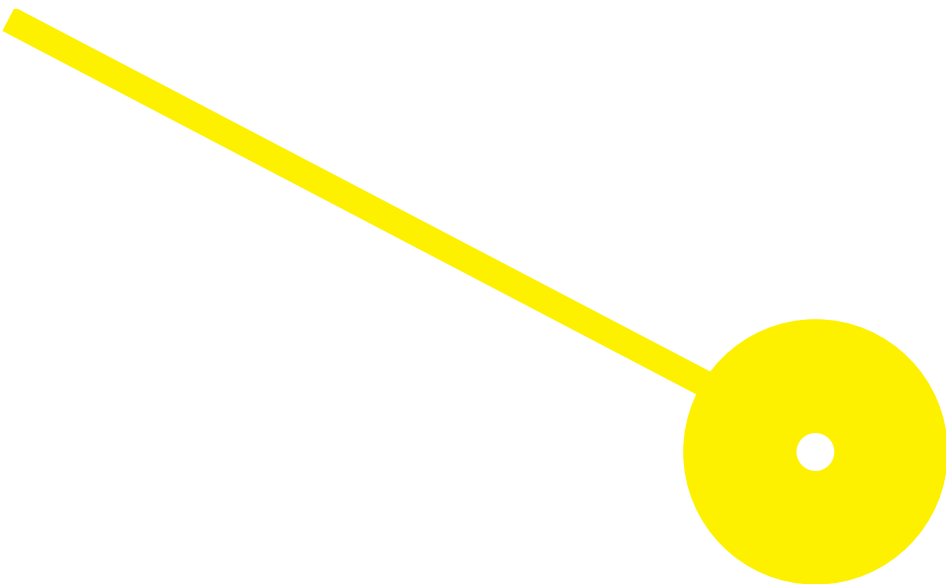




# Validação da sequenciação por NGS de um painel dirigido para o rastreio de Trombofilias

Juliana Filipa Oliveira Vieira

09/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



## **Validação da sequenciação por NGS de um painel dirigido para o rastreio de Trombofilias**

### **Autor**

Juliana Filipa Oliveira Vieira

### **Orientadores**

Alexandra Filipa Branco Lopes, Coordenadora do Laboratório de sequenciação, Laboratório de Genética Médica Unilabs

Prof Doutor Hugo Rocha, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto

Prof Doutora Regina A Silva, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto

**Projeto de Estágio** apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Ramo Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Unilabs, onde realizei o meu estágio, por me proporcionar uma incrível experiência de aprendizagem e um ambiente de apoio para a realização do meu projeto. Estou verdadeiramente grata por ter tido a oportunidade de trabalhar diariamente ao lado de profissionais dedicados, dando um especial destaque à Alexandra Lopes, orientadora deste projeto, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e pela sua excelente orientação fundamental para a realização deste trabalho.

A minha apreciação estende-se a toda a equipa da Unilabs, cujas todas as contribuições foram fundamentais na execução deste trabalho. Estou especialmente grata pelo apoio, ajuda e orientação da Cátia Nunes que desempenhou um papel crucial na concretização bem sucedida deste projeto.

Agradeço ainda a toda a coordenação e professores deste mestrado, em especial à Professora Regina.

Ao Professor Hugo, o meu muito obrigada, por todo o tempo dispensado e toda ajuda prestada no desenvolvimento da minha tese.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família e namorado, por todo o amor, crença nas minhas capacidades e apoio, são os pilares da minha vida e a minha motivação para querer continuar a ser mais e melhor.

## **Resumo**

A trombose é uma patologia frequente e complexa, referente à formação de um coágulo, o que prejudica o normal fluxo sanguíneo. Alterações nos genes que codificam as proteínas envolvidas direta ou indiretamente na regulação hemostática podem resultar em um aumento anormal da coagulação, aumentando assim a propensão à formação de coágulos obstrutivos. Esta condição é conhecida como trombofilias e descreve um estado de hipercoagulabilidade responsável pelo desenvolvimento de eventos trombóticos que comprometem a vida. A trombose tem uma origem multifatorial causada pela interação de fatores de risco genéticos e/ou não genéticos que podem coexistir no mesmo indivíduo e conferir um risco contínuo ao longo da vida.

Em virtude do caráter poligénico das trombofilias, muitos indivíduos podem ser portadores de diversas variantes genéticas em diferentes genes, sendo a identificação da suscetibilidade genética fundamental na prevenção de eventos trombóticos.

Deste modo, foram reunidas num painel NGS um conjunto de variantes genéticas de diferentes genes que detém um papel importante nas trombofilias.

Os resultados confirmam que o laboratório conseguiu amplificar todos os genes incluídos no painel NGS, o que possibilita a integração eficaz deste método na prática de amplificação, sequenciação e análise deste painel no laboratório.

**Palavras-chave:** Trombofilias; NGS (Next-Generation Sequencing); Multiplex; Sequenciação; Painel

## **Abstract**

Thrombosis is a frequent and complex condition involving the formation of a blood clot, disrupting the normal blood flow. Changes in the genes encoding proteins, directly or indirectly involved in hemostatic regulation, can lead to enhanced abnormal coagulation, increasing the propensity for obstructive clot formation. This condition is known as thrombophilia, describing a state of hypercoagulability responsible for the development of life-threatening thromboembolic events. Thrombosis has a multifactorial origin due to the interaction of genetic and/or non-genetic risk factors that can coexist in the same individual and a lifelong continuous risk.

Due to the polygenic nature of thrombophilias, many individuals can carry various genetic variants in different genes, but the identification of genetic susceptibility is fundamental in preventing thrombotic events.

Therefore, a panel of various genetic variants from different genes that play a significant role in thrombophilias was assembled.

The results confirm that the laboratory successfully amplified all the genes included in the NGS panel, enabling the effective integration of this method into the laboratory's practices for amplification, sequencing and analysis of this panel.

**Keywords:** Thrombophilias; NGS (Next-Generation Sequencing); Multiplex; Sequencing; Panel

## Índice

1. Trombofilias.....	1
1.1. Epidemiologia e tipos de trombose .....	1
1.2. A Hemostasia e o seu papel na integridade do sistema vascular e no surgimento de trombofilias.....	3
1.3. Fatores de Risco para o surgimento de trombofilias .....	4
1.4. A genética da trombose: Estados de Hipercoagulabilidade Hereditária.....	5
1.4.1. A perda de função de um anticoagulante natural: Deficiência de Antitrombina.....	5
1.4.2. A perda de função de um anticoagulante natural: Deficiência de proteína S e de proteína C.....	6
1.4.3. O ganho de função em proteínas pró-coagulantes: mutações no fator V de Leiden e a variante da Protrombina .....	8
1.4.4. Hiperhomocisteinemia devido a variantes no Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) <sup>10</sup>	
1.4.5. Fibrinólise prejudicada pelo inibidor do ativador do plasminogénio I.....	12
1.5. Estados hipercoaguláveis adquiridos.....	14
1.5.1. O efeito do tabagismo nos sistemas hemostáticos.....	14
1.5.2. A gravidez e as suas complicações trombóticas .....	15
1.5.3. O impacto dos anticoncepcionais orais .....	16
1.6. Indicações para rastreio de trombofilias.....	17
1.7. Sequenciação de próxima geração (NGS).....	18
1.8. O DNA Bead Array no rastreio das trombofilias.....	18
2. Objetivos.....	20
3. Métodos .....	21
3.1. Seleção de amostras e extração de DNA.....	21
3.2. Desenho e Verificação dos primers para PCR Multiplex.....	22
3.3. PCR Multiplex .....	25
3.4. Eletroforese Capilar Automatizada .....	25
3.5. Purificação dos produtos de PCR Multiplex.....	26
3.6. Quantificação e diluição dos produtos de PCR purificados .....	26
3.7. Fragmentação e Tagmentação.....	26
3.8. Purificação dos produtos de Tagmentação.....	27

3.9.	Amplificação por PCR para ligação de sequências identificadoras de amostras (indexes) para NGS.....	27
3.10.	Purificação dos produtos de PCR após ligação das sequências identificadoras das amostras para NGS.....	28
3.11.	Avaliação e pooling das bibliotecas.....	28
3.12.	Sequenciação NGS.....	28
3.13.	Controlo de qualidade e avaliação de resultados.....	29
3.14.	Classificação da zigotia das variantes.....	29
4.	Resultados.....	30
4.1.	Validação das misturas de primers desenhados com amostras normais.....	30
4.2.	Amplificação das amostras positivas.....	31
4.3.	Variante encontrada nas amostras na sequenciação por DNA Bead Array .....	32
4.4.	Resultados obtidos após a sequenciação por NGS.....	32
4.5.	Variante encontrada nas amostras após sequenciação por NGS.....	32
5.	Discussão.....	35
6.	Conclusão.....	43
7.	Referências Bibliográficas .....	44

## Lista de abreviaturas

5,10-MTHF - 5,10-metilenotetrahidrofolato  
5-MTHF - 5-metiltetrahidrofolato  
A - Adenina  
AOC - Anticoncepcionais orais combinados  
AT - Antitrombina  
AVC - Acidente vascular cerebral  
C - Citosina  
CNVs - Variações no número de cópias  
EAM - Enfarte agudo do miocárdio  
EP - Embolia pulmonar  
F - Feminino  
FII - Protrombina  
FT - Fator tecidual  
FV - Fator V  
FVL - Fator V de Leiden  
G - Guanina  
%G/C - Percentagem de Guanina/Citosina  
Het - Heterozigotia  
Hom - Homozigotia  
M - Masculino  
MS - Metionina sintetase  
MTHFR - Metilenotetrahidrofolato redutase  
PAI-1 - *SERPINE 1*  
pb - Pares de base  
PC - Proteína C  
PCa - Proteína C ativada  
PCR - Polymerase chain reaction  
%PF - Passing filter  
PS - Proteína S  
Q30 - Quality reads with quality score 30 or higher  
RPCa - Resistência à proteína C ativada  
SNPs - Single Nucleotide Polimorfisms  
TM - Temperatura de Melting  
T - Timina

## **Índice de tabelas**

Tabela 1- Informações das amostras incluídas no projeto.....	21
Tabela 2- Distribuição dos primers pelas diferentes MIX.....	22
Tabela 3- Dados sobre os primers desenhados.....	24
Tabela 4- Programa de PCR utilizado.....	25
Tabela 5- Variantes detetadas na sequenciação por Array e respetiva zigotia .....	33
Tabela 6- Variantes detetadas na sequenciação por NGS e respetiva zigotia.....	34

## Índice de figuras

Figura 1- Formas fisiopatológicas da trombose: Trombose arterial ou Trombose venosa .....	2
Figura 2- Distribuição dos genes com variantes mais comumente encontradas nas trombofilias.....	5
Figura 3- Inibição da coagulação pela PCa (APC) .....	8
Figura 4- Mutações no gene FV causam RPCa.....	9
Figura 5- Variante G20210A da Protrombina (FII).....	10
Figura 6- Formação de homocisteína e o papel da enzima MTHFR na reciclagem desse aminoácido.....	12
Figura 7- Modulação da expressão do gene PAI-1 pela variante genética PAI-1 4G/5G.....	13
Figura 8- Separação eletroforética do resultado das reações de PCR de amostras normais	30
Figura 9- Separação eletroforética do resultado das reações de PCR numa amostra positiva .....	31

## **1. Trombofilias**

### **1.1. Epidemiologia e tipos de trombose**

As trombofilias descrevem um estado de hipercoagulabilidade responsável por um maior risco de desenvolvimento de trombose (1). A trombose é uma condição comum e complexa referente à formação de um coágulo sanguíneo, que dificulta o normal fluxo sanguíneo para um tecido, provocando isquemia e morte tecidual (2,3). Sob condições normais, os mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes e fibrinolíticos regulam a hemostasia para evitar a formação patológica destes coágulos (4). No entanto, alterações nos genes que codificam as proteínas envolvidas direta ou indiretamente na regulação hemostática podem levar a um aumento anômalo da coagulação e a uma maior predisposição à formação de coágulos obstrutivos, levando a um maior risco de ocorrência de eventos trombóticos que comprometem a vida (1,4).

Estima-se que a incidência global anual da trombose venosa está entre os 100 a 200 por cada 100000 habitantes (5). As taxas de incidência são significativas a partir dos 45 anos para ambos os sexos, contudo o seu crescimento exponencial se registre a partir dos 60 anos de idade, atingindo uma incidência de 5 a 6 em cada 1000 adultos aos 80 anos (6). Isto deve-se a acumulação de uma série de fatores de risco ao longo da vida e às mudanças fisiológicas que ocorrem com o envelhecimento (6).

A trombose é classificada em duas formas fisiopatológicas: a trombose arterial (ou aterotrombose), relacionada com a ativação plaquetária que, geralmente, ocorre após a ruptura de uma placa aterosclerótica que danifica as células endoteliais e leva à formação de um aglomerado de plaquetas, e a trombose venosa (ou tromboembolismo venoso), em que o sistema de coagulação é ativado sem que ocorra ruptura endotelial (figura 1) (7,99).

A aterotrombose é o tipo mais comum, com um aumento de prevalência em países desenvolvidos e ocorre frequentemente em indivíduos que apresentam um alto risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares derivado ao ambiente propício para o desenvolvimento de aterosclerose e, subsequentemente, de aterotrombose (8,9).

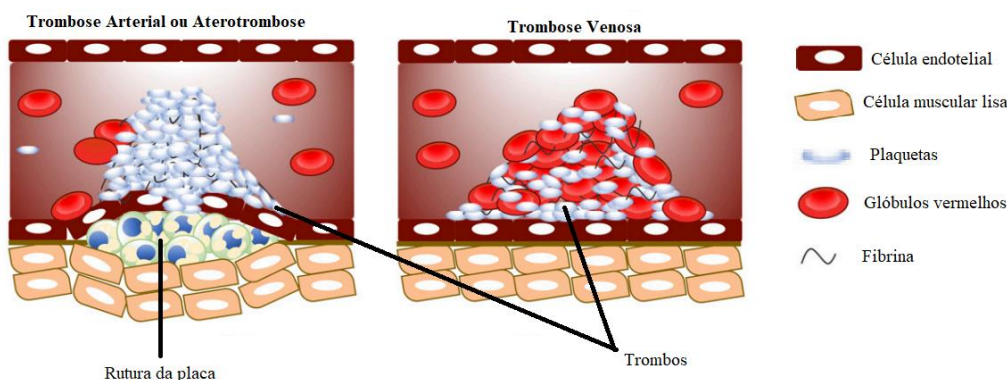


Figura 1- Formas fisiopatológicas da trombose: Trombose arterial e Trombose venosa. Adaptado de (8).

É o mecanismo patológico central subjacente ao enfarte agudo do miocárdio (EAM) e acidente vascular cerebral (AVC), e juntos são as principais causas de morte nos países desenvolvidos (9,10). O desenvolvimento de ambos os distúrbios é muito semelhante e a sua apresentação clínica, assim como as suas consequências, é ditada pela localização e extensão do trombo, principalmente se este obstruir a circulação coronária ou cerebral, afetando respetivamente as artérias que fornecem oxigénio ao coração ou ao cérebro (11,12).

A formação de um trombo na circulação arterial promove a rápida progressão das lesões ateroscleróticas (8), uma vez que as placas ateroscleróticas são extremamente perigosas devido ao seu alto teor em fator tecidual (FT), uma propriedade que confere uma maior trombogenicidade (13). Após a erosão ou rutura da placa, o FT entra em contato com o sangue circulante o que desencadeia a cascata de coagulação sanguínea, que estimula a agregação plaquetária (essencial para a estabilidade do trombo) (14). Deste modo, a trombose forma-se sobre a placa, levando a oclusão vascular, redução do fluxo sanguíneo e necrose do tecido perfundido pela artéria oclusiva (13–15).

O tromboembolismo venoso (TEV) é a terceira principal doença vascular, demonstrando uma incidência de cerca 30 a 200 casos por 100.000 habitantes por ano, sendo particularmente comum entre os indivíduos descendentes europeus (12,13,16). Compreende dois eventos clínicos principais relacionados: a trombose venosa profunda (TVP), caracterizada pela formação de coágulos nas veias das pernas e braços e o embolismo pulmonar (EP), quando os coágulos embolizados viajam para os pulmões (12,17). Estas duas incidências geralmente constituem um único evento clínico no qual a TVP é seguido pelo EP, sendo este o causador da maioria das mortes por TEV (12,16).

Apesar de ser uma doença comum, os mecanismos patogénicos subjacentes do TEV são apenas parcialmente conhecidos comparativamente com os da aterotrombose (12).

Atualmente, julga-se que a ocorrência de trombose venosa depende especialmente de estados de estase sanguínea e hipercoagulabilidade, muito mais do que dano endotelial (principal determinante da trombose arterial) (12). Além disso, os trombos venosos são formados principalmente por fibrina e glóbulos vermelhos e, menos por plaquetas (o principal componente do trombo arterial) (figura 1) (12).

As trombofilias representam um conjunto de doenças multifatoriais comuns que apresentam um risco ao longo da vida, estando o aparecimento destas ligado a um conjunto de fatores ambientais e genéticos e, geralmente, ocorre quando um ou mais dos fatores interagem (10).

Apesar de, como descrito em cima, o surgimento desta doença estar dependente de vários fatores, tanto a trombose arterial quanto a venosa estão sob a influência significativa de um componente genético que confere predisposição para a ocorrência de eventos trombóticos (10,13). Estes riscos genéticos são apresentados, na sua maioria, sob a forma de mutações que causam um desequilíbrio entre as forças pró-coagulantes e anticoagulantes, afetando os mecanismos anticoagulantes naturais, levando a um estado de hipercoagulabilidade responsável pelo desenvolvimento da maioria dos distúrbios tromboembólicos potencialmente fatais (10,13). Esse estado hipercoagulável também pode ser promovido por fatores de risco cardiovascular que desencadeiam trombogenicidade no sangue, sendo assim associado a inúmeras complicações trombóticas (13).

## **1.2. A Hemostasia e o seu papel na integridade do sistema vascular e no surgimento de trombofilias**

O sistema vascular é constituído por vasos sanguíneos, que conduzem o sangue sob pressão pela vasculatura (2). Quando ocorre algum dano nos vasos, é crucial repará-lo rapidamente para manter o fluxo sanguíneo e a integridade vascular (2). O sangue extravasado deve ser convertido num coágulo para bloquear o orifício e evitar mais sangramento, permitindo a ocorrência dos processos de reparação (2,18). Estes eventos, conhecidos como hemostasia, controlam o sangramento excessivo, mantendo o fluxo sanguíneo nas veias e artérias enquanto inibem a coagulação intravascular (2,18). A hemostasia é um processo bem regulado e complexo que preserva a integridade do sistema vascular (19–21).

Convencionalmente, a hemostasia é dividida em dois processos: primário e secundário. A hemostasia primária ocorre em resposta a danos em pequenos vasos e envolve a ativação,

adesão e agregação das plaquetas. A hemostasia secundária controla o sangramento excessivo e formação de um coágulo sanguíneo, incluindo deposição de fibrina (18,19,21).

À medida que ocorre a cicatrização, os coágulos são dissolvidos (fibrinólise) (18). Apesar de serem descritos separadamente, estes mecanismos ocorrem conjuntamente no local do vaso lesado e a interrupção de alguma etapa pode levar a um estado de risco aumentado de formação de um trombo conhecido como trombofilia (22).

A integridade do sistema vascular depende do equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticos, garantindo a atividade coordenada de todas as plaquetas, fatores vasculares e plasmáticos (18,21).

### **1.3. Fatores de Risco para o surgimento de trombofilias**

Fatores de risco modificáveis e não modificáveis são reconhecidos como riscos crescentes para trombofilias. A suscetibilidade a essas condições depende da interação entre fatores genéticos e não genéticos, levando ao fenótipo policlínico associado às trombofilias (23,24).

O risco de ocorrência de um episódio tromboembólico é influenciado não apenas pela presença dos fatores de risco, mas também pelo tipo de fator e da possibilidade de terapêutica (23). Quando associados, muitos deles têm efeitos sinérgicos, como a toma de contraceptivos orais que aumenta em 4 vezes o risco de trombose comparativamente com a população em geral, ou a presença do fator V de Leiden, em heterozigotia, onde o risco aumenta 5 a 10 vezes. Quando estes dois fatores surgem associados, o risco de trombose da população geral aumenta cerca de 36 vezes (23).

Vários estudos atuais têm enfatizado a relação do cancro com a trombose (6), devido à ativação da coagulação pelas células cancerígenas, compressão de vasos sanguíneos pelo crescimento tumoral e tratamentos como quimioterapia, que aumentam o risco (6).

O risco é mais elevado para certos tipos de cancro como os do fígado, pâncreas e trato gastrointestinal (25). Este fenómeno é conhecido por Síndrome de Trousseau. Portadores de mutações genéticas como o fator V de Leiden e da mutação da Protrombina G20210A, são os mais suscetíveis a este síndrome (25).

Outra associação comum é a da trombose e gravidez (25). Alterações hormonais durante a gravidez podem criar um estado hipercoagulante característico. Isso, combinado com distúrbios trombofílicos hereditários ou adquiridos aumenta o risco de complicações como pré-eclâmpsia e abortos recorrentes (25).

#### 1.4. A genética da trombose: Estados de Hipercoagulabilidade Hereditária

A via da coagulação é cuidadosamente regulada para equilibrar os mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes naturais, essenciais para conter os coágulos onde há lesão e manter o fluxo sanguíneo fluído no vaso afetado (12,19). Este processo é dividido em etapas e é controlado por diferentes inibidores naturais que dificultam a formação excessiva e descontrolada de coágulos (19,20,22). Alterações genéticas podem perturbar esse equilíbrio, levando a uma coagulação excessiva (coagulação hiperativa) devido a mutações de ganho de função em fatores de coagulação ou a uma diminuição da atividade dos inibidores (anticoagulação hipoativa), levando a um estado de hipercoagulabilidade (12,26,27).

Estudos genéticos associaram alterações nos genes que codificam as proteínas envolvidas em todas as vias cruciais da coagulação, um maior risco de trombose venosa e arterial (27).

Variantes genéticas frequentes nesses genes, como o fator V (FV), FII (protrombina), e a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), que estão direta ou indiretamente envolvidos na regulação hemostática, são comuns em pacientes sintomáticos o que corrobora o fenótipo clínico poligênico associado às trombofilias (28,29).

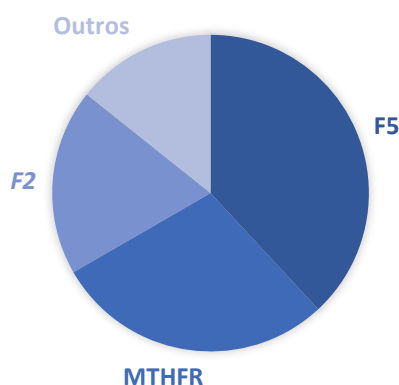


Figura 2- Distribuição dos genes com variantes mais comumente encontradas nas trombofilias, a partir da compilação de dados disponíveis na literatura.

##### 1.4.1. A perda de função de um anticoagulante natural: Deficiência de Antitrombina

A AT é um anticoagulante endógeno, pertencente à superfamília das serpinas (inibidores de serina protease), que inativa a trombina (fator II ativado) e o fator Xa, além de outros fatores de coagulação como IXa, XIa, XIIa (30).

Em condições normais, a AT encontra-se num estado reprimido, apresentando uma atividade anticoagulante fraca e lenta (30,31). De forma a ajudar a controlar a coagulação e restringi-la aos limites do endotélio danificado, esta combina cofatores de heparina ou sulfato de

heparano, acelerando a inibição do fator Xa, e aumentando substancialmente a sua capacidade inibitória como inibidor rápido de proteases (26,31).

Herdada de forma autossômica dominante, a deficiência hereditária da AT é uma doença causada por várias alterações no gene *SERPINC1* (32). Foi o primeiro distúrbio trombofílico encontrado e, apesar da sua heterogeneidade clínica, é um dos fatores de risco mais graves para TEV (30). Embora a capacidade anticoagulante da AT seja fraca, este distúrbio é conhecido por causar uma forma grave de trombofilia e, a deficiência completa deste inibidor é quase sempre fatal *in útero* (26,33). Por esta razão, indivíduos com deficiência em AT são geralmente heterozigóticos e tendem a sofrer algum episódio trombótico ainda na adolescência. Os raros casos homozigóticos de deficiência em AT só podem ser causados por defeitos mais leves, responsáveis por apenas leves deficiências na capacidade inibitória da AT ou na ligação da heparina (26,33).

Tendo em conta a importante função fisiológica da AT em manter o equilíbrio entre a coagulação e anticoagulação, essencial para a prevenção da trombose, mesmo a deficiência modesta desta atividade inibidora, pode aumentar significativamente o risco de eventos trombóticos e recorrentes (30).

Manifestações tromboembólicas estão significativamente aumentadas em indivíduos com deficiência de AT, pois apresentam um risco 6 a 10 vezes maior de EAM e cerca de 9 vezes maior, comparativamente com a população normal, de desenvolver TEV sendo incomum durante as duas primeiras décadas de vida, possivelmente graças ao elevado nível de anticoagulantes naturais (30). A combinação da deficiência de AT com outros fatores de risco genéticos, nomeadamente as variantes da protrombina e do FVL, contribui substancialmente para o aumento do risco de trombose (26,30).

#### **1.4.2. A perda de função de um anticoagulante natural: Deficiência de proteína S e de proteína C**

A proteína C (PC) é uma proteína da coagulação dependente da vitamina K e está associada à regulação do sistema de coagulação sanguíneo, atuando como um anticoagulante natural. A sua ativação ocorre à superfície de células endoteliais pela trombina que está vinculada a trombomodulina, originando a proteína C ativada (PCa) (34,35).

A PCa possui uma atividade aumentada por alguns cofatores, como a PS, sendo responsável pela clivagem de sítios ativos de fatores pró-coagulantes, os fatores Va e VIIIa, inativando-os.

Indivíduos que tem uma deficiência de PC apresentam uma capacidade diminuída para regular a propagação e a geração de trombina, fator V e fator VIII, após a ativação da PC pela pequena quantidade de trombina gerada no início da coagulação (1,34,35).

A PCa possui também funções na regulação da inflamação. Durante a sépsis a sinalização inflamatória pela interleucina-1 (IL-1) e pelo fator de necrose tumoral medeiam a reposta inflamatória sistêmica, esta resposta diminui a síntese de proteínas reguladoras (AT, PS e PC), e aumenta a síntese de proteínas pró-trombóticas, como o fator VIII, fator Von Willebrand e fibrinogênio (1,34).

A deficiência em PC é herdada de forma autossômica dominante e caracteriza-se por uma ausência de inativação dos fatores Va e VIIIa com conseqüente hipercoagulabilidade. Está associada também a um aumento do risco de complicações na gravidez, nomeadamente de morte fetal *in útero* e de pré-eclâmpsia (1,34,35).

A proteína S (PS) é uma proteína dependente da vitamina K e possui um papel importante no sistema de coagulação natural, ao aumentar a velocidade de inativação, mediado pela PCa, do fator Va e fator VIIIa (35,36).

A deficiência em PS pode ser hereditária ou adquirida, a hereditária é transmitida de forma autossômica dominante e está associada à ocorrência de TEV (1), assim como a adquirida, contudo, esta surge devido à terapia com antagonistas da vitamina K, contraceptivos orais e diversos transtornos como doenças hepáticas, síndrome nefrótica, coagulação intravascular disseminada e infeções (34,35).

Durante a gestação, verifica-se uma progressiva diminuição da atividade da PS, considerando-se assim uma deficiência adquirida. Grávidas que apresentam uma deficiência de PS possuem um risco de 10 a 30% de apresentarem um episódio trombótico durante a gestação e, existe um risco ainda maior para a ocorrência de perda fetal tardia (1,34).

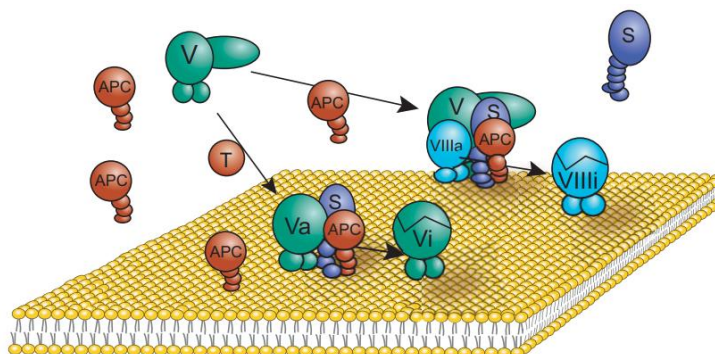


Figura 3- Inibição da coagulação pela PCa (APC). Degradação do FVa e FVIIIa pela PCa. FVa e FVIIIa são clivados e inibidos pela PCa em reações envolvendo cofatores de PCa, proteína S (S) e fator V (V). A proteína S e PCa são suficientes para inibir o FVa, enquanto a regulação do FVIIIa envolve adicionalmente FV, que nesta reação serve como cofator para PCa. Adaptado de (35).

### 1.4.3. O ganho de função em proteínas pró-coagulantes: mutações no fator V de Leiden e a variante da Protrombina

A trombofilia hereditária pode ser causada por vários fatores genéticos conhecidos por conferir um fenótipo protrombótico significativo. Entre todos os fatores genéticos, a descoberta de dois principais defeitos hereditários, uma mutação pontual no gene do FV, a variante FV G1601A, também conhecida como fator V Leiden (FVL), e a identificação da variante FII (protrombina) G20210A, alteraram acentuadamente a visão molecular da trombose venosa (10,34).

O FV é uma proteína sanguínea necessária para a normal coagulação do sangue, por isso, está diretamente envolvida na regulação hemostática e no desenvolvimento de vários distúrbios crônicos como as doenças cardiovasculares (28). A atividade do FV é regulada negativamente pelo sistema anticoagulante PC e PS, uma abordagem de defesa importante contra a trombose (10,37). Depois de ativado, a PC vai exercer o seu efeito anticoagulante através da proteólise de ligações específicas de arginina ao FV (37).

No entanto, alterações no gene que codifica o FV podem gerar resistência à proteólise induzida pela PC, impedindo a sua degradação e desencadeando a formação de coágulos. Esta condição é conhecida como resistência à PC ativada (RPCa) e é a causa mais frequente de trombofilia hereditária (37,38).

FVL apresenta uma herança autossômica dominante e resulta da substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 1601 do exão 10 do FV (p.Arg534Gln), resultando numa mutação missense que causa má resposta anticoagulante à PCa (1). Para inativar o FVa, a PCa

necessita de reconhecer uma arginina na posição 506 da molécula FV (um dos locais de clivagem da PCa) (37,39). Porém, devido ao defeito do FVL, o codão (CGA), codifica o resíduo de arginina normalmente presente, transforma-se em um codão diferente (CAA) que é traduzido como glutamina no local de clivagem 506 (R506Q) (37,39). Como resultado, a PCa não consegue inativar o FVa e este torna-se resistente à degradação e mantém as suas habilidades de coagulação (figura 4)(37,39).

Consequentemente, os portadores desta variante estão propensos a desenvolver hipercoagulabilidade, que pode manifestar-se como episódios de TEV (10,11). Julga-se que portadores heterozigóticos da mutação FVL apresentam um risco de 5 a 10 vezes maior de trombose, enquanto os indivíduos homozigóticos podem ter um risco de 50 a 100 vezes maior de desenvolver um evento trombótico ao longo da vida (10,11).

Este risco aumenta substancialmente quando estão presentes outros fatores de risco como gravidez, cirurgia, toma de anticoncepcionais orais, entre outros (1,34).

Importa referir que a RPCa pode ocorrer, embora raramente, na ausência da mutação do FVL, devido a outros fatores genéticos como a variante c.3980A>G ou mesmo de forma não hereditária, mas associada a fatores adquiridos, como por exemplo a utilização de anticoncepcionais orais (34).

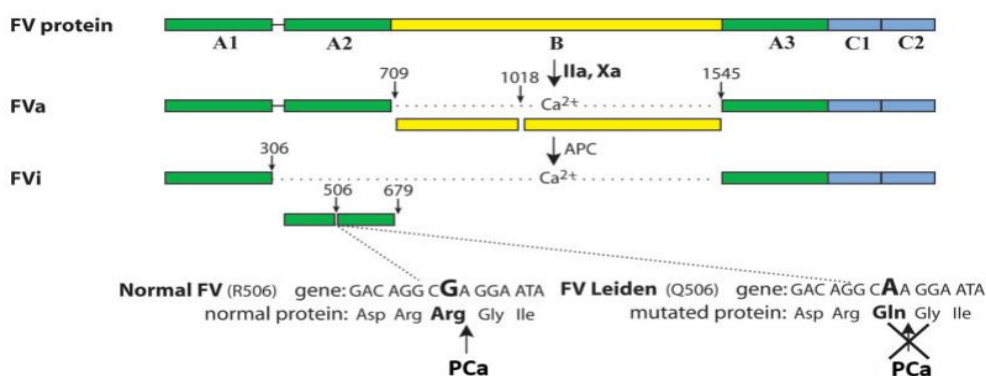


Figura 4- Mutações no gene FV causam RPCa. O FVa é inativado pela clivagem de ligações específicas da arginina pela PCa, que inibe a sua atividade pró-coagulante. Contudo, a presença da mutação do FVL induz RPCa, pois elimina um dos sítios de clivagem da PCa (Arg506), prejudicando assim a degradação de FVa e, conseqüentemente, levando ao aumento da geração de trombina. Adaptado de (35).

A hipercoagulabilidade, devida à variante FII G20210A, também é herdada de forma autossômica dominante e consiste na mudança de G para A na posição 20210 da região 3' não traduzida (UTR) do gene, que codifica a estabilidade do mRNA (figura 4) (34). Como tanto a região 5'-UTR quanto a 3'-UTR podem desempenhar funções regulatórias na expressão gênica, esta variante está associada ao aumento dos níveis plasmáticos de protrombina

(34,40). Esta mutação é encontrada em cerca de 1 a 3% de indivíduos na população geral, e em 6 a 18% dos doentes com TEV (1,41). Assim, pode ser considerada a segunda anomalia genética mais frequentemente associada às trombofilias (1).

A protrombina é o precursor da trombina (FIIa), o efetor final da cascata de coagulação e uma enzima chave na hemostasia e trombose (40,41). Além disso, apesar de estar envolvida na via de geração de fibrina, a protrombina está também envolvida na ativação plaquetária (41). Assim, relativamente ao seu papel pró-coagulante, a trombofilia relacionada à protrombina é um fator predisponente significativo para TEV (40,42).

Enquanto o genótipo heterozigótico da variante FII G20210A aumenta 2 a 3 vezes o risco de ocorrência de TEV, o genótipo homozigótico pode aumentar esse risco em 5 a 10 vezes (1,40). Além disso está associada a uma probabilidade quase 6 vezes maior de recorrência (12).

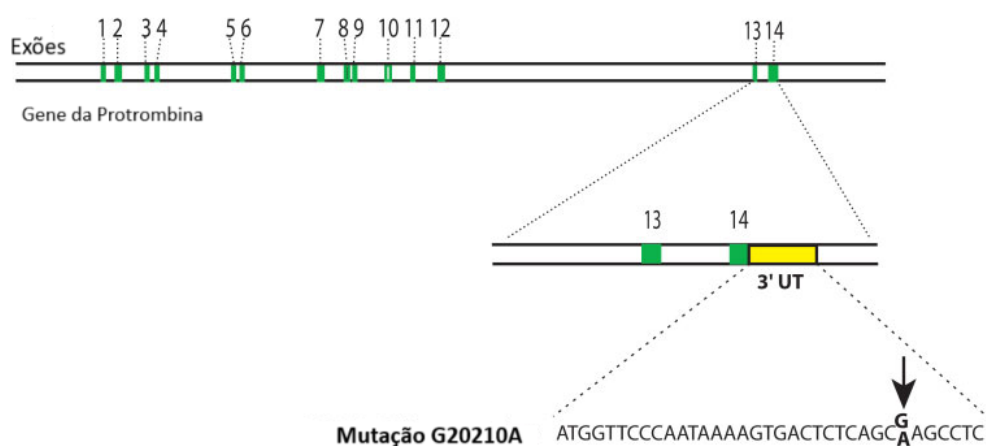


Figura 5- Variante G20210A da Protrombina (FII). Uma mudança de nucleotídeo (G para A) na posição 20210 da região 3'UT do gene da protrombina levará ao aumento da produção de protrombina. Adaptado de (35).

#### 1.4.4. Hiperhomocisteinemia devido a variantes no Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

A homocisteína é um aminoácido sulfidrilo não essencial, produzido por síntese bioquímica em todas as células, através do metabolismo do aminoácido essencial metionina em cisteína (12,22,43). Além de ser extremamente importante para a homeostase celular, a homocisteína pode causar danos nos vasos, induzir inflamação e perturbar a desintoxicação do fígado (43,44). Níveis elevados de homocisteína total são um fator de risco para trombose, estando especialmente associados a uma maior incidência de ocorrência de trombose arterial, mas também de TEV (12,45). Os níveis podem estar aumentados não só pelo aumento da produção

de homocisteína como pela diminuição do seu metabolismo, que pode ocorrer por meio de um processo de remetilação para converter novamente a homocisteína em metionina (43,45).

A remetilação metabólica da homocisteína está dependente de uma enzima chave, a 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), um importante agente catalisador no metabolismo do folato. Após a redução do folato (Vitamina B9) para tetrahidrofolato (THF), este é convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) (34,43,44). A enzima *MTHFR* vai então reduzir a 5,10-MTHF a 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF), uma etapa crucial para a reciclagem de homocisteína, pois, por meio da ação da metionina sintetase (MS) na presença do cofator essencial da vitamina B12, o substrato 5-MTHF vai funcionar como um dador de grupo metil para converter homocisteína em metionina (figura 5) (34,43,44). A hiperhomocisteinemia é um estado de aumento anormal de concentrações plasmáticas de homocisteína, identificado como um forte fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (1,34). De forma prolongada promove a formação de placas ateroscleróticas, eventos aterotrombóticos (através da disfunção endotelial e dano) e aumento da inflamação, levando ao chamado perfil trombofílico (43,46).

Uma das causas de hiperhomocisteinemia são mutações genéticas no gene *MTHFR* que causam diminuição na atividade da enzima *MTHFR* (43). As mutações genéticas mais frequentes são C677T e A1298C, ambas estão correlacionadas com alterações na atividade do *MTHFR*, nomeadamente a redução significativa da formação de 5-MTHF (que pode reduzir até cerca de 75%), sendo assim limitada a conversão de homocisteína em metionina, o que leva à sua acumulação no sangue (47,48).

A variante *MTHFR* C677T é comum e prevalente, nomeadamente entre a população europeia, e apresenta os efeitos mais pronunciados (22,47). Esta consiste na troca de uma citosina (C) por uma timina (T) e ocorre na região de codificação do exão 4 do *MTHFR*, resultando num resíduo altamente conservado (47,48). Esta mutação leva à síntese de uma forma termolábil e menos ativa da enzima *MTHFR*, estando associada a uma redução em cerca de 30% da sua atividade levando assim a um aumento dos níveis de homocisteína total (43,47). Comparativamente com a enzima funcional normal (genótipo CC), indivíduos heterozigóticos para esta variante (genótipo CT) exibem menos 30–40% de atividade enzimática, enquanto os homozigóticos tem atividade *MTHFR* reduzida em 60–70% (47–49).

A variante *MTHFR* A1298C está igualmente associada a uma diminuição da atividade de *MTHFR* (34). Neste caso, ocorre a substituição de uma adenina (A) por uma citosina (C) no exão

7, causando uma mudança de aminoácido de glutamina para alanina, dentro do domínio regulatório C-terminal da proteína (47,48).

A atividade *MTHFR* reduzida também é mais pronunciada no estado homocigótico do que no heterocigótico, pois enquanto os portadores heterocigóticos (genótipo AC) tem uma redução de 20-30% da atividade enzimática, os homocigóticos (genótipo CC) exibem uma redução de 40-50% (47,48).

A coexistência de genótipos 677TT/1298AA e 677CT/1298AC reduzem em grande medida a atividade em 60-70% e 40-50%, respectivamente (48).

Os níveis de homocisteína total são geralmente mais baixos durante a gravidez, contudo níveis elevados de homocisteína plasmática são frequentemente associados ao aumento da incidência de abortos espontâneos, enfartes placentários, defeitos do tubo neural e pré-eclâmpsia (34,50).

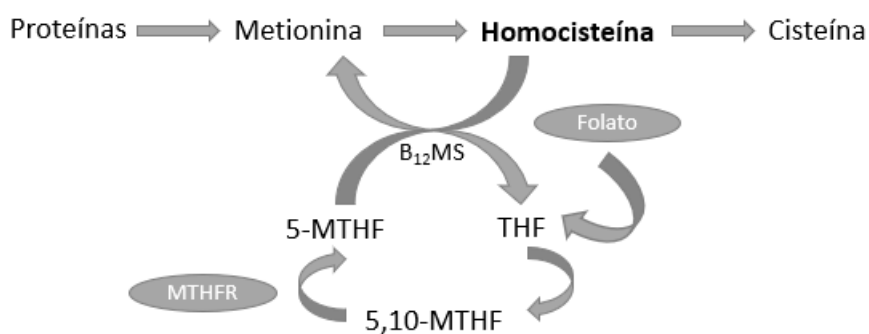


Figura 6- Formação de homocisteína e o papel da enzima *MTHFR* na reciclagem desse aminoácido. A reação de conversão metabólica do aminoácido metionina em cisteína leva à produção do produto intermediário homocisteína. Esta pode ser reciclada através do metabolismo do folato, onde o THF é convertido em 5,10-MTHF. A enzima *MTHFR* irá reduzir então 5,10-MTHF a 5-MTHF, que atua como um doador de grupo metil para a remetilização da homocisteína em metionina novamente. Esta última reação necessita da ação da enzima metionina sintase na presença do cofator da vitamina B12 (*B12MS*).

#### 1.4.5. Fibrinólise prejudicada pelo inibidor do ativador do plasminogénio I

O sistema fibrinolítico é uma peça fundamental na manutenção da hemostasia, pois este é responsável pela dissolução dos coágulos formados durante a lesão (51). Assim, acredita-se que variantes em fatores envolvidos na modulação desse sistema, mais precisamente aqueles associados à fibrinólise deficiente, propiciem a formação de coágulos (51,52). É o caso daqueles que potencializam a acumulação de inibidores fibrinolíticos endógenos como o *SERPINE1* (também conhecido como *PAI-1*) (52-54).

O *PAI-1* é o principal inibidor do sistema fibrinolítico, sendo capaz de restringir rapidamente a fibrinólise pela inibição direta dos ativadores do plasminogénio e, assim, interrompe a conversão do plasminogénio, ou seja, a formação de plasmina (53,55). O bloqueio do *SERPINE1*

pode promover a degradação dos coágulos formados, enquanto que a sua ativação pode resultar na formação de um trombo, estabelecendo-se assim uma clara associação entre o *PAI-1* e a patogénese e progressão de vários eventos vasculares trombóticos (56,57). Níveis aumentados de *PAI-1*, são uma das principais causas de atividade fibrinolítica, que parece comprometer os mecanismos de depuração normal da fibrina e uma maior propensão a eventos trombóticos (56,57). Várias variantes dentro do gene *PAI-1* que codifica como modeladores de expressão do *PAI-1* (53,58). Entre elas, uma variante principal que se presume aumentar o risco de trombose (é a mais frequentemente descrita), uma inserção/deleção na região promotora do gene *SERPINE1*, resultando em alelos com um genótipo 4G ou 5G (51–53). Embora os alelos 4G e 5G se liguem ao gene ativador transcrricional, apenas o alelo 5G também se pode ligar a uma proteína repressora no local de ligação sobreposto, reduzindo a transcrição e diminuindo o conteúdo de *PAI-1* circulante (figura 5) (34,52).

Indivíduos com o genótipo 5G/5G são aqueles que apresentam os níveis mais baixos de *PAI-1*, enquanto os portadores heterozigóticos (4G/5G) apresentam níveis intermédios e os homozigóticos 4G/4G têm as concentrações maiores de *PAI-1* (52,53,58). Além disso, os portadores do genótipo 4G/4G também apresentam uma maior atividade pró-coagulante (incluindo a formação de fibrina), quando comparados com indivíduos com 1 ou 2 cópias do alelo 5G (51,52).

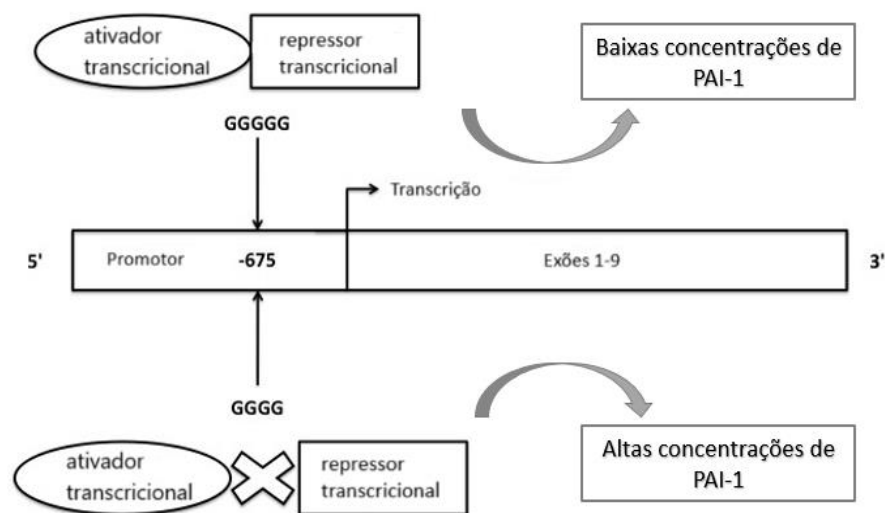


Figura 7- Modulação da expressão do gene *PAI-1* pela variante genética *PAI-1* 4G/5G. Enquanto o alelo 5G permite a ligação do ativador de transcrição e da proteína repressora, apenas o ativador de transcrição se liga ao alelo 4G, o que leva a uma maior transcrição do gene e elevados níveis plasmáticos de *PAI-1*. Adaptado de (54).

## **1.5. Estados hipercoaguláveis adquiridos**

Sabe-se que indivíduos que apresentam risco aumentado por causa genética, podem, ao longo da sua vida, enfrentar um evento trombótico, contudo o defeito herdado pode ser agravado por um fator predisponente ou pela exposição a condições de alto risco (22,45). Da mesma forma que interações entre genes podem resultar num efeito sinérgico aumentado de desenvolvimento de trombose, também as interações gene-ambiente são capazes de aumentar o risco geral acima da soma dos fatores de risco trombogénicos individuais (22,59). A trombose é uma doença multifatorial causada pela interação de fatores de risco herdados (genéticos) e adquiridos (ambientais), que podem coexistir no mesmo indivíduo (60). Para além da predisposição genética, múltiplos fatores como a idade, o sexo, níveis de colesterol, hipertensão, obesidade, imobilização, tabagismo, uso de contraceptivos orais, diabetes, cancro, inflamações, entre outras e condições de hipercoagulabilidade adquiridas como a gravidez, contribuem para um aumento da incidência de trombose e aumentam sinergicamente o seu risco (9,37,39).

### **1.5.1. O efeito do tabagismo nos sistemas hemostáticos**

Classificado como a maior causa evitável de mortalidade e morbidade, o tabagismo é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, com enormes implicações para a saúde a nível populacional (61). Acredita-se que o tabagismo aumenta o risco de ocorrência de trombose arterial, sendo um preditor de risco para EAM (62,63).

O tabagismo afeta os principais sistemas hemostáticos ao interferir nas funções das células endoteliais, das plaquetas e dos fatores de coagulação (61). Fumadores ativos podem, efetivamente, apresentar mudanças individuais significativas ao nível do sistema de coagulação comparativamente a não fumadores, ao longo da vida (61). Além disso, também é sugerido que o tabagismo interfira nas funções antitrombótica e fibrinolítica do sangue e dos vasos sanguíneos o que pode ser a principal causa dos eventos vasculares na maioria dos fumadores (13,61). No entanto, o mecanismo patológico subjacente ao tabagismo ainda estão longe de serem totalmente compreendidos (61). Contudo, entre todas as razões hipotéticas, acredita-se que o aumento do risco trombótico conferido pelo tabagismo esteja relacionado com o dano oxidativo, à disfunção endotelial, ao aumento da libertação de fator tecidual e à agregação plaquetária (13,61).

O tabagismo pode induzir mecanismos de disfunção endotelial que ativam a liberação de fator tecidual e ativação da cascata de coagulação, que culmina na geração de trombina e, por fim, leva à formação de coágulos (13).

### **1.5.2. A gravidez e as suas complicações trombóticas**

A gravidez, por si só, é um fator de risco adquirido e independente para o desenvolvimento de TEV (45). Durante a gravidez as trombofilias têm sido associadas a pré-eclâmpsia, restrição de crescimento fetal, descolamento prematuro da placenta, abortos espontâneos recorrentes e perdas fetais (45).

Durante a gravidez, ocorrem alterações na coagulação para ajudar a manter a função placentária e minimizar perda de sangue durante o parto (45). Enquanto os níveis de fatores pró-coagulantes aumentam, algumas vias anticoagulantes são reprimidas (12). Graças a essas mudanças, as grávidas desenvolvem RPCa adquirida, parcialmente relacionado a níveis reduzidos de PS, o que leva a um aumento da geração de trombina e leva a um estado de hipercoagulabilidade que pode predispor a mulher a trombose e complicações vasculares placentárias (12,45).

O aborto espontâneo, é uma condição bastante comum associada às trombofilias. Embora a sua fisiopatologia não esteja totalmente compreendida, a sua causa acredita-se ser multifatorial, associada a fatores de coagulação e fibrinolíticos (64,65). Durante a gravidez, cada fator que causa um desequilíbrio entre a fibrinólise e a coagulação pode causar trombose e, conseqüentemente, episódios recorrentes de aborto espontâneo (64).

Distúrbios na hemostasia podem afetar o sistema placentário, elevando cerca de 34 vezes o risco de TEV na gravidez (64). Deficiências de AT, PC ou PS aumentam o risco, enquanto as variantes do FVL ou protrombina têm menor impacto (45). A enzima MTHFR é crucial para a implantação e invasão do embrião (48,49), uma vez que distúrbios que afetam o metabolismo do ciclo do folato que resultam em níveis aumentados de homocisteína total podem causar danos vasculares placentários, que por sua vez está correlacionado com aborto, aborto recorrente e outras complicações obstétricas (47,48).

A expressão de *SERPINE 1* também pode contribuir para a fisiopatologia do aborto espontâneo, inibindo a invasão do trofoblasto e a remodelação do tecido materno (53).

### **1.5.3. O impacto dos anticoncepcionais orais**

Os anticoncepcionais orais combinados (AOC) contém estrogénio para controlar o sangramento de privação, associado a um progestagénio, para impedir a ovulação (66,67). O uso destas hormonas, seja em AOC ou terapia hormonal (com estrogénio e com ou sem progestagénio) para menopausa e tratamentos de cancro, está associado ao risco para TEV, eventos cardiovasculares e trombose arterial (45,67).

Os estrogénios estão ligados a mudanças no perfil lipídico e no metabolismo das lipoproteínas e acredita-se que afetem diretamente a parede vascular, promovam alterações nos fatores que promovem a disfunção endotelial e modifiquem modestamente os níveis plasmáticos dos vários fatores da coagulação (12,68). Também levam a uma diminuição dos níveis de inibidores naturais de PS e AT, aumento da RPCa adquirida e aumento da geração de trombina (67). Mesmo as novas formulações com uma menor dosagem de estrogénio revelaram aumentar a incidência de trombose, estando associadas a um risco de 1,5 a 3 vezes maior de TEV, comparativamente com o risco de não usuárias em idade reprodutiva, o que levou a reconhecerem também o papel desempenhado pelo progestagénio na modulação dos efeitos na trombose (45,67).

O progestagénio dos AOC tem efeitos via ligação a recetores de esteroides, afetando o risco trombótico (67,69). Progestagénios de 3ª geração em comparação com os de 2ª geração têm níveis mais elevados de fatores pró-coagulantes (como FVII e protrombina) e níveis mais baixos de anticoagulantes naturais, aumentando a resistência à PCa e associados a um risco trombótico 2 vezes maior (67,69).

Já os progestagénios isolados não parecem interferir na coagulação e os anticoncepcionais só de progestagénio têm efeito nos lípidos e coagulação, conferindo um baixo risco de TEV (12,67,68).

## 1.6. Indicações para rastreio de trombofilias

Trombofilias definem-se como uma tendência à trombose derivada de um estado de hipercoagulabilidade determinado por alterações hematológicas hereditárias ou adquiridas. Cerca de 70% dos doentes com história de trombose são portadores de uma trombofilia e 33% destes apresentam antecedentes familiares relevantes (4).

Por norma, as trombofilias, são rastreadas com dois propósitos principais: ajustar o regime terapêutico em doentes com historial de trombose e/ou identificar familiares assintomáticos que poderão vir a necessitar de profilaxia antitrombótica (4).

O rastreio de trombofilias, aquando da presença de critérios para tal, deve ser feito de forma criteriosa e sequencial, de forma a evitar erros de interpretação e terapêuticas dispendiosas e desnecessárias (4,70).

Os critérios de rastreio das trombofilias são (70):

- História pessoal ou familiar de tromboembolismo venoso
- Trombose antes dos 50 anos na ausência de fatores de risco transitórios
- Tromboembolismo recorrente
- Trombose atípica (mesentérica, esplénica, hepática, renal, cerebral)
- Parente do 1.º grau com mutação específica
- Patologia obstétrica:
  - Uma ou mais mortes *in útero* inexplicadas de fetos morfologicamente normais (>10 semanas gestação).
  - Três ou mais abortos espontâneos consecutivos (<10 semanas), excluídas causas anatómicas e cromossómicas.
  - Um ou mais nascimentos prematuros (<34 semanas), de fetos morfologicamente normais, associados a eclâmpsia ou pré-eclâmpsia grave ou insuficiência placentar.

## **1.7. Sequenciação de próxima geração (NGS)**

O NGS revolucionou a pesquisa genômica, esta tecnologia é capaz de sequenciar milhares de fragmentos de DNA em simultâneo, acelerando consideravelmente o processo de sequenciação. Esta capacidade de sequenciação massiva torna o NGS uma técnica versátil com inúmeras aplicações, incluindo a investigação de condições genéticas complexas como as trombofilias.

No contexto das trombofilias, o NGS destaca-se pela sua habilidade de analisar num painel uma ampla variedade de genes relacionados à coagulação sanguínea de maneira abrangente e detalhada. Esta abordagem abrangente é crucial, uma vez que as trombofilias representam um conjunto de doenças multifatoriais, envolvendo uma interação complexa de variantes genéticas. O uso deste painel NGS permite detetar mutações específicas associadas a um maior risco de desenvolvimento de trombofilias, permitindo assim intervenções mais personalizadas, preventivas e eficazes.

Assim, a aplicação do NGS no rastreio de mutações associadas ao risco de desenvolver um evento trombótico representa um avanço promissor na compreensão e gestão dessas condições, oferecendo uma visão mais abrangente e detalhada do perfil genético dos indivíduos e da sua suscetibilidade genética.

## **1.8. O DNA Bead Array no rastreio das trombofilias**

Antes do NGS, o rastreio das trombofilias neste laboratório era realizado recorrendo à técnica de DNA Bead Array. Esta era uma abordagem de microarray utilizada para analisar variações genéticas em larga escala, sendo comumente usada em pesquisas de Single Nucleotide Polimorfisms (SNPs). A técnica envolvia pequenas partículas esféricas (beads) com sequências específicas de DNA ligadas a uma matriz sólida, como uma lâmina de vidro. Cada bead carregava uma sequência de DNA complementar a uma sequência genética específica que se pretendia estudar. Durante a realização da técnica, a amostra em estudo era marcada com uma cor específica e hibridizada com as beads que continham as sequências complementares. Feita a hibridização, um scanner lia as beads para determinar quais as sequências de DNA que estavam presentes na amostra, com base nas cores das beads. Isto permitia identificar quais as variantes associadas às trombofilias que estavam presentes na amostra.

Contudo, esta técnica foi descontinuada e, mais tarde, surge a técnica de NGS com uma capacidade mais aprimorada de fornecer informações mais detalhadas e abrangentes, maior especificidade e sensibilidade, custos mais acessíveis e uma maior flexibilidade em termos de aplicações. Ao longo do desenvolvimento deste projeto e através dos resultados apresentados, será possível observar a performance do NGS no rastreamento das trombofilias.

## **2. Objetivos**

Este projeto tem como objetivo geral a implementação no laboratório de um painel NGS dirigido para o rastreio de mutações associadas ao risco de trombofilias. Isto vai permitir uma pesquisa mais alargada e variada de mutações que não era possível pela técnica DNA Bead Array anteriormente utilizada. Para o efeito, foram estabelecidos especificamente os seguintes objetivos:

1. Desenho dos primers para as regiões de interesse de acordo com os requisitos necessários e validação da sua amplificação
2. Estabelecimento das condições necessárias para a realização da técnica de PCR Multiplex
3. Amplificação das amostras através da técnica de Multiplex, seguida da sequenciação por NGS
4. Cumprimento dos requisitos estabelecidos no controlo de qualidade das amostras.
5. Correlacionar os dados apresentados na literatura com as variantes detetadas, a sua contribuição para o aumento do risco de eventos trombóticos e, como estas se alinham com o quadro clínico apresentado pelos pacientes

### 3. Métodos

#### 3.1. Seleção de amostras e extração de DNA

Neste estudo foram utilizadas 10 amostras selecionadas aleatoriamente da base de dados para os estudos de trombofilias da Unilabs, com variantes positivas que se adequavam à validação do painel NGS. Na tabela 1 estão disponíveis os dados relativos às amostras bem como a informação clínica das mesmas.

Tabela 1- Informações das amostras incluídas no projeto

Indivíduo	Sexo	Informação Clínica
A1	F	Infertilidade
A2	F	Síndrome HELLP com cesariana às 32 semanas
A3	F	Doente com vários episódios de TVP por ano
A4	M	TEP não estratificada. Para exclusão de HTP pulmonar, TVP
A5	F	Trombose dos seios venosos, sob tratamento com enoxaparina
A6	F	AVC criptogénico. Dislipidemia
A7	F	Resistência à proteína C ativada
A8	M	Rastreio de trombofilias
A9	M	Rastreio de trombofilias
A10	M	Rastreio de trombofilias

Legenda: M- Masculino; F-Feminino

As amostras de DNA foram extraídas de amostras de sangue periférico. Foi utilizado o QIA Symphony, que é uma técnica baseada em sílica com o auxílio de partículas magnéticas, de forma a obter uma concentração aproximada de 75 ng/ $\mu$ L.

Realizada a extração, a quantidade e qualidade da amostra foram avaliadas, usando o Epoch 2 Microplate Spectrophotometer, enquanto a integridade, para verificar a sua degradação, foi avaliada por meio de uma eletroforese.

A concentração mínima aceitável utilizada foi de 20 ng/ $\mu$ L, e a razão A260/A280 deve estar entre 1.5-2.

Por fim, as amostras foram diluídas de forma a obter-se uma alíquota de DNA a uma concentração de 20 ng/ $\mu$ L.

Todo este procedimento mencionado anteriormente foi realizado pelo departamento de extração do laboratório.

### 3.2. Desenho e Verificação dos primers para PCR Multiplex

O desenho dos primers para a amplificação das regiões de interesse específicas dos genes incluídos neste painel, nomeadamente as regiões exónicas, implicam a consideração de alguns critérios como: o comprimento dos mesmos não deve exceder os 18–25 pares de bases (pb), a temperatura de melting entre os primers devem ser idênticas (56–59°C) ou diferenciarem, no máximo, em 1–2°C e por fim, devem ser específicos para as regiões genómicas de interesse (tabela 3).

Regiões contendo sequências repetitivas e SNPs (Single Nucleotide Polimorfisms) devem ser evitados, uma vez que estas características podem impactar negativamente a eficiência da amplificação por PCR.

Para o efeito recorreu-se ao uso do SNPCheck, In-Silico PCR, BiSearch e o UMelt para garantir que os primers não apresentam SNPs, a temperatura de melting entre os primers é idêntica ou não varia mais que 1–2°C, que são específicos e para verificar a curva de melting dos amplicões, o que permite escolher as condições de PCR.

Após isto, os primers foram agrupados em 3 grupos distintos (tabela 2), de forma a rentabilizar a 100% a reação de PCR, garantindo assim condições ótimas de amplificação a todos os genes. A separação baseou-se, também, no tamanho dos amplicões, a fim de facilitar a identificação de cada gene após a amplificação na eletroforese capilar realizada no sistema Qiagen Qiaxcel. Além disso, todos os primers que apresentavam um teor de G/C  $\geq$  55 foram agrupados na MIX 2. A MIX 2 difere das restantes pela presença de DMSO, um aditivo de PCR que vai melhorar o desempenho de um PCR que pode estar abaixo do ideal tendo em conta o elevado teor em GC.

Tabela 2- Distribuição dos primers pelas diferentes MIX

MIX 1.1	MIX 1.2	MIX 2
Trombofilia	Trombofilia	Trombofilia
<i>ACE</i>	<i>F13A1</i>	<i>AGT</i>
<i>AGTR1</i>	<i>F2</i>	<i>APOE</i>
<i>APOB</i>	<i>ITGB3</i>	<i>GP1BA</i>
<i>F5</i>	<i>MTRR</i>	<i>GSTP1</i>
<i>ITGA2</i>	<i>MTR</i>	<i>ITGA2B</i>
<i>SERPINE1</i>		<i>MTHFR</i>

As mix de primers foram testados com amostras normais de DNA, ou seja, indivíduos saudáveis e com controlo negativo para garantir que todas as regiões são amplificadas e os primers específicos.

Ao longo de controlo de qualidade desta amostra, foi observado o alinhamento dos resultados obtidos no Alamut Visual Plus v.1.7.1 e verificou-se que esta tinha a cobertura mínima necessária de 20 leituras para validar os primers e o procedimento realizado. Nesta fase, prosseguiu-se com as amostras de doentes positivos a fim de validar a presença de mutações anteriormente identificadas pela técnica de array.

Tabela 3- Dados sobre os primers desenhados

Gene	NM	Mutação	Primer Forward	TM (°C)	Primer Reverse	TM (°C)	Tamanho (pb)	% G/C
ACE	NM_000789.3	c.2306-117_2306-116insA	5'-CAGGTGTCTGCAGCATGT-3'	57	5'-CTTGGGGTTTCACAGCAC-3'	57	435	53
AGT	NM_001384479.1	c.803T>C	5'-CTCTCTCTATCTGGGAGCCT-3'	55	5'-GCCTGACTGGCTGATCTC-3'	56	500	59
AGTR1	NM_031850.3	c.*86A>C	5'-TGGATGTATTGATTCAACTAGGC-3'	56	5'-ATTGTTCTTCGAGCAGCC-3'	58	535	39
APOB	NM_000384.3	c.10580G>A	5'-GACCACAAGCTTAGCTTGAA-3'	59	5'-ACAAAGGCAGTTGAAACACG-3'	59	695	45
APOE	NM_000041.2	c.526C>T c.388T>C	5'-ATCTGCTCTCTGCATCTGTCTC-3'	58	5'-TCGAACCAGCTCTTGAGG-3'	59	775	71
F13A1	NM_000129.3	c.103G>T	5'-TTGGAATCCTTGTCTCAAATG-3'	58	5'-GAGACAGAGGATGTTTACCTGC-3'	58	312	51
F2	NM_000506.5	c.*97G>A	5'-AGAAACAGTTGCCTGGCAG-3'	58	5'-TAAAACCCAGAGGGTGGAA-3'	59	637	47
F5	NM_000130.4	c.1601G>A	5'-AATATTAATTGGTTCCAGCGA-3'	56	5'-AGCCAGGAGACCTAACATGTT-3'	57	384	38
		c.3980A>G	5'-CTCTTCTCCAGAGCTCAGTGA-3'	58	5'-ACCAAGTCTGGAGAAAGTGT-3'	58	805	51
GP1BA	NM_000173.7	c.482C>T	5'-GTGGATGCTGTTTCTGGAAG-3'	58	5'-GATTCTCCAGCCCATTAG-3'	58	681	60
GSTP1	NM_000852.4	c.313A>G	5'-GGCAGTCTCTCATCCTTCC-3'	57	5'-ACTTGGCTGTTGATGTCC-3'	58	458	62
ITGA2	NM_002203.4	c.1600G>A	5'-CTGAGGGAAGGAAGTGTGC-3'	58	5'-TCATAACTTAATGGGGACATCCT-3'	59	461	32
ITGA2B	NM_000419.5	c.2621T>G	5'-CCAAAGTGGAGCACACCTAT-3'	56	5'-GCAAGTGTCTTTCAGCTCAC-3'	58	703	64
ITGB3	NM_000212.2	c.176T>C	5'-TTTATGCTCCAATGTACGGG-3'	58	5'-GCTACTTCCCAAGACTTCC-3'	59	406	57
		c.506G>A	5'-AAGGAAGAGGAAAAGGGACC-3'	58	5'-GACAGCCAACAAAGTGATCC-3'	59	487	47
		c.1544G>A	5'-GAACTCCAGATTGCAAAAGC-3'	58	5'-CCTATGTTTCCAGTGGTTGC-3'	59	642	47
MTHFR	NM_005957.5	c.677C>T	5'-TGTGGTCTTTCATCCCTC-3'	56	5'-AGTTCTGGACCTGAGAGGAG-3'	56	397	58
		c.1298A>C	5'-AGTCAGGGGCAGAATTTACAG-3'	58	5'-AAGACCCAGCCTGTCTTTG-3'	58	473	56
MTR	NM_000254.2	c.2756A>G	5'-CCTGAAGGAGGTGTTATCAG-3'	55	5'-TGATCCAAAGCCTTTTACAC-3'	55	296	34
MTRR	NM_002454.3	c.66A>G	5'-AGACTGTTGTAATGATACTGTGG-3'	58	5'-AGACACAGCATATGCTACTTCTGT-3'	58	839	37
SERPINE1	NM_000602.5	c.-820G[(4_5)]	5'-GCCATGAATTGACTCTGTT-3'	58	5'-GAGGACTCTTGGTCTTTCCC-3'	58	342	56

### 3.3. PCR Multiplex

Primeiramente, foram preparadas as 3 mix de primers através da adição de cada Primer Forward e Primer Reverse, das respectivas soluções stock a 100 nmol/ $\mu$ L e 360  $\mu$ L para a mix 1.1 e 1.2 trombofilia e 380  $\mu$ L para a mix 2 trombofilia de água autoclavada para um volume final de 500  $\mu$ L num microtubo de 1.5 mL. De seguida, preparou-se as mix de reagentes seguindo as quantidades do kit Qiagen Multiplex PCR (100), realizadas no frio com duas reações em excesso, ou seja, por amostra preparou-se 25  $\mu$ L de 2X Multiplex PCR Master Mix, 5  $\mu$ L de água livre de RNAses e 5  $\mu$ L de DMSO na mix 2.

Após isto, os tubos de amostras de PCR foram preparados numa placa fria e foi acrescentado por amostra a mix dos reagentes, a mix de primers e o DNA a 20 ng/ $\mu$ L, excetuando o controlo negativo onde foi adicionado o buffer ATE do QIASymphony DNA Mini Kit (fornecido pelo departamento de extração) a uma concentração apta para o tipo de amostra, ao invés de DNA.

A tabela 4 representa o programa de PCR utilizado:

Tabela 4- Programa de PCR utilizado

	Temp °C	Tempo	Ciclos
Ativação	95	15min	1
Desnaturação	94	30s	
Annealing	58	1min30s	35
Extensão	72	1min30s	
Extensão final	72	10min	1
Hold	4	$\infty$	-

### 3.4. Eletroforese Capilar Automatizada

De forma analisar e validar a amplificação feita por PCR (controlo de qualidade interno), os produtos são submetidos a uma eletroforese capilar automatizada onde foi o utilizado o equipamento Qiagen Qiaxcel, de acordo com as instruções disponibilizadas pelo fornecedor. Após todo o processo de reação de PCR os produtos são posteriormente sequenciados por NGS.

### **3.5. Purificação dos produtos de PCR Multiplex**

Dos produtos de PCR amplificados, 30  $\mu\text{L}$  foram pipetados para uma MIDI plate (placa de 96 poços) e nestes foram ressuspensos 54  $\mu\text{L}$  de beads CleanNGS da cleanNA (esferas magnéticas) seguido de uma incubação de 5 min à temperatura ambiente e outra de mais 5 min na placa magnética. Após as duas incubações, o sobrenadante em excesso é retirado e adicionado 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% e incubado por 30 seg à temperatura ambiente após retirar o etanol sem tocar nas esferas magnéticas formadas pelas beads. A lavagem com etanol é novamente repetida e, após isso, as esferas magnéticas seguem para o termociclador a 37°C onde são secas. Assim que os aglomerados formados pelas esferas magnéticas começam a formar fissuras são imediatamente retiradas do termociclador e é lhes adicionado 40  $\mu\text{L}$  de água a 0,2  $\mu\text{M}$  (Ambion DEPC-treated water), a solução é homogeneizada e incubada durante 2 min à temperatura ambiente e novamente, por mais 2 min na placa magnética. Por fim, é retirado 27  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e transferido para novos poços.

### **3.6. Quantificação e diluição dos produtos de PCR purificados**

Utilizando o kit Qubit dsDNA BR Assay, foi preparado a mix de quantificação suficiente para o número de reações necessárias incluindo 2 standards mais duas reações em excesso, sendo que a razão da mix é de 1:199. Após a preparação da mix, são preparadas alíquotas para a quantificação, onde é adicionado 198  $\mu\text{L}$  da mix de quantificação e 2  $\mu\text{L}$  da amostra, excetuando as alíquotas dos standards onde é adicionado 190  $\mu\text{L}$  da mix e 10  $\mu\text{L}$  do standard a 10 ng/ $\mu\text{L}$ . Para a quantificação, foi utilizado o Qubit 4.0 seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Tendo por base os resultados da quantificação, as amostras foram diluídas em novos tubos de forma a obter uma concentração de 10 ng/ $\mu\text{L}$  utilizando água HPLC como diluidor e foi novamente quantificado para confirmar a concentração. Finalmente, num novo tubo, juntou-se 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição que pertencem à mesma combinação de indexes (pool de amostras) num mesmo tubo.

### **3.7. Fragmentação e Tagmentação**

Utilizando o kit SureSelect QXT Library Prep, em tubos de PCR foram preparados em cada poço, 17  $\mu\text{L}$  de QXT buffer, 2  $\mu\text{L}$  da amostra e 4  $\mu\text{L}$  de QXT enzyme Mix ILIM, nas concentrações

indicadas pelo fornecedor. A fragmentação foi realizada de acordo com o seguinte programa de PCR (pré-aquecido): 1 ciclo a 45°C, durante 10 min e, 1 ciclo a 4°C durante 1 min, com hold a 4°C. Após terminado o PCR, foi adicionado 32 µL de 1X QXT Stop solution, realizado sob uma placa fria, e depois incubado durante 1 min à temperatura ambiente.

### **3.8. Purificação dos produtos de Tagmentação**

Foram transferidos 60 µL dos produtos de PCR para uma MIDI plate e, em seguida, adicionou-se 65 µL de beads CleanNGS (esferas magnéticas) para ressuspender esses produtos. A placa foi incubada por 5 min à temperatura ambiente e, em seguida, por mais 5 min na placa magnética. O sobrenadante foi removido e adicionaram-se 200 µL de etanol a 70%, seguido de uma incubação por 1 min. O etanol foi retirado com o máximo cuidado, sem tocar nas esferas magnéticas e foi realizada uma nova lavagem com o etanol. Após isso, as esferas magnéticas foram secas recorrendo ao termociclador em pausa a 37°C e, assim que os aglomerados formados pelas esferas magnéticas apresentam uma fissura, adicionou-se 11 µL de água a 0.2 µM (Ambion DEPC-treated water) e a solução foi homogeneizada. A placa foi incubada por 2 min à temperatura ambiente e novamente colocada na placa magnética por 2 min. Por fim, todo o líquido sobrenadante foi removido e transferido para novos poços.

### **3.9. Amplificação por PCR para ligação de sequências identificadoras de amostras (indexes) para NGS**

Inicialmente, a mix de PCR para o número necessário de reações mais duas em excesso, foi preparada numa covete fria usando o kit SureSelect QXT Library Prep. Para cada reação adicionou-se 13.5 µL de água livre de nucleases, 10 µL de Herculase II 5x Reaction Buffer, 0.5 µL de 100 mM dNTP mix e 1 µL de Herculase II fusion DNA polymerase. As concentrações utilizadas foram as indicadas pelo fornecedor. Em seguida, numa placa fria, foram adicionados 25 µL da mix de PCR preparada em cada tubo, juntamente com 1 µL do index P7 e 1 µL do index P5 adequado para cada tubo/biblioteca (do mesmo kit mencionado anteriormente), e 10 µL de DNA purificado. O programa de PCR utilizado para a ligação dos indexes foi o seguinte: 1 ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 6 ciclos de 98°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e, finalmente, um ciclo a 72°C por 5 min com hold a 4°C.

### **3.10. Purificação dos produtos de PCR após ligação das sequências identificadoras das amostras para NGS**

Foram pipetados 40  $\mu\text{L}$  dos produtos de PCR para uma MIDI plate e, em seguida, nestes foram ressuspendidos 60  $\mu\text{L}$  de beads CleanNGS (esferas magnéticas). A placa foi incubada por 5 min à temperatura ambiente e, depois por mais 5 min na placa magnética. O sobrenadante foi removido e adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 70%, seguido de uma incubação de 1 min. Sem tocar nas esferas magnéticas, o etanol foi removido e realizou-se uma nova lavagem com etanol. Após isso, as esferas magnéticas foram secas em um termociclador em pausa a 37°C. Assim que os aglomerados formados pelas esferas magnéticas apresentaram uma fissura, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de água a 0.2  $\mu\text{M}$  (Ambion DEPC-treated water) e a solução foi homogeneizada. A placa foi incubada durante 2 min à temperatura ambiente e novamente colocada na placa por mais 2 min. Por fim, todo o sobrenadante foi removido e transferido para novos poços.

### **3.11. Avaliação e pooling das bibliotecas**

Para a avaliação das bibliotecas, o Qubit 4.0 foi utilizado novamente, conforme mencionado anteriormente. Além disso, a avaliação também foi realizada utilizando a TapeStation, a D1000 ScreenTapes, incluindo os reagentes High Sensitivity D1000 e o respectivo software de acordo com as instruções do fornecedor. Para isso, alíquotas contendo 3  $\mu\text{L}$  de High Sensitivity D1000 e 1  $\mu\text{L}$  das bibliotecas foram preparadas. Com base nos resultados das quantificações, quantidades específicas de cada pool e de RSB (ressuspension buffer) foram adicionadas num novo tubo, a fim de obter uma concentração de 10 nM. A partir dessa solução, uma nova solução foi feita, adicionando-se 12  $\mu\text{L}$  da pool a 10 nM e 18  $\mu\text{L}$  de RSB, resultando numa concentração de 4 nM. Em seguida, as duas pool preparadas, o tubo a 10 nM e o tubo a 4 nM, foram avaliadas novamente na TapeStation, sendo cada uma delas analisada em triplicado, para confirmar a correta preparação das concentrações.

### **3.12. Sequenciação NGS**

Num novo tubo, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de NaOH a 0.2 N e 5  $\mu\text{L}$  da pool a 4 nM para desnaturar o DNA e foi incubado por 5 min. Em seguida, utilizando o Kit Miseq Reagent Nano v2 da Illumina, adicionou-se 990  $\mu\text{L}$  de HT1 à pool desnaturada para interromper a desnaturação. Depois num

novo tubo, transferiu-se 360 µL deste (pool com HT1) e 240 µL da pool desnaturada para obter uma diluição final de 10 pM (pool final). A Miseq Cartridge da Illumina foi preparada para a corrida, incluindo a preparação de uma mix de primer 1 (com buffer do poço 13 da cartridge e 3 µL de index) e uma mix de primer 2 (com buffer do poço 14 da cartridge e 3 µL de primer 2). Em seguida, carregou-se a cartridge com a mix de primer 1 no poço 18, mix de index no poço 19, mix de primer 2 no poço 20, 600 µL da pool diluída a 10 pM no poço 17. Por fim, a corrida de NGS na plataforma Illumina Miseq foi iniciada, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

### **3.13. Controlo de qualidade e avaliação de resultados**

Finalizada a corrida de sequenciação no MiSeq, é efetuada a análise da qualidade da corrida de NGS através da ferramenta bioinformática BaseSpace. Esta ferramenta permite avaliar o %Q30 e %PF (qualidade das bases e clusters), que devem estar acima de 80%, indexing QC, para avaliar a representatividade do index na corrida e, indiretamente da amostra, devendo esta ser homogénea e a densidade dos clusters deve estar compreendida entre 800-1200.

Para o alinhamento e obtenção dos arquivos BAM, BAM.bai e VCF, foi utilizado o programa Dragen Germline Pipeline V.3.2.8 (Illumina), usando a sequência de referência Human (UCSC hg19). A BED necessária para gerar a BAM, BAM.bai e VCF foi desenhada usando o UCSC e inclui os exões desejados +/- 8 pb.

O Omnomics foi utilizado para avaliar a qualidade dos resultados, fornecendo um relatório de qualidade. Nesse relatório, foi dada atenção a qualidade das bases, que devem apresentar uma leitura igual ou superior a 20 e a percentagem de cobertura a 20x deve ser de 100%.

### **3.14. Classificação da zigotia das variantes**

Para a classificação da zigotia das variantes encontradas, foi usado o Alissa Interpret conjuntamente com a VCF. O Alamut Visual Plus v.1.7.1 também foi utilizado para auxiliar na classificação das variantes, bem como verificar a cobertura do gene.

Relativamente à Alissa interpret, os filtros aplicados sobre as variantes encontradas, foram estabelecidos e desenhados pelo laboratório.

## 4. Resultados

### 4.1. Validação das misturas de primers desenhados com amostras normais

Relativamente aos primers desenhados, estes foram separados em 3 mix tendo em conta os tamanhos dos amplicões, de forma heterogénea, para que fosse mais fácil identificá-los aquando da realização da eletroforese capilar. Os amplicões resultantes do PCR apresentam um tamanho entre 250–850 pb, pelo que se espera que as bandas estejam entre esses valores.

Na figura 8 podemos observar os resultados da corrida de eletroforese usada para avaliação do PCR.

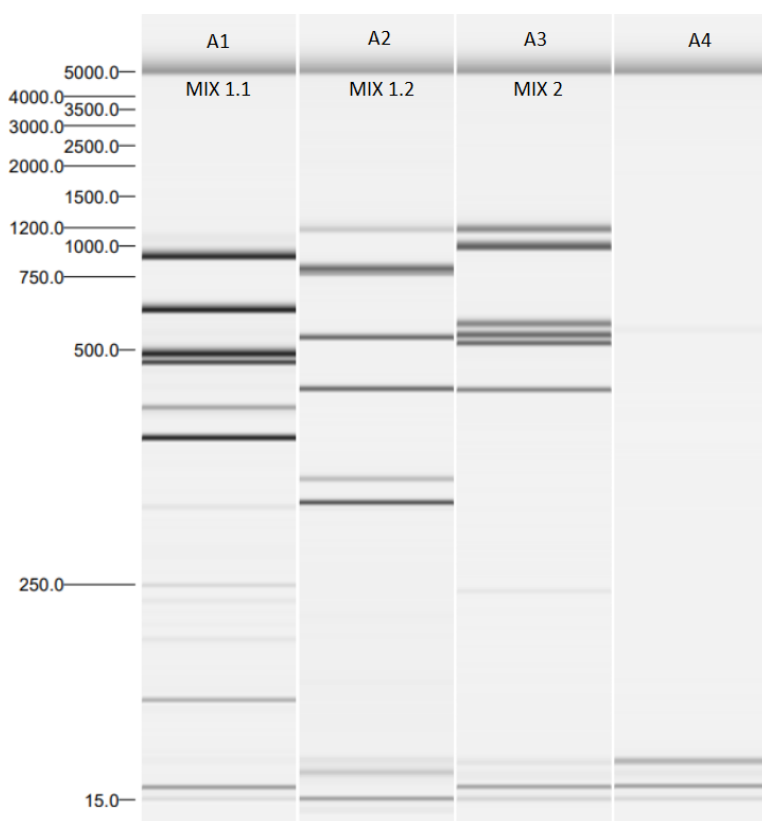


Figura 8- Separação eletroforética do resultado das reações de PCR de amostras normais.

Tendo em conta a tabela 2 e atendendo à distribuição dos diferentes primers pelas 3 MIX, podemos observar que todos amplificaram, dado que é possível observar bandas entre os 250–850 pb.

Quanto à sequenciação por NGS, ao longo do controlo de qualidade desta amostra, foi observado o alinhamento dos resultados obtidos no Alamut Visual Plus v.1.7.1 e verificou-se o cumprimento dos critérios estabelecidos para o controlo de qualidade das amostras, e que esta tinha a cobertura mínima necessária para validar os primers e o procedimento realizado. Nesta fase, prosseguiu-se com as amostras de doentes positivos a fim de validar a presença de mutações anteriormente identificadas pela técnica de DNA Bead Array.

#### 4.2. Amplificação das amostras positivas

Na figura 9, podemos observar a amplificação de 1 (A9) das 10 amostras amplificadas pela técnica de Multiplex seguida de sequenciação por NGS.

O padrão de amplificação verificado para esta amostra foi praticamente idêntico ao padrão de amplificação das restantes.

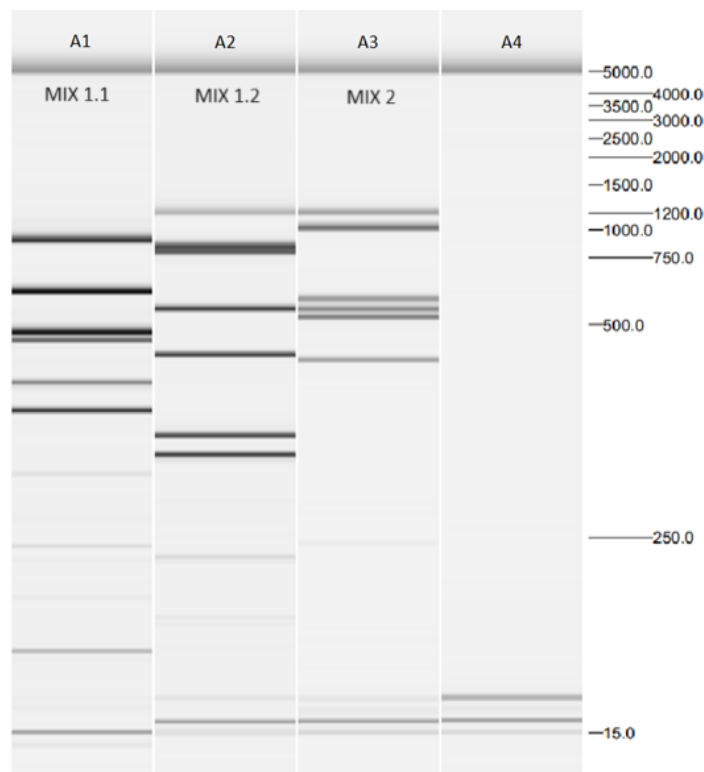


Figura 9- Separação eletroforética do resultado das reações de PCR numa amostra positiva.

### **4.3. Variantes encontradas nas amostras na sequenciação por DNA Bead Array**

As amostras positivas de DNA utilizadas foram anteriormente testadas pela técnica de DNA Bead Array, onde foram encontradas as variantes assinaladas na tabela 5 bem como a zigotia em que estas se encontravam.

### **4.4. Resultados obtidos após a sequenciação por NGS**

Ao testar as amostras positivas, provenientes da sequenciação por DNA Bead Array, com todos os genes incluídos neste novo alargado painel, foram detetadas 82 variantes nas amostras, das quais 57 encontravam-se em heterozigotia (69.5%) e 25 em homozigotia (30.5%).

Os resultados de NGS passam o controlo de qualidade apresentando um Q30 e %PF maior a 80%, densidade de clusters entre 1000 a 1200 k/mm<sup>2</sup>, uma representatividade de index semelhantes e cobertura de 100%, cumprindo assim o mínimo de cobertura estabelecido de 20 leituras (dados obtidos pelo Omnomics), tendo-se obtido uma cobertura média de 730 leituras por pb. Após isto, procedeu-se à análise da zigotia utilizando a Alissa Interpret.

### **4.5. Variantes encontradas nas amostras após sequenciação por NGS**

Na tabela 6 podemos observar todas as variantes encontradas nas diferentes amostras após a sequenciação por NGS bem como a sua zigotia.

Por meio da sua análise, podemos notar que todas as variantes positivas submetidas a teste por NGS (destacadas a cinzento) mantiveram-se positivas e concordantes com os resultados previamente obtidos pela técnica DNA Bead Array, quer a nível da presença da variante, quer da zigotia. No entanto, é notável que com a nova abordagem NGS há uma identificação significativamente maior de variantes em comparação com a técnica anteriormente utilizada.

Tabela 5- Variantes detetadas na sequenciação por DNA Bead Array e respetiva zigotia

GENE	MUTAÇÃO	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
ACE	c.2306-117_2306-116insA										
AGT	c.803T>C										
AGTR1	c.*86A>C										
APOB	c.10580G>A										
APOE	c.526C>T										
	c.388T>C										
F13A1	c.103G>T		X (het)	X (het)	X (het)	X (hom)	X (het)	X (het)	X (hom)		
F2	c.*97G>A		X (het)								
F5	c.1601G>A							X (het)			X (hom)
	c.3980A>G										
GP1BA	c.482C>T										
GSTP1	c.313A>G										
ITGA2	c.1600G>A										
ITGA2B	c.2621T>G										
ITGB3	c.176T>C										
	c.506G>A										
	c.1544G>A										
MTHFR	c.677C>T	X (het)		X (hom)	X (het)		X (het)	X (het)		X (het)	X (hom)
	c.1298A>C	X (het)			X (het)	X (hom)			X (het)	X (het)	
MTR	c.2756A>G										
MTRR	c.66A>G										
SERPINE1	c.-820G[(4_5)]										

Legenda: Het- Heterozigotia; Hom- Homozigotia

Tabela 6- Variantes detetadas na sequenciação por NGS e respetiva zigotia

GENE	MUTAÇÃO	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
ACE	c.2306-117_2306-116insA										
AGT	c.803T>C		X (hom)	X (hom)	X (het)	X (het)	X (het)	X (hom)	X (het)	X (hom)	X (het)
AGTR1	c.*86A>C		X (het)		X (het)	X (hom)	X (het)		X (het)		X (het)
APOB	c.10580G>A										
APOE	c.526C>T						X (het)				
	c.388T>C	X (het)	X (het)	X (het)			X (het)		X (het)		X (hom)
F13A1	c.103G>T		X (het)	X (het)	X (het)	X (hom)	X (het)	X (het)	X (hom)		
F2	c.*97G>A		X (het)								
F5	c.1601G>A	X (hom)	X (hom)	X (hom)	X (hom)	X (hom)	X (hom)	X (het)	X (hom)	X (hom)	X (hom)
	c.3980A>G					X (het)		X (het)	X (het)		
GP1BA	c.482C>T				X (het)						
GSTP1	c.313A>G	X (het)	X (het)	X (hom)	X (het)	X (het)			X (het)	X (het)	
ITGA2	c.1600G>A										
ITGA2B	c.2621T>G		X (het)	X (hom)	X (het)	X (het)					
	c.176T>C		X (het)		X (het)						
ITGB3	c.506G>A										
	c.1544G>A										
MTHFR	c.677C>T	X (het)		X (hom)	X (het)		X (het)	X (het)		X (het)	X (hom)
	c.1298A>C	X (het)			X (het)	X (hom)			X (het)	X (het)	
MTR	c.2756A>G			X (het)			X (het)	X (het)			
MTRR	c.66A>G	X (het)		X (hom)	X (het)	X (het)	X (hom)	X (hom)	X (het)	X (het)	
SERPINE1	c.-820G[(4_5)]		X (het)			X (het)					

Legenda: Het- Heterozigotia; Hom- Homozigotia; As variantes assinaladas a cinzento foram detetadas anteriormente pela sequenciação por DNA Bead Array e confirmadas por NGS

## 5. Discussão

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que os primers desenhados especificamente para as regiões exônicas de interesse dos genes incluídos neste painel e testados através da técnica de Multiplex, cumpriram todos os requisitos e funcionaram de forma eficaz, uma vez que se obteve amplificação para todas as amostras. A sequenciação de NGS do painel de genes construído, permitiu verificar a elevada qualidade do alinhamento, e a boa cobertura da região alvo e a respetiva profundidade demonstrando o sucesso da solução desenhada. Assim, os requisitos exigidos para a sequenciação do painel de trombofilias foram conseguidos de forma eficaz, pelo que este método poderá ser aplicado na rotina de amplificação, sequenciação e análise destes genes por parte do laboratório.

Embora as trombofilias, geralmente, resultem da interação de um conjunto de fatores genéticos e/ou adquiridos, a identificação da suscetibilidade genética em indivíduos pode ser fundamental na prevenção de eventos trombóticos. Os resultados apresentados revelam que muitos pacientes são portadores de diversas variantes genéticas em diferentes genes, refletindo o caráter poligénico associado às trombofilias.

A maioria das variantes de risco identificadas nos genes avaliados são reconhecidas como fatores de risco em condições como aterosclerose, TV, AVC, e complicações associadas a gravidez/fertilidade. Estes achados reforçam a relevância clínica das variantes detetadas no contexto das trombofilias.

Quando combinados, muitos dos fatores de risco interagem de uma forma sinérgica. De seguida, e tendo em conta os dados apresentados na literatura, perceber-se-á como as variantes detetadas contribuem para o aumento do risco de eventos trombóticos e, como estas se alinham com o quadro clínico apresentado pelos pacientes.

Alterações sanguíneas que originem um estado de hipercoagulabilidade, ou seja, as trombofilias podem comprometer o processo de implantação embrionária (71). Os fatores biológicos de trombofilia são definidos pela presença de uma ou mais anomalias permanentes da hemostasia, hereditária ou adquirida, que originam um estado de hipercoagulabilidade (71,72). Dentre estes fatores, destacam-se a presença do fator V de Leiden, uma mutação no gene da enzima metileno tetrahidrofolato redutase, ambas as mutações foram detetadas no indivíduo A1 (71,72).

O conjunto de alelos, C677T e A1298C, estão associados a alterações na enzima MTHFR, resultando em níveis reduzidos da mesma, aumentando o risco de trombose, contudo estas alterações na enzima também pode interferir com o metabolismo do folato, que desempenha um papel essencial na formação e desenvolvimento do embrião (50,72). A deficiência do folato pode prejudicar a implantação do embrião no útero e reduzir as chances de uma gravidez bem sucedida (50,72). O mesmo se verifica para o *MTRR* que está igualmente envolvido no metabolismo do folato e a variante C.66A>G tem sido igualmente associada a problemas de fertilidade (73).

A mutação no *F5* é também associada a um aumento do risco de trombose e, pode afetar também a fertilidade (74). Esta variante detetada em homozigotia está associada a um maior risco de ocorrência de trombose venosa (10). A trombose em vasos sanguíneos uterinos pode originar problemas de implantação do embrião no endométrio (local onde o embrião se fixa para o desenvolvimento da gravidez), problemas de circulação inadequada de nutrientes e sangue para o feto, o que poderá resultar num crescimento intrauterino inadequado ou até mesmo perda fetal (74).

A variante c.388T>C detetada em heterozigotia no gene *APOE* está associada a uma condição de origem genética, denominado, hiperlipoproteinemia, capaz de afetar a fertilidade de várias maneiras (75). Níveis elevados de lípidos no sangue podem afetar o equilíbrio hormonal, interferindo no ciclo menstrual e na ovulação regular (75). Isso pode levar a ciclos menstruais irregulares ou anovulatórios, onde a libertação do óvulo não ocorre, reduzindo assim as chances de gravidez. Danos oxidativos nas células dos ovários podem também resultar de níveis elevados de lípidos, levando a anomalias cromossômicas nos óvulos que podem resultar em falhas de fertilização, prejudicar o desenvolvimento embrionário e um maior risco de aborto (75).

Todas as variantes referidas foram detetadas no indivíduo A1, o que vem corroborar o fenótipo de infertilidade associado.

O indivíduo A2 apresenta uma informação clínica de síndrome de HELLP, que pode ocorrer durante a gravidez, principalmente no terceiro trimestre (76). Esta síndrome é considerada uma complicação da pré-eclâmpsia, uma condição caracterizada por pressão arterial alta, presença de proteína na urina e disfunção de órgãos (76). A pré-eclâmpsia também pode estar relacionada a mudanças no sistema de coagulação e aumentar o risco de trombose (77). Algumas mulheres podem ter predisposição genética para trombofilias, o que pode aumentar

ainda mais o risco de complicações trombóticas durante a síndrome de HELLP (77). Quando uma mulher desenvolve esta síndrome e necessita de realizar uma cesariana prematura, especialmente antes das 34 semanas de gestação, como é o caso desta paciente, pode haver uma maior preocupação com o risco de trombofilias (77). Isto acontece devido ao estado de hipercoagulabilidade associado à gravidez, ou seja, um estado em que há uma maior tendência à formação de coágulos sanguíneos (69). Atualmente sabemos que as variantes genéticas associadas a este síndrome são as mutações em genes relacionados à coagulação, como o fator V de Leiden em homozigotia, associada a um maior risco de trombose venosa, e a protrombina em heterozigotia que confere um risco acrescido de 3 a 4x de TEV, ambos os alelos foram detetados (10,40). Um outro estudo demonstrou que a variante c.313A>G do gene *GSTP1* pode influenciar a hipertensão na gravidez juntamente com outros fatores de atuação de forma independente e/ou sinérgica (78). Nesse estudo, foi ainda relatado que mulheres portadoras da variante c.803T>C no gene *AGT* tinham um risco elevado de pré-eclâmpsia, uma vez que a expressão local de *AGT* é elevada na remodelação das artérias espirais (cruciais para manter o fornecimento adequado de oxigénio e nutrientes para o embrião ou feto em crescimento, qualquer disfunção pode estar associada a complicações durante a gravidez como a pré-eclâmpsia) das mulheres que carregam este alelo (78).

Todas as variantes detetadas contribuem e corroboram o fenótipo apresentado pelo indivíduo A2.

Um outro estudo realizado demonstrou que as variantes *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G influenciam mais fortemente a incidência da deficiência em folato, sendo que esta deficiência é um fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares (79). Posto isto, e sabendo que as doenças cardiovasculares são um contributo muito forte para o desenvolvimento de trombooses principalmente devido às alterações que estas produzem a nível do sistema vascular e na coagulação sanguínea, é de esperar que alguém que apresente estas variantes anteriormente descritas apresente uma tendência maior para TVP (13). A paciente A3 apresenta todas as variantes descritas em cima, conjuntamente com outras que contribuem para o aumento do risco de TVP, como já referido anteriormente, a mutação em homozigotia G1601A no gene *F5* e a C677T no *MTHFR* (1,11). De notar também a mutação c.388T>C em heterozigotia detetada para o *APOE*, que está associada a níveis moderadamente elevados de colesterol LDL no sangue (80). O LDL é frequentemente chamado de "mau colesterol", pois altos níveis desse lípido estão associados a um maior risco

do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo a formação de placas nas artérias e o desenvolvimento de trombose (80). Contudo, diversos estudos têm demonstrado que o alelo c.103G>T em heterozigotia no *F13A1* tem um efeito protetor para trombofilias (81). Portanto, de acordo com a influência que muitas destas variantes apresentam na ocorrência de um evento trombótico, é provável que esta paciente tendo em conta as variantes detetadas, apresente risco de ocorrência de um episódio de TVP.

Como mencionado anteriormente, mutações genéticas detetadas no *MTHFR* (C677T e A1298C), são ambas correlacionadas com alterações na atividade do *MTHFR*, nomeadamente a redução da formação de 5-MTHF, sendo assim limitada a conversão de homocisteína em metionina, o que leva à sua acumulação no sangue (hiperhomocisteinemia). A deteção destas variantes em heterozigotia está associada a um aumento do risco de trombose venosa. O mesmo se verifica para a mutação G1601A em homozigotia detetada no gene *F5*, os portadores desta variante estão propensos a desenvolver hipercoagulabilidade, que pode manifestar-se como episódios de TEV. Os indivíduos portadores podem ter um risco de 50 a 100 vezes maior de desenvolver um evento trombótico ao longo da vida (10,11). Indivíduos que apresentam ambos os alelos têm um risco ainda mais alta de trombose venosa (82). A mutação c.66A>G no gene *MTRR* tem sido descrita como um fator de risco para hiperhomocisteinemia, o que consequentemente contribui para um aumento do risco de ocorrência de TVP (83).

Uma outra mutação detetada foi a variante c.313A>G no *GSTP1*, um estudo realizado demonstrou que esta variante está associada a um rápido declínio da função pulmonar em indivíduos que apresentam diferentes graus de comprometimento pulmonar (84). Outros estudos demonstram também uma possível associação entre esta variante e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), e embora sejam condições diferentes os efeitos produzidos por ambos podem indiretamente estar associados. Contudo, os resultados dos estudos apresentados na literatura permanecem controversos (85). De acordo com os dados apresentados e, sabendo que o TEV compreende dois eventos clínicos principais relacionados: TVP e o EP, não se pode excluir da hipótese a ocorrência de TVP ou HTP pulmonar no paciente A4, que já apresentou um episódio de tromboembolismo pulmonar e o seu genótipo conta com todas as variantes descritas até ao momento.

O indivíduo A5 apresenta uma informação clínica onde é reportada trombose dos seios venosos, uma condição complexa e multifatorial que envolve a formação de coágulos

sanguíneos nas veias cerebrais. Vários estudos têm demonstrado o aumento do risco de trombose venosa cerebral na presença de hiperhomocisteinemia o risco de trombose venosa cerebral aumenta em 4 vezes (86). Como se pode observar na tabela 6, neste indivíduo foram detetadas variantes associadas à hiperhomocisteinemia como é o caso da mutação c.1298A>C detetada em homozigotia para o gene *MTHFR* e a c.66A>G em heterozigotia para o *MTRR*, o que conseqüentemente confere um aumento do risco de trombose venosa cerebral que corrobora a informação clínica desta paciente. Vários estudos têm demonstrado que a presença de hiperhomocisteinemia concomitantemente com a toma de ACO, aumenta o risco de trombose venosa cerebral. Tendo em conta que a paciente é do sexo feminino, não é conhecido mas não se pode descartar a probabilidade de toma dos mesmos (87). Contudo, e sendo o AVC uma condição multifatorial foram detetadas outras variantes que podem apresentar um efeito cumulativo no risco de trombose e subseqüentemente na trombose venosa cerebral. Por exemplo, foi detetada em homozigotia no gene *F5* a variante c.1601G>A que aumenta o risco de ocorrência de TV, incluindo TVC. Já a variante detetada no *SERPINE1* em níveis elevados contribui para o desenvolvimento de oclusões venosas (88), o que aumenta a predisposição para trombofilias. Todas as variantes referidas em cima, podem contribuir e corroborar o fenótipo apresentado pela paciente.

As variantes C526T e T388C do *APOE* têm sido relacionadas a níveis anormais de lípidos no sangue, caracterização denominada de dislipidemia e a risco cardiovascular (89). Esta condição pode levar a uma acumulação de placas nas artérias que podem contribuir para o risco de AVC. O AVC é uma condição multifatorial, influenciada pela combinação de fatores genéticos e ambientais. Como já referimos anteriormente, há mutações em genes que afetam a coagulação sanguínea e aumentam o risco de formação de coágulos e, conseqüentemente de AVC como as variantes detetadas para *F5*, *MTR* e *MTRR*. Já a variante detetada para o *F13A1* em heterozigotia apresenta um efeito protetor para trombofilia, assim como a variante c.677C>T isolada e em heterozigotia no *MTHFR* não apresenta um risco acrescido, uma vez que embora essa mutação prejudique a regulação da homocisteína, acredita-se que níveis adequados de folato anulem esse efeito (90).

A hipertensão está associada a acidentes vasculares cerebrais e doenças cardiovasculares, sendo problemas bastantes comuns associados a elevadas taxas de morbidade e mortalidade (91). Muitos estudos têm sugerido que a hipertensão resulta de um conjunto de interações onde o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) pode desempenhar um

papel crucial na regulação da pressão arterial e na patogênese da hipertensão (92). Polimorfismos genéticos nos genes *SRA*, como o *AGT* e *AGTR1*, têm sido estudados como fatores genéticos envolvidos na hipertensão (93). Assim, compreende-se que existe uma interconexão entre todas estas condições e que, certas variantes genéticas podem aumentar o risco de desenvolver tanto hipertensão quanto distúrbios lipídicos, o que, por sua vez, pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares e subsequentemente, TVP e AVC. Estas variantes foram todas detetadas na paciente A6, o que suporta o fenótipo apresentado.

O fenótipo de resistência à PCa está associada a uma única mutação pontual no gene do fator V (G1601A), onde ocorre a síntese de uma molécula do *FV* que não foi devidamente inativada pela PCa (94). A presença do *FVL* e subsequentemente, de resistência à PCa aumenta muito o risco de eventos trombóticos venosos. Tal impacto foi demonstrado num estudo que revelou risco de quase 7 vezes maior de trombose venosa (95). No *F5* foi ainda detetada em heterozigotia a variante c.3980A>G, que está também relacionada com a resistência à PCa, tendo sido esta variante detetada num indivíduo com trombofilias devido à resistência à PCa onde identificaram a mesma mutação em heterozigotia (96). Contudo, tendo em conta o elevado risco associado a este fenótipo é importante realçar o efeito aditivo que outras variantes apresentam no risco de ocorrência de um evento trombótico, como é o caso das variantes detetadas para o gene *MTRR*, *MTR* e *AGT*. Tendo em conta as variantes detetadas no indivíduo A7, estas corroboram a informação clínica apresentada.

No indivíduo A8 foi detetada em homozigotia a variante G1601A no *F5* associada a um risco aumentado de ocorrência de trombose venosa e a c.103G>T no *F13A1* que apresenta um efeito protetor para trombofilias. O mesmo se verifica para a variante c.1298A>C em heterozigotia no *MTHFR* que isolada e em heterozigotia não apresenta um risco de hiperhomocisteinemia e consequentemente de aumento do risco de trombose (97). Contudo foram detetadas outras variantes que têm influência no risco trombótico como a variante detetada no *MTRR*, que contribui para um aumento do risco de ocorrer um evento trombótico, assim como a mutação no *APOE*, associada a um distúrbio que resulta em níveis moderadamente elevados de colesterol LDL no sangue, associado a um maior risco de doenças cardiovasculares, incluindo a formação de placas nas artérias e o desenvolvimento de trombose. De notar também a deteção de variantes nos genes *AGT* e *AGTR1* associada a uma maior predisposição para a hipertensão, associada a um risco aumentado de trombofilia. Estas variantes afetam a função do recetor tipo 1 da angiotensina II, interferindo na regulação do *SRAA*, o que pode levar a

alterações na coagulação sanguínea e aumentar a tendência para a formação de coágulos anormais (93). De acordo com as variantes detetadas, percebe-se a importância da realização do rastreio de trombofilias neste paciente que apresenta várias variantes que podem culminar num evento trombótico que possa comprometer a vida.

No indivíduo A9, foram detetadas variantes que podem contribuir de forma significativa para a ocorrência de eventos trombóticos. Como já referido anteriormente, o conjunto de alelos C677T e A1298C detetados em heterozigotia no *MTHFR* estão associados a uma diminuição da atividade da *MTHFR* que culmina numa acumulação de homocisteína no sangue (hiperhomocisteinemia), o que resulta em um aumento do risco de trombose venosa. A mutação c.66A>G no gene *MTRR* está associada a uma alteração na função da enzima *MTRR* que afeta indiretamente o metabolismo do folato e o nível de homocisteína no sangue, o que aumenta o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares e subsequentemente de TV (83). A mutação C1601A no *F5* quando detetada em homozigotia está associada a um risco de 50 a 100 vezes maior de desenvolver algum evento trombótico. Com a detecção das variantes acima descritas, torna-se novamente evidente a importância da realização do rastreio de trombofilias.

Para o indivíduo A10 foram detetadas em heterozigotia as variantes nos genes *AGT* e *AGTR1* associadas a hipertensão, estas alterações podem levar a alterações na coagulação sanguínea e a um aumento na tendência de formar coágulos e, conseqüentemente, aumentar o risco de trombose venosa. A variante C677T detetada em homozigotia está associada a uma diminuição da atividade da *MTHFR* o que leva ao distúrbio da hiperhomocisteinemia e, conseqüentemente a um aumento do risco de 1,5x de ocorrência de TV. Um estudo demonstrou que a variante c.388T>C detetada para o *APOE* parece conferir um maior risco de doença cardíaca isquémica prematura nomeadamente nos homens (o paciente é do sexo M), sendo que os indivíduos homozigóticos têm um risco de ocorrência numa idade ainda mais jovem (98). Mais uma vez, a importância do rastreio é realçada.

Posto isto, a utilização de um painel direcionado sequenciado por NGS para o rastreio de trombofilias representa uma ferramenta valiosa para a melhoria da saúde pública e a qualidade de vida de pacientes suscetíveis a eventos trombóticos. A abordagem por NGS escolhida, possibilita a identificação de variantes genéticas específicas associadas a um aumento no risco de trombose, viabilizando identificar precocemente indivíduos em risco, bem como intervenções preventivas antes da ocorrência de um evento trombótico. Assim, tal rastreio não

auxilia apenas indivíduos com suscetibilidade genética, como também oferece benefícios a pacientes que já sofreram algum episódio trombótico, nomeadamente quando o episódio surge num contexto em que não há fatores de risco evidentes. O conhecimento das variantes permite personalizar tratamentos, incluindo a seleção de anticoagulantes adequados, ajustes de dosagem e duração, diminuindo os eventos trombóticos e as suas graves consequências como AVC e TEP.

A abordagem por NGS também enriquece a compreensão das bases genéticas das trombofilias e a sua interação com fatores de risco como o estilo de vida e a toma de medicação, possibilitando avanços na pesquisa e desenvolvimento de terapias inovadoras. O rastreio em larga escala gera dados cruciais para o conhecimento científico, impulsionando descobertas relativas aos mecanismos subjacentes às trombozes e conduzindo ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

## **6. Conclusão**

Em conclusão, os resultados revelam que sequenciação do painel de NGS desenvolvido para as trombofilias cumpre os critérios de qualidade definidos, permitindo que este método seja implementado de forma eficiente na rotina de amplificação, sequenciação e análise deste painel no laboratório.

Este teste será útil para a prevenção e/ou diminuição da ocorrência de eventos trombóticos que possam levar ao comprometimento da vida.

Como perspectiva futura, será importante manter o painel atualizado em relação às regiões de interesse sequenciadas, sendo ajustado à medida que vá surgindo evidência científica sobre o tema.

No futuro, seria interessante validar um kit de colheita dedicado ao uso de zaragatoas bocais para o rastreio de trombofilias. Esta abordagem simplificaria a expansão do rastreio e tornaria a colheita mais acessível. Assim, seria mais fácil compreender a propensão dos indivíduos para o acontecimento de algum evento trombótico, facilitando o desenvolvimento de estratégias de prevenção eficazes.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Silva A.S., Brazão M.L., Granito S., Escórcio S., Jardim M., Silva S., Andrade J.L., Vieira R. Teixeira C., Freitas D., Araújo J.N. Distúrbios pró-trombóticos/Trombofilias. 2010;17(1):49–64.
2. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326–36.
3. Soria JM, Morange PE, Vila J, Souto JC, Moyano M, Trégouët DA, et al. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment. *J Am Heart Assoc.* 23 de outubro de 2014;3(5):e001060.
4. Fonseca G.S., Amaro M. Thrombophilias: the importance of clinical screening in thromboembolic disease. 2008;15(4):284–90.
5. März W, Nauck M, Wieland H. The molecular mechanisms of inherited thrombophilia. *Z Kardiol.* julho de 2000;89(7):575–86.
6. Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol.* abril de 2007;44(2):62–9.
7. Araújo F, Santos A, Araújo V, Henriques I, Monteiro F, Meireles E, et al. Genetic risk factors in acute coronary disease. *Haemostasis.* 1999;29(4):212–8.
8. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 7 de novembro de 2011;17(11):1423–36.
9. Ginsburg D. Genetic risk factors for arterial thrombosis and inflammation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005;442–4.
10. Himabindu G, Rajasekhar D, Latheef K, Sarma PVGK, Vanajakshamma V, Chaudhury A, et al. Factor V Leiden mutation is not a predisposing factor for acute coronary syndromes. *Indian Heart J.* 2012;64(6):570–5.
11. Siegerink B, Maino A, Algra A, Rosendaal FR. Hypercoagulability and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke in young women. *J Thromb Haemost.* setembro de 2015;13(9):1568–75.
12. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus.* abril de 2011;9(2):120–38.
13. Sambola A, Fuster V, Badimon JJ. [Role of coronary risk factors in blood thrombogenicity and acute coronary syndromes]. *Rev Esp Cardiol.* outubro de 2003;56(10):1001–9.

14. Widimský P., Kožnar B., Vaško P. Acute myocardial infarction and acute stroke: What are the differences? Focus on reperfusion therapy. *april de 2013*;55(2):e111–6.
15. Parpugga TK, Tatarunas V, Skipskis V, Kupstyte N, Zaliaduonyte-Peksiene D, Lesauskaite V. The Effect of PAI-1 4G/5G Polymorphism and Clinical Factors on Coronary Artery Occlusion in Myocardial Infarction. *Dis Markers*. 2015;2015:260101.
16. Gregson J, Kaptoge S, Bolton T, Pennells L, Willeit P, Burgess S, et al. Cardiovascular Risk Factors Associated With Venous Thromboembolism. *JAMA Cardiol*. 1 de fevereiro de 2019;4(2):163–73.
17. Cunha MLR, Meijers JCM, Rosendaal FR, Vlieg A van H, Reitsma PH, Middeldorp S. Whole exome sequencing in thrombophilic pedigrees to identify genetic risk factors for venous thromboembolism. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187699.
18. Troy GC. An overview of hemostasis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. janeiro de 1988;18(1):5–20.
19. Smith J.W., Day T.K., Mackin A. Diagnosing bleeding disorders. 2005;828–43.
20. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 28 de agosto de 2008;359(9):938–49.
21. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Favaloro EJ. Inherited disorders of blood coagulation. *Ann Med*. agosto de 2012;44(5):405–18.
22. Sacher RA. Thrombophilia: a genetic predisposition to thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1999;110:51–60; discussion 60-61.
23. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest*. julho de 2012;122(7):2331–6.
24. Weinmann EE, Salzman EW. Deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*. 15 de dezembro de 1994;331(24):1630–41.
25. Bockenstedt PL. Management of hereditary hypercoagulable disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;444–9.
26. Bhakuni T, Sharma A, Rashid Q, Kapil C, Saxena R, Mahapatra M, et al. Antithrombin III deficiency in Indian patients with deep vein thrombosis: identification of first India based AT variants including a novel point mutation (T280A) that leads to aggregation. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121889.
27. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJM, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA*. 19 de março de 2008;299(11):1306–14.

28. Asghar M, Kabita S, Kalla L, Murry B, Saraswathy KN. Prevalence of MTHFR, Factor V, ACE and APOE gene polymorphisms among Muslims of Manipur, India. *Ann Hum Biol.* janeiro de 2013;40(1):83–7.
29. Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, Gonzalez-Conejero R, Ordonez A, Gonzalez-Porras JR, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 15 de maio de 2007;109(10):4258–63.
30. Franco RF. Trombofilias hereditárias. *Medicina (Ribeirão Preto).* 30 de dezembro de 2001;34(3/4):248–57.
31. Mulder R, Croles FN, Mulder AB, Huntington JA, Meijer K, Lukens MV. SERPINC1 gene mutations in antithrombin deficiency. *Br J Haematol.* julho de 2017;178(2):279–85.
32. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, Spannagl M, Krause M, Miesbach W, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost.* abril de 2011;105(4):635–46.
33. Águila S, Martínez-Martínez I, Collado M, Llamas P, Antón AI, Martínez-Redondo C, et al. Compound heterozygosity involving Antithrombin Cambridge II (p.Ala416Ser) in antithrombin deficiency. *Thromb Haemost.* março de 2013;109(3):556–8.
34. Dahlbäck B. Advances in Understanding Mechanisms of Thrombophilic Disorders. *Hamostaseologie.* fevereiro de 2020;40(01):012–21.
35. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med.* 19 de abril de 2001;344(16):1222–31.
36. Thomas RH. Hypercoagulability syndromes. *Arch Intern Med.* 12 de novembro de 2001;161(20):2433–9.
37. Jadaon MM. Epidemiology of activated protein C resistance and factor v leiden mutation in the mediterranean region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011;3(1):e2011037.
38. Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27(2):362–7.
39. Moussaoui S, Saussoy P, Ambroise J, Defour JP, Zouitene R, Sifi K, et al. Genetic Risk Factors of Venous Thromboembolism in the East Algerian Population. *Clin Appl Thromb Hemost.* março de 2017;23(2):105–15.
40. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 15 de novembro de 1996;88(10):3698–703.

41. Li C, Ren H, Chen H, Song J, Li S, Lee C, et al. Prothrombin G20210A (rs1799963) polymorphism increases myocardial infarction risk in an age-related manner: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 19 de outubro de 2017;7(1):13550.
42. Giordano P, De Lucia D, Coppola B, Iolascon A. Homozygous prothrombin gene mutation and ischemic cerebrovascular disease: a case report. *Acta Haematol.* 1999;102(2):101–3.
43. Price BR, Wilcock DM, Weekman EM. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:350.
44. Clément A, Menezo Y, Cohen M, Cornet D, Clément P. 5-Methyltetrahydrofolate reduces blood homocysteine level significantly in C677T methyltetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphism carriers consulting for infertility. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* janeiro de 2020;49(1):101622.
45. Anderson JAM, Weitz JI. Hypercoagulable states. *Clin Chest Med.* dezembro de 2010;31(4):659–73.
46. Tinelli C, Di Pino A, Ficulle E, Marcelli S, Feligioni M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. *Front Nutr.* 2019;6:49.
47. Nefic H, Mackic-Djurovic M, Eminovic I. The Frequency of the 677C>T and 1298A>C Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in the Population. *Med Arch.* junho de 2018;72(3):164–9.
48. Wolski H, Kocięcka M, Mrozikiewicz AE, Barlik M, Kurzawińska G. Coexistence of the 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms and its significance in the population of Polish women. *Ginekol Pol.* outubro de 2015;86(10):742–7.
49. Merviel P, Cabry R, Lourdel E, Lanta S, Amant C, Copin H, et al. Comparison of two preventive treatments for patients with recurrent miscarriages carrying a C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation: 5-year experience. *J Int Med Res.* dezembro de 2017;45(6):1720–30.
50. Servy EJ, Jacquesson-Fournols L, Cohen M, Menezo YJR. MTHFR isoform carriers. 5-MTHF (5-methyl tetrahydrofolate) vs folic acid: a key to pregnancy outcome: a case series. *J Assist Reprod Genet.* agosto de 2018;35(8):1431–5.
51. Prabhudesai A, Shetty S, Ghosh K, Kulkarni B. Investigation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism in Indian venous thrombosis patients: A case-control study. *Eur J Haematol.* setembro de 2017;99(3):249–54.

52. Huq MA, Takeyama N, Harada M, Miki Y, Takeuchi A, Inoue S, et al. 4G/5G Polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with multiple organ dysfunction in critically ill patients. *Acta Haematol.* 2012;127(2):72–80.
53. Huang Z, Tang W, Liang Z, Chen Q, Li M, Li Y, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Polymorphism Confers a Genetic Contribution to the Risk of Recurrent Spontaneous Abortion: An Updated Meta-Analysis. *Reprod Sci.* novembro de 2017;24(11):1551–60.
54. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 15 de junho de 2000;342(24):1792–801.
55. Song C, Burgess S, Eicher JD, O'Donnell CJ, Johnson AD. Causal Effect of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 on Coronary Heart Disease. *J Am Heart Assoc.* 26 de maio de 2017;6(6):e004918.
56. Liu Y, Cheng J, Guo X, Mo J, Gao B, Zhou H, et al. The roles of PAI-1 gene polymorphisms in atherosclerotic diseases: A systematic review and meta-analysis involving 149,908 subjects. *Gene.* 5 de outubro de 2018;673:167–73.
57. Akhter MS, Biswas A, Abdullah SM, Behari M, Saxena R. The Role of PAI-1 4G/5G Promoter Polymorphism and Its Levels in the Development of Ischemic Stroke in Young Indian Population. *Clin Appl Thromb Hemost.* novembro de 2017;23(8):1071–6.
58. Ruiz-Quezada S, Vázquez-Del Mercado M, Parra-Rojas I, Rangel-Villalobos H, Best-Aguilera C, Sánchez-Orozco LV, et al. Genotype and allele frequency of PAI-1 promoter polymorphism in healthy subjects from the west of Mexico. Association with biochemical and hematological parameters. *Ann Genet.* 2004;47(2):155–62.
59. Komsa-Penkova R, Golemanov G, Tsankov B, Ivanov P, Beshev L, Tonchev P. Rs5918ITGB3 Polymorphism, Smoking, and BMI as Risk Factors for Early Onset and Recurrence of DVT in Young Women. *Clin Appl Thromb Hemost.* setembro de 2017;23(6):585–95.
60. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. Am J Hum Genet.* dezembro de 2000;67(6):1452–9.
61. Elkhalifa AM. Effects of cigarette smoking on coagulation screening tests and platelet counts in a Sudanese male adults population. *Saudi Med J.* setembro de 2018;39(9):897–901.

62. Yang D, Iyer S, Gardener H, Della-Morte D, Crisby M, Dong C, et al. Cigarette Smoking and Carotid Plaque Echodensity in the Northern Manhattan Study. *Cerebrovasc Dis.* 2015;40(3–4):136–43.
63. Cheng YJ, Liu ZH, Yao FJ, Zeng WT, Zheng DD, Dong YG, et al. Current and former smoking and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2013;10(9):e1001515.
64. Croles FN, Nasserinejad K, Duvekot JJ, Kruip MJ, Meijer K, Leebeek FW. Pregnancy, thrombophilia, and the risk of a first venous thrombosis: systematic review and bayesian meta-analysis. *BMJ.* 26 de outubro de 2017;359:j4452.
65. Baumann K, Beuter-Winkler P, Hackethal A, Strowitzki T, Toth B, Bohlmann MK. Maternal factor V Leiden and prothrombin mutations do not seem to contribute to the occurrence of two or more than two consecutive miscarriages in Caucasian patients. *Am J Reprod Immunol.* dezembro de 2013;70(6):518–21.
66. Stewart M, Black K. Choosing a combined oral contraceptive pill. *Aust Prescr.* fevereiro de 2015;38(1):6–11.
67. Brito MB, Nobre F, Vieira CS. Contraceção hormonal e sistema cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* abril de 2011;96(4):e81–9.
68. Sacco S, Merki-Feld GS, Ægidius KL, Bitzer J, Canonico M, Kurth T, et al. Hormonal contraceptives and risk of ischemic stroke in women with migraine: a consensus statement from the European Headache Federation (EHF) and the European Society of Contraception and Reproductive Health (ESC). *J Headache Pain.* 30 de outubro de 2017;18(1):108.
69. Doyle NM, Monga M. Thromboembolic disease in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* junho de 2004;31(2):319–44, vi.
70. Margetic S. Diagnostic algorithm for thrombophilia screening. *Clin Chem Lab Med.* dezembro de 2010;48 Suppl 1:S27-39.
71. Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checola MG, Cittadini E, Margaglione M. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. *Fertility and Sterility.* julho de 2001;76(1):201–2.
72. Altmäe S, Stavreus-Evers A, Ruiz JR, Laanpere M, Syvänen T, Yngve A, et al. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertility and Sterility.* junho de 2010;94(1):130–7.
73. Zhang Y, Zhan W, Du Q, Wu L, Ding H, Liu F, et al. Variants c.677 C>T, c.1298 A>C in *MTHFR* , and c.66 A>G in *MTRR* Affect the Occurrence of Recurrent Pregnancy

Loss in Chinese Women. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 1 de novembro de 2020;24(11):717–22.

74. Ehrenforth S, Nemes L, Mannhalter C, Rosendaal FR, Koder S, Zoghalmi-Rintelen C, et al. Impact of environmental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V:G1691A. *J Thromb Haemost*. março de 2004;2(3):430–6.

75. Descamps OS, Bruniaux M, Guilmot PF, Tonglet R, Heller FR. Lipoprotein metabolism of pregnant women is associated with both their genetic polymorphisms and those of their newborn children. *J Lipid Res*. novembro de 2005;46(11):2405–14.

76. Brazão M.L., Silva A.S., Gaspar J., Barros C., Pereira H., Araújo J.N. Trombofilias e perdas embriofetais. dezembro de 2010;17(4):213–21.

77. Figueiró-Filho EA, Oliveira VMD, Coelho LR, Breda I. Marcadores séricos de trombofilias hereditárias e anticorpos antifosfolípidos em gestantes com antecedentes de pré-eclâmpsia grave. *Rev Bras Ginecol Obstet*. janeiro de 2012;34(1):40–6.

78. Ohta K, Kobashi G, Hata A, Yamada H, Minakami H, Fujimoto S, et al. Association between a variant of the glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) and hypertension in pregnancy in Japanese: interaction with parity, age, and genetic factors. *Semin Thromb Hemost*. dezembro de 2003;29(6):653–9.

79. Li WX, Dai SX, Zheng JJ, Liu JQ, Huang JF. Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. *Nutrients*. 10 de agosto de 2015;7(8):6670–87.

80. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2013;101(4):01–22.

81. Ašić A, Salazar R, Storm N, Doğan S, Höppner W, Marjanović D, et al. Population study of thrombophilic markers and pharmacogenetic markers of warfarin prevalence in Bosnia and Herzegovina. *Croat Med J*. 13 de junho de 2019;60(3):212–20.

82. Keijzer M, Den Heijer M, Blom H, Bos G, Willems H, Gerrits W, et al. Interaction Between Hyperhomocysteinemia, Mutated Methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) and Inherited Thrombophilic Factors in Recurrent Venous Thrombosis. *Thromb Haemost*. 2002;88(11):723–8.

83. Gaughan DJ, Kluijtmans LAJ, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic

- determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis*. agosto de 2001;157(2):451–6.
84. He JQ, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. Glutathione S-transferase variants and their interaction with smoking on lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de agosto de 2004;170(4):388–94.
85. Yang L, Li X, Tong X, Fan H. Association between glutathione S-transferase P1 Ile (105) Val gene polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis based on seventeen case-control studies. *Meta Gene*. dezembro de 2015;6:59–64.
86. Martinelli I, Battaglioli T, Pedotti P, Cattaneo M, Mannucci PM. Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis. *Blood*. 15 de agosto de 2003;102(4):1363–6.
87. Christo PP, Carvalho GMD, Gomes Neto AP. Trombose de seios venosos cerebrais: Estudo de 15 casos e revisão de literatura. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(3):288–92.
88. Erickson LA, Fici GJ, Lund JE, Boyle TP, Polites HG, Marotti KR. Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Nature*. 5 de julho de 1990;346(6279):74–6.
89. Cano-Corres R, Candás-Estébanez B, Padró-Miquel A, Fanlo-Maresma M, Pintó X, Alía-Ramos P. Influence of 6 genetic variants on the efficacy of statins in patients with dyslipidemia. *J Clin Lab Anal*. outubro de 2018;32(8):e22566.
90. Miyaki K. Genetic polymorphisms in homocysteine metabolism and response to folate intake: a comprehensive strategy to elucidate useful genetic information. *J Epidemiol*. 2010;20(4):266–70.
91. Lawes CMM, Vander Hoorn S, Rodgers A, International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*. 3 de maio de 2008;371(9623):1513–8.
92. Williams SS. Advances in genetic hypertension. *Curr Opin Pediatr*. abril de 2007;19(2):192–8.
93. Thiel B, Weder AB. Genes for Essential Hypertension: Hype, Help, or Hope? *J Clin Hypertens (Greenwich)*. maio de 2000;2(3):187–93.
94. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 5 de maio de 1994;369(6475):64–7.
95. Adam M.P., Mirzaa G.M., Pagon R.A., et al., editors. *Factor V Leiden Thrombophilia*. University of Washington, Seattle; 1993.

96. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*. 15 de fevereiro de 1998;91(4):1140–4.
97. Dean L. Metylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. Em *National Center for Biotechnology Information (US)*; 2012.
98. van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity in young men with coronary heart disease. *Lancet*. 10 de outubro de 1992;340(8824):879–80.
99. Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases. *Pharmacol Rev*. julho de 2018;70(3):526–48.