



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANNA VIRGÍNIA CALAZANS ROMANO

"VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS A TROMBOSE VENOSA: REPLICAÇÃO
EM UM ESTUDO MULTICÊNTRICO BRASILEIRO"

*"GENE VARIANTS ASSOCIATED WITH VENOUS THROMBOSIS: A REPLICATION
STUDY IN A MULTICENTER BRAZILIAN STUDY"*

CAMPINAS

2019

ANNA VIRGÍNIA CALAZANS ROMANO

"VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS À TROMBOSE VENOSA: REPLICAÇÃO
EM UM ESTUDO MULTICÊNTRICO BRASILEIRO"

*"GENE VARIANTS ASSOCIATED WITH VENOUS THROMBOSIS: A REPLICATION
STUDY IN A MULTICENTER BRAZILIAN STUDY"*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as as part of the requirements for obtaining the Master's Degree in Science.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANNA VIRGÍNIA CALAZANS ROMANO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R662v Romano, Anna Virgínia Calazans, 1991-
Variantes genéticas associadas à trombose venosa : replicação em um estudo multicêntrico brasileiro / Anna Virgínia Calazans Romano. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Joyce Maria Annichino Bizzacchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Polimorfismo de nucleotídeo único. 2. Tromboembolismo venoso. 3. Estudos de associação genética. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Gene variants associated with venous thrombosis : a replication study in a multicenter brazilian study

Palavras-chave em inglês:

Single nucleotide polymorphism

Venous thromboembolism

Genetic association studies

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichino Bizzacchi [Orientador]

Daniel Dias Ribeiro

Kiara Cristina Senger Zapponi Cerri

Data de defesa: 31-05-2019

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5729-5271>

Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8695105461990650>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANNA VIRGÍNIA CALAZANS ROMANO

ORIENTADORA: JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI**
 - 2. PROF. DR. DANIEL DIAS RIBEIRO**
 - 3. PROFA. DRA. KIARA CRISTINA SANGER ZAPPONI CERRI**
-

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 31/05/2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e a meus pais e avós, por me darem a oportunidade da vida.

A todos os meus familiares e amigos, pelo apoio e por torcerem pela realização desse projeto.

Aos meus amigos de laboratório.

À orientadora Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi, agradeço a oportunidade e por todo o aprendizado ao longo desses anos.

À Dra. Fernanda Orsi pela convivência e auxílio nas análises estatísticas.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação que me ajudaram a chegar até aqui.

À Dra Íscia Lopes Cendes e ao Rodrigo Secolin, do Laboratório de Genética Molecular da FCM/UNICAMP, pela contribuição no presente trabalho.

Aos pacientes e controles, pois sem eles, a realização deste trabalho não seria possível.

Ao centro AMIGOH - parte do Centro de Oncologia e Hematologia do Hospital Israelita Albert Einstein.

À agência financiadora CAPES.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Introdução: O Tromboembolismo Venoso (TEV) é uma doença multifatorial resultante da exacerbação da resposta hemostática normal no sistema vascular venoso. Recentemente foram identificados polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) associados ao risco de TEV, apesar de um baixo grau de significância, em populações européias e americanas.

Objetivos: Replicar SNPs associados ao TEV em um estudo multicêntrico caso-controle brasileiro. Identificar a ocorrência de estratificação na população estudada. Avaliar em um subgrupo de pacientes a correlação entre alguns SNPs e a atividade plasmática de fatores e inibidores da coagulação a eles associados.

Material/Métodos: Foram selecionados pacientes com antecedente de TEV, acompanhados no período de 2009 a 2013, em ambulatórios de trombofilia de 3 centros da região sudeste brasileira (Hemocentro da UNICAMP, Campinas-SP / Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro-RJ / Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo-SP), e controles normais da mesma região geográfica, pareados por idade e sexo. Os critérios de exclusão foram: idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos, história de câncer nos 5 últimos anos, anticorpos antifosfolípidos, doenças renal, hepática, inflamatória ou mieloproliferativa, deficiência de proteínas C e S, antitrombina, homozigose para FV Leiden ou polimorfismo G20210A no gene da protrombina.

Foram avaliados 29 SNPs, previamente associados a risco de TEV em outras populações, e 91 SNPs para análise de estratificação da população. Pela alta miscigenação da população brasileira e falta de estudos prévios, o cálculo do poder amostral foi realizado após a genotipagem. Em uma parcela das amostras do Hemocentro da Unicamp foram quantificados fatores de coagulação (FV, FVIII, FXI, FvW), antitrombina, proteína C e S, para correlação com os SNPs correspondentes.

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando o programa GPOWER v.3.1. A frequência alélica e o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram estimados pelo programa PLINK v.1.07. A análise de associação e *odds ratio* foram estimados por regressão

logística e os resultados foram ajustados para múltiplos testes usando a correção de Bonferroni. A avaliação da similaridade da estrutura genética dos casos e controles foi realizada por meio de uma AMOVA (ARLEQUIN v3.5.1.2 *software*).

Resultados: Neste estudo caso-controle foram incluídos 436 casos e 430 controles, e demonstrou-se que esta amostra apresenta um poder estatístico de detectar associação genética de 79,4%. A AMOVA mostrou que a variabilidade genética entre os grupos foi de 0,0% e em cada grupo foi de 100%. Nenhum dos SNPs mostrou associação com TVP.

Conclusões: Em um estudo multicêntrico caso-controle brasileiro com adequado poder amostral, com elevada variabilidade genética, mas sem estratificação entre os grupos, não houve replicação de SNPs associados ao TEV. A alta miscigenação da população brasileira pode ser responsável por esses resultados, enfatizando a influência da estrutura genética populacional em estudos de associação.

ABSTRACT

Introduction: Venous thromboembolism (VTE) is a multifactorial disease resulting from the exacerbation of the normal hemostatic response in the venous vascular system. Recently, single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with VTE risk have been identified, but with a low degree of significance, in European and American populations.

Objectives: To Replicate SNPs associated with VTE in a multicenter Brazilian case-control study. To identify the occurrence of stratification in the population studied. To evaluate in a subgroup of patients the correlation between some SNPs and the plasmatic activity of coagulation factors and inhibitors associated with them.

Material/Methods: Patients with a history of VTE were selected, followed in the period 2009 to 2013, in thrombophilia outpatient clinics of 3 centers of the southeastern Brazilian region (Blood Center of UNICAMP, Campinas-SP / Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro-RJ / Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo-SP), and normal controls of the same geographic region, paired by age and sex. Exclusion criteria were: age below 18 years and higher than 60 years, history of cancer in the last 5 years, antiphospholipid antibodies, renal disease, hepatic, inflammatory or myeloproliferative, protein C and S deficiency, antithrombin, homozygosity / duple heterozygosity for FV Leiden, or G20210A polymorphism in the prothrombin gene.

We evaluated 29 SNPs, previously associated with VTE risk in other populations, and 91 SNPs for stratification analysis of the population. Due to the high miscigenation of the Brazilian population and lack of previous studies, the calculation of the sample power was performed after genotyping. Coagulation factors (FV, FVIII, FXI, FvW), antithrombin, protein C and S were quantified for correlation with corresponding SNPs in a portion of the Blood Center of Unicamp samples.

The sample size calculation was performed using the GPOWER v. 3.1 software. The allelic frequency and Hardy-Weinberg equilibrium were estimated BY PLINK v. 1.07 software. The analysis of association and odds ratio were estimated by logistic regression and the results were adjusted for multiple tests using Bonferroni correction.

The evaluation of the similarity of the genetic structure of the cases and controls was performed by AMOVA (ARLEQUIN v 3.5.1.2 software).

Results: In this case-control study, 436 cases and 430 controls were included, and it was demonstrated that this sample has a statistical power to detect a genetic association of 79.4%. AMOVA showed that the genetic variability between the groups was 0.0% and, in each group, it was 100%. None of the SNPs showed association with DVT.

Conclusions: In a multicentre Brazilian case-control study with adequate sample power, with high genetic variability but without stratification between groups, there was no replication of SNPs associated with VTE. The high miscegenation of the Brazilian population may be responsible for these results, emphasizing the influence of the population genetic structure in association studies.

Keywords: GWAS, Genetic association Study, TEV, SNP, Single Nucleotide Polymorphism, Venous Thromboembolism, Pulmonary Embolism, Thrombosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares.....	17
Figura 2 – Esquema da cascata da coagulação incluindo os mecanismos reguladores.....	19
Figura 3 – Placa de genotipagem <i>Open Array</i>	41
Figura 4 – Sistema de detecção de polimorfismos.....	42
Figura 5 – Imagem do programa <i>Cloud</i> após a captura da fluorescência de um SNP.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais estudos como base para estudos GWAS.....	29
Tabela 2 – SNPs selecionados.....	40
Tabela S1 – Informações sobre Frequência Alélica e Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> dos 90 SNPs selecionados para o controle genômico.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Siglas em Português

AT	Antitrombina
EP	Embolia Pulmonar
EHW	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
FT	Fator Tecidual
FVa	Fator V da coagulação Ativado
FVIIIa	Fator VII da coagulação Ativado
FIXa	FIX da coagulação Ativado
FXIa	FXI da coagulação Ativado
FV	Fator V da coagulação
FVIII	Fator VIII da coagulação
FXI	Fator XI da coagulação
FvW	Fator de von Willebrand
PC	Proteína C
PS	Proteína S
SAF	Síndrome Antifosfolípide
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEV	Tromboembolismo Venoso

TVP Trombose Venosa Profunda

Siglas em Inglês

DNA *Deoxyribonucleic acid* - Ácido Desoxirribonucleico

DVT *Deep Vein Thrombosis* - Trombose Venosa Profunda

GWAS *Genome Wide Association Study* - Estudos Amplos de Associação Genômica

HWE *Hardy-Weinberg Equilibrium* - Equilíbrio de Hady-Weinberg

LD *Linkage Disequilibrium* - Desequilíbrio de ligação

OR *Odds Ratio*

PCR *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

PE *Pulmonary Embolism* - Embolia Pulmonar

SNP *Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de Nucleotídeo Único

VET *Venous Thromboembolism* - Tromboembolismo Venoso

vWF *von Willebrand Factor* - Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
TROMBOEMBOLISMO VENOSO	17
COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	17
O MODELO DE COAGULAÇÃO BASEADO EM SUPERFÍCIES CELULARES	17
MECANISMOS REGULADORES DA COAGULAÇÃO	19
INCIDÊNCIA DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO	21
FATORES DE RISCO PARA TROMBOEMBOLISMO VENOSO	21
POLIMORFISMOS GENÉTICOS	22
ESTRUTURA POPULACIONAL	23
ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DO GENOMA - GWAS	25
GWAS E TEV	27
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	36
OBJETIVO GERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
PACIENTES E CONTROLES	37
AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES E CONTROLES	38
COLETA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS	38

EXTRAÇÃO DO DNA NO SANGUE PERIFÉRICO	38
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA	39
CONTROLE GENÔMICO PARA AVALIAÇÃO DA ESTRATIFICAÇÃO POPULACIONAL	40
SELEÇÃO DOS SNPs	40
GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS	42
QUANTIFICAÇÃO DE FATORES E INIBIDORES DA COAGULAÇÃO	45
<i>Determinação plasmática do antígeno do FvW (FvW Ag)</i>	46
<i>Determinação da atividade do Fator VIII:C</i>	46
<i>Determinação da atividade do FV</i>	47
<i>Dosagem da atividade do FXI</i>	47
<i>Dosagem de Proteína C</i>	48
<i>Dosagem de Proteína S livre</i>	48
<i>Dosagem de Antitrombina</i>	49
ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
<i>Verificação do padrão de qualidade dos SNPs genotipados</i>	50
<i>Verificação da estruturação populacional dos grupos</i>	50
<i>Cálculo da Regressão Logística Múltipla e Odds Ratio (OR)</i>	50
<i>Correlação de atividade plasmática de fatores e inibidores com SNPs associados</i>	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
GENE VARIANTS ASSOCIATED WITH VENOUS THROMBOSIS: A REPLICATION STUDY IN A MULTICENTER BRAZILIAN STUDY	52
ABSTRACT	53

INTRODUCTION	55
OBJECTIVE	55
METHODS	56
<i>Selection of study participants</i>	56
<i>SNP selection</i>	57
<i>Genotyping</i>	59
<i>Quantification of coagulation factors and inhibitors</i>	59
<i>Statistical analysis</i>	60
RESULTS	61
<i>Study Population</i>	61
<i>Clinical and Demographic Characteristics</i>	62
<i>Stratification Analysis</i>	63
<i>Association Analysis of SNPs with VTE risk</i>	64
<i>Correlation between SNPs and plasma activity of coagulation factors and natural anticoagulants</i>	66
DISCUSSION	66
CONCLUSIONS	70
REFERENCES	70
SUPPORTING MATERIAL	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
7. ANEXOS	86
8. DADOS SUPLEMENTARES	96

1. INTRODUÇÃO

TROMBOEMBOLISMO VENOSO

O Tromboembolismo Venoso (TEV) é caracterizado por duas manifestações clínicas: a trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP). É uma doença resultante da exacerbação da resposta hemostática normal no sistema vascular venoso, caracterizando-se pela formação de um trombo no interior de uma veia, seja pela reduzida capacidade das vias inibitórias, pela exacerbação de estímulos pró-coagulantes ou pelo estado de hipercoagulabilidade (Zago *et al.*, 2013). A fisiopatologia do TEV ainda hoje se baseia na Tríade de Virchow, em que fatores desencadeiam hipercoagulabilidade, estase venosa ou um dano na parede vascular (Bagot; Arya, 2008).

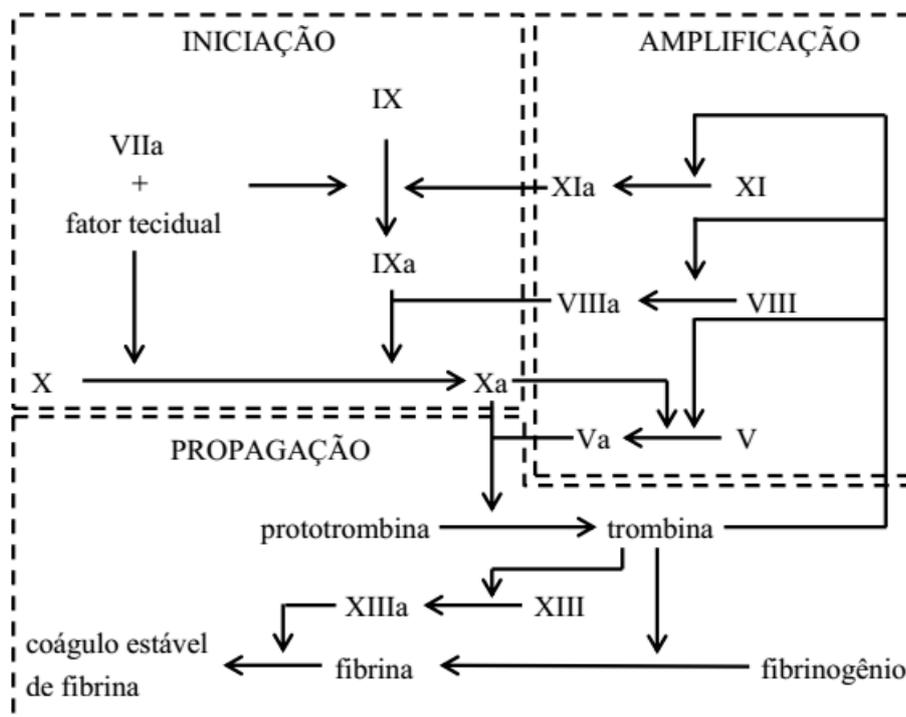
COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A coagulação do sangue é resultante de um conjunto de reações químicas que terminam na formação de polímeros de fibrina insolúvel. Em um indivíduo saudável, o sangue não coagula na corrente sanguínea devido ao equilíbrio das reações de ativação e inibição da coagulação (Zago *et al.*, 2013).

O MODELO DE COAGULAÇÃO BASEADO EM SUPERFÍCIES CELULARES

Apesar do modelo clássico das duas vias de ativação da coagulação ter sido empregado durante quase cinquenta anos, atualmente uma revisão deste modelo foi proposta, e se baseia no fato de que a formação do coágulo exige que os fatores ativados estejam sempre presentes no sítio da lesão. Além disso, entendeu-se que o início do processo se dá com a exposição do fator tecidual (FT) na corrente sanguínea, e se dividiu a sequência de reações em três etapas: inicialização, amplificação e propagação (Ferreira *et al.*, 2010), conforme ilustra a Figura 1.

Figura 1 – Esquema da cascata da coagulação baseada em superfícies celulares.



Martins T.D. Predição da recorrência de tromboembolismo venoso via redes neurais artificiais. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, 2018.

Na fase de iniciação, as células subendoteliais que expressam o FT em sua superfície são expostas aos componentes do sangue no sítio da lesão. O FT também pode ser expresso nos monócitos ou em micropartículas circulantes. O FT ativa o FVII, e se liga a ele formando um complexo que é capaz de gerar pequenas quantidades dos fatores IXa e Xa. O FV é ativado pelo FXa e por proteases não coagulantes. Assim, juntos, os fatores Xa e Va formam o complexo protrombinase na superfície da célula que expressa o FT. Nessa etapa, o complexo protrombinase só responde pela formação de pequenas quantidades de trombina. Quando há um dano vascular, o processo de coagulação segue para a próxima fase.

A fase de amplificação consiste na transformação dos fatores V, VIII e XI em FVa, FVIIIa e FXIa, respectivamente. Nessa fase, a trombina gerada na fase de iniciação ativa as plaquetas presentes no sangue, e também intermedia a ativação dos fatores supracitados na superfície das plaquetas.

A fase de propagação consiste na estabilização do coágulo de fibrina no sítio da lesão.

Para isso, há um grande aumento no número de plaquetas no local lesionado. O FIXa, gerado na fase inicial pelo FXIa, liga-se ao FVIIIa na superfície das plaquetas, e forma o complexo tenase, que é responsável pela produção de maiores quantidades de FXa. Em seguida, o FVa ligado na superfície da plaqueta se liga ao FXa, resultando na formação do complexo protrombinase, que gera grandes quantidades de trombina. Esta vai transformar o fibrinogênio em fibrina solúvel, que será estabilizada pelo FXIII, que também foi ativado pela trombina (Ferreira *et al.*, 2010).

Em todas as reações de ativação, diversos cofatores são necessários, dentre eles os íons cálcio, que agem promovendo a ligação da protrombina e dos fatores VII, IX e X aos fosfolípidos plaquetários.

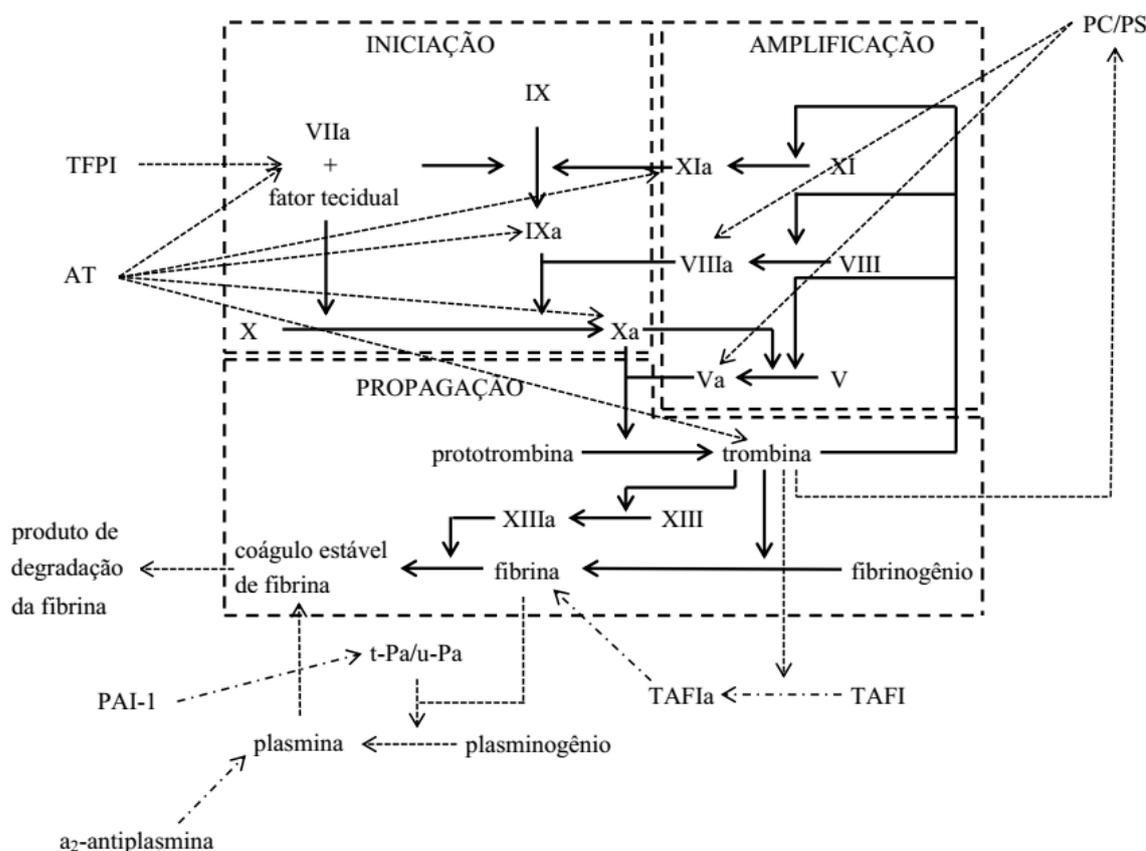
MECANISMOS REGULADORES DA COAGULAÇÃO

Uma vez que o coágulo de fibrina está formado e estável no local lesionado, é necessário que a ativação do sistema seja contida, a fim de não haver o bloqueio do vaso sanguíneo. Assim, mecanismos anticoagulantes e de dissolução do coágulo (fibrinólise) ocorrem de modo a equilibrar as reações de coagulação.

Existem quatro anticoagulantes naturais conhecidos atualmente que atuam no controle das reações de coagulação: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS), e a antitrombina (AT). Cada um atua na inibição de um determinado fator coagulante, conforme ilustrado na Figura 2.

O TFPI é uma proteína produzida pelas células endoteliais e inibe a geração de FXa se ligando a ele e posteriormente ao complexo FT-FVIIa, formando um complexo quaternário, e limitando as reações de coagulação. A PC, quando ligada ao endotélio através do receptor de proteína C, é ativada pela trombina ligada à proteína transmembrana trombomodulina (IIa-TM). O poder inibitório da PC é potencializado pela PS, que atua como um cofator não enzimático na clivagem dos fatores Va e VIIIa, inativando-os. A AT inibe a atividade da trombina e dos fatores IXa, Xa, XIa e XIIa, e acelera a dissociação do complexo FT-FVIIa. Seu efeito é potencializado por ação de substâncias presentes no endotélio, como o heparan sulfato (Zago *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2010).

Figura 2 – Cascata da coagulação, fibrinólise e os mecanismos reguladores



Martins T.D. Predição da recorrência de tromboembolismo venoso via redes neurais artificiais. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, 2018. Nessa figura, as linhas contínuas representam as reações de coagulação e as tracejadas, os mecanismos de anticoagulação e fibrinólise.

Outro mecanismo regulador da coagulação é a dissolução dos polímeros de fibrina, denominado fibrinólise, também ilustrado na Figura . Nessa etapa, o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) hidrolisam o plasminogênio, gerando a plasmina, que degrada a fibrina. Essa reação é altamente específica, visto que o t-Pa tem baixa afinidade pelo plasminogênio na ausência de fibrina. Por outro lado, também existe um mecanismo de inibição da fibrinólise (representado na figura 2 com linhas traço-ponto): o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) inibe a formação da plasmina por sua ação contra o t-PA, e a α_2 -antiplasmina impede a ação da plasmina. Por fim, há também outro inibidor da fibrinólise, denominado inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), que é ativado pelo complexo FIIa-TM (TAFIa), e atua inibindo a geração de plasmina.

INCIDÊNCIA DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

O TEV é um dos principais problemas de saúde pública, com uma incidência anual de 1 a 3 casos por 1.000 indivíduos, de acordo com diferentes estudos populacionais (Heit, 2005). A trombose venosa profunda (TVP) pode ficar restrita ao leito vascular acometido, ou levar à embolia pulmonar (EP). Por outro lado, a EP pode ser primária. A incidência de TVP no Brasil não é ampla e sistematicamente investigada. A última estatística vem de dados do SUS entre os anos de 2008 e 2010, que indicaram 85.772 internações decorrentes de TVP, sendo que a taxa de mortalidade foi de 2,38 %. Sabe-se, também, que a TVP causa mais mortes que o HIV, câncer de próstata, câncer de mama e acidentes automobilísticos juntos. Por fim, a EP causa 1 morte a cada 6 indivíduos, em um período de até 3 meses após sua ocorrência (Ibope, 2010).

FATORES DE RISCO PARA TROMBOEMBOLISMO VENOSO

O TEV é uma doença multifatorial em que fatores genéticos e adquiridos interagem dinamicamente provocando inicialmente a ativação e propagação inapropriada dos mecanismos de coagulação e, posteriormente a formação de trombos patológicos na circulação (Rosendaal, 1999; White *et al.*, 2003; Criado *et al.*, 2008; Ho, 2010).

Os fatores de risco adquiridos são os mais importantes, e incluem a imobilização, viagens aéreas com duração superior a 6 horas, cirurgias, gravidez, puerpério, câncer, anticoncepção oral ou terapia de reposição hormonal, trauma e presença de anticorpos antifosfolipídios (López *et al.*, 2004).

Os fatores de risco genéticos podem tanto levar à diminuição do potencial anticoagulante, como a um aumento no pró-coagulante. Assim a deficiência dos anticoagulantes naturais, AT, PC e PS, levam a diminuição da regulação negativa do sistema pró-coagulante. Podemos também encontrar um aumento da concentração plasmática de fatores da coagulação (fatores I, II, VIII, IX e XI), como nos polimorfismos no gene do FV (R506Q, FV Leiden), e no gene da protrombina (FII G20210A), que ocasionam uma resistência do fator V à inibição pela PC ativada, e ao aumento na concentração plasmática de FII, respectivamente (Heit, 2005;

Rosendaal; Reitsma, 2009).

Apesar dos fatores de risco bem estabelecidos, aproximadamente 30% dos casos de TEV são espontâneos, ocorrendo na ausência de qualquer fator de risco identificável (Heijboer *et al.* 1990; Poort *et al.* 1996; Silverstein *et al.* 1998; Rosendaal 1999; Morange; Trégouët, 2010). Por outro lado, indivíduos com trombofilia hereditária ou adquirida, podem apresentar quadros clínicos diversos, o que sugere a presença de outros fatores não definidos que podem interferir na expressão fenotípica da doença. Por se tratar de doença multifatorial, existe uma gama de possibilidades, incluindo um grande número de mutações raras com forte efeito fenotípico, e as variantes comuns de baixa penetrância em genes conhecidos ou não. Nesse sentido, na última década, houve um esforço para se identificar outros fatores genéticos que pudessem ter um papel etiopatogênico no TEV.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS

O DNA humano é constituído por mais de 3 milhões de pares de base e apesar de bem organizado é exposto a processos constantes de reparação durante sua duplicação, replicação e transcrição. Algumas mudanças em sua estrutura acabam ocorrendo, geralmente no processo de duplicação. Essas variações na estrutura do DNA são chamadas de mutações, e restritas a 0,1% a 0,4% de sua totalidade, demonstrando que o genoma se mantém bem conservado ao longo da evolução (Karki *et al.*, 2015).

Uma variação na sequência de DNA que ocorre em uma população com uma frequência igual ou superior a 1% é denominada polimorfismo. A maior incidência de uma mutação polimórfica na população sugere que os polimorfismos ocorrem de forma natural, com a grande maioria deles tendo impacto nulo ou mínimo em sistemas biológicos.

Os polimorfismos podem se caracterizar por uma ou mais mudanças de nucleotídeos. O SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* – exemplifica o polimorfismo mais comum, com uma incidência de um a cada 1.000 pares de bases no genoma humano.

SNPs nas regiões codificantes de genes (cSNPs) ou em regiões reguladoras, são mais propensos a causar diferenças funcionais. Para fins de estudos genéticos, os SNPs são comumente usados como marcadores de uma região genômica (Brookes, 1999; Collins *et al.*, 1998).

Devido a análise funcional do SNP e à degeneração do código genético, que resulta em SNPs sinônimos (altera nucleotídeo, altera códon, mas não altera aminoácido) menos de 1% dos SNPs exerce efeito sobre a estrutura e função proteica (Venter *et al.*, 2001). Não podemos desconsiderar que polimorfismos em regiões não codificantes podem estar envolvidos em processos de regulação de expressão gênica, como alteração de sítio de *splicing* e produção de microRNAs (miRNA) (Prokunina; Alarcón-Riquelme, 2004; Weber, 2005).

A frequência de um SNP é dada em termos da frequência do alelo. Por exemplo, um SNP com a frequência de um alelo G de 0,40 implica que 40% daquela população possui o alelo G *versus* o alelo mais comum (o alelo principal), que é encontrado em 60% da população (Bush; Moore, 2012).

Um SNP em particular frequentemente fornece informações, de maneira previsível, sobre alelos variantes em outros locais próximos, ou seja, a presença de uma variante fornece informações sobre a presença de outras variantes. Esta correlação é conhecida como desequilíbrio de ligação (LD), e uma combinação particular de alelos ao longo de um cromossomo é denominada haplótipo (Weiss; Clark, 2002).

ESTRUTURA POPULACIONAL

Todo projeto populacional que vise a investigação de SNPs exige o conhecimento da população a ser estudada, incluindo a avaliação da variação dos polimorfismos genéticos dos indivíduos juntamente com métodos estatísticos para medir esta variação entre e dentro das populações (Hartl & Clark, 1997). O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) indica que após uma geração de acasalamentos aleatórios, as frequências genóticas em um único *locus* atingirá o equilíbrio, tornando-se fixa. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* representa uma população no seu equilíbrio genético,

mas este princípio refere-se somente a populações mendelianas em equilíbrio, onde cruzamentos ocorrem ao acaso (panmixia) e com ausência de forças evolutivas (Hardy, 1908, Hartl; Clark, 1997).

A estrutura populacional em genética refere-se à quantificação das diferenças genéticas entre subgrupos a partir dos níveis de heterozigose média e sua relação entre e dentro das populações. A estratificação populacional pode ocorrer em grupos que possuem frequências alélicas diferentes entre e dentro de subgrupos populacionais, ou entre populações miscigenadas com diferentes ancestralidades. A maior parte da variabilidade genética entre humanos ocorre dentro das populações (80-90%), enquanto a menor parte da variação ocorre entre as populações, sugerindo que não ocorre estruturação populacional na espécie humana (Pritchard; Rosenberg, 1999; Rosenberg *et al.*, 2002). Com isso alelos muito frequentes podem ser observados em diversas populações. Por outro lado, mesmo a pequena parte que é distinta entre uma população e outra, possibilita identificar a diferença entre grupos continentais (Bastos-Rodrigues *et al.*, 2006; Pimenta *et al.*, 2006).

Segundo Rosenberg e colaboradores (2002), existem 5 grandes populações humanas mundiais: África sub-Saariana, Ásia Oriental, Oceania, Américas (índios nativos) e um maior grupo que engloba Europa, norte da África e Ásia Ocidental. Além disso, algumas populações, como a Européia, ainda podem ser divididas (nórdicas e mediterrâneas) (Tian *et al.*, 2006), indicando que mesmo no pequeno grupo de loci que diferenciam as populações há diferentes frequências alélicas e genotípicas, podendo detectar pequena estruturação populacional.

Assim, a estruturação de populações é um fator que deve ser considerado em um estudo de associação genética, pois se houver estruturação das populações em estudo, os resultados de variação das frequências alélicas e genotípicas entre as populações estudadas (caso-controle) podem ser devido à estruturação genética e não devido à característica de interesse, como por exemplo, a doença.

Os estudos de associação caso (indivíduos com o fenótipo de interesse) – controle (sem o fenótipo) são bastante empregados na identificação de *loci* para doenças complexas. Uma associação estatisticamente significativa entre o alelo e a doença

sugere que o locus influencia na causa da doença e que o alelo marcador (causal) é identificado ou está em desequilíbrio de ligação com a variante causal.

Entretanto, um resultado falso-positivo ou falso-negativo de um estudo de associação pode ser devido à estratificação da população, que pode existir quando a população do estudo não é homogênea, podendo ser dividida em subpopulações com variações na prevalência da doença, e diferenças na frequência alélica do marcador (Shmulewitz *et al.*, 2004; Ardlie *et al.*, 2002; Thomas; Witte, 2002).

Um alelo marcador com uma frequência maior em subpopulações da população estudada mostrará associação com a doença, mesmo se não houver relação. Isso aumenta a razão de falsos positivos esperada, sendo o resultado positivo devido à estratificação da amostra (Li, 1972).

Portanto, o uso do controle genômico em estudos de associação é uma opção muito interessante, onde utiliza-se de marcadores randômicos para eliminar associações devido à estratificação (Devlin; Roeder, 1999). Turakulov e Easteal (2003) demonstraram que a inclusão de 65 SNPs é suficiente para análise de estratificação de uma população. Esse cuidado deve ser empregado, particularmente em populações altamente miscigenadas, para se evitar resultados não confiáveis.

A população brasileira é altamente heterogênea, tendo contribuições das populações européia, africana e indígena. Segundo Estrela *et al.*, 2008, a identificação das raças na população brasileira de acordo com as categorias raciais baseadas em cor de pele, como propõe o Censo Brasileiro, é insuficiente para ser utilizado como controle da estratificação.

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DO GENOMA - GWAS

No início dos anos 2000, houve uma grande revolução em relação ao panorama da investigação genética de doenças humanas. O projeto HapMap (Weiss; Clark, 2002) criado a partir do Projeto Genoma Humano, possibilitou realizar um mapa de haplótipos em quatro populações mundiais e um banco de dados público para os SNPs mais comuns do genoma humano, contribuindo para estudos de associação

genética em doenças complexas (International HapMap Consortium, 2005).

Foram incluídas quatro populações humanas distintas: 90 indivíduos (30 trios – pai, mãe e filho) da população de Yoruba em Ibadan, Nigéria (YRI); 45 japoneses não relacionados de Tóquio, Japão (JPT); 45 chineses não relacionados de Beijing, China (CHB), e 90 indivíduos (30 trios) norte-americanos residentes de Utah com ancestralidade na europa nórdica e ocidental (CEU).

Em 2008, foram incluídas mais 7 populações humanas: 83 indivíduos norte-americanos do sudeste dos EUA com descendência africana (ASW); 86 indivíduos não relacionados norte-americanos descendentes de chineses da região metropolitana de Denver, Colorado (CHD); 88 índios Gufarati não relacionados de Houston, Texas (GIH); 90 africanos não relacionados da região de Luhya em Webuye, Kênia (LWK); 77 norte-americanos com descendência mexicana residentes em Los-Angeles, Califórnia (MEX); 171 africanos da região de Massai em Kinyawa, Kênia (MKK); 88 italianos da região da Toscana (TSI). Foram incluídos mais 84 indivíduos na população de CEU; mais 41 indivíduos na população de CHD; 44 indivíduos na população de JPT; e 86 indivíduos na população de YRI.

Após anos de pesquisa e a genotipagem de mais de 3 milhões de SNPs nas populações houve a possibilidade de identificação de haplótipos para cada grupo populacional (International HapMap Consortium, 2007).

Esse projeto também possibilitou o desenvolvimento de *chips* de DNA, que permitem a genotipagem de centenas de milhares de SNPs que cobrem a quase totalidade do genoma (Norrsgard, 2008).

Em seguida, a pesquisa genética entrou na era dos estudos de associação do genoma (GWAS - *Genome Wide Association Study*), que consiste em testar a associação entre um conjunto de SNPs e um fenótipo, com o objetivo de identificar a variação genética mais comum para a doença, ou que possa ser considerada um fator de risco. A abordagem dos GWAS é revolucionária porque permite a varredura de todo o genoma humano em níveis de resolução anteriormente inatingíveis, em milhares de indivíduos não relacionados (Pearson; Manolio, 2008).

No entanto, o cuidado com resultados falso-positivos, que pode ocorrer quando são realizados muitos testes de significância, deve ser tomado. Uma solução tradicional é a aplicação de correção de Bonferroni.

Também vale ressaltar que o alto custo para genotipagem de milhares de SNPs, apesar de ser bem inferior aos estudos pioneiros de biologia molecular, não deixa de ser relevante (Devlin; Roeder, 1999).

GWAS E TEV

A definição dos SNPs associados ao TEV foi baseada na análise de milhares de SNPs em estudos prospectivos populacionais, caso-controles, ou *cohorts* de pacientes ou famílias. Os principais estudos para identificação dos SNPs associados ao TEV estão descritos na tabela 1. Fica evidente a amplitude dos estudos, e que se restringiram a análise de indivíduos da população europeia e norte-americana, e principalmente de etnia caucasóide.

O *Leiden Thrombophilia Study* (LETS) é um estudo holandês caso-controle que incluiu indivíduos de 3 centros, com idade entre 18 e 70 anos, sem histórico de câncer, sendo 443 pacientes com uma primeira TVP confirmada e 453 controles sem história de TEV. Esse estudo foi realizado no período de janeiro 1988 a dezembro 1992, e os pacientes foram selecionados em Leiden, Amsterdam e Rotterdam (van der Meer *et al.*, 1997).

O estudo *Multiple Environmental and Genetic Assessment of risk factors for venous thrombosis* (MEGA Study) é um estudo caso-controle desenhado para investigar os fatores de risco hereditários e adquiridos associados ao TEV. Este estudo contou com pacientes com idade entre 18 e 70 anos com diagnóstico de TEV, acompanhados em clínicas de anticoagulação da Holanda durante o período de 1º de março de 1999 a 31 de maio de 2004. No total foram incluídos 4.300 pacientes e os acompanhantes dos pacientes participaram como controles, além da inclusão de outro grupo controle aleatório (Blom *et al.*, 2005).

No ano de 2008, Bezemer e colaboradores avaliaram 19.682 SNPs em amostras de

DNA dos participantes do LETS e do MEGA Study, e mostraram que dos 7 SNPs associados ao TEV, apenas 3 apresentavam uma forte associação: gene CYP4V2 relacionado ao aumento do FXI (rs13146272), SERPINC1 à redução da AT (rs2227589) e GP6 que codifica a GPVI (1613662). Em 2009, o mesmo grupo de pesquisadores incluiu a análise de mais 103 SNPs, e apenas 2 (rs2289252 e rs2036914), localizados no gene do F11 mostraram contribuir de forma independente para o risco de TVP (Li *et al.*, 2009).

O projeto *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia* (GAIT) é um estudo que incluiu 21 famílias espanholas com história de TEV, composto por 398 indivíduos, abrangendo 3 a 5 gerações. Os participantes variaram em idade, de 1 a 88 anos, sendo 46% homens e 54% mulheres. O objetivo primário desse estudo foi identificar genes que poderiam influenciar na variação plasmática da PC. Os resultados mostraram que uma região no cromossomo 16 (16q23) apresenta forte evidência de ligação com os níveis plasmáticos da PC (Buil *et al.*, 2004; Souto *et al.*, 2000).

Posteriormente, através da análise de 283.437 SNPs demonstrou-se que 3 SNPs no *locus* C4BPB / C4BPA (rs3813948, rs11120218 e rs2808470), associados aos níveis da principal isoforma da proteína de ligação C4BP, poderiam interferir com os níveis de PS livre nos estudos *GAIT*, *MARTHA* e *FARIVE* (Buil *et al.*, 2010).

Na amostra de pacientes do GAIT foram investigados outros 307.984 SNPs relacionados aos níveis plasmáticos de PC e PS. Dois SNPs no gene PROCR (rs867186 e rs8119351) e 2 SNPs no gene DNAJC6 (rs1413885 e rs1570868) mostraram associação estatística (Athanasiadis *et al.*, 2011).

O *MARseille THrombosis Association* (MARTHA) é um estudo composto por 1592 pacientes franceses com TEV, acompanhados no período de janeiro de 1994 a outubro de 2005. Todos os indivíduos incluídos eram caucasianos não relacionados, nos quais foram excluídas as deficiências de AT, PC, PS, homozigose para o FV Leiden ou FIIG20210A, e a SAF (Morange *et al.*, 2011).

Oudot-Mellakh e colaboradores (2012) conduziram um estudo com 915 amostras do estudo MARTHA. Nenhum SNP testado foi significativamente associado com níveis plasmáticos de PS e AT. Dos 14 SNPs com significância estatística em relação aos

níveis plasmáticos de PC, apenas 3 SNPs mostraram uma associação mais forte, sendo eles GSS rs17310467, PROCR rs6088735 e PROCR rs6060278.

Os estudos *Lothian Birth Cohorts* 1921 e 1936 (LBC 1921 e LBC1936) são estudos populacionais escoceses do *Scottish Mental Surveys*, com o objetivo original de descobrir os determinantes genéticos do envelhecimento cognitivo. O LBC 1921 é composto por 550 indivíduos relativamente saudáveis, 316 mulheres e 234 homens, avaliados quanto às características cognitivas e médicas aos 79 anos de idade. O LBC 1936 teve como objetivo descobrir uma maior variedade de causas das diferenças no envelhecimento cognitivo em 1091 indivíduos, sendo 548 homens e 543 mulheres, nascidos no ano de 1936 (Houlihan *et al.*, 2010).

O *Three-City Study* (3C) é um estudo populacional conduzido em três regiões diferentes da França: Bordeaux (Sudoeste), Dijon (Nordeste) e Montpellier (Sudeste), no período de março de 1999 a março de 2001. O objetivo foi avaliar o risco de demência e comprometimento cognitivo atribuível a fatores vasculares. Dos 9.294 participantes do estudo 39,3% eram homens e 60,7% mulheres, com idade igual ou superior a 65 anos. Noventa por cento dos participantes aceitaram ter coleta de sangue para a avaliação de parâmetros biológicos no início do estudo e a constituição de um banco de amostras de sangue (soro, plasma e DNA) (Antoniak *et al.*, 2003).

A partir de amostras dos estudos MARTHA, LBC 1921 e LBC 1936, Morange e colaboradores (2011) realizaram a análise de SNPs dos genes F12 (rs27431672), HRG (rs9898) e KNG1 (rs710446) em comparação com a população do estudo 3C. Os resultados não mostraram associação entre os 2 primeiros SNPs e o risco de TEV, e um risco aumentado (OR 1.196, 95% IC 1.075-1.336) para o rs710446 no KNG1.

Germain e colaboradores (2011) conduziram um estudo incluindo 551.141 SNPs genotipados em 1.542 pacientes e 1.110 controles. A primeira fase do estudo comparou os pacientes de TEV que participaram do MARTHA com indivíduos saudáveis do 3C. Na segunda fase, os resultados deste GWAS foram combinados com os do GWAS publicado anteriormente por Trégouët em 2009, com o objetivo de detectar novas associações que não se mostraram significativas na primeira fase do estudo. Na primeira fase, dos 491.258 SNPs testados, 12 deles, localizados nos loci

ABO, FGG, F5, e F11, mostraram associação com TEV. Na segunda fase, nenhuma nova associação foi detectada (Germain *et al.*, 2011).

O *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), é um estudo epidemiológico longitudinal que incluiu 15.792 adultos afro-americanos e euro-americanos com idade entre 45 e 64 anos, durante o período de 1987 a 1989 (The ARIC Investigators, 1989).

Com o objetivo de avaliar a associação de determinantes genéticas dos níveis de PC, Tang e colaboradores (2010) investigaram 2,5 milhões de SNPs em 8.048 indivíduos de ascendência europeia, seguida de uma análise de replicação em uma amostra de 1.376 indivíduos do ARIC. Um total de 504 SNPs de múltiplos genes mostrou significância estatística, localizados em 5 loci independentes em 3 regiões do genoma, sendo os mais significativos: GCKR (rs1260326) no cromossomo 2p23, PROC (rs1158867) no cromossomo 2q13-q14, PROCR (rs8119351) no cromossomo 20q11, EDEM2 (rs6120849) no cromossomo 20q11.22, e BAZ1B (rs17145713) no cromossomo 7q11.23.

O *Facteurs de Risque et de récidives de la maladie thromboembolique Veineuse* (FARIVE) é um estudo caso-controle multicêntrico, com 607 pacientes com um primeiro episódio de TEV e 607 controles saudáveis, com idade superior a 18 anos e sem história de câncer ativo nos últimos 5 anos (Buil *et al.*, 2010; Trégouët *et al.*, 2009).

Uma análise com base nos estudos MARTHA, FARIVE e MEGA, validou o SNP rs169713 no gene HIVEP1, que codifica uma proteína que participa na regulação transcricional de genes inflamatórios associados ao risco de TEV (OR 1.20, 95% IC 1.13-1.27) (Morange *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Principais estudos GWAS para identificação de SNPs associados ao TEV

Estudo	Desenho	Doença	N	País	Etnias
MEGA	Caso-Controle	TEV	4.300	Holanda	Caucasoides
CHARGE	Prospectivo Populacional	Cardiovascular	23.608	Europa/EUA	Caucasoides
ARIC	Prospectivo Populacional	Cardiovascular	15.792	EUA	Afrodescendentes e Caucasoides
RS	Prospectivo Populacional	Cardiovascular Neuro-motora Oftalmológica	7.893	Holanda	Caucasoides
MARTHA	Cohort	TEV	1.592	França	Caucasoides
FARIVE	Caso Controle	TEV	607	França	Caucasoides
GAIT	Cohort Prospectivo	TEV	398 - 21 famílias	Espanha	Caucasoides
3C	Populacional Prospectivo	Vascular	9.693	França	Caucasoides
LETS	Caso Controle	TEV	474	Holanda	Caucasoides

MEGA: *Multiple Environmental and Genetic Assessment of Risk Factors for Venous Thrombosis* (Blom et al., 2005)

CHARGE: *Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology* (Psaty et al., 2009; Smith et al., 2010)

ARIC: *Atherosclerosis Risk in Communities* (The ARIC Investigators, 1989)

RS: *The Rotterdam Study* (Breter, et al., 1992)

MARTHA: *MARseille THrombosis Association* (Morange et al., 2011)

FARIVE: *Facteurs de Risque et de récives de la maladie thromboembolique Veineuse* (Buil et al., 2010; Trégouët et al., 2009)

GAIT: *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia* (Souto et al., 2000)

3C: *Three-City Study* (Antoniak et al., 2003)

LETS: *Leiden Thrombophilia Study* (van der Meer et al., 1997)

EUA: Estados Unidos da América

Com o objetivo de avaliar SNPs associados ao risco de TEV e aos níveis de FVIII e FvW, um estudo incluiu famílias franco-canadenses, e a replicação em amostras dos estudos MARTHA e FARIVE. Foram identificadas 4 regiões principais, entre as quais o *locus* ABO, o gene STAB2, e um terceiro no cromossomo 6q13-14. Contudo, apenas o SNP rs9363864, localizado ~500 kb abaixo do gene BAI3 pode ser replicado. O genótipo AA foi associado a menor risco de TEV (OR 0.58, 95% IC 0.42-0.80), e níveis reduzidos de FVIII e FvW (Antoni *et al.*, 2010).

O *The Rotterdam Study* é um estudo de coorte prospectivo unicêntrico de base populacional, com 7983 pessoas. Todos os habitantes de Rotterdam com idade maior ou igual a 55 anos foram convidados a participar do estudo, o que resultou em uma taxa de resposta de 78%. Dados dietéticos estavam disponíveis para 5435 pessoas e os participantes foram excluídos de acordo com os seguintes critérios: infarto do miocárdio no ano anterior à investigação (n = 574), diabetes mellitus (n = 779), uso de anticoagulantes (n = 1349), estase durante punção venosa (n = 1513), e nenhuma amostra de sangue disponível (n = 933). Alguns indivíduos foram excluídos por várias razões, e um total de 4976 não foi elegível. A análise, portanto, foi baseada em dados obtidos transversalmente para 3007 indivíduos (Breter, *et al.*, 1992).

O *Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology* (CHARGE) incluiu dados de 5 coortes prospectivas populacionais: o Gene/Environment Susceptibility (AGES), o ARIC, o *Cardiovascular Health Study* (CHS), o *Framingham Heart Study* (FHS), e o *Rotterdam Study* (RS). Os dados genômicos do *British 1958 Birth Cohort* (B58C), foram incluídos nas análises do *Wellcome Trust Case-Control Consortium*. Usando dados de 23.608 adultos de ascendência europeia, foram investigadas associações entre 2.734.954 SNPs e níveis plasmáticos de FVII, FVIII e FvW. Demonstrou-se associação significativa com 305 SNPs presentes em 5 regiões em 5 cromossomos para o FVII, 400 SNPs localizados em 8 regiões de 6 cromossomos para o FvW, e 191 SNPs presentes em 5 regiões de 4 cromossomos para o FVIII (Psaty *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos mostraram que um encurtamento no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) está relacionado a um aumento no risco trombótico. Houlihan e colaboradores (2010) avaliaram 542.050 SNPs em

participantes dos estudos LBC1936 e LBC1921. Os SNPs nos genes do F12 (rs2731672), KNG1 (rs710446) e HRG (rs9898), foram significativamente associados ao TTPa, e juntos, explicaram 16,6% da variação do TTPa no estudo LBC1936 e 15,47% no estudo LBC1921.

Trégouët e colaboradores (2009) analisaram 317.000 SNPs, em 453 pacientes com TEV de 4 centros franceses, e 1.327 controles, provenientes do estudo populacional SU.VI.MAX (Supplementation en vitamins et mineraux antioxydants). Apenas 3 SNPs localizados nos locus do F5 e do grupo sanguíneo ABO foram associados ao risco de TEV: maior com FV Leiden e menor com os grupos sanguíneos O e A2.

A análise de 442.728 SNPs em 1.624 indivíduos de 3 estudos independentes: *FVL-families*, *MARTHA* e *In silico GWAS study on VT*, em locus relacionados ao FvW e ao FVIII não mostraram associação com risco de TEV. Contudo, os resultados replicaram associações com os níveis plasmáticos do FvW (genes STXBP5, vWF, STX2, TC2N e CLEC4M) e do FVIII (genes SCARA5 e STAB2) (Antoni *et al.*, 2011).

Quando observamos os SNPs relacionados ao risco de TEV, há aqueles localizados em genes que codificam proteínas envolvidas com a hemostasia, como por exemplo os localizados nos genes SERPINC1, PROCR, F11, F5, GP6. Por outro lado, há SNPs que não estão localizados em genes que codificam componentes da coagulação, mas que estão associados a outras vias que podem ter relação com a trombose, como por exemplo o HIVEP1 e GCR, que estão associados à inflamação. Há ainda aqueles em que não se conhece o mecanismo, mas o SNP mostra associação com um fenótipo que aumenta o risco de trombose. Neste último caso podemos citar os SNPs nos genes MYH7B, EDEM2, BAZ1B.

Um dado interessante a ser pontuado, é que um mesmo SNP pode ser significativo em uma amostra populacional e não em outra, mesmo dentro de um mesmo país. Como exemplo, podemos citar o SNP GSS rs17310467 que somente foi significativo no estudo de Morange e colaboradores (2011) e não no de Houlihan e colaboradores (2010), que avaliaram diferentes populações francesas.

Também é evidente que mesmo com a pesquisa de milhares de SNPs, poucos apresentam associação com o risco de TEV. Além disso, o acréscimo desse risco é

muito baixo.

Pelo exposto anteriormente, fica claro que as descobertas dos GWAs têm sido aplicada com sucesso na identificação de novos *loci* de suscetibilidade em relação a etiologia do TEV. Contudo, pela grande variabilidade genética, a validação e replicação de um achado nem sempre é observado. Particularmente, na população brasileira, altamente miscigenada, esse é um ponto bastante relevante. Além disso, apesar do TEV, como em outros países, ser importante no Brasil, a investigação dos SNPs associados ao risco dessa doença nunca foi avaliado em nossa população.

2. JUSTIFICATIVA

Há SNPs associados ao risco de TEV, identificados através de GWAS, em populações europeias e norte-americanas, de origem étnica principalmente caucasóide e africana.

Até o momento, nenhum dos SNPs associados ao risco de TEV foram analisados na população brasileira.

Apesar de os SNPs conferirem um pequeno aumento no risco de TEV, sua replicação em outras populações é relevante, corroborando para a análise da validade do seu uso na prática clínica.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Replicar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao TEV em um estudo multicêntrico caso-controle brasileiro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Genotipar 29 SNPs em 25 genes, previamente associados ao risco de TEV em populações européias e americanas, em pacientes brasileiros de 3 centros da região sudeste e controles.

Genotipar 90 SNPs adicionais, não relacionados aos genes candidatos (controle genômico), em pacientes e controles, a fim de verificar se estes podem ser comparados em estudos de associação.

Avaliar em um subgrupo de pacientes a correlação entre SNPs previamente associados com a atividade plasmática de fatores (FV, FVIII, FXI, FvW) e inibidores (PC, PS e AT) da coagulação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES E CONTROLES

Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, idade entre 18 e 60 anos, com diagnóstico clínico de TVP de membro inferior e/ou EP, comprovados por ultrassom com *doppler* ou tomografia pulmonar/cintilografia pulmonar, respectivamente. Estes pacientes foram atendidos em 3 centros brasileiros no período de 2009 a 2013: Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP em Campinas-SP, Ambulatório de Trombofilia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) no Rio de Janeiro-RJ, e Ambulatório de Trombofilia do Hospital Israelita Albert Einstein em São Paulo-SP.

Os critérios de exclusão foram: idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos, história de câncer nos cinco anos anteriores à coleta sanguínea, presença de anticorpos antifosfolipídeos, doença renal ou hepática, síndromes mieloproliferativas, doenças inflamatórias, deficiência de PC, PS, AT e homozigose ou dupla heterozigose para FV Leiden ou polimorfismo G20210A no gene da protrombina. A faixa etária de 18 a 60 anos foi escolhida, por se tratar de estudo de investigação de fatores de risco genéticos.

O grupo controle foi composto por indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos, pareados de acordo com sexo e idade. Os indivíduos controles foram recrutados da mesma região geográfica dos pacientes incluídos no estudo. Por se tratar de um estudo de associação genética, nenhum indivíduo controle tinha parentesco sanguíneo com os pacientes participantes. Os critérios de exclusão incluíram além daqueles empregados no grupo de pacientes com TVP, a não antecedência pessoal ou familiar de trombose venosa ou arterial.

AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES E CONTROLES

Os pacientes e controles que aceitaram participar do estudo preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexos I e II). Após a assinatura do mesmo, os participantes foram encaminhados para coleta de amostras e posteriormente para avaliação clínica. Os pacientes e controles foram avaliados clinicamente através de autorrelato, utilizando um formulário padronizado (Anexo III), contendo informações da anamnese (nome, sexo, data de nascimento, localização do evento trombótico, fatores de risco para o TEV) e dados de exame físico.

COLETA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

O sangue para a dosagem dos parâmetros de coagulação foi coletado de veia periférica em tubo Vacutainer, contendo citrato de sódio 3,2%, na proporção de 9:1. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1550 g por 15 minutos. Foram feitas alíquotas de 400 µL de plasma que foram congeladas e armazenadas a - 80 °C até a sua análise.

O sangue para preparo do DNA foi coletado em tubo Vacutainer com EDTA.

EXTRAÇÃO DO DNA NO SANGUE PERIFÉRICO

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de 8 mL de sangue venoso. O plasma foi descartado, após centrifugação do sangue a 1351 g por 10 minutos. Para a lise das hemácias adicionou-se NH₄Cl 0.144M na proporção de 0.5 vezes o volume de células. Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 600 g, por 20 minutos. Repetiu-se esta etapa até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10 mL de tampão TKM1 (KCl 1M, EDTA 0,2M, Tris/HCl 2M pH 7.6 MgCl₂ 1M). A seguir adicionou-se 125 µL de Triton X-100 e após

homogeneização por inversão, o material foi novamente centrifugado a 726 g por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 5 mL de TKM1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspensão em 1 mL de tampão TKM2 (KCl 1M, EDTA 0.2M, Tris/HCl 2M pH 7.6, MgCl₂ 1M, NaCl 5M).

Após a adição de 50 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10%, a suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 55 °C, por 30 minutos. Acrescentou-se então, 300 µL de NaCl 5M, e após mistura por inversão, o material foi centrifugado a 21.612 g por 10 minutos.

Ao final, a camada superior contendo o DNA foi transferida para um tubo estéril de 1.5 mL. Foi adicionado 1 mL de fenol (redesilado e saturado em tris/HCl 0.2 mM, pH 8.0, contendo 0.1% de hidroxiquinolona), clorofórmio e álcool-isoamílico, na proporção de 25:24:1. Após mistura por inversão, o material foi centrifugado a 8.050 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido e novamente adicionou-se 1 mL de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1). Após mistura por inversão o material foi centrifugado a 21.612 x g por 10 minutos.

Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado na proporção de 2 vezes o volume da fase aquosa, à temperatura ambiente. Esta mistura foi invertida diversas vezes até a obtenção do precipitado de DNA.

O DNA precipitado foi lavado em etanol gelado a 70%, para eliminar resíduos de sal e, o resultado obtido foi ressuspensão em quantidade apropriada de TE (Tris pH 8,0 10 mM, EDTA 0,1mM pH 7,4).

Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer a - 20 °C até a genotipagem.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

A concentração de DNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop), para avaliar

a qualidade das amostras quanto à presença de proteínas, e a razão deveria apresentar comprimentos de onda entre 260 nm e 280 nm, com um valor de 1,8 a 2,0. Além disso, foi verificado o índice de absorvância no comprimento de onda de 260 nm, pois somente são confiáveis leituras com valor de absorvância maior que 0,05.

Ainda para a quantificação da concentração das amostras, foi usado o equipamento *Qubit® 2.0 Fluoremeter* (Invitrogen). Primeiramente foram mensurados os valores dos padrões e em seguida foi realizada a leitura, uma de cada vez, de todas as amostras em triplicatas. Os valores, já calculados pelo próprio *Qubit® 2.0 Fluoremeter*, foram dados na concentração de ng/ μ L.

Após a quantificação, a amostra de DNA foi diluída para uma concentração final de 50 ng/ μ L.

CONTROLE GENÔMICO PARA AVALIAÇÃO DA ESTRATIFICAÇÃO POPULACIONAL

Para confirmar a semelhança racial entre pacientes e controles foi realizado o método do controle genômico, utilizando-se de marcadores randômicos (Devlin; Roeder, 1999).

Os 90 SNPs selecionados para o controle genômico estão representados na tabela S1 dos dados suplementares.

SELEÇÃO DOS SNPs

De acordo com os estudos realizados em pacientes com TEV em outras populações, foram selecionados 29 SNPs que apresentaram resultados de associação através do programa *SNPBROWSER™ v.4.0* programa (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), com uma frequência alélica mínima (MAF) > 0.05 , e um desequilíbrio de ligação (LD) $r^2 > 0.8$ (tabela 2). Os SNPs EDEM2, GCKR, BAZ1B e DNAJC6 já constavam de uma plataforma da empresa, e haviam sido previamente estudados em pacientes com doença cardiovascular, e foram incluídos no estudo. Estes SNPs foram previamente testados pelo fabricante e demonstraram boa qualidade.

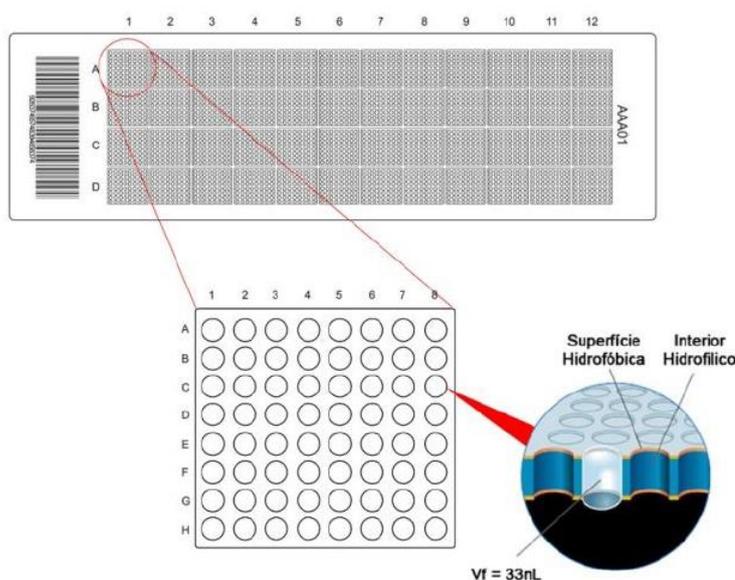
Tabela 2 - SNPs selecionados

Gene	SNP	Literatura: OR (95% CI)	Fenótipo Associado
CYP4V2	rs13146272	1.22 (1.10-1.49)	↑ FXI
SERPINC1	rs2227589	1.29 (1.10-1.49)	↓ Antitrombina
GP6	rs1613662	0.86 (0.70-1.06)	↓ Ativação e Agregação Plaquetária – Codificação da Glicoproteína 6
F11	rs2036914	1.33 (1.11-1.59)	↑ FXI
	rs2289252	1.49 (1.25-1.76)	↑ FXI
HIVEP1	rs169713	1.20 (1.13-1.27)	Codificação de proteínas expressas em células relacionadas à inflamação
KNG1	rs710446	1.19 (1.07-1.34)	↓ TTPa
C4BPB	rs3813948	1.24 (1.00-1.53)	↑ $\alpha_7\beta_0$ C4BP - PS
PROCR	rs867186	1.35 (1.19–1.54)	↓ Níveis de Proteína C
	rs6088735	1.33 (1.11-1.60)	↓ Níveis de Proteína C
EDEM2	rs6120849	-	↓ Níveis de Proteína C
GCKR	rs1260326	-	Relacionado ao colesterol
BAZ1B	rs17145713	-	↓ Níveis de Proteína C
DNAJC6	rs1413885	-	↓ Níveis de Proteína S
TC2N	rs1884841	1.17 (0.92-1.50)	↑ Fator de von Willebrand
FVW	rs1063857	1.15 (não fornecido)	↑ Fator de von Willebrand
STXBP5	rs1039084	0.78 (0.65-0.93)	↑ Fator de von Willebrand
CLEC4M	rs868875	1.07 (0.67-1.72)	↓ Fator de von Willebrand
SCARA 5	rs2726953	0.98 (não fornecido)	Relacionado a níveis de Fator de von Willebrand
	rs9644133	1.12 (não fornecido)	↓ FVIII
STAB2	rs4981022	0.97 (0.74-1.27)	↓ Fator de von Willebrand
	rs4981021	1.29 (1.14–1.46)	↑ FVIII
STX2	rs7978987	1.01 (0.83-1.22)	Relacionado a níveis de Fator de von Willebrand
BAI3	rs9363864	0.58 (0.42–0.80)	↓ FVIII e Fator de von Willebrand
FV	rs2420371	1.39 (1.17-1.64)	Relacionado a níveis de FV
ABO	rs687621	1.52 (1.28-1.80)	Relacionado ao tipo sanguíneo
SERPINF2	rs8074026	-	Relacionado a α_2 -antiplasmina
NME7	rs16861990	2.02 (1.66-2.45)	↑ D-dímero
SLC44A2	rs2288904	1.19 (1.12–1.26)	↑ SLCC44A2

GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS

O estudo dos SNPs foi realizado por uma plataforma de alto rendimento de genotipagem (*TaqMan® OpenArray™ Genotyping System* – Applied Biosystems), baseado em PCR em tempo real, e a placa utilizada foi de 120 SNPs para 24 amostras. Os resultados foram observados pelo programa *Cloud*, Applied Biosystems.

Figura 3 – Placa de genotipagem *Open Array*



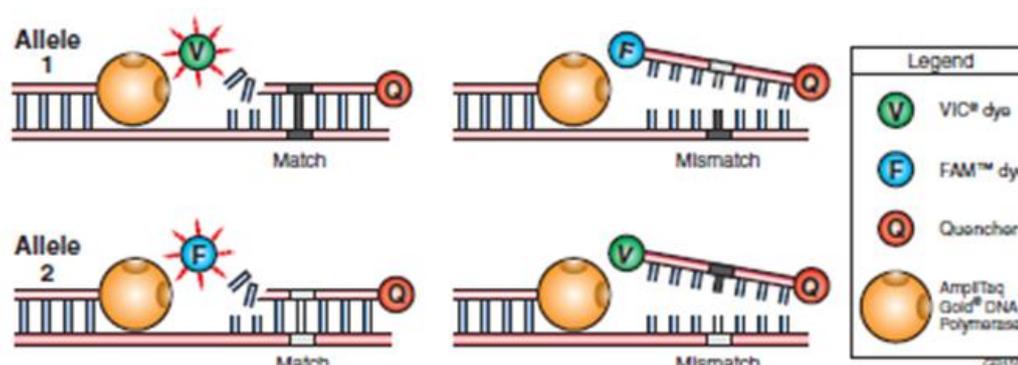
Adaptado de Applied BioSystems, 2015. Representação da placa de OpenArray™, contendo os 48 subarrays e, em destaque, um subarray com 64 nano-poços, cada um apresentando o volume de 33nL.

A superfície da placa de genotipagem *OpenArray* apresenta propriedades hidrofóbicas, enquanto o interior dos poços (local onde já estão as sondas e os primers necessários para as reações) apresenta característica hidrofílica. Esta engenharia é capaz de permitir a distribuição dos pequenos volumes (33 nL) das amostras com grande acurácia e precisão (Morrison *et al.*, 2006).

Os ensaios de genotipagem *TaqMan® OpenArray™ Genotyping* (Applied Biosystems, 2012) utilizaram duas sondas (MGB) marcadas com fluoróforos (*VIC®* e *FAM®*) e um par de *primers*. A sequência das sondas variou em um único nucleotídeo

correspondente a cada alelo do gene. O sinal de amplificação foi captado quando o fluoróforo foi liberado após a destruição da sonda pela enzima *Ampli Taq Gold DNA Polimerase*. Como os fluoróforos foram diferentes para cada alelo, o sinal emitido foi correspondente à cor do fluoróforo, discriminando assim, alelos diferentes no caso de indivíduos heterozigotos ou homozigotos para um ou outro alelo. A sonda ainda apresentava um *Quencher* não-fluorescente (NFQ) e uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) na extremidade 3'. A MGB possibilitou a ligação da sonda no alelo antes da amplificação pela enzima, e a molécula *Quencher* é um inibidor de emissão de fluorescência, como mostrado a seguir na figura 4.

Figura 4 - Sistema de detecção de polimorfismos (*Applied Biosystems*)



Applied BioSystems, 2015

O sistema de detecção de polimorfismos combina ensaios de genotipagem TaqMan pré-carregados em placas com tecnologia *OpenArray* usando nanolitros de fluidos e baixos volumes de soluções (33 nL por reação). A placa utilizada tinha o tamanho de uma lâmina de microscópio com 3072 cavidades, sendo organizadas em 48 sub-matrizes de 64 poços, onde até 256 SNPs podiam ser rastreados simultaneamente em 12 amostras, assim como demonstrados na Figura 3. As placas estavam disponíveis em diferentes formatos, possibilitando a análise de 64 a 256 SNPs em vários números de amostras por matriz.

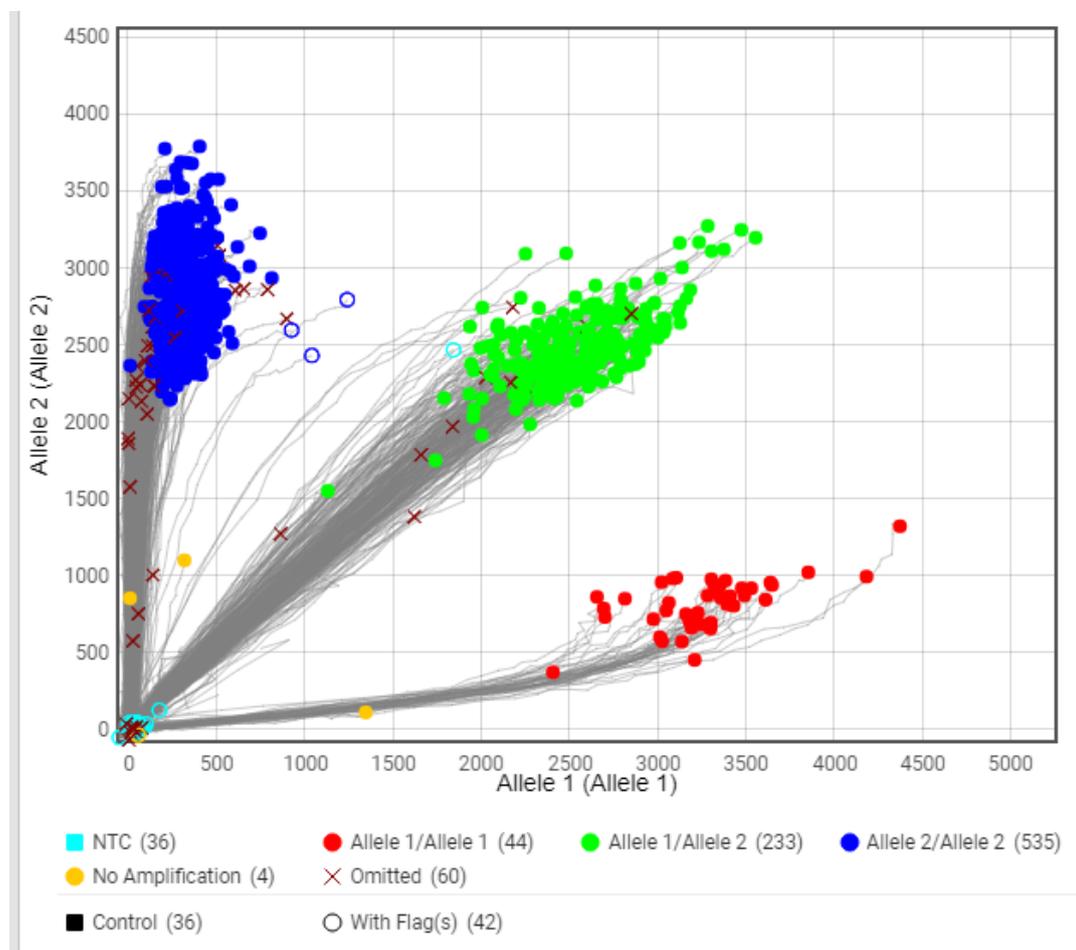
Durante a PCR, cada sonda anelava especificamente para a sua sequência complementar entre os sítios de frente e verso de primers. A DNA polimerase pode

clivar sondas apenas que hibridizam com seu alelo específico SNP (match). A clivagem separa o corante *reporter* a partir do corante *quencher*, aumentando substancialmente a fluorescência do corante *reporter*. Assim, os sinais de fluorescência gerados durante a amplificação por PCR indicavam os alelos que estavam presentes na amostra. A figura 4 ilustra os resultados de acordo com a sequência das sondas e amostras em ensaios de genotipagem dos SNPs pelo TaqMan (Livak *et al.*, 1995). Uma incompatibilidade entre uma sonda e um alelo do SNP reduz grandemente a eficiência de hibridação da sonda. Além disso, a polimerase de DNA é susceptível de deslocar a sonda incompatível, em vez de clivá-lo para liberação de corante *reporter*.

No programa, estes números passam por algoritmos não revelados pela empresa e são convertidos em novos valores e em clusters, separando os indivíduos em 3 clusters diferentes, os homozigotos normais, os heterozigotos e os homozigotos mutantes. Os indivíduos homozigotos normais são representados pelo cluster de cor vermelho, indicando que ambos alelos do indivíduo tiveram a sonda contendo o *reporter VIC*[®] pareada e hidrolisada. O cluster de cor verde representa os indivíduos heterozigotos, que apresentaram um alelo normal e outro com a sequência mutante, tendo as sondas *VIC*[®] e *FAM*[®], respectivamente, aneladas e hidrolisadas. Já o último cluster, de cor azul, apresenta os indivíduos com ambos alelos mutantes, contendo apenas a hidrólise da sonda *FAM*[®] no ensaio. As respostas de um SNP, após a PCR, estão representados na figura 5.

O eixo X representa os valores de emissão de fluorescência *VIC*[®], e o eixo Y representa os valores de emissão de fluorescência *FAM*[®] durante a amplificação. Com isso, os três possíveis genótipos se posicionam em regiões diferentes no gráfico, dependendo da emissão de fluorescência dada em cada amostra.

Figura 5 - Imagem do programa Cloud após a captura da fluorescência de um SNP



Software Cloud. Applied BioSystems, 2019

QUANTIFICAÇÃO DE FATORES E INIBIDORES DA COAGULAÇÃO

Para comparação entre as quantificações do FV, FVIII, FXI, FvW, proteína S, proteína C e antitrombina, e a genotipagem dos SNPs correspondentes foram utilizadas as técnicas descritas a seguir:

Determinação plasmática do antígeno do FvW (FvW Ag)

O FvW Ag foi determinado por técnica de imunoturbidimetria, utilizando o kit HemosIL vWF[®] no equipamento ACL TOP 500 (Werfen Medical Ltda, Bedford, EUA).

A mistura do plasma, que contém o FvW Ag, com o reagente látex e o tampão de reação, leva à aglutinação das partículas de látex. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de FvW Ag presente no plasma.

No equipamento, após incubação de 20 µL da amostra de plasma por 20 a 55 segundos, adicionou-se 70 µL de tampão FvW: Ag com incubação por 20 a 55 segundos, e finalmente a adição de 90 µL de Látex FvW: Ag com incubação por mais 20 segundos. O tempo de aquisição do resultado é 300 segundos no comprimento de onda de 405 nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de normalidade de FvW Ag, e os valores de referência são: grupo sanguíneo O: 41,1 - 125,9%, e grupo sanguíneo A+B+AB: 61,3 - 157,8%.

Determinação da atividade do Fator VIII:C

A atividade do FVIII foi determinada por método coagulométrico utilizando o kit *Factor VIII deficient plasma* da IL[®], baseado no teste de Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) modificado, no equipamento ACL TOP 500 (Werfen Medical Ltda, Bedford, EUA).

O plasma do paciente é diluído e adicionado ao plasma deficiente em Fator VIII. A correção do TTPa prolongado do plasma deficiente é proporcional à concentração (% em atividade) do FVIII no plasma do paciente.

No equipamento, após incubação de 25 µL da amostra de plasma por 30 a 45 segundos, adicionou-se 25 µL de plasma deficiente em FVIII com incubação por 50 a 70 segundos. A seguir adicionou-se 50 µL de APTT-SS com incubação por 180 a 220 segundos, e 50 µL de APTT-SS CaCl₂ com incubação por mais 20 segundos. O tempo

de aquisição do resultado é 165 segundos no comprimento de onda de 671 nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de normalidade de FVIII, e os valores de referência são de 50-150%.

Determinação da atividade do FV

A atividade do Fator V, utilizando o kit Factor V deficient plasma da IL[®], foi determinada por um teste de Tempo de Protrombina (TP) modificado, no equipamento ACL TOP 500 (Werfen Medical Ltda, Bedford, EUA).

O plasma do paciente é diluído e adicionado ao plasma deficiente em fator V. A correção do TP prolongado do plasma deficiente é proporcional à concentração (% de atividade) do FV no plasma do paciente.

No equipamento, após incubação de 50 µL da amostra de plasma por 20 a 90 segundos, adicionou-se 50 µL de plasma deficiente em FV com incubação por 30 a 150 segundos. A seguir adicionou-se 100 µL de PT-RecombiPlastin com incubação por 20 segundos. O tempo de aquisição do resultado é 100 segundos no comprimento de onda de 671 nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de normalidade de FV e os valores de referência são de 62 a 139%.

Dosagem da atividade do FXI

A atividade do FXI, utilizando o kit *Factor XI deficient plasma* da IL[®], foi determinada por um teste de TTPa modificado, no equipamento ACL TOP 500 (Werfen Medical Ltda, Bedford, EUA).

O plasma do paciente é diluído e adicionado ao plasma deficiente em FXI. A correção do TTPa prolongado do plasma deficiente é proporcional à concentração (% de atividade) do FXI no plasma do paciente.

No equipamento, após incubação de 25 µL da amostra de plasma por 30 a 45

segundos, adicionou-se 25 µL de plasma deficiente em FXI com incubação por 50 a 70 segundos. A seguir adicionou-se 50 µL de APTT-SS com incubação por 180 a 220 segundos, e 50 µL de APTT-SS CaCl₂ com incubação por mais 20 segundos. O tempo de aquisição do resultado é de 165 segundos, no comprimento de onda de 671 nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de normalidade de FXI e os valores de referência são de 65 a 150%.

Dosagem de Proteína C

A atividade da PC foi determinada por método cromogênico, utilizando o kit *Protein C* da IL[®], no equipamento ACL TOP 500 (Werfen Medical Ltda, Bedford, EUA).

Após ativação da PC pelo veneno de víbora *Agkistrodon contortrix contortrix*, a quantificação de PC ativada é realizada utilizando o substrato cromogênico S-2366. A paranitroanilina liberada é medida cineticamente a 405 nm, sendo o seu nível diretamente proporcional à atividade da PC da amostra.

No equipamento, após incubação de 56 µL da amostra de plasma por 20 a 90 segundos, adicionou-se 56 µL de ativador de PC com incubação por 240 a 300 segundos. A seguir adicionou-se 56 µL de substrato de PC com incubação por 20 segundos. O tempo de aquisição do resultado é de 120 segundos no comprimento de onda de 405 nm.

Os resultados são expressos em atividade (% do normal), e os valores de referência são de 70 a 140%.

Dosagem de Proteína S livre

A quantificação de PS livre foi determinada por imunensaio automatizado, por turbidimetria com partículas de látex, utilizando o kit *Free Protein S* da IL[®], no equipamento ACL TOP 500 (Werfen Medical Ltda, Bedford, EUA).

A proteína S livre na amostra de plasma liga-se à C4BP adsorvida a partículas de látex, na presença de cálcio. Após essa ligação, há uma reação de aglutinação com outras partículas de látex que contém um anticorpo monoclonal anti-proteína S livre adsorvido. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de proteína S livre.

No equipamento, após incubação de 12 µL da amostra de plasma por 20 a 55 segundos, adicionou-se 150 µL de ativador de C4BP Látex com incubação por 90 a 100 segundos. A seguir adicionou-se 80 µL de substrato de Anti PS MAb Látex com incubação por 20 segundos. O tempo de aquisição do resultado é de 120 segundos no comprimento de onda de 405 nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de normalidade de PS livre. Os valores de referência são: masculino 74,1 a 146,1%, e feminino 54,7 a 123,7%.

Dosagem de Antitrombina

A atividade de AT foi determinada por método cromogênico, utilizando o kit *Liquid Antithrombin* da IL[®], no equipamento ACL TOP 500 (Werfen Medical Ltda, Bedford, EUA).

Neste método o plasma é incubado com reagente contendo FXa na presença de excesso de heparina. A atividade residual de FXa é avaliada pela liberação de paranitroanilina, medida cineticamente a 405 nm com o substrato cromogênico S-2765, sendo inversamente proporcional à quantidade de AT.

No equipamento, após incubação de 50 µL da amostra de plasma por 20 a 90 segundos, adicionou-se 50 µL de *AT Liq FXa* com incubação por 100 a 140 segundos. A seguir adicionou-se 50 µL de *AT Liq Substrate* com incubação por 20 segundos. O tempo de aquisição do resultado é de 20 segundos no comprimento de onda de 405 nm.

Os resultados são expressos em atividade (% do normal), e os valores referência são de 83 a 128%.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Verificação do padrão de qualidade dos SNPs genotipados

Para um SNP ser considerado um polimorfismo informativo dentro da população que está sendo estudada é necessário que este SNP esteja em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) e possua MAF (do inglês, *minor allele frequency*) maior que 5%.

O EHW foi calculado para cada SNP, separadamente para cada população: grupo casos e o grupo controle. Valores de $p > 0,05$ demonstram que a população estudada se encontra em EHW e, para valores $< 0,05$ demonstram que a população não se encontra em EHW.

O MAF é obtido a partir do cálculo das frequências alélicas de cada alelo do SNP.

Nós avaliamos a frequência alélica de SNPs genotipados em termos de equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor $> 0,05$), MAF $> 0,05$ e LD emparelhados ($r^2 > 0,8$) pelo programa HAPLOVIEW v.4.2. (Barret *et al.*, 2005).

Verificação da estruturação populacional dos grupos

Para avaliar possíveis diferenças na variabilidade genética entre os dois grupos estudados, devido a uma possível estratificação populacional, foi feita a Análise de Variância Molecular - *Analysis of Molecular Variance* – (AMOVA). Este é um método que estima a diferenciação de populações a partir de dados moleculares e testa hipóteses geradas dessa diferenciação. Para o cálculo da AMOVA foi utilizado o programa Arlequin, v.3.11 (Excoffier; Schneider, 2005).

Cálculo da Regressão Logística Múltipla e Odds Ratio (OR)

O cálculo do poder estatístico deste estudo caso-controle para detecção de associações genéticas com o TEV foi realizado por método *post hoc* através do

programa GPOWER (Faul *et al.*, 2007) com os seguintes parâmetros: regressão logística; teste bicaudal; força do SNP através do OR = 1.4, $\alpha = 0.002$ (corrigido para múltiplos testes usando correção de Bonferroni). O tamanho calculado foi de 875 indivíduos. O *effect size* mínimo para se ter um poder estatístico de 80% foi de 1.4. Utilizando este OR num teste *a priori*, seriam necessários 875 indivíduos.

Correlação de atividade plasmática de fatores e inibidores com SNPs associados

As associações das quantificações com os resultados genéticos foram investigadas usando um modelo de regressão linear como implementado no programa SPSS, onde os genótipos foram codificados como 1 para homozigotos saudáveis e 2 para heterozigotos somados aos homozigotos mutantes, de acordo com o número de alelos menores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Gene variants associated with venous thrombosis: a replication study in a multicenter Brazilian study

Romano, A.V.C.; Barnabé, A.; Gadelha, T.B.; Campanate, G.C.; Guerra, J.C.C., Wolosker, N; Secolin, R.; Annichino-Bizzacchi, J.M.

Gene variants associated with venous thrombosis: a replication study in a multicenter Brazilian study

¹Anna Virgínia Calazans Romano, ¹Aline Barnabé, ²Rodrigo Secolin, ³Telma Barbosa Gadelha, ³Gizele de Castro Sousa Campanate; ⁴João Carlos de Campos Guerra, ⁵Nelson Wolosker; ¹Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

¹University of Campinas-Unicamp, Hematology and Hemotherapy Center, Campinas, Brazil;

²University of Campinas-Unicamp, Faculty of Medical Sciences, Hematology and Hemotherapy Center, Campinas, Brazil;

³Federal University of Rio de Janeiro, Hematology, Rio de Janeiro, Brazil;

⁴Israelite Hospital Albert Einstein, Clinical Pathology, São Paulo, Brazil,

⁵Israelite Hospital Albert Einstein, Vascular Surgery, São Paulo, Brazil,

Keywords: GWAS, Genetic association, TEV, SNP, Single Nucleotide Polymorphism, Venous Thromboembolism, Pulmonary embolism, Thrombosis

Corresponding author: *joyce@unicamp.br*

ABSTRACT

Introduction: Single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with VTE risk have been identified in European and American populations.

Objectives: Replicate SNPs associated with VTE in a multicenter Brazilian case-control study. Evaluate the correlation between some SNPs and the plasmatic activity of coagulation factors and inhibitors in a subgroup of patients.

Material/Methods: Patients with previous VTE assisted in thrombophilia outpatient clinics of 3 centers of the southeastern Brazilian region (Blood Center of UNICAMP, Campinas-SP / Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro-RJ / Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo-SP), from 2009 to 2013; normal controls of the same geographic region, matched by age and sex. Exclusion criteria were age below 18 and higher than 60 years, history of cancer in the last 5 years, antiphospholipid antibodies, renal, hepatic, inflammatory or myeloproliferative disease, protein C, protein S and antithrombin deficiency, homozygosity for FV Leiden, or G20210A polymorphism in the prothrombin gene.

We evaluated 29 SNPs associated with VTE risk in other populations, and 90 SNPs for stratification analysis of the population. Due to the high miscigenation of the Brazilian population and lack of previous studies, the calculation of the sample power was performed after genotyping. Coagulation factors (FV, FVIII, FXI, FvW), antithrombin, protein C and S were quantified for correlation with corresponding SNPs in samples of the Blood Center of Unicamp.

The sample size calculation was performed using the GPOWER v. 3.1 software. The allelic frequency and Hardy-Weinberg equilibrium were estimated BY PLINK v. 1.07 software. The analysis of association and *odds ratio* were estimated by logistic regression and the results were adjusted for multiple tests using Bonferroni correction. The evaluation of the similarity of the genetic structure of the cases and controls was performed by Amova (ARLEQUIN v 3.5.1.2 software).

The association between coagulation factors and natural anticoagulants levels and genetic results were investigated using a linear regression model, as implemented in

the SPSS software where the genotypes were coded as 1 for healthy homozygotes and 2 heterozygotes added to the mutant homozygotes, according to the number of minor alleles.

Results: In this case-control study, 436 cases and 430 controls were included, and it was demonstrated that this sample has a statistical power to detect a genetic association of 79,4%. AMOVA showed that the genetic variability between the groups was 0.0% and, 100% in each group. None of the SNPs showed association with DVT in our population.

Conclusions: In a multicentre Brazilian case-control study with adequate sample power, with high genetic variability but without stratification between groups, there was no replication of SNPs associated with VTE. The high miscegenation of the Brazilian population may be responsible for these results, emphasizing the influence of the population genetic structure in association studies.

INTRODUCTION

VTE is a multicausal disease with an annual incidence about 1% [1], associated with both environmental and genetic risk factors [2].

SERPINC1, PROC, PROS1, F5, F2, ABO and FGG were well-established susceptibility genes to VTE. The first three encoded for AT, PS and PC and are associated to deficiency of these natural anticoagulants [5–7]. Although associated to a high risk of thrombosis, these deficiencies are relatively rare. The other genes are associated to more frequent polymorphisms but to a lower risk of VTE (FV Leiden, F2 G20210A, A1 and B blood group, and fibrinogen, respectively) [3].

The HapMap project and the introduction of Genome Wide Association Study (GWAS) strategy allowed the possibility to identify genetic alterations associated to complex diseases [4]. This encouraged the search for additional genetic factors that could contribute to the knowledge of the widespread clinical heterogeneity of VTE.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) associated with VTE was based on the analysis of million of SNPs in prospective population studies, case-control, and cohorts of patients and families. Many loci have been robustly demonstrated to harbor common and low frequency susceptibility alleles. However, these GWAS studies included only European-ancestry adults from French and Dutch case-control studies, and cohort and case-control studies from the United States, and mostly of Caucasian ethnicity [5-27].

The present study was the first to evaluate SNPs associated with VTE in a Brazilian population.

OBJECTIVE

We sought to replicate 29 SNPs previously associated with VTE risk, in a multicenter study covering 3 Brazilian centers of southeastern region. We also evaluated the correlation between SNP genotyping and activity of corresponding coagulation parameter in samples of participants of one of the centers.

METHODS

SELECTION OF STUDY PARTICIPANTS

All participants provided written informed consent and the study protocol was approved by the institutional Research Ethics Committee (CAAE: 07970212.2.0000.5404).

This is a multicenter case-control study including outpatients and controls from southeastern region of Brazil. Cases were Caucasian or African descendent unrelated patients with a previous diagnosis of deep venous thrombosis (DVT) of the lower limb or pulmonary embolism (PE). They were consecutively recruited from Thrombophilia Clinic of Blood Center of the State University of Campinas (Hemocentro / UNICAMP) in Campinas-SP, Thrombophilia Clinic of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) in Rio de Janeiro-RJ, and Thrombophilia Clinic of the Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), in São Paulo-SP, from 2009 to 2013. Controls were Brazilian individuals without a history of VTE, from the same geographical area of the cases, matched by age and sex. Control subjects did not have blood relationship with the participating patients.

Two investigators in each center interviewed all individuals and collected information using structured questionnaire. For patients, information regarding sex, age at VTE event, risk factors for VTE (prolonged immobilization, local trauma, hospitalization, long air or road travel 30 days before the VTE episode, surgery, cancer, use of oral contraceptive or hormonal replacement therapy, pregnancy, puerperium, central venous catheter, nephrotic syndrome, personal or familial history of thrombosis, antiphospholipid syndrome), thrombosis site were collected.

The inclusion criteria were age between 18 and 60 years and confirmed diagnosis of DVT by Doppler ultrasonography and PE by angiotomography, angioressonance or ventilation/perfusion lung scan.

The exclusion criteria were VTE related to cancer, antiphospholipid syndrome, renal, liver or autoimmune disease, and hereditary thrombophilia (deficiency of protein C –

PC, protein S – PS, antithrombin – AT, FV Leiden and F2 20210A homozygosity or double heterozygosity).

For controls, information regarding sex, age at data collection, clinical comorbidities, use of oral contraceptive or hormonal replacement therapy, pregnancy and surgical history, medicine intake including acetylsalicylic acid were collected.

Exclusion criteria for controls were personal or familial history of cardiovascular or VTE episode, non-thrombotic antiphospholipid syndrome, renal, liver or autoimmune disease, and hereditary thrombophilia.

SNP SELECTION

Twenty-nine SNPs were selected because of previous association with VTE irrespective of ethnicity or country of origin [5-25], described in detail in table 1. In order to represent variability across candidate genes, we perform a systematically SNPtag selection using SNPBROWSE™ v.4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), based on the International HapMap Project (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), a minimum allele frequency (MAF) > 0.05, and a pairwise linkage disequilibrium (LD) of $r^2 > 0.8$ (table 1). Indeed, those SNPs were previously tested by manufacturer and showed a good quality performance.

Furthermore, we used an additional 90 SNPs for population stratification analysis. Previous studies showed that any number of SNPs greater than 65 is adequate to evaluate population stratification. However, since the human genome contains a high density of SNPs, we developed a bioinformatics pipeline to select randomly SNPs for the population stratification analysis. Briefly, using the International HapMap Project, a SNP frequency vector was built based on the following parameters: MAF>0.05, and minimum distance between two SNPs = 300 kb, which avoid possible LD [26]. In the next step, the pipeline uses the sample function in R software v.3.2.3 (<http://www.r-project.org>) to select randomly the 90 SNPs from the SNP frequency vector. We concentrated SNP selection on chromosomes 2, 7, 10, 15 and 22 [27].

Table 1 - Selected SNPs

Locus	SNP	Alleles*	OR	Global MAF
NME7	rs16861990	A / C	2.02 (1.66-2.45) / 1.79 (not p)	0.062
F5	rs2420371	A / G	1.39 (1.17-1.64) / 1.44 (1.07-1.93)	0.031
SERPINC1	rs2227589	A / G	1.29 (1.10-1.49) / 1.24 (1.05-1.47)	0.129
C4BPB	rs3813948	A / G	1.24 (1.00-1.53)	0.123
STAB2	rs4981021	A / G	1.29 (1.24-1.46)	0.322
SCARA5	rs9644133	C / T	1.12 (not provided)	0.241
BAI3	rs9363864	A / G	0.58 (0.42–0.80)	0.334
STAB2	rs4981022	C / T	0.97 (0.74-1.27) / 1.29 (not p)	0.249
STXBP5	rs1039084	A / G	1.11 / 0.78 (0.65-0.93)	0.457
SCARA5	rs2726953	C / T	0.78 (0.65-0.93)	0.263
STX2	rs7978987	A / G	1.01 (0.83-1.22)	0.286
vWF	rs1063857	C / T	1.15 (not provided)	0.336
TC2N	rs1884841	C / T	1.17 (0.92-1.50) / 1.27 (0.94-1.72)	0.479
CLEC4M	rs868875	A / G	1.07 (0.67-1.72)	0.208
SERPINF2	rs8074026	C / T	-	0.279
SLC44A2	rs2288904	C / T	1.19 (1.12-1.26) / 1.28 (1.16-1.40)	0.183
GP6	rs1613662	A / G	0.86 (0.70-1.06) / 1.15 (not p)	0.157
GCKR	rs1260326	C / T	-	0.293
EDEM2	rs6120849	C / T	-	0.157
PROCR	rs6088735	C / T	1.35 (1.19–1.54)	0.221
PROCR	rs867186	A / G	1.33 (1.11-1.60)	0.096
DNAJC6	rs1413885	C / T	-	0.218
BAZ1B	rs17145713	C / T	-	0.172
KNG1	rs710446	A / G	1.19 (1.07-1.34) / 1.20 (not p)	0.415
CYP4V2	rs13146272	A / C	1.22 (1.10-1.49) / 1.19 (1.07-1.32)	0.441
F11	rs2036914	C / T	1.33 (1.11-1.59) / 1.38 (not p)	0.394
F11	rs2289252	C / T	1.49 (1.25-1.76) / 1.33 (not p)	0.319
HIVEP1	rs169713	C / T	1.20 (1.13-1.27) / 1.11 (not p)	0.337
ABO	rs687621	C / T	1.52 (1.28-1.80)	0.381

*: reference/risk allele; OR: Odds Ratio from different studies; MAF: Minor Allele Frequency; Not P/Provided: confidence interval [C.I.] 95% information was not provided by the author.

GENOTYPING

The SNPs study was carried out by a high-performance genotyping Platform (taqman® Openarray genotype System - Applied biosystems), based on real-time PCR, and the plate used was 120 SNPs for 24 samples.

Genomic DNA was extracted and purified, using standard procedure [28] The concentration of the extracted DNA samples was determined in spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer). The DNA samples had A260/A230 and A260/A280 ratios from 1.8 to 2.0; the concentrations of the samples were adjusted to 50 ng/μl.

DNA analysis for both, factor V Leiden (G1691A) and the prothrombin (G20210A) polymorphism was performed using a polymerase chain reaction (PCR) method using a TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The OpenArray TaqMan assays for genotyping were performed using the QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) according to the manufacturer's recommended operating guideline. DNase/RNase-free distilled water was used in each assay as a non-template control (NTC).

The genotype data were analyzed using the OpenArray® SNP Genotyping Analysis software (version 1.0.5) (Applied Biosystems, CA, USA).

QUANTIFICATION OF COAGULATION FACTORS AND INHIBITORS

The quantification of coagulation factors FV, FVIII, FXI, vWF, and protein S, protein C and antithrombin were performed to correlate with the genotyping of the corresponding SNPs. Fasting blood was collected in citrate tube and separated plasma was stored at - 80 °C until its use.

AT and PC activity were performed using Liquid Antithrombin kit and PC kit, IL®, respectively (Instrumentation Laboratory, Werfen Company, Bedford, USA).

Quantitative determinations of free PS levels were performed using an immunoturbidimetric assay (Free Protein S kit, IL[®], Instrumentation Laboratory, Werfen Company, Bedford, USA).

Coagulation activity of FV, FVIII and FXI were determined in ACL TOP 500 using a coagulation test with respectives Factor V, Factor VIII, and FXI deficient plasma (IL[®], Werfen Company, Bedford, EUA).

Quantitative determination of vWF antigen (vWF: Ag) was performed in ACL TOP 500 by enzyme-linked immunosorbent assay, using HemosIL, IL[®], Werfen Company, Bedford, EUA).

STATISTICAL ANALYSIS

We evaluated the allele frequency of genotyped SNPs in terms of Hardy-Weinberg equilibrium (p -value > 0.05), MAF > 0.05 and pairwise LD ($r^2 > 0.8$) by HAPLOVIEW v.4.2 software [29].

In order to evaluate whether population substructure is similar, we performed the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) by ARLEQUIN v3.5.1.2 software [30], using the 90 additional SNPs as factors in the analysis. The AMOVA partitions the source of genetic variance into two components: within-groups, between-groups, and measures the population differentiation due to genetic structure by the fixation index (F_{st}). We considered $F_{st} < 0.05$ as the absence of population stratification [27], as well as the between-groups variance component $< 0.7\%$, because this value was the smallest one found when comparing populations within regions worldwide [31].

The statistical power to detect genetic associations was determined from the *post hoc* statistical power of the sample in the software GPOWER [32] with the following parameters: logistic regression test; two-tailed; OR = 1.4; $\alpha = 0.002$ (corrected for multiple testing using the Bonferroni correction); and $n = 875$.

The associations of coagulation factors and natural anticoagulants levels with specific SNPs were investigated using a linear regression model, as implemented in the SPSS

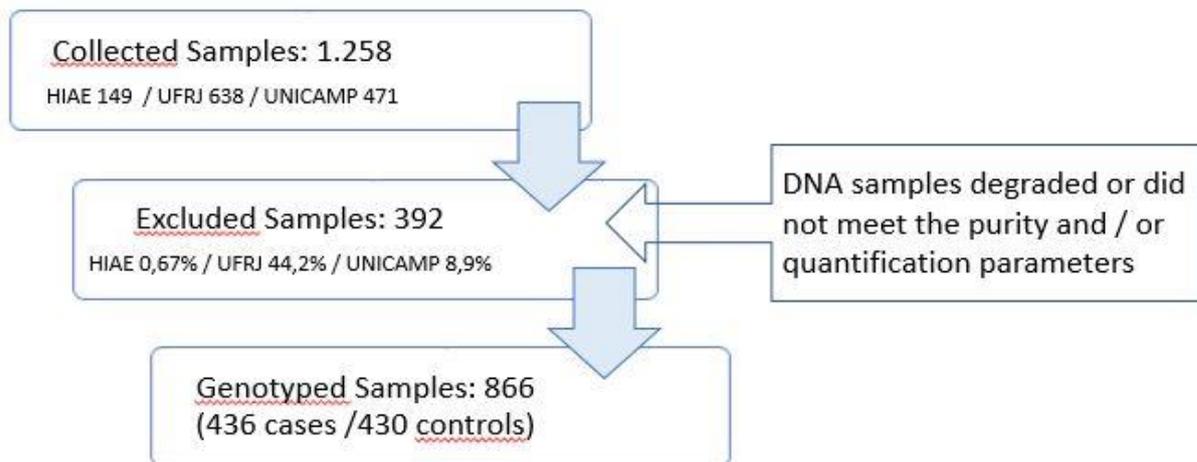
software where the genotypes were coded as 1 for healthy homozygous and 2 heterozygous plus the mutant homozygous, according to the number of minor alleles.

RESULTS

STUDY POPULATION

In this case-control study, patients and controls of both sexes aged between 18 and 60 years were included.

In the period from 2009 to 2013, 1258 samples of participants were collected, of which 149 were from HIAE, 638 were from UFRJ and were 471 from Unicamp. Of these, 392 samples were disregarded because they did not meet the purity and / or DNA quantification standards



CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS

436 cases and 430 controls from 2009 to 2013, were recruited in 3 Brazilian centers:

Thrombophilia Clinic of Blood Center of the State University of Campinas (Hemocentro / UNICAMP): 206 cases, 230 controls;

Thrombophilia Clinic of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ): 134 cases, 148 controls;

Thrombophilia Clinic of the Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE): 96 cases, 52 controls. This sample has a statistical power to detect a genetic association of 79.4%.

The age and sex of patients and controls, separated by each center of study, are shown in Table 2.

Table 2 - Characteristic of patients and controls, separated by each center of study

	HIAE		Unicamp		UFRJ	
	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls
	(n= 96)	(n= 52)	(n=206)	(n=230)	(n=134)	(n=148)
Men, <i>n</i> (%)	46 (47.92%)	27 (51.92%)	61 (29.61%)	65 (28.26%)	48 (35.82%)	55 (37.16%)
Age mean, <i>y</i>	41 *	42	42*	40	38*	40

*For patients, age at VTE

n = number of participants

HIAE = Hospital Israelita Albert Einstein

UNICAMP = State University of Campinas

UFRJ = Federal University of Rio de Janeiro

Of the 96 HIAE patients, 48.8% had spontaneous VTE and 60.4% were located only in the lower limbs. Of the associated risk factors, immobilization stands out with 26.4% of cases

25.2% of the 206 Unicamp patients had spontaneous VTE and 84.5% were located only in the lower limbs. Among the associated risk factors, oral contraceptive intake has the highest index, with 40.3% of cases.

Among the 134 UFRJ patients, 66.4% had spontaneous VTE, 85.8% of which were located in the lower limbs. The risk factor with the greatest association to the event was surgery, with 28.9% of the cases.

The clinical characteristics of patients are shown in Table 3.

Table 3 - Clinical characteristics of patients

	HIAE	Unicamp	UFRJ
Lower limbs	58 (60.4%)	174 (84.5%)	115 (85.8%)
Pulmonary Embolism - PE	16(16.7%)	21 (10.2%)	18 (13.4%)
Lower limbs associated with PE	22 (22.9%)	11 (5.3%)	1 (0.7%)
Spontaneous	43 (44.8%)	52 (25.2%)	89 (66.4%)
Provoked VTE	53 (55.2%)	154 (74.8%)	45 (33.6%)
Hormonal contraceptive Hormone replacement therapy	10 (18.9%)	62 (40.3%)	2 (4.4%)
Surgery	4 (7.5%)	34 (22.1%)	13 (28.9%)
Pregnancy/Puerperium	4 (7.5%)	36 (23.4%)	6 (13.3%)
Trauma	12 (22.6%)	7 (4.5%)	9 (20%)
Immobilization	14 (26.4%)	8 (5.2%)	12 (26.7%)
Travel	9 (17%)	7 (4.5%)	3 (6.7%)

STRATIFICATION ANALYSIS

The SNP average genotypes call rate was 99.7% (standard deviation = 4.7%) in the candidate genes and 99.4% (standard deviation = 12.2%) for SNPs used in the stratification analysis.

ASSOCIATION ANALYSIS OF SNPs WITH VTE RISK

Among the 29 SNPs genotyped in the candidate genes, four SNPs (rs2227589, rs169713, rs687621, rs2288904) in the cases and four SNPs in the controls (rs2726953, rs687621, rs1884841, rs868875) did not follow the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and were excluded. None of the SNPs failed frequency test (MAF <0.05) (Table 4). With these results we excluded SNPs without Hardy-Weinberg equilibrium in the controls.

Table 4 - Presented HWE in case and controls and MAF for each SNPs. Seven SNPs were not in HWE

<i>SNP</i>	<i>Gene</i>	<i>Chr.</i>	<i>HWE Cases</i>	<i>HWE Controls</i>	<i>HWE Total</i>	<i>MAF%</i>
rs1413885	DNAJC6	1	0,3598	0,2784	0,8875	0,4568
rs16861990	NME7	1	0,5585	0,2212	0,1969	0,3218
rs2420371	F5	1	0,7807	1	1	0,1005
rs2227589*	SERPINC1	1	0,01876	0,4754	0,2597	0,2208
rs3813948	C4BPB	1	0,1947	0,4376	0,7832	0,2583
rs1260326	GCKR	2	0,3104	0,1946	0,102	0,4439
rs710446	KNG1	3	0,7599	0,7697	0,6221	0,4833
rs13146272	CYP4V2	4	0,2066	0,5986	0,6413	0,3446
rs2036914	F11	4	1	0,2244	0,3802	0,404
rs2289252	F11	4	0,7199	0,9096	0,869	0,3073
rs169713*	HIVEP1	6	0,01995	0,2999	0,4549	0,2081
rs9363864	BAI3	6	0,6818	0,6087	0,8853	0,4173
rs1039084	STXBP5	6	0,08157	0,2322	0,8301	0,4369
rs17145713	BAZ1B	7	0,3928	0,4771	0,2389	0,3911
rs2726953**	SCARA5	8	0,2058	0,01769	0,0142	0,08067
rs9644133	SCARA5	8	0,5652	0,1492	0,1455	0,237
rs687621* **	ABO	9	0,01406	0,0313	0,0008949	0,4727
rs1063857	VWF	12	0,622	1	0,6404	0,1846
rs4981022	STAB2	12	0,4788	0,6255	0,9439	0,4821
rs4981021	STAB2	12	0,8199	0,7467	1	0,3389
rs7978987	STX2	12	0,7266	0,5844	0,9365	0,3294
rs1884841**	TC2N	14	0,8147	0,004088	0,0266	0,3113

rs8074026	SERPINF2	17	0,8206	0,2692	0,4766	0,3303
rs868875**	CLEC4M	19	0,5892	0,04017	0,06269	0,3846
rs2288904*	SLC44A2	19	0,04182	0,1167	0,8097	0,1783
rs1613662	GP6	19	0,6439	0,3756	0,8106	0,3286
rs6120849	EDEM2	20	0,6115	1	0,6722	0,4623
rs6088735	PROCR	20	0,4411	0,1251	0,6509	0,2639
rs867186	PROCR	20	0,4672	0,72	0,395	0,2901

SNPs not following Hardy-Weinberg equilibrium in cases (*) and in controls (**).

Ch, chromosome; HWE Hardy-Weinberg equilibrium; MAF, minor allele frequency.

AMOVA results showed a $F_{st} < 0.05$ over all loci, and a between-groups variance component of 0.0%, indicating that the two groups did not present differences in genetic structure between each other. These results indicated no population stratification (table 5).

Table 5 - Analysis of molecular variance (AMOVA)

Source of Variation	Sum of Squares	Variance Components	Percentage Variation
Among Populations	14.191	-0.00089	-0.00597
Within populations	24.020.005	1.491.077	10.000.597
Total	24.034.196	1.490.988	

Our replication results showed that none of the 25 candidate SNPs were associated with VTE risk in this Brazilian population. Results of the association analyses are reported in table 6.

Table 6 – Results of logistic regression

SNP	Gene	Chr	p - Value	OR (95%)	Beta
rs1413885	DNAJC6	1	0.8326	0.97 (0.81-1.19)	-0.2114
rs16861990	NME7	1	0.7783	0.97 (0.79-1.19)	-0.2815
rs2420371	F5	1	0.8701	0.97 (0.70-1.35)	-0.1635
rs2227589	SERPINC1	1	0.7179	1.04 (0.83-1.31)	0.3612
rs3813948	C4BPB	1	0.6074	1.06 (0.85-1.33)	0.5138
rs1260326	GCKR	2	0.1021	1.18 (0.97-1.45)	1.635
rs710446	KNG1	3	0.2365	0.88 (0.73-1.08)	-1.184
rs13146272	CYP4V2	4	0.1545	0.86 (0.70-1.06)	-1.424
rs2036914	F11	4	0.8942	1.01 (0.83-1.23)	0.133
rs2289252	F11	4	0.7541	0.96 (0.78-1.20)	-0.3133
rs169713	HIVEP1	6	0.8959	0.98 (0.77-1.26)	-0.1309
rs9363864	BAI3	6	0.6209	1.25 (1.03-1.53)	2.244
rs1039084	STXBP5	6	0.7562	1.03 (0.85-1.26)	0.3104
rs17145713	BAZ1B	7	0.5033	0.93 (0.76-1.14)	-0.6693
rs9644133	SCARA5	8	0.3685	0.90 (0.72-1.13)	-0.8993
rs1063857	VWF	12	0.5455	1.08 (0.84-1.39)	0.6046
rs4981022	STAB2	12	0.6194	0.95 (0.78-1.16)	-0.4967
rs4981021	STAB2	12	0.7009	0.96 (0.78-1.18)	-0.3841
rs7978987	STX2	12	0.5746	0.94 (0.77-1.16)	-0.5613
rs8074026	SERPINF2	17	0.9083	1.01 (0.86-1.23)	0.1152
rs2288904	SLC44A2	19	0.4278	1.11 (0.86-1.44)	0.793
rs1613662	GP6	19	0.9988	1.00 (0.81-1.23)	0.001454
rs6120849	EDEM2	20	0.5842	1.05 (0.87-1.29)	0.5473
rs6088735	PROCR	20	0.5641	1.06 (0.86-1.33)	0.5768
rs867186	PROCR	20	0.5256	1.07 (0.86-1.34)	0.6348

Chr: chromosome

CORRELATION BETWEEN SNPs AND PLASMA ACTIVITY OF COAGULATION FACTORS AND NATURAL ANTICOAGULANTS

Our results of quantification of coagulation factors and inhibitors are presented in Table 1 and Table 2 from supporting material. We could not demonstrate any association of the 20 SNPs that were associated with plasma levels of coagulation factors and inhibitors in other population.

DISCUSSION

A central goal of human genetics is to identify genetic risk factors for common, complex diseases. In the last years, GWAS studies provided the identification of genetic risk factors for VTE that are common in the population.

Some of these SNPs were located in genes that encode proteins associated with coagulation and hemostasis, like receptor glycoprotein VI (GP6), AT (SERPINC1), PC receptor (PROCR), F11 and F5. There are SNPs in genes associated to protein involved in pathways associated to DVT, like HIVEP1 and GCR. Otherwise, some SNPs are functional variants and others may only be markers in linkage disequilibrium (LD) with functional variants that are still to be identified, like MYH7B, EDEM2, BAZ1B.

It is important to note that although SNPs are the most frequent genetic variation in the human genome, the majority has a minimal biological impact and confer a modest increase of disease risk [33], and this is not different for VTE.

GWAS that identified SNPs linked to VTE included predominantly white populations, and only one study included Blacks [18]. We performed the first case-control study in a Brazilian miscigenous population, with the aim to replicate some of these SNPs previously demonstrated in other populations. Our replication results showed that none of the 25 candidates SNPs were associated with VT risk in this Brazilian population.

Brazil is a genetically trihybrid population, with the genomic inheritance of European, African and Amerindian groups. The ethnic distribution in Brazil follows a geographical pattern, with European influence more prevalent in the southeast and south, African in the northeast, and Amerindian in the north. The South region received successive migration cycles of Europeans during the 16th (Portuguese) and 19th (Germans and Italians) centuries. The majority of African slaves arrived and settled in Brazil's northeast and southeast before moving to other Brazilian regions. [34]. The patients and controls of this study are residents from Brazilian states of the southeast region.

Because of the large genomic variation between populations, we could expect the replication in populations of different ancestry. A SNP identified in a study with a sufficient sample size and replicated in an independent dataset from the same population, confirm the effect in the GWAS target population [35]. However, reviews of literature based on associations between SNPs and VTE were not always robustly

confirmed in studies aimed for replication, even in the same population [15, 17, 19, 36].

On the other side, failure to replicate in a different population do not necessarily invalidate the original study and suggest that the SNP has an ethnic-specific effect.

Austin *et al.*, (2011) evaluated 10 SNPs identified in three European case-control studies as risk factors for VTE in White and Black Americans. Some SNPs were replicated in Whites, but among Blacks the association with F11 SNPs were not confirmed, after adjustment for multiple comparisons. In this setting, we correctly performed Bonferroni correction in our analysis [37].

An important point is the relation of one SNP with another established genetic factor. In a case-control study, [38] described association of VTE with four SNPs (ATP1B1, NME7, BLZF1, and SLC19A2). However, after a replication study and controlling for FV Leiden (F5 rs6025), showed that no additional information over that provided by patients characteristics and F5 rs6025 T alone could be added. They found that FV Leiden is inherited as a haplotype block that spans seven genes on chromosome 1q24.2, including those that have been associated with VTE risk, like ATP1B1, NME7, BLZF1, C1orf114, SLC19A2, F5 and SELP.

Phenotype comparable to those reported in the initial study should be used in all replication studies. Our patients presented phenotype very similar to those described in the original studies, including VTE of the lower limb and PE. This is another strength of our study.

The possibility of differences in selection criteria when compared to other European and American studies would have prevented us from confirming in our study the association of some of the SNPs with VTE risk. MARTHA cases are patients referred to thrombophilia centers generally younger than FARIVE cases, which were recruited from the general population [11, 13]. In addition, MARTHA population was enriched with Factor V Leiden or FII G20210A mutations, 50% in cases and 41% in controls, compared to 18% and 8% in FARIVE, respectively. All three centers that selected patients to our study were thrombophilia reference centres. Indeed, one of the exclusion criteria of our study was the FV Leiden and F2 20210A hetero/homozygosity or double heterozygosity.

Lack of reproducibility of genetic associations can be attributed to lack of comparability between cases and controls, that increases the risk of biases because there can be heterogeneity in exposure to environmental challenges and population stratification, particularly in admixed populations [35, 39, 40].

In our study, we beware about these critical points and included patients and controls of the same geographical area. We genotyped 90 SNPs to exclude stratification of the population analyzed and our results confirmed that the two groups had similar genetic structures, which allowed us to perform an unbiased genetic association analysis.

Small sample size is a frequent problem and can result in insufficient power to detect minor contributions of one or more alleles. We calculated our sample size according to previous studies that described OR around 1.4. Our sample size presented 79,4% of statistical power to detect genetic association, with an OR of 1.4. When we analyse the results of previous studies in populations of European ancestry, we observed a large variation in OR (17, 24). All of our results showed an OR < 1.4, and our study was underpowered to determine whether some association between the SNPs and DVT exist in our population.

Otherwise, even our results had limited power because the allele frequency of the SNPs were lower than expected, they highlight the weak effect on thrombosis, with relative risks lower than 1.1. Eighty-eight percent of them were under 1,1 and our results emphasize that these risk factors have no clinical utility.

Although we have attention to many of important points for a replication study, we consider this the more limitant factor of our study.

The search for SNPs influencing the plasma variability of coagulation factors and inhibitors is interesting. The SNPs can explain about 10% to 20% of variance in protein C levels (PROCR rs867186 and rs6088735), and to a lesser extend the variability of the FVIII and vWF (BAI3, STAB2, CLEC4M, SCARA5, STXBP5 and TC2N locus) and FXI. However, even with large samples, association with SNPs previously associated with levels of some of theses hemostatic factors could not be demonstrated. One possibility for this discrepancy was underpowered sample or different plasma assay, associated to a greater dispersion when compared to other studies [14, 24, 37].

We had restricted available samples from Unicamp patients to evaluate the correlation between SNP genotyping and activity of some coagulation parameter. It has limited the analysis when they were separated according to the allele frequency. Although some of them showed a pattern similar to that described in previous studies, there is no statistical significance (Factor VIII rs4981021 and rs9363864; von Willebrand Factor rs868875).

CONCLUSIONS

We compared VTE and control populations, who presented genetically similar and found different results in SNPs association study with VTE when compared to literature. Brazilian's population genetic heterogeneity probably explains this result, highlighting the influence of population's genetic structure in association studies.

In a multicentre Brazilian case-control study with adequate sample power, with high genetic variability but without stratification between groups, there was no replication of SNPs associated with VTE. The high miscegenation of the Brazilian population may be responsible for these results, emphasizing the influence of the population genetic structure in association studies.

This was the first study that evaluated SNPs associated with TEV in the Brazilian population.

The group and the VTE group did not present genetic differences regarding ancestry.

There was no association of candidate SNPs with VTE in the Brazilian population.

There was no correlation between coagulation factors and natural anticoagulants, with genotyped SNPs

REFERENCES

1. Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Buller H, Gallus A, Hunt BJ, Hylek EM, Kakkar A, Konstantinides SV, McCumber M, Ozaki Y. Thrombosis: a major

- contributor to global disease burden. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014 Nov;34(11):2363-71.
2. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet*. 1999 Apr 3;353(9159):1167-73.
 3. Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *ASH Education Program Book*. 2005 Jan 1;2005(1):1-2.
 4. The international HapMap project. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):789.
 5. van der Meer FJ, Koster T, Vandenbroucke JP, Briet E, Rosendaal FR. The Leiden thrombophilia study (LETS). *Thrombosis and haemostasis*. 1997 Jun;78(01):631-5.
 6. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *Jama*. 2005 Feb 9;293(6):715-22.
 7. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, Catanese J, Young BA, Reitsma PH, Devlin JJ, Rosendaal FR. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *Jama*. 2008 Mar 19;299(11):1306-14.
 8. Li Y, Bezemer ID, Rowland CM, Tong CH, Arellano AR, Catanese JJ, Devlin JJ, Reitsma PH, Bare LA, Rosendaal FR. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2009 Nov;7(11):1802-8.
 9. Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasy L, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Jul 1;24(7):1321-5.
 10. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Garí M, Martínez E, Mateo J, Stone WH, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation*. 2000 Apr 4;101(13):1546-51.

11. Buil A, Trégouët DA, Souto JC, Saut N, Germain M, Rotival M, Tiret L, Cambien F, Lathrop M, Zeller T, Alessi MC. C4BPB/C4BPA is a new susceptibility locus for venous thrombosis with unknown protein S-independent mechanism: results from genome-wide association and gene expression analyses followed by case-control studies. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4644-50.
12. Athanasiadis G, Buil A, Souto JC, Borrell M, López S, Martinez-Perez A, Lathrop M, Fontcuberta J, Almasy L, Soria JM. A genome-wide association study of the Protein C anticoagulant pathway. *PloS one*. 2011 Dec 28;6(12):e29168.
13. Morange PE, Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Antoni G, Alessi MC, Bertrand M, Dupuy AM, Letenneur L, Lathrop M. KNG1 Ile581Thr and susceptibility to venous thrombosis. *Blood*. 2011 Mar 31;117(13):3692-4.
14. Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Kallel C, Zelenika D, Lathrop M, Trégouët DA, Morange PE. Genome wide association study for plasma levels of natural anticoagulant inhibitors and protein C anticoagulant pathway: the MARTHA project. *British journal of haematology*. 2012 Apr;157(2):230-9.
15. Houlihan LM, Davies G, Tenesa A, Harris SE, Luciano M, Gow AJ, McGhee KA, Liewald DC, Porteous DJ, Starr JM, Lowe GD. Common variants of large effect in F12, KNG1, and HRG are associated with activated partial thromboplastin time. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 Apr 9;86(4):626-31.
16. Antoniak M, Pugliatti M, Hubbard R, Britton J, Sotgiu S, Sadovnick AD, Yee IM, Cumsille MA, Bevilacqua JA, Burdett S, Stewart L. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. 2003;22(6):316-25.
17. Germain M, Saut N, Greliche N, Dina C, Lambert JC, Perret C, Cohen W, Oudot-Mellakh T, Antoni G, Alessi MC, Zelenika D. Genetics of venous thrombosis: insights from a new genome wide association study. *PloS one*. 2011 Sep 27;6(9):e25581.

18. Tang W, Basu S, Kong X, Pankow JS, Aleksic N, Tan A, Cushman M, Boerwinkle E, Folsom AR. Genome-wide association study identifies novel loci for plasma levels of protein C: the ARIC study. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):5032-6.
19. Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5298-303.
20. Morange PE, Bezemer I, Saut N, Bare L, Burgos G, Brocheton J, Durand H, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P. A follow-up study of a genome-wide association scan identifies a susceptibility locus for venous thrombosis on chromosome 6p24. 1. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 Apr 9;86(4):592-5.
21. Antoni G, Morange PE, Luo Y, Saut N, Burgos G, Heath S, Germain M, Biron-Andreani C, SCHVED JF, Pernod G, Galan P. A multi-stage multi-design strategy provides strong evidence that the BAI3 locus is associated with early-onset venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010 Dec;8(12):2671-9.
22. Breteler MM, Van Den Ouweland FA, Grobbee DE, Hofman A. A community-based study of dementia: the Rotterdam Elderly Study. *Neuroepidemiology*. 1992;11(Suppl. 1):23-8.
23. Psaty BM, O'donnell CJ, Gudnason V, Lunetta KL, Folsom AR, Rotter JI, Uitterlinden AG, Harris TB, Witteman JC, Boerwinkle E. Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium: Design of prospective meta-analyses of genome-wide association studies from 5 cohorts. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2009 Feb;2(1):73-80.
24. Smith NL, Chen MH, Dehghan A, Strachan DP, Basu S, Soranzo N, Hayward C, Rudan I, Sabater-Lleal M, Bis JC, de Maat M. Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE Consortium. *Circulation*. 2010 Mar 30;121(12):1382.

25. Antoni G, Oudot-Mellakh T, Dimitromanolakis A, Germain M, Cohen W, Wells P, Lathrop M, Gagnon F, Morange PE, Trégouët DA. Combined analysis of three genome-wide association studies on vWF and FVIII plasma levels. *BMC medical genetics*. 2011 Dec;12(1):102.
26. Turakulov R, Easteal S. Number of SNPS loci needed to detect population structure. *Hum Hered*. 2003; 55(1):37±45. PMID: 12890924.
27. Baye TM. Inter-chromosomal variation in the pattern of human population genetic structure. *Hum Genomics*. 2011 May; 5(4):220±40. doi: 10.1186/1479-7364-5-4-220 PMID: 21712187.
28. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
29. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15; 21(2):263±5. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457 PMID: 15297300.
30. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010 May; 10(3):564±7. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x PMID: 21565059.
31. Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, et al. Genetic structure of human populations. *Science*. 2002 Dec 20; 298(5602):2381±5. doi: 10.1126/science.1078311 PMID:12493913.
32. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G* Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior research methods*. 2009 Nov 1;41 (4): 1149-60.
33. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010 Oct;467(7319):1061.
34. Passos-Bueno MR, Bertola D, Horovitz DD, de Faria Ferraz VE, Brito LA. Genetics and genomics in Brazil: a promising future. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2014 Jul;2(4):280-91.

35. Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, Hirschhorn JN, Abecasis G, Altshuler D, Bailey-Wilson JE, Brooks LD. Replicating genotype–phenotype associations. *Nature*. 2007 Jun 6;447(7145):655.
36. Trégouët DA, Delluc A, Roche A, Derbois C, Olaso R, Germain M, De Andrade M, Tang W, Chasman DI, van Hylckama Vlieg A, Reitsma PH. Is there still room for additional common susceptibility alleles for venous thromboembolism?. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016 Sep;14(9):1798-802.
37. Austin H, De Staercke C, Lally C, Bezemer ID, Rosendaal FR, Hooper WC. New gene variants associated with venous thrombosis: a replication study in White and Black Americans. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2011 Mar;9(3):489-95.
38. Heit JA, Armasu SM, Asmann YW, Cunningham JM, Matsumoto ME, Petterson TM, De Andrade M. A genome-wide association study of venous thromboembolism identifies risk variants in chromosomes 1q24. 2 and 9q. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2012 Aug;10(8):1521-31.
39. Tsai HJ, Kho JY, Shaikh N, Choudhry S, Naqvi M, Navarro D, et al: Admixture-matched case-control study: a practical approach for genetic association studies in admixed populations. *Hum Genet*. 2006. 118: 626e639.
40. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature genetics*. 2006 Aug;38(8):904.

SUPPORTING MATERIAL

Table 1 – Correlation between coagulation inhibitors and genotyped SNPs

Protein C			Protein S		
<i>rs867186</i>			<i>rs1413885</i>		
1 (31)	115,59	Mean	1 (5)	100,992	Mean
2 (8)	124,94		2 (34)	87,683	
Total (39)	117,51		Total (39)	89,389	
2x1	0,406	p value	2x1	0,166	p value
 <i>rs6088735</i>			 Anthrithrombin		
<i>rs2227589</i>			<i>rs2227589</i>		
1 (26)	117,30	Mean	1 (32)	109,222	Mean
2 (12)	115,03		2 (10)	107,910	
Total (38)	116,58		Total (42)	108,910	
2x1	0,818	p value	2x1	0,726	p value
 <i>rs17145713</i>					
1 (28)	115,12	Mean			
2 (11)	123,60				
Total (39)	117,51				
2x1	0,401	p value			
 <i>rs6120849</i>					
1 (30)	119,14	Mean			
2 (9)	112,07				
Total (39)	117,51				
2x1	0,513	p value			

Table 2 – Correlation between coagulation factors and genotyped SNPs

von Willebrand Factor			Factor V		
<i>rs1884841</i>			<i>rs2420371</i>		
1 (9)	5,060	Mean	1 (37)	98,586	Mean
2 (32)	5,196		2 (4)	90,450	
Total (41)	5,166		Total (41)	97,793	
2x1	0,200	p value	2x1	0,315	p value
<i>rs868875</i>			Factor VIII		
<i>rs4981021</i>			<i>rs4981021</i>		
1 (18)	5,1296	Mean	1 (21)	180,857	Mean
2 (23)	5,1951		2 (21)	153,286	
Total (41)	5,1663		Total (42)	167,071	
2x1	0,088	p value	2x1	0,088	p value
<i>rs1039084</i>			<i>rs9363864</i>		
1 (6)	5,179	Mean	1 (6)	131,920	Mean
2 (20)	5,164		2 (36)	172,930	
Total (41)	5,166		Total (42)	167,071	
2x1	0,905	p value	2x1	0,076	p value
<i>rs1063857</i>			<i>rs9644133</i>		
1 (17)	5,212	Mean	1 (26)	175,23	Mean
2 (15)	5,134		2 (16)	153,819	
Total (41)	5,166		Total (42)	167,071	
2x1	0,386	p value	2x1	0,202	p value
<i>rs4981022</i>			Factor XI		
<i>rs2289252</i>			<i>rs2289252</i>		
1 (23)	5,178	Mean	1 (15)	130,047	Mean
2 (15)	5,151		2 (26)	136,054	
Total	5,166		Total (41)	133,856	
2x1	0,763	p value	2x1	0,50362	p value
<i>rs7978987</i>			<i>rs2036914</i>		
1 (6)	5,192	Mean	1 (19)	135,942	Mean
2 (23)	5,162		2 (22)	132,055	
Total (41)	5,166		Total (41)	133,856	
2x1	0,812	p value	2x1	0,89815	p value
<i>rs2726953</i>			<i>rs13146272</i>		
1 (1)	5,071	Mean	1 (12)	133,667	Mean
2 (19)	5,169		2 (29)	133,934	
Total (41)	5,166		Total (41)	133,856	
2x1	0,734	p value	2x1	0,9776	

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antoni G, Morange PE, Luo Y, Saut N, Burgos G, Heath S, Germain M, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P. A multi-stage multi-design strategy provides strong evidence that the BAI3 locus is associated with early-onset venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010 Dec;8(12):2671-9.

Antoni G, Oudot-Mellakh T, Dimitromanolakis A, Germain M, Cohen W, Wells P, Lathrop M, Gagnon F, Morange PE, Trégouët DA. Combined analysis of three genome-wide association studies on vWF and FVIII plasma levels. *BMC medical genetics*. 2011 Dec;12(1):102.

Antoniak M, Pugliatti M, Hubbard R, Britton J, Sotgiu S, Sadovnick AD, Yee IM, Cumsille MA, Bevilacqua JA, Burdett S, Stewart L. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. 2003;22(6):316-25.

Ardlie KG, Lunetta KL, Seielstad M. Testing for population subdivision and association in four case-control studies. *The American Journal of Human Genetics*. 2002 Aug 1;71(2):304-11.

Athanasiadis G, Buil A, Souto JC, Borrell M, López S, Martinez-Perez A, Lathrop M, Fontcuberta J, Almasy L, Soria JM. A genome-wide association study of the Protein C anticoagulant pathway. *PloS one*. 2011 Dec 28;6(12):e29168.

Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *British journal of haematology*. 2008 Oct;143(2):180-90.

Barrett JC, Fry B, Maller JD, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2004 Aug 5;21(2):263-5.

Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Annals of human genetics*. 2006 Sep;70(5):658-65.

Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, Catanese J, Young BA, Reitsma PH, Devlin JJ, Rosendaal FR. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *Jama*. 2008 Mar 19;299(11):1306-14.

Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *Jama*. 2005 Feb 9;293(6):715-22.

Breteler MM, Van Den Ouweland FA, Grobbee DE, Hofman A. A community-based study of dementia: the Rotterdam Elderly Study. *Neuroepidemiology*. 1992;11(Suppl. 1):23-8.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999 Jul 8;234(2):177-86.

Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasy L, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Jul 1;24(7):1321-5.

Buil A, Trégouët DA, Souto JC, Saut N, Germain M, Rotival M, Tiret L, Cambien F, Lathrop M, Zeller T, Alessi MC. C4BPB/C4BPA is a new susceptibility locus for venous thrombosis with unknown protein S-independent mechanism: results from genome-wide association and gene expression analyses followed by case-control studies. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4644-50.

Bush WS, Moore JH. Genome-wide association studies. *PLoS computational biology*. 2012 Dec 27;8(12):e1002822.

Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *nature*. 2003 Apr 14;422(6934):835.

Criado PR, Rivitti EA, Vasconcellos C, Valente NY, Martins JE. Manifestações cutâneas das trombofilias Cutaneous manifestations of thrombophilia. *An Bras Dermatol*. 2008;83(6):491-506.

Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics*. 1999 Dec 1;55(4):997-1004.

Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics* 9. 2008;267–276.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. An integrated software package for population genetics data analysis. *Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland*. 2006.

Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G* Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior research methods*. 2009 Nov 1;41(4):1149-60.

Ferreira CN, Sousa MD, Dusse LM, Carvalho MD. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010 Sep;32(5):416-21.

Germain M, Saut N, Greliche N, Dina C, Lambert JC, Perret C, Cohen W, Oudot-Mellakh T, Antoni G, Alessi MC, Zelenika D. Genetics of venous thrombosis: insights from a new genome wide association study. *PloS one*. 2011 Sep 27;6(9):e25581.

Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Classic papers in genetics*. Prentice-Hall, Inc.: Englewood Cliffs, NJ. 1908:60-2.

Hartl DL, Clark AG, Clark AG. *Principles of population genetics*. Sunderland, MA: Sinauer associates; 1997 Jan; Vol 116

Heijboer H, Brandjes DP, Büller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *New England journal of medicine*. 1990 Nov 29;323(22):1512-6.

Heit J, Cohen A, Anderson FJ. Estimated annual number of incident and recurrent, non-fatal and fatal venous thromboembolism (VTE) events in the US. *Blood*. 2005; 106: 267A, Abst 910.

Ho WK. Deep vein thrombosis: risks and diagnosis. *Australian family physician*. 2010 Jul;39(7):468.

Houlihan LM, Davies G, Tenesa A, Harris SE, Luciano M, Gow AJ, McGhee KA, Liewald DC, Porteous DJ, Starr JM, Lowe GD. Common variants of large effect in F12, KNG1, and HRG are associated with activated partial thromboplastin time. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 Apr 9;86(4):626-31.

Houlihan LM, Davies G, Tenesa A, Harris SE, Luciano M, Gow AJ, McGhee KA, Liewald DC, Porteous DJ, Starr JM, Lowe GD. Common variants of large effect in F12, KNG1, and HRG are associated with activated partial thromboplastin time. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 Apr 9;86(4):626-31.

IBOPE. Resultados pesquisa IBOPE: Trombose venose profunda e embolia pulmonar. 2010.

International HapMap Consortium. A second-generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct;449(7164):851.

International HapMap Consortium. The international HapMap project. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):789.

Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*. 2015 Dec;8(1):37.

Li CC. Population subdivision with respect to multiple alleles. *Ann Hum Genet*. 1969 Jul;33(1):23-9.

Li Y, Bezemer ID, Rowland CM, Tong CH, Arellano AR, Catanese JJ, Devlin JJ, Reitsma PH, Bare LA, Rosendaal FR. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2009 Nov;7(11):1802-8.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*. 1995 Jun 1;4(6):357-62.

López JA, Kearon C, Lee AY. Deep venous thrombosis. *ASH Education Program Book*. 2004 Jan 1;2004(1):439-56.

Morange PE, Bezemer I, Saut N, Bare L, Burgos G, Brocheton J, Durand H, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P. A follow-up study of a genome-wide association scan identifies a susceptibility locus for venous thrombosis on chromosome 6p24. 1. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 Apr 9;86(4):592-5.

Morange PE, Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Antoni G, Alessi MC, Bertrand M, Dupuy AM, Letenneur L, Lathrop M. KNG1 Ile581Thr and susceptibility to venous thrombosis. *Blood*. 2011 Mar 31;117(13):3692-4.

Morange PE, Trégouët DA. Deciphering the molecular basis of venous thromboembolism: where are we and where should we go?. *British journal of haematology*. 2010 Feb;148(4):495-506.

Morrison T, Hurley J, Garcia J, Yoder K, Katz A, Roberts D, Cho J, Kanigan T, Ilyin SE, Horowitz D, Dixon JM. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic acids research*. 2006 Sep 25;34(18):e123-.

Norrsgard K. Genetic variation and disease: GWAS. *Nature Education*. 2008;1(1):87.

Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Kallel C, Zelenika D, Lathrop M, Trégouët DA, Morange PE. Genome wide association study for plasma levels of natural anticoagulant inhibitors and protein C anticoagulant pathway: the MARTHA project. *British journal of haematology*. 2012 Apr;157(2):230-9.

Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *Jama*. 2008 Mar 19;299(11):1335-44.

Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Human Heredity*. 2006;62(4):190-5.

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*. 1996 Nov 15;88(10):3698-703.

Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *The American Journal of Human Genetics*. 1999 Jul 1;65(1):220-8.

Prokunina L, Alarcón-Riquelme ME. Regulatory SNPs in complex diseases: their identification and functional validation. *Expert reviews in molecular medicine*. 2004 Apr;6(10):1-5.

Psaty BM, O'donnell CJ, Gudnason V, Lunetta KL, Folsom AR, Rotter JI, Uitterlinden AG, Harris TB, Witteman JC, Boerwinkle E. Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium: Design of prospective meta-analyses of genome-wide association studies from 5 cohorts. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2009 Feb;2(1):73-80.

Reitsma PH, Rosendaal FR. Activation of innate immunity in patients with venous thrombosis: the Leiden Thrombophilia Study. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2004 Apr;2(4):619-22.

Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. Genetic structure of human populations. *science*. 2002 Dec 20;298(5602):2381-5.

Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet*. 1999 Apr 3;353(9159):1167-73.

Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *ASH Education Program Book*. 2005 Jan 1;2005(1):1-2.

Shmulewitz D, Zhang J, Greenberg DA. Case-control association studies in mixed populations: correcting using genomic control. *Human heredity*. 2004;58(3-4):145-53.

Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Archives of internal medicine*. 1998 Mar 23;158(6):585-93.

Smith NL, Chen MH, Dehghan A, Strachan DP, Basu S, Soranzo N, Hayward C, Rudan

I, Sabater-Lleal M, Bis JC, de Maat M. Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE Consortium. *Circulation*. 2010 Mar 30;121(12):1382.

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Garí M, Martínez E, Mateo J, Stone WH, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation*. 2000 Apr 4;101(13):1546-51.

Tang W, Basu S, Kong X, Pankow JS, Aleksic N, Tan A, Cushman M, Boerwinkle E, Folsom AR. Genome-wide association study identifies novel loci for plasma levels of protein C: the ARIC study. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):5032-6.

Thomas DC, Witte JS. Point: population stratification: a problem for case-control studies of candidate-gene associations?. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2002 Jun 1;11(6):505-12.

Tian C, Hinds DA, Shigeta R, Kittles R, Ballinger DG, Seldin MF. A genomewide single-nucleotide-polymorphism panel with high ancestry information for African American admixture mapping. *The American Journal of Human Genetics*. 2006 Oct 1;79(4):640-9.

Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5298-303.

Turakulov R, Easteal S. Number of SNPS loci needed to detect population structure. *Human heredity*. 2003;55(1):37-45.

van der Meer FJ, Koster T, Vandenbroucke JP, Briet E, Rosendaal FR. The Leiden thrombophilia study (LETS). *Thrombosis and haemostasis*. 1997 Jun;78(01):631-5.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD. The sequence of the human genome. *science*. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.

Weber MJ. New human and mouse microRNA genes found by homology search. *The FEBS journal*. 2005 Jan;272(1):59-73.

Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *TRENDS in Genetics*. 2002 Jan 1;18(1):19-24.

White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. *Thrombosis and haemostasis*. 2003;90(09):446-55.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, Spector N, Covas DT, Rego EM. *Tratado de hematologia*. São Paulo: Editora Atheneu. 2013:65-7.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes com Tromboembolismo Venoso

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Projeto: “ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDIO ÚNICO CANDIDATOS E PACIENTES BRASILEIROS COM TROMBOEMBOLISMO VENOSO”

Responsáveis pelo projeto: Anna Virgínia Calazans Romano, Aline Barnabé, Prof^ª. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, Profa. Dra. Telma Gadelha, Prof.Dr. João Carlos Guerra

Eu, _____,

Idade: _____, RG: _____, HC/AIH/RH: _____,

Residente à Rua/Av. _____,

CEP: _____, Telefones: _____,

e-mail: _____,

Concordo em participar do presente estudo, autorizo a coleta e a utilização do material coletado, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade: _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____, Residente à

Rua/Av. _____ Telefo

ne: _____.

Este estudo pretende avaliar a presença de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) identificados em outras populações com tromboembolismo venoso através de estudos de associação genética em pacientes brasileiros com tromboembolismo venoso e identificar a ocorrência de estratificação da amostra entre os pacientes com tromboembolismo venoso e indivíduos saudáveis. Os polimorfismos nos genes CYP4V2, SERPINC1, GP6, F11, HIVEP1, KNG1, C4BPB, PROCR, EDEM2, GCKR, BAZ1B, DNAJC6, TC2N, FVW, STXBP5, CLEC4M, SCARA 5, STAB2, STX2, BAI3, FV e ABO serão avaliados por uma plataforma de alto desempenho de genotipagem. Para tanto, coletaremos 2 tubos de 4mL de sangue do senhor (a) para a extração de DNA. Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes. A participação nesse estudo contribuirá para o melhor entendimento desta doença e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em conseqüência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa.
2. O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. Caso o (a) senhor (a) não concorde ou desista, a qualquer momento, de participar do estudo não haverá nenhum prejuízo ao tratamento da sua doença em curso.
4. O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
5. Caso seja realizado outro estudo com este material biológico, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.
6. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.

7. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

8. Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP,
Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Docente responsável

Fone: (19) 3521-8601

Aline Barnabé

Aluna de Pós-graduação

Fone: (19) 3521-8617

CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos saudáveis

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Projeto: “ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO CANDIDATOS E PACIENTES BRASILEIROS COM TROMBOEMBOLISMO VENOSO”

Responsáveis pelo projeto: Anna Virgínia Calazans Romano, Aline Barnabé, Prof^ª. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, Profa. Dra. Telma Gadelha, Prof.Dr. João Carlos Guerra

Eu, _____,

Idade: _____, RG: _____, HC/AIH/RH: _____,

Residente à Rua/Av. _____,

CEP: _____, Telefones: _____,

e-mail _____,

Concordo em participar do presente estudo, autorizo a coleta e a utilização do material biológico coletado, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade : _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____, Residente à Rua/Av. _____

Telefone: _____.

Este estudo pretende avaliar a presença de polimorfismos de nucleotídeo único identificados em outras populações com tromboembolismo venoso através de estudos de associação genética em pacientes brasileiros com tromboembolismo venoso e identificar a ocorrência de estratificação da amostra entre os pacientes com tromboembolismo venoso e indivíduos saudáveis. Os polimorfismos nos genes CYP4V2, SERPINC1, GP6, F11, HIVEP1, KNG1, C4BPB, PROCR, EDEM2, GCKR, BAZ1B, DNAJC6, TC2N, FVW, STXBP5, CLEC4M, SCARA 5, STAB2, STX2, BAI3, FV e ABO serão avaliados por uma plataforma de alto

desempenho de genotipagem. Entretanto, para termos confiança de que as alterações que por ventura encontraremos no sangue das pessoas acometidas pelo tromboembolismo venoso estão diretamente relacionadas à doença que apresentam, precisamos estudar os mesmos fatores no sangue de pessoas saudáveis, como o(a) senhor(a). Para tanto, coletaremos 2 tubos de 4mL de sangue do senhor (a) para realizarmos a extração de DNA. Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes. A participação nesse estudo contribuirá para o melhor entendimento desta doença e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. Não haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em consequência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa.
2. O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. Caso seja realizado outro estudo com este material biológico, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.
5. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
6. Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP, Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Campinas ____/____/____

*Assinatura do Voluntário*_____
Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Docente responsável

Fone: (19) 3521-8601

Aline Barnabé

Aluna de Pós-graduação

Fone: (19) 3521-8617

CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Assinatura do voluntário

Campinas ____/____/____

Anexo 3 - Ficha de Avaliação do Paciente com Histórico e Trombose

Avaliação do Paciente com Histórico e Trombose

Nome do Paciente:		Nº de cadastro:	
HC:	Sexo: <input type="checkbox"/> Feminino 0 <input type="checkbox"/> Masculino 1		
Idade na época da trombose:		Data de Nascimento:	
Data do diagnóstico da trombose: ____/____/____			
Data da coleta dos dados: ____/____/____			
Forma de coleta de dados: <input type="checkbox"/> Paciente+revisão do prontuário- 0 <input type="checkbox"/> Somente através da revisão do prontuário- 1			
Endereço: _____ nº compl. _____			
Cidade/ estado: _____		Telefone () _____ Celular:() _____	
E-mail: _____		Profissão: _____	
Escolaridade: <input type="checkbox"/> ausente 0 <input type="checkbox"/> 1o Grau 1 <input type="checkbox"/> 2o Grau 2 <input type="checkbox"/> 3o Grau 3			
Origem étnica: <input type="checkbox"/> Branco 0 <input type="checkbox"/> Afrodescendente 1 <input type="checkbox"/> Oriental 2 <input type="checkbox"/> Outros 3: _____			
Tipo de trombose: <input type="checkbox"/> TEV 0 <input type="checkbox"/> OAA 1 <input type="checkbox"/> IAM 2			Número de episódios:
Locais de ocorrência:		TV Cerebral <input type="checkbox"/> 13	Sem Informação <input type="checkbox"/> 20
MIE distal <input type="checkbox"/> 1	TEP <input type="checkbox"/> 7	TV Mesent <input type="checkbox"/> 14	TVP outras localizações <input type="checkbox"/> 21
MIE proxi <input type="checkbox"/> 2	TV Cava <input type="checkbox"/> 8	TV Esplênica <input type="checkbox"/> 15	AVC indeterminado <input type="checkbox"/> 22
MID distal <input type="checkbox"/> 3	TV porta <input type="checkbox"/> 9	TVS MIE <input type="checkbox"/> 16	TIA <input type="checkbox"/> 23
MID proxi <input type="checkbox"/> 4	TV retina <input type="checkbox"/> 10	TVS MID <input type="checkbox"/> 17	AVC arterial <input type="checkbox"/> 24
MSE <input type="checkbox"/> 5	TV Renal <input type="checkbox"/> 11	TVS MSE <input type="checkbox"/> 18	TA retina <input type="checkbox"/> 25
MSD <input type="checkbox"/> 6	TV SNC <input type="checkbox"/> 12	TVS MSD <input type="checkbox"/> 19	TA Renal <input type="checkbox"/> 26
Característica: <input type="checkbox"/> Espontânea- 0 <input type="checkbox"/> Provocada - 1 Confirmação por imagem: <input type="checkbox"/> Sim- 0 <input type="checkbox"/> Não- 1			
Fatores desencadeantes ou doenças associadas à época da trombose:			
Imobilização nos 3 meses prévios : 1 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Pequenos traumas de membros inferiores (nas 2 semanas prévias) 2 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Internação por motivos clínicos por mais de 3 dias (nos 3 meses prévios) 3 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Infecção (abscesso) localizada próximo à trombose 4 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Viagens nas últimas duas semanas <input type="checkbox"/> Avião- 5 <input type="checkbox"/> Carro- 6 <input type="checkbox"/> Ônibus- 7 <input type="checkbox"/> Trem- 8			
Duração da viagem: _____ horas			

Cirurgia (c/ mais de 30 minutos de duração anestesia geral, peridural ou raqui nos últimos 3 meses) 9 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Quimioterapia (nos 3 meses prévios): 10 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Neoplasia em atividade ou no último ano: 11 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Doença autoimune: 12 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Uso de anticoncepcional (uso no momento da TEV) 13 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não - Tempo: Qual:	
Terapia de reposição hormonal (atual): 14 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Estímulo hormonal para coleta de óvulos 15 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Período gestacional: 16 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> 1º trimestre 17 <input type="checkbox"/> 2º trimestre 18 <input type="checkbox"/> 3º trimestre 19	
Pós-parto (até 3 meses): 20 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Tipo: <input type="checkbox"/> Vaginal 21 <input type="checkbox"/> Cesariana 22	
Neoplasia mieloproliferativa: 23 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Hemoglobinúria Paroxística Noturna: 24 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Presença de cateter venoso central no sítio da trombose: 25 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Púrpura trombocitopênica trombótica: 26 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Insuficiência cardíaca congestiva grave (Classe III ou IV) 27 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Síndrome nefrótica: 28 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Má formação vascular: (hemangioma gigante) 29 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Doenças infecciosas nos 3 meses que antecederam a TEV sem internação 30 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Pneumonia 31 <input type="checkbox"/> Cistite 32 <input type="checkbox"/> Pielonefrite 33 <input type="checkbox"/> Sinusite 34 <input type="checkbox"/> Otite 35 <input type="checkbox"/> de Garganta 36 <input type="checkbox"/> Gripe 37	
<input type="checkbox"/> Artrite 38 <input type="checkbox"/> Bursite 39 <input type="checkbox"/> Erisipela 40 <input type="checkbox"/> Celulite 41 <input type="checkbox"/> HIV Positivo 42 <input type="checkbox"/> Dengue 43	
<input type="checkbox"/> Outros 44 : _____	
Tromboflebite nos últimos 3 meses:(comprovada por método imagem) 45 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Não tratou 46 <input type="checkbox"/> anti-inflamatório 47 <input type="checkbox"/> anticoagulante oral 48 <input type="checkbox"/> heparina 49	
Comorbidades	
Diabetes mellitus: 1 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Disfunção hepática: 2 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Dislipidemia: 3 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Ins. Renal: 4 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
HAS: 5 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Cirurgia prévia 6 : <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
História Gestacional:	
Gestações__ Partos__ Abortos__ Nascidos Vivos__ Nascidos Mortos__	
Complicações gestacionais: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não 0	
<input type="checkbox"/> HAS 1 <input type="checkbox"/> DM 2 <input type="checkbox"/> pré eclâmpsia 3 <input type="checkbox"/> eclâmpsia 4 <input type="checkbox"/> síndrome HELLP 5 <input type="checkbox"/> RCIU 6 <input type="checkbox"/> parto prematuro 7	

História Familiar: Não **0** TEV **1** OAA **2** AVCi **3** IAM **4**

Tipo de parentesco: 1º grau (avós, pais, irmãos, filhos) **1** 2º grau (tios, primos) **2**

número de parentes:

Hábitos: <input type="checkbox"/> Não 0 <input type="checkbox"/> Fumo 1 <input type="checkbox"/> Álcool 2 <input type="checkbox"/> Drogas ilícitas 3			
Mantinha o hábito na época da trombose: <input type="checkbox"/> Sim 1 <input type="checkbox"/> Não 0			
Medicamentos: <input type="checkbox"/> antiHAS 0 <input type="checkbox"/> AINES 1 <input type="checkbox"/> AAS 2 <input type="checkbox"/> estatinas 3 <input type="checkbox"/> protetor gástrico 4 <input type="checkbox"/> psicotrópicos 5			
Uso de anticoagulantes: <input type="checkbox"/> Não 0 <input type="checkbox"/> heparina 1 <input type="checkbox"/> warfarin 2 <input type="checkbox"/> marcoumar 3 <input type="checkbox"/> dabigatran 4 <input type="checkbox"/> rivaroxaban 5			
Medidas Antropométricas:			
	Peso:		Circunferência abdominal:
	Altura:		Obesidade: <input type="checkbox"/> Sim 1 <input type="checkbox"/> Não 0
	IMC:		

Anexo 4 - Ficha de Coleta para Participantes Controle

Ficha de Coleta - Controle

Nome do Paciente:		Nº no estudo:
Prontuário:	Sexo: <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino	
Idade:	Data de Nascimento:	
Data da coleta dos dados: ____/____/____		
Origem étnica: <input type="checkbox"/> Caucasoíde <input type="checkbox"/> Afrodescendente <input type="checkbox"/> Oriental <input type="checkbox"/> Outros		

Sofre de alguma dessas doenças:

	Hipertensão arterial : <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
	Diabetes <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
	Síndrome convulsiva <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
	Hipotireoidismo <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Fumo <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
	Quanto tempo?: _____ Quantos cigarros?: _____
Faz uso de algum medicamento ? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? _____ _____ _____	
Fez uso de AAS nos últimos dias? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Faz uso de anticoncepcional ? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? _____ Quanto tempo? _____ Via de administração: _____	

Faz uso de terapia de reposição hormonal ? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? _____ Quanto tempo? _____
Está grávida ?: 12 <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Quantas semanas? _____
Quantas gestações anteriores ? 11 _____ Complicações? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? _____ Abortos? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Quantos? _____
Já passou por cirurgias? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? _____ _____ _____

RESPONSÁVEL: _____

8. DADOS SUPLEMENTARES

Tabela S1 - Informações sobre Frequência Alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos 90 SNPs selecionados para o controle genômico.

Nome	Alelo	MAF	HWD p-valor	Call rate (%)
rs860847	A	0.099	0,3598	99,510
rs655274	C	0.468	0,7599	99,631
rs2269234	G	0.225	0,2066	97,414
rs11102362	T	0.384	0,5585	99,632
rs10494190	A	0.176	0,7807	99,755
rs17352281	C	0.406	0,0187	99,877
rs12086247	A	0.102	0,1947	99,510
rs12143625	C	0.242	0,3104	100,000
rs2681019	C	0.461	0,0140	98,650
rs2381868	T	0.362	0,0199	99,754
rs1559908	C	0.163	0,0815	99,755
rs6735841	C	0.227	0,6818	99,755
rs7562701	T	0.050	0,2058	99,878
rs7580498	C	0.359	0,5652	99,010
rs9881792	C	0.309	0,8199	100,000
rs6439663	T	0.345	0,4788	99,877
rs16992287	T	0.015	0,8206	100,000
rs1105397	T	0.564	0,6439	99,877
rs1865182	G	0.174	0,3516	99,383
rs1994253	C	0.134	0,5200	99,878
rs6837799	T	0.078	0,7266	99,755
rs7699787	C	0.103	0,6220	99,632
rs2913366	A	0.447	0,6630	99,877
rs10066284	C	0.525	0,8599	99,387
rs748138	T	0.314	0,1780	99, 754
rs10054570	T	0.234	0,3600	98,896

rs1560673	A	0.373	0,1381	100,000
rs7729098	A	0.304	0,7710	96,552
rs2431135	G	0.200	0,1374	99,877
rs6900267	C	0.075	0,7609	100,000
rs6901463	C	0.241	0,7198	99,631
rs9354464	T	0.240	0,3909	99,754
rs9361864	C	0.534	0,0907	99,388
rs4707427	G	0.243	0,3408	99,877
rs2757732	G	0.228	1,0000	99,877
rs4946608	A	0.258	0,0247	99,877
rs2806357	A	0.758	9,55E-65	97,426
rs9768991	T	0.317	1,0000	99,877
rs206198	G	0.612	1,0000	99,877
rs704871	T	0.225	0,8961	100,000
rs1554631	C	0.567	0,3136	99,630
rs929383	G	0.059	0,8846	100,000
rs6988825	C	0.079	0,0307	100,000
rs9792156	C	0.240	0,4136	100,000
rs2199266	C	0.434	0,3466	99,877
rs7845815	A	0.291	0,4006	100,000
rs3812440	A	0.183	0,3563	97,417
rs13297234	G	0.305	0,1047	99,632
rs17768235	C	0.416	0,3281	100,000
rs278754	A	0.311	0,4672	99,755
rs10733750	C	0.337	0,6632	100,000
rs7872317	T	0.089	0,9014	99,877
rs592977	A	0.123	0,7594	99,386
rs1909413	G	0.099	0,7618	97,301
rs4918001	C	0.108	0,7406	99,632
rs7093793	T	0.160	0,8304	100,000
rs10839317	C	0.560	1,0000	99,877
rs4547111	A	0.126	0,3591	99,877
rs10793227	C	0.259	0,9033	99,755
rs16917427	C	0.134	0,1844	96,560

rs1425861	C	0.317	0,3913	91,912
rs2220072	T	0.405	0,3953	100,000
rs10773726	A	0.485	0,1416	99,510
rs9548930	T	0.378	0,2001	99,877
rs4635231	A	0.310	0,4042	98,409
rs9529809	C	0.526	0,2025	99,877
rs9560800	C	0.522	0,9129	99,018
rs9559465	G	0.148	0,7331	99,385
rs1209087	C	0.425	1,0000	99,510
rs177228	G	0.102	0,4188	99,265
rs12893289	G	0.375	0,7002	100,000
rs1950618	T	0.065	0,3579	100,000
rs1874841	A	0.242	0,2611	99,510
rs2578582	T	0.183	0,3294	96,301
rs12922811	G	0.161	0,5442	99,264
rs17561170	A	0.090	0,5901	97,540
rs10500580	G	0.329	0,6405	99,877
rs11654469	G	0.476	0,8179	99,877
rs6501983	G	0.428	0,3112	99,508
rs2852974	C	0.359	0,4621	100,000
rs2238658	G	0.425	0,9058	98,892
rs1981827	T	0.128	0,1168	100,000
rs2569471	T	0.383	0,09643	99,139
rs6086733	A	0.112	0,7645	99,631
rs6040514	G	0.350	0,3023	100,000
rs6021304	A	0.325	0,1013	100,000
rs2829077	G	0.192	1,0000	99,878
rs2284510	T	0.061	0,0667	99,754
rs5754932	T	0.029	0,5441	97,301
rs140065	G	0.238	0,7455	99,877

HWD, Hardy-Weinberg disequilibrium; MAF, minimum allele frequency