



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José do Rio Preto

Renan Garcia de Oliveira

O papel da angiogênese e da hemólise na úlcera de perna de  
pessoas com anemia falciforme

São José do Rio Preto  
2016

Renan Garcia de Oliveira

O papel da angiogênese e da hemólise na úlcera de perna de pessoas  
com anemia falciforme

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto  
Março de 2016

Oliveira, Renan Garcia de.

O papel da angiogênese e da hemólise na úlcera de perna de pessoas com anemia falciforme / Renan Garcia de Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2016

64 f. : il.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular humana. 2. Anemia falciforme – Aspectos genéticos. 3. Anemia hemolítica – Aspectos genéticos. 4. Pernas - Úlceras. 5. Neovascularização. 6. Hipóxia. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Renan Garcia de Oliveira

O papel da angiogênese e da hemólise na úlcera de perna de pessoas  
com anemia falciforme

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos  
UNESP- São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum  
Instituto Naoum de Hematologia

Profa. Dra. Ana Paula Girol  
Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA/FAMECA)

São José do Rio Preto  
07 de março de 2016

*Dedico esse trabalho aos irmãos que, diariamente, lutam por direitos e por autonomia, para garantir melhor qualidade de vida às pessoas com a doença falciforme. Desejo que o conhecimento e a informação sejam aliados nessa batalha e que possam colher saborosos frutos deste árduo trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Valdir** e **Dirce**, por me educarem e por acreditarem em mim. Sou eternamente grato por abrirem mão de suas conquistas para que eu alcançasse as minhas. Vocês são meus maiores exemplos na vida. Espero um dia poder retribuir todo o esforço que dedicaram a mim.

Ao meu irmão, **Rafael**, pelo exemplo de honestidade e determinação. Espero que a vida sempre lhe ofereça motivos verdadeiros e permanentes de felicidade. Agradeço à minha cunhada, **Naegeli**, pelo presente maravilhoso que me deu - meu sobrinho **Bruno!** -, para alegrar ainda mais as nossas vidas.

À toda a minha família, **vô, vós, tios, tias e primos**. Obrigado por me educarem por meio de suas atitudes. Com vocês aprendi a me reconhecer humilde, a saber me posicionar diante de uma dificuldade e acreditar que as coisas podem ficar melhores. Amo vocês.

À minha noiva, **Patrícia Masuno**, pelo amor e companheirismo vividos ao longo desses anos todos. Minha vida é mais feliz e completa ao seu lado, obrigado por tudo. Agradeço a toda família **Masuno** por me acolherem tão bem e serem tão bons comigo. Amo vocês.

Aos amigos de longa data (de Tupã), **Will, Thayla, Marquinhos, Camila, Lucas Mattar, Ledo, Orlando e Alê**. Obrigado por fazerem parte de mim. Vivi grandes momentos da minha vida ao lado de vocês.

Aos amigos “recentes”, **Dorigão, Madalena, Vitor, Luis Felipe, Will e Patrícia Nascimento**. Vocês tornam a minha vida mais fácil e feliz. Saber que tenho amigos como vocês é um motivo de me sentir mais tranquilo. Amo vocês por tudo o que foram e são para mim.

À minha [mais que] orientadora, **Claudia Bonini**. Obrigado por, acima de tudo, ser minha amiga e conselheira. Por ter dedicado parte do seu tempo para me orientar profissionalmente, por torcer pelas minhas conquistas. Espero que a vida seja sempre feliz para você e toda a sua família.

Aos amigos do **LHGDH**, pelos anos que passamos juntos. Terei muitas boas lembranças dos momentos em que estive com vocês. Obrigado pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela amizade. Agradeço, especialmente, ao **Belini, Kexu, Gisele, Lidiane, Mugs, Will, Patrícia Nascimento, Larissa Venâncio, Tiago Lucena e Nathália (mini)** por toda a ajuda que me

*deram, tanto para as situações que surgiam no dia a dia do nosso trabalho como para alguns momentos difíceis da vida. Espero que os sonhos de vocês sejam alcançados, mais que, acima de tudo, vocês sejam muito felizes nas escolhas que fizerem para a vida.*

*A todos os **professores** que passaram pela minha vida, tanto os de ensino básico quanto os de ensino superior e pós-graduação. Vocês me influenciam muito e despertam em mim o desejo de ser como vocês, de fazer a diferença, de mudar a vida das pessoas e de despertar o que cada um tem de melhor. Muito obrigado por tudo.*

*“Tudo o que a gente conhece está numa ilha e essa ilha é cercada pelo desconhecido. À medida em que o conhecimento avança, a ilha aumenta, porém, aumenta-se também a fronteira que ela faz com o desconhecido [as dúvidas]. Assim, quanto mais a gente conhece as coisas mais a gente desconhece também”.*

*Marcelo Gleiser, trecho do documentário “Eu Maior”*

## SUMÁRIO

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                                                   | 14 |
| 1.1. A hemoglobina .....                                                                              | 14 |
| 1.2. Hemoglobinopatias .....                                                                          | 16 |
| 1.3. Anemia falciforme .....                                                                          | 17 |
| 1.4. Úlcera de perna na AF .....                                                                      | 18 |
| 1.5. Princípios básicos do processo de cura de feridas .....                                          | 20 |
| 1.6. Citocinas e fatores de crescimento mediadores do processo angiogênico .....                      | 21 |
| 2. Objetivo geral.....                                                                                | 24 |
| 2.1. Objetivos específicos.....                                                                       | 24 |
| 3. Material e métodos.....                                                                            | 26 |
| 3.1. Casuística.....                                                                                  | 26 |
| 3.2. Considerações éticas.....                                                                        | 26 |
| 3.3. Procedimentos experimentais .....                                                                | 27 |
| 3.3.1. Caracterização das amostras.....                                                               | 27 |
| 3.3.2. Análise dos polimorfismos dos marcadores vasculares .....                                      | 35 |
| 3.3.3. Avaliação dos níveis de proteínas relacionadas a angiogênese por <i>Western Blotting</i> ..... | 39 |
| 3.3.4. Análise dos marcadores de hemólise .....                                                       | 40 |
| 3.3.5. Análises estatísticas.....                                                                     | 40 |
| 4. Resultados .....                                                                                   | 42 |
| 4.1. Caracterização das amostras .....                                                                | 42 |
| 4.2. Marcadores hemolíticos.....                                                                      | 42 |
| 4.3. Avaliação dos polimorfismos genéticos relacionados a angiogênese .....                           | 43 |
| 4.4. Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao processo angiogênico.....                    | 46 |
| 5. Discussão .....                                                                                    | 53 |
| 6. Conclusões .....                                                                                   | 60 |
| Referências bibliográficas .....                                                                      | 61 |

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma anemia hemolítica hereditária, autossômica recessiva, causada pela mutação em um único nucleotídeo no gene da beta globina (HBB:c.20A>T). Essa alteração resulta na produção de uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (Hb S). Em condições de hipóxia, essas hemoglobinas se polimerizam dentro do eritrócito, ocasionando alteração em sua estrutura e resultando na formação de eritrócitos falciformes, que são menos flexíveis, aderem ao endotélio e são propensos à hemólise, favorecendo os dois principais eventos fisiopatológicos da AF, a hemólise e a vasclusão, que dirigem os processos envolvidos nos diferentes tipos de manifestações clínicas que esses indivíduos podem apresentar ao longo da vida. A úlcera de perna é uma condição clínica frequente nesses indivíduos e a etiologia dessa complicação pode estar relacionada a eventos hemolíticos e angiogênicos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de marcadores hemolíticos e de angiogênese em pacientes com AF, na presença ou ausência de úlcera de perna, a fim de contribuir com o entendimento a respeito dos mecanismos envolvidos na ocorrência de tal manifestação clínica. Para isso, foram avaliados os polimorfismos que regulam a expressão de proteínas que participam do processo de angiogênese, como *TGF- $\beta$ 1*, *VEGFA1* e *HIF-1 $\alpha$* ; os marcadores de hemólise, como níveis de hemoglobina (Hb), lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina indireta (BI), aspartato aminotransferase (AST) e contagem de reticulócitos (RET); além da síntese proteica de *VEGFA1*, *TGFB1* e *HIF1A*, fatores importantes para a angiogênese e regulação do processo de cura das feridas. Os resultados obtidos evidenciam significativa relação da gravidade da anemia com a ocorrência de úlcera de perna em pessoas com a AF. No entanto, o mesmo não ocorreu com os polimorfismos que regulam a expressão das proteínas que participam da angiogênese, em que não foi observada relação, de risco ou de proteção, desses polimorfismos com a ocorrência de úlcera de perna na AF. Além disso, a avaliação dos níveis plasmáticos das proteínas *VEGFA1*, *TGFB1* e *HIF1A*, indica que a úlcera de perna em pessoas com AF está associado a um quadro pró-angiogênico, evidenciado pelos altos níveis de *VEGFA1* e *TGFB1* nesses indivíduos, em comparação as pessoas com AF que não

apresentam essa complicação clínica, o que resulta em prejuízo a homeostase do processo de cura da ferida.

Palavras-chave: doença falciforme, úlcera de membro inferior, anemia hemolítica, isquemia tecidual, estímulo angiogênico.

## ABSTRACT

The sickle cell anemia (SCA) is an inherited hemolytic anemia, autosomal recessive, caused by mutations in a single nucleotide in the beta globin gene (HBB:c.20A>T). This change results in production of an abnormal hemoglobin called hemoglobin S (Hb S). In hypoxic conditions, these hemoglobins polymerize within the erythrocyte, causing changes in their structure and resulting in the formation of sickle erythrocytes, which are less flexible, adhere to the endothelium and are prone to hemolysis, favoring the two main pathophysiological events of alpha hemolysis and vasocclusão, driving the processes involved in different types of clinical manifestations that these individuals may have lifelong. The leg ulcer is a common clinical condition of these individuals and the etiology of this complication may be related to haemolytic and angiogenic events. Thus, the objective of this study was to evaluate the presence of hemolytic markers and angiogenesis in patients with AF in the presence or absence of leg ulcer in order to contribute to the understanding of the mechanisms involved in the occurrence of such clinical manifestation. For this, we evaluated the polymorphisms that regulate the expression of proteins involved in the angiogenesis process, such as *TGF- $\beta$ 1*, *VEGFA1* and *HIF-1 $\alpha$* ; the markers of hemolysis, such as hemoglobin (Hb), lactate dehydrogenase (LDH), bilirubin indirect (BI), aspartate aminotransferase (AST) and reticulocyte count (RET); addition of protein synthesis of VEGFA1, TGFB1 and HIF1A, important factors for regulating angiogenesis and the healing process of wounds. The results show a significant relationship between severity of anemia with the occurrence of leg ulcers in people with SCA. However, the same did not occur with the polymorphisms that regulate the expression of proteins involved in angiogenesis, in which no relationship was observed, risk or protection of these polymorphisms with the occurrence of leg ulcer in SCA. Moreover, the evaluation of plasma levels of proteins VEGFA1, TGFB1 and HIF1A, indicates that leg ulcers in sickle cell patients is associated with a pro-angiogenic state, as evidenced by the high levels of VEGFA1 and TGFB1 these individuals, compared to individuals with SCA who do not have this clinical complication, which results in injury homeostasis of the wound healing process.

Keywords: sickle cell disease, sickle cell leg ulcer, hemolytic anemia, tissue ischemia, angiogenic stimulus.

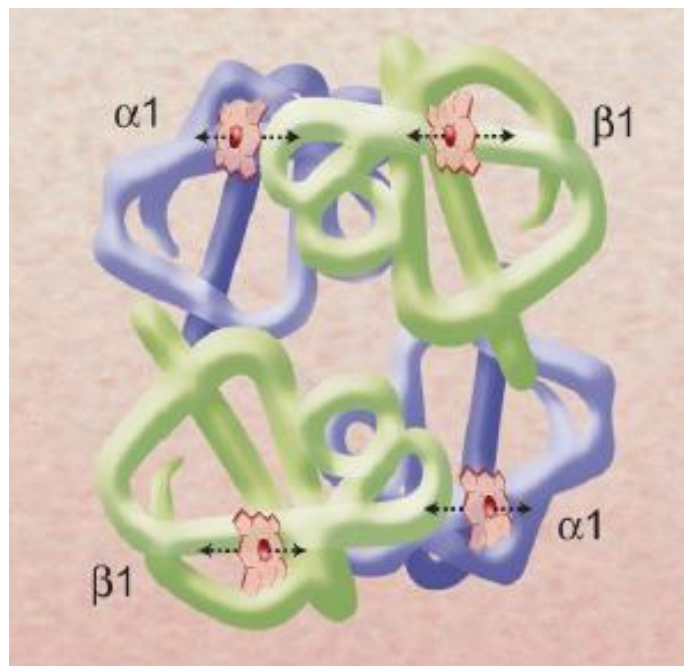
## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. Introdução

### 1.1. A hemoglobina

A hemoglobina é uma molécula tetramérica, localizada no interior das células vermelhas do sangue. É formada por quatro subunidades, sendo cada uma delas constituída de uma porção protéica (a cadeia globínica), que varia geneticamente, e um grupo prostético, que contém o ferro (grupo heme), o qual se combina com o oxigênio e confere à molécula sua capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de CO<sub>2</sub>, no caminho inverso. A fração proteica da hemoglobina é constituída de quatro cadeias globínicas que juntas totalizam 574 aminoácidos. Duas dessas contêm 141 aminoácidos cada e são denominadas cadeias do tipo alfa ( $\alpha$ ). As outras duas possuem 146 aminoácidos cada e são denominadas cadeias do tipo beta ( $\beta$ ), como ilustrado na Figura 1 (HONIG; ADAMS III, 1986; MANCA; MASALA, 2008).



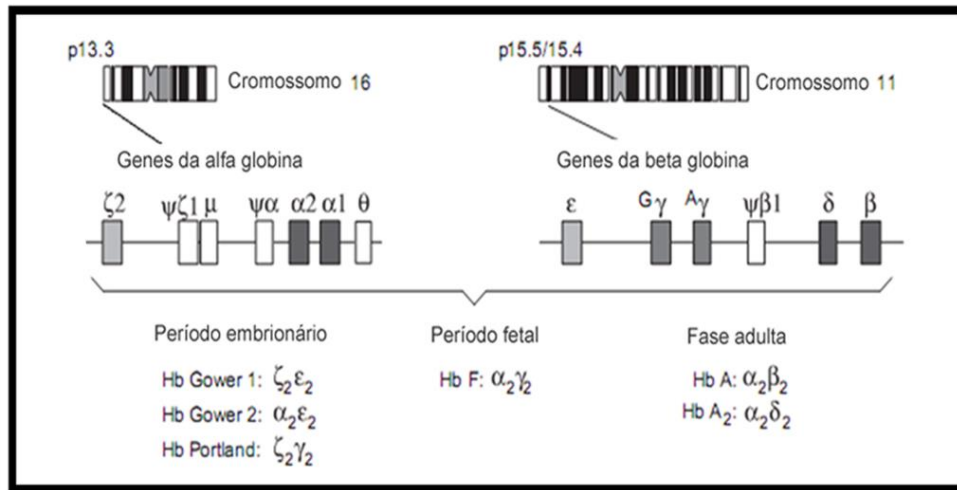
**Figura 1.** Representação da estrutura espacial do tetrâmero da molécula de hemoglobina, constituída de duas cadeias alfa, duas cadeias beta e o grupo heme inserido em cada uma das cadeias globínicas (SCHECHTER, 2008).

A síntese das cadeias do tipo alfa é realizada por uma família de genes específicos, localizada na região 16p13.3. O complexo gênico inclui os genes *alfa* ( $\alpha$ ), *HBA1* e *HBA2*, que expressam as cadeias globínicas alfa; o gene *zeta* (*HBZ*), de atuação na fase

embrionária; e os pseudogenes *alfa* e *zeta* (*HBAP* e *HBZP*), que possuem sequência homóloga aos genes estruturais ativos, mas contêm mutações que inibem sua expressão.

As cadeias do tipo beta, por sua vez, são elaboradas por uma família de genes, com aproximadamente 50 Kb, localizada na região 11p15.1. Esse complexo gênico é constituído pelos genes *beta* (*HBB*) e *delta* (*HBD*), expressam-se em toda a plenitude no período pós-nascimento; os genes *épsilon* (*HBE*), expressos na fase embrionária; e os genes *gama* (*HBG*), *HBG1* (gama alanina) e *HBG2* (gama glicina), característicos do período fetal (STEINBERG et al., 2009).

Os genes estão presentes em ambos os cromossomos na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento. Dessa forma, durante o período embrionário, as Hb predominantes são Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ), Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e Portland II ( $\zeta_2\beta_2$ ). Durante a vida fetal, predomina a Hb fetal (Hb F) ( $\alpha_2\gamma_2$ ), porém, no período pós-natal, essa hemoglobina é gradualmente substituída pela Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), majoritária, e Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), minoritária, como ilustrado na Figura 2. Após a estabilização na taxa de produção das cadeias, que ocorre geralmente após o sexto mês de nascimento, é considerado padrão para um indivíduo sem hemoglobinopatias, a presença aproximada de 96% a 98% de Hb A; de 2,5% a 3,5% de Hb A<sub>2</sub> e de 0% a 1,0% de Hb F (HONIG; ADAMS III, 1986; BONINI-DOMINGOS, 2006; MANCA; MASALA, 2008).



**Figura 2.** Representação esquemática da organização das famílias gênicas das globinas alfa e beta nos cromossomos 16 e 11, respectivamente, e a síntese esperada de hemoglobinas ao longo do desenvolvimento humano (modificado de STEINBERG et al., 2009).

## 1.2. Hemoglobinopatias

Mutações que afetam a taxa de síntese das cadeias globínicas causam as talassemias, caracterizadas pelo desequilíbrio quantitativo dessas cadeias, enquanto que alterações na estrutura proteica das hemoglobinas, podendo interferir nas suas características físico-químicas, originam as hemoglobinas variantes (STEINBERG et al., 2001; BAIN, 2011). Essas alterações de hemoglobinas, ou hemoglobinopatias, são consideradas as doenças genéticas mais frequentes no mundo, abrangendo, sobretudo, o continente africano, americano, europeu e extensas regiões da Ásia. Estima-se que haja mais de 270 milhões de portadores de hemoglobinopatias no mundo e que, aproximadamente, 60 mil crianças nasçam, anualmente, com talassemia e 250 mil com AF, resultando na estimativa de 2,4 crianças afetadas para cada 1.000 nascimentos (SIMOES et al., 2010).

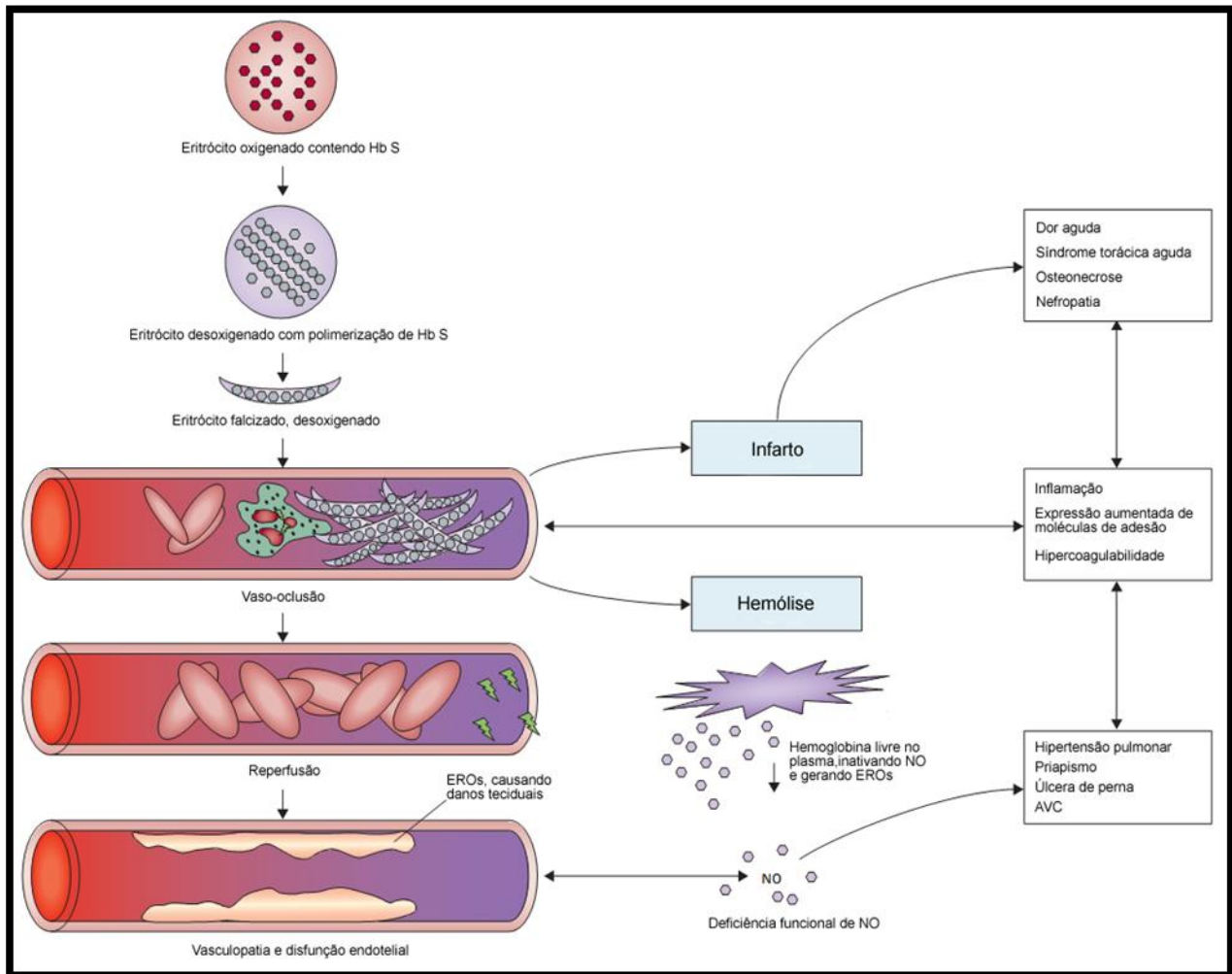
A frequência de portadores de hemoglobinopatias no Brasil é variável entre as regiões (1-12% aproximadamente) e depende da composição étnica da população local (BONINI-DOMINGOS, 1993; CANÇADO; JESUS, 2007). A AF é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo predominantemente entre afrodescendentes e possui distribuição heterogênea, sendo mais frequente nas populações dos Estados do Norte e Nordeste do país. Atualmente, estima-se que, aproximadamente, 30 mil brasileiros são

portadores da doença falciforme (SIMOES *et al.*, 2010). Tal cenário permite tratar essa doença como problema de saúde pública em nosso país.

### 1.3. Anemia falciforme

A AF é uma anemia hereditária autossômica recessiva, causada por uma mutação pontual, do tipo transversão, em que há a troca de uma base púrica (adenina) por uma pirimídica (timina) no códon do gene da  $\beta$  globina, resultando na substituição de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia globínica (*HBB:c.20A>T*). Essa alteração produz uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (Hb S), que possui características físico-químicas diferentes da hemoglobina adulta normal (Hb A) (FRENETTE & ATWEH, 2007; SPARKENBAUGH & PAWLINSKI, 2013). Em condições de hipóxia, desidratação ou acidose, as Hb S se polimerizam no interior do eritrócito, devido a interação entre as cadeias  $\beta 1$  e  $\beta 2$  de duas moléculas de hemoglobina, formando-se longos feixes de polímeros, que rompem a ligação da membrana do eritrócito com proteínas do citoesqueleto, resultando em protusões na membrana e modificação na arquitetura e flexibilidade dessa célula, culminando na formação de eritrócitos falciformes, que são menos flexíveis, mais aderentes ao endotélio e propensos à hemólise (ZAGO; PINTO, 2007; HEBBEL *et al.*, 2009; REES *et al.*, 2010).

A falcização do eritrócito resulta, portanto, nos dois principais eventos fisiopatológicos da AF, a hemólise e a vaso-oclusão (Figura 3). Além disso, mecanismos que envolvem a ativação de leucócitos, células endoteliais e plaquetas, indução de mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), estão envolvidos nos complexos processos fisiopatológicos da doença que, associados a fatores genéticos e ambientais, modulam a diversidade de manifestação clínica que esses pacientes podem apresentar, como: anemia, episódios de crises de dor, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, acidente vascular encefálico, priapismo, osteonecrose, úlcera de perna e insuficiência de múltiplos órgãos (FRENETTE; ATWEH, 2007; STEINBERG, 2008; DRISS *et al.*, 2009; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009; AKINSHEYE; KLINGS, 2010; CONRAN).



**Figura 3.** Representação esquemática dos eventos fisiopatológicos envolvidos na anemia falciforme (AF) (modificado de REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Dentre essas complicações clínicas, a úlcera de perna é uma condição debilitante e frequente nesses indivíduos e alguns autores demonstraram que a etiologia dessa complicação pode estar relacionada a eventos hemolíticos, trombóticos e angiogênicos (BALLAS *et al*, 2009; LADIZINSKI *et al*, 2012).

#### 1.4. Úlcera de perna na AF

A úlcera de perna em pessoas com AF é uma condição dolorosa, debilitante e persistente. É considerada uma das principais causas de internação hospitalar e de diminuição na qualidade de vida desses indivíduos. Ocorrem, principalmente, na região maleolar (figura 4), devido a menor quantidade de gordura subcutânea e do fluxo sanguíneo dessa região, sendo mais comum em homens do que em mulheres. Essas feridas podem ser 20 vezes mais resistentes ao tratamento do que outros tipos de feridas em alguns desses indivíduos e, por esse motivo, alguns

deles podem apresentá-las durante anos, caracterizando uma condição crônica (BAO et al., 2006; BALLAS et al, 2009; MACMAHON et al, 2010; MINNITI, 2015).



**Figura 4.** Úlcera de perna, na região maleolar, em pessoas com anemia falciforme (modificado de MINNITI et al, 2015).

As úlceras de perna em pessoas com AF podem surgir em decorrência de uma lesão, em que apresenta dificuldades durante o processo de cura, ou espontaneamente, uma vez que as características fisiopatológicas da doença são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento dessas feridas. Segundo alguns autores, a úlcera de perna na AF está associada a um sub-fenótipo mais grave da doença, em que os pacientes também apresentaram acidentes vasculares encefálicos e problemas pulmonares (STEINBERG, 2005; MINNITI et al, 2013).

Alguns trabalhos evidenciaram que a ocorrência da úlcera esteve associada a um quadro hemolítico grave, em que os pacientes apresentaram baixos níveis de hemoglobina (Hb), níveis elevados de reticulócitos (RET) e de bilirrubina indireta (BI), além de atividades aumentadas das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) que, segundo Gladwin et al (2013), são os principais marcadores que caracterizam o perfil de hemólise na AF (NOLAN et al, 2006; KATO et al, 2007; BOWERS et al, 2013; MINNITI et al, 2013).

Nolan et al. (2006), em um estudo multicêntrico, que avaliou mais de 250 polimorfismos em genes moduladores da AF, encontrou relação entre a úlcera de perna e alguns

polimorfismos que regulam a angiogênese no processo de cura de feridas, indicando o envolvimento dessa etapa como um fator de predisposição à úlcera de perna. Um estudo, em fases iniciais, que avaliou o uso de drogas terapêuticas com efeitos angiogênicos, como o butirato de arginina, demonstrou bons resultados no tratamento dessa complicação clínica, na AF, reforçando a hipótese de que o equilíbrio no processo angiogênico é de grande importância para o processo de cura dessas feridas. (MACMAHON et al, 2010). Estudos que avaliaram a úlcera crônica em pessoas com diabetes mostram que o prejuízo no processo de cura está associado, principalmente, a diminuição da angiogênese (BAO et al., 2006; RAM et al., 2016).

### **1.5. Princípios básicos do processo de cura de feridas**

A função primária da pele é servir de barreira contra ameaças externas (físicas, químicas ou biológicas) que podem causar algum tipo de dano ao organismo. Eventualmente, algumas lesões podem ocorrer, ocasionando perda na integridade da pele, resultando na formação de feridas. Em resposta a esse dano, inicia-se um complexo processo de cura, que pode ser, resumidamente, dividido em três etapas principais (FALER et al., 2006; MINNITI et al, 2015):

1. Fase inflamatória: o dano no tecido causa extravasamento de sangue e o coágulo resultante fornece a matriz extracelular, facilitando a migração de células para o local da lesão. Essa etapa é marcada pela ativação de células inflamatórias, que migram para o local da lesão e liberam uma série de mediadores, citocinas e fatores de crescimento, que acentuam a inflamação e iniciam a formação do tecido de granulação. Inicia-se nas primeiras 12 horas após a lesão e dura de três a cinco dias.
2. Fase proliferativa: é marcada pelo início da reepitelização e formação do tecido de granulação, caracterizado pela presença de fibroblastos, deposição de colágeno e pelo processo de angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos preexistentes), estabelecendo um conduto para

chegada de nutrientes, oxigênio e outros fatores de resposta a cura. Inicia-se no segundo dia após a lesão e dura entre 10 e 12 dias.

3. Fase de maturação: nessa etapa ocorre um controle negativo do processo de cura, com diminuição na deposição de colágeno e de expressão de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias, permitindo a maturação do tecido recém-formado. Essa etapa tem duração de mais de 30 dias.

### **1.6. Citocinas e fatores de crescimento mediadores do processo angiogênico**

A otimização do processo de cura de feridas requer a integração organizada de complexos eventos moleculares e celulares. Vários estudos demonstraram que algumas citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos na regulação do processo de cura de feridas, favorecendo o completo reparo do tecido (FALER; BAO, 2006; RAM et al., 2016).

O fator transformante do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) é uma citocina pró-inflamatória de grande importância nos processos angiogênicos, de reepitelização e regeneração de tecido conjuntivo, sendo considerado um fator importante para a manutenção da homeostase epidérmica (STEINBERG, 2009; PASTAR et al., 2010; BHAYAL et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que o TGF- $\beta$  é altamente regulado após a ocorrência de injúria e que, no entanto, a cascata de sinalização mediada por essa citocina é atenuada em casos de úlcera venosa crônica, evidenciando, assim, que essa citocina pode coordenar os processos envolvidos na cura dessas feridas (PASTAR et al., 2010).

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é uma citocina fundamental para os processos angiogênicos. Possui cinco isoformas resultantes de *splicing alternativo* de seu mRNA, com cadeias de 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos, podendo ser encontradas livremente no plasma ou associadas a membrana (DEHGHANIAN et al., 2014). Como evidenciado por alguns trabalhos, essa citocina tem importante papel na fisiopatologia de doenças vasculares, devido a sua participação em vias envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos, no auxílio para o recrutamento de células tronco em tecidos em processo isquêmico,

além de participar de vias que controlam as expressões de óxido nítrico (NO) e de proteínas pró e anti-apoptóticas (TAIMEH et al, 2013). Alguns estudos recentes têm evidenciado um importante papel do VEGF nos processos de cura de feridas, devido a seus múltiplos efeitos nos componentes dessa cascata, como a angiogênese, reepitelização, migração e proliferação celular e deposição de colágeno (BAO et al., 2008; DEHGHANIAN et al., 2014). O VEGF é sintetizado por vários tipos celulares que participam dos processos de cura da ferida, como células endoteliais, fibroblastos, células da musculatura lisa, plaquetas, neutrófilos e macrófagos (DEHGHANIAN *et al.*, 2014).

Estudos recentes mostram que a expressão gênica do VEGF e do TGF- $\beta$  são aumentadas em resposta a hipóxia por influência do fator induzível por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), por uma via dependente de NO (TAIMEH et al, 2013; RAM et al., 2016). No tecido danificado, a tensão de O<sub>2</sub> diminui para níveis próximos a 6-7 mmHg após cinco dias, valores bem abaixo dos níveis normais, 45-50 mmHg, caracterizando uma condição de hipóxia tecidual. Em decorrência desse quadro de hipóxia no tecido, eleva-se os níveis de HIF1A, promovendo a resposta angiogênica, que tem por objetivo restaurar a perfusão do tecido e garantir o reparo da ferida (BAO et al., 2006). No entanto, alguns estudos mostram que o desequilíbrio no controle da angiogênese, em diferentes condições, pode estar associado ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar, retinopatia e úlcera de perna (DUITS et al, 2006).

Evidências emergentes sugerem que um estado pró-angiogênico pode estar associado a AF, o que poderia predispor esses pacientes ao desenvolvimento de complicações clínicas como a úlcera de perna (LOPES et al., 2014). Por se tratar de um evento complexo e multifatorial, a causa e os mecanismos que dificultam a cura dessa complicação clínica, na AF, ainda é muito controverso. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de estudos mais detalhados a respeito dos mecanismos envolvidos na ocorrência de úlceras de perna em pacientes com AF, a fim de contribuir com o entendimento da etiologia dessa complicação clínica e dos fatores que as tornam resistentes à cura.

## 2. OBJETIVOS

---

## 2. Objetivo geral

Avaliar a presença de marcadores hemolíticos e angiogênicos em pessoas com AF que apresentem úlcera de perna, a fim de contribuir com o entendimento a respeito dos mecanismos envolvidos na ocorrência dessa complicação clínica.

### 2.1. Objetivos específicos

- Caracterização dos grupos quanto a presença dos polimorfismos -509C/T do *TGFB1* (rs 1800469), -2578 C/A do *VEGF* (rs 699947), e 1772C/T do *HIF1A* (rs 11549465), que afetam a expressão das respectivas proteínas;
- Avaliação de marcadores hemolíticos como níveis de hemoglobina (Hb), lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina indireta (BI), aspartato aminotransferase (AST); e contagem de reticulócitos;
- Avaliação dos níveis plasmáticos de VEGF, HIF-1 $\alpha$  e TGF- $\beta$  nos grupos de estudo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Casuística**

Foram analisadas 57 amostras de sangue periférico, colhidas em tubos contendo EDTA 5% como anticoagulante, de pacientes com AF, de ambos os gêneros, em acompanhamento no Hemocentro do Rio de Janeiro (HEMORIO) – Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcante e do Hemocentro de São José do Rio Preto, após consentimento informado.

Após a coleta das amostras e da consulta ao prontuário médico dos pacientes, feita as análises iniciais e observados os critérios de inclusão - idade superior a 10 anos, pois a úlcera de perna é uma condição mais frequente a partir da segunda década de vida, e úlcera ativa há, no mínimo, 4 semanas - os grupos foram formados, de modo que, o grupo AFUP+ caracterizou-se pela presença de 24 pacientes com anemia falciforme (AF) que desenvolveram úlcera de perna (UP+) e o grupo AFUP- foi constituído por 33 pacientes AF que não desenvolveram úlcera de perna em qualquer período da vida (UP-). Foram excluídos do estudo os indivíduos que haviam recebido transfusão sanguínea nos dois meses anteriores a coleta, pois essa condição poderia influenciar nos parâmetros avaliados.

#### **3.2. Considerações éticas**

Os sujeitos da pesquisa foram expostos somente a um risco considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de hematoma no local da punção. Todas as informações fornecidas e os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram e serão mantidos em sigilo sendo que, estes últimos, só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. A análise dos prontuários foi acompanhada pelos clínicos responsáveis pelos pacientes, e os resultados dos testes laboratoriais foram enviados aos mesmos, para inclusão em prontuários e orientação. O TCLE foi aplicado pelo pesquisador responsável ou pela equipe de coleta do HEMORIO, devidamente treinada para a atividade.

### **3.3. Procedimentos experimentais**

#### **3.3.1. Caracterização das amostras**

Todas as amostras passaram pelos testes de triagem laboratorial para caracterização do perfil de hemoglobinas e, posteriormente, os genótipos dos indivíduos foram confirmados por biologia molecular. Os testes clássicos de diagnóstico, para direcionamento das análises moleculares, estão especificados a seguir.

- **Análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)**

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio óptico, quanto ao tamanho, forma e quantidade de hemoglobinas nos eritrócitos. Os resultados foram divulgados segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados:

- Alterações discretas (+).
- Alterações moderadas (++)
- Alterações acentuadas (+++).
- Células normais (N).

- **Avaliação da resistência dos eritrócitos à hemólise (SILVESTRONI & BIANCO, 1975)**

Princípio: Esta técnica avalia a resistência dos eritrócitos à hemólise. Resultados positivos para este teste são encontrados em heterozigose para hemoglobina C e, principalmente, em 97% dos casos de beta talassemia heterozigota, em que os eritrócitos microcíticos presentes são mais resistentes ao processo de hemólise.

Reagentes:

*Solução Estoque NaCl a 10% pH 7,4:*

- NaCl ..... 9,0 g.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 1,36 g.
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ..... 0,28 g.
- Água destilada q.s.p. ....100 mL.

*Solução trabalho:*

- NaCl 10% ..... 36 mL.
- Água destilada q.s.p ..... 1000 mL.

Procedimento:

Em um tubo de ensaio, foram colocados 2,0 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total, com posterior agitação por inversão. A leitura foi feita em até 10 minutos.

Interpretação:

O tubo de ensaio com a solução foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com listras negras. Amostras negativas para o teste permitiram fácil visualização das listras, enquanto amostras positivas não permitiram essa visualização, já que a resistência aumentada à hemólise torna a amostra opaca.

- **Análise do padrão de migração das Hb em eletroforese de pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965)**

Princípio:

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das anormais, com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

*Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB) pH 8,6:*

- Tris hidroximetil aminometano ..... 10,2 g.
- Ácido etilenodiaminotetracético ..... 0,6 g.
- Ácido Bórico ..... 3,2 g.
- Água destilada q.s.p ..... 1000 mL.

*Corante Ponceau:*

- Ponceau S ..... 0,5 g.
- Ácido tricloroacético ..... 5,0 g.
- Água destilada q.s.p ..... 100 mL.

*Solução descorante:*

- Ácido acético glacial ..... 100 mL.
- Metanol ..... 50 mL.
- Água destilada q.s.p ..... 1000 mL.

Procedimento:

Após estarem submersas em tampão TEB, durante 15 minutos, as fitas de acetato de celulose foram secas, com auxílio de papel absorvente. Após esse procedimento, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese e os compartimentos eletrolíticos foram conectados com auxílio de papel filtro. O hemolisado de Hb foi aplicado nas fitas de celulose com distância de 1,0 cm da extremidade da fita que estava em contato com o pólo negativo, recebendo 300 volts por 30 minutos. As frações globínicas formadas foram, primeiramente, observadas sem qualquer coloração sendo, depois, coradas com Ponceau. Para a coloração, as fitas foram submersas no corante durante cinco minutos e, posteriormente, embebidas em solução descorante por 30 minutos.

- **Análise do padrão de migração das Hb em eletroforese de pH ácido (VELLA, 1968)**

Princípio:

Técnica para diferenciar alguns tipos de Hb, que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino, e caracterização semi-quantitativa de Hb F.

Reagentes:

*Tampão Fosfato pH 6,2 (Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel)*

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ..... 2,02 g.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ..... 7,66 g.
- Água destilada q.s.p ..... 1000 mL.

*Gel de Ágar-Fosfato:*

- Ágar-agar ..... 500 mg.
- Tampão fosfato pH 6,2..... 25 mL.

Procedimento:

Misturou-se o ágar e o tampão fosfato em um erlenmeyer de 250 mL até a completa dissolução do primeiro. A mistura foi levada ao microondas para que o gel pudesse ser formado. Pipetou-se 5,0 mL do gel em uma lâmina de microscópio, deixando-as gelificar à temperatura ambiente. Após a gelificação, as amostras foram aplicadas na porção média da lâmina. Utilizou-se papel filtro para promover a conexão entre o gel e os compartimentos eletrolíticos, passando 100 volts durante 30 minutos. As lâminas foram coradas, com o corante Ponceau, a fim de permitir melhor observação e interpretação das frações de Hb obtidas.

- **Quantificação das frações de Hb por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 1999)**

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. Este equipamento consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância *versus* tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Foram misturados, em um tubo, 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante, fornecida no kit de análise. Após hemólise total dos eritrócitos, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento. Os procedimentos foram realizados conforme a pré-programação de leitura das amostras.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de Hb em cada amostra foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparada com os valores de calibração específicos, fornecidos pelo fabricante, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Os valores de Hb A<sub>2</sub> considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,0%, previamente estabelecidos pelo fabricante.

- **Extração do DNA (SAMBROOK; FRITCSH; MANATIS, 1989 modificado por BONINI-DOMINGOS, 2006)**

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol.

#### Princípio:

Este método promove a extração de DNA de sangue periférico utilizando-se fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Neste procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. À mistura de fenol/clorofórmio é adicionado álcool isoamílico. A adição de etanol faz com que os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução, enquanto os ácidos nucleicos precipitam-se e podem ser separados facilmente por centrifugação. O DNA obtido deste processo de extração é adequado para aplicação em métodos de biologia molecular como a amplificação por PCR.

#### Reagentes:

##### 1. Solução de lise 1 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células vermelhas):

- Sacarose 0,32 M ..... 10,95g.
- Tris HCl 10 mM ..... 1mL.
- MgCl<sub>2</sub> 5mM ..... 0,5 mL.
- Triton 1% 100x ..... 1 mL.
- Água ultrapura autoclavada ..... 100 mL.

##### 2. Solução de lise 2 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células brancas):

- NaCl 0,075 M ..... 2,19 g.
- EDTA 0,02 M (solução estoque pH 8,0) ..... 20 mL.
- Água ultrapura ..... 500 mL.

##### 3. Proteinase K (20 mg/mL):

- Proteinase K ..... 20 mg.
- Água ultrapura ..... 1 mL.

## 4. Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1:

- Clorofórmio..... 24 mL.
- Álcool isoamílico ..... 1 mL.

## 5. SDS 10%:

- SDS ..... 10 g.
- Água ultrapura ..... 100 mL.

## 6. Etanol 70% ;

## 7. Fenol;

## 8. KCl 2M:

- KCl (peso molecular 74,55 g) ..... 14,91 g.
- Água ultra pura autoclavada q.s.p. .... 100 mL.

Procedimento:

Cerca de 500 a 800 uL de amostras de sangue periférico, colhidas em tubos contendo EDTA, foram colocados em tubos tipo *ependorf*® e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 6500 rpm.

O sobrenadante foi descartado, deixando-se aproximadamente 300 uL de *pellet* no tubo, e a esse precipitado adicionou-se novamente solução de lise 1, até completar 1,0 mL. As amostras foram agitadas até dissolução do pellet e descansaram por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente antes de serem centrifugadas novamente por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento de lavagem foi realizado mais uma vez.

Ao *pellet* foram adicionados 450 µL de solução de lise 2, 25 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização, as amostras ficaram incubadas em banho-maria a 37°C *overnight* ou a 42°C por três horas. Após o período de incubação, foram adicionados 500 µL de fenol e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 6500 rpm durante cinco minutos.

A fase superior foi transferida para outro tubo e foram adicionados 500 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por mais cinco minutos a 6500 rpm e o procedimento foi repetido por mais uma vez.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 50 µL de KCL gelado e foi adicionado 500 µL de etanol 100%, também gelado. O tubo foi invertido várias vezes, até ocorrer a precipitação do DNA, e centrifugado por 30 segundos a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA, que ficou aderido ao tubo, com 200 µL de etanol 70% gelado. As amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os tubos passaram cerca de 15 minutos secando.

O DNA foi re-hidratado com 50 µL de água ultra pura e ficou descansando *overnight* em temperatura ambiente, para total solubilização da amostra. As amostras foram estocadas a -20°C para posterior análise.

- **PCR-RFLP para Hb S (SAIKI et al., 1985)**

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação, que envolvem o códon 6, foram:

- *primer sense* P 277: 5' - GGCAGAGCCATCTATTGCTTA - 3'

- *primer antisense* P 278: 5' - ACCTTAGGGTTGCCCATAAC - 3'

Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| - H <sub>2</sub> O ultrapura .....   | 14,3 µL; |
| - <i>Primer</i> P 277 10 µM .....    | 1,5 µL;  |
| - <i>Primer</i> P 278 10 µM .....    | 1,5 µL;  |
| - dNTP 1,25 mM .....                 | 1,0 µL;  |
| - Tampão sem MgCl <sub>2</sub> ..... | 2,5 µL;  |
| - MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....      | 3,0 µL;  |
| - Taq Polimerase 5U .....            | 0,2 µL;  |
| - DNA 150 ng/µL .....                | 2,0 µL.  |

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

*Ciclo de 35 repetições:*

- Desnaturação durante 30 segundos a 94°C.
- Anelamento durante 30 segundos a 55°C.
- Extensão de 1 minuto a 72°C.
- Extensão de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 376 pb foi digerido a 37°C por cinco minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

- H<sub>2</sub>O Mili Q ..... 9,0 µL;
- Enzima Fast Digest *Dde* I (C↓TNAG) ..... 1,0 µL;
- Tampão Fast Digest ..... 1,0 µL;
- Produto da PCR ..... 5,0 µL.

A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizada sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

A mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição, assim, após a digestão, alelos normais geraram três fragmentos: 201 pb, 88 pb e 87 pb; enquanto alelos mutantes geraram dois fragmentos 288 pb e 88 pb.

### **3.3.2. Análise dos polimorfismos dos marcadores vasculares**

Todas as amostras foram submetidas a testes moleculares, por PCR-RFLP, para rastreamento dos polimorfismos -509C/T (*TGFB1*), -2578 C/A (*VEGF*), e 1772C/T e 1790G/A (*HIF1A*), segundo os protocolos a seguir.

- **PCR-RFLP para o polimorfismo -509C/T (TGFB1) (SILVERMAN et al., 2004)**

- *primer sense* TGFB1: 5' - CCGCTTCTGTCCTTTCTAGG - 3'

*primer antisense* TGFB2: 5' - AAAGCGGGTGATCCAGATG - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| H <sub>2</sub> O Mili Q .....      | 13,55 µL. |
| Tampão sem MgCl <sub>2</sub> ..... | 2,5 µL.   |
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....      | 0,75 µL.  |
| dNTP 5 mM .....                    | 2,0 µL.   |
| <i>PrimerTGFB1</i> 10 µM .....     | 2,0 µL.   |
| <i>PrimerTGFB2</i> 10 µM .....     | 2,0 µL.   |
| Taq Polimerase 5U .....            | 0,2 µL.   |
| DNA 150 ng/µL .....                | 2,0 µL.   |

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 35 repetições
- Desnaturação durante 30 segundos a 95°C.
- Anelamento durante 30 segundos a 60°C.
- Extensão de 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 406 pb foi digerido de acordo com o protocolo:

|                                                             |         |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O Mili Q .....                               | 8,5 µL. |
| Tampão Fast Digest .....                                    | 1,0 µL. |
| Enzima Fast Digest <i>Bsu36 I</i> (5' - CC↓TNAGG -3') ..... | 0,5 µL. |
| Produto da PCR .....                                        | 5,0 µL. |

Digestão em banho maria a 37°C por 5 minutos.

Na presença do alelo C, foram originados dois fragmentos (223 pb e 183 pb), enquanto a presença do alelo T elimina o sítio reconhecido pela enzima de restrição, gerando um fragmento (406 pb). Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

• **PCR-RFLP para o polimorfismo -2578C/A (VEGFA)**

- *primer sense* VEGFA1: 5' - GGATGGGGCTGACTAGGTAAGC - 3'

- *primer antisense* VEGFA2: 5' - AAGCCCCTTTTCCTCCAAC - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| H <sub>2</sub> O Mili Q .....      | 11,6 µL. |
| Tampão sem MgCl <sub>2</sub> ..... | 2,5 µL.  |
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....      | 1,0 µL.  |
| DMSO100% .....                     | 0,7 µL   |
| dNTP 5 mM .....                    | 2,0 µL.  |
| <i>Primer</i> VEGFA1 10 µM .....   | 2,5 µL.  |
| <i>Primer</i> VEGFA2 10 µM .....   | 2,5 µL.  |
| Taq Polimerase 5U .....            | 0,2 µL.  |
| DNA 150 ng/µL .....                | 2,0 µL.  |

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições de ciclagem:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 35 repetições
- Desnaturação 30 segundos a 95°C.
- Anelamento durante 30 segundos a 64°C.
- Extensão de 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento gerado foi de 324 pb. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

|                                                           |         |
|-----------------------------------------------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O Mili Q .....                             | 8,5 µL. |
| Tampão Fast Digest .....                                  | 1,0 µL. |
| Enzima Fast Digest <i>Bgl</i> II (5' - A↓GATCT -3') ..... | 0,5µL.  |
| Produto da PCR .....                                      | 5,0 µL. |

Digestão em banho maria por 5 minutos a 37°C

Na presença do alelo C, a enzima não reconhece o sítio de restrição e, portanto, observa-se apenas o amplificado de 324 pb. O alelo mutante A cria um sítio de corte para a enzima, gerando dois fragmentos (202 pb e 122 pb). Os fragmentos foram analisados por

eletroforese em gel de agarose a 2,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

• **PCR-RFLP para os polimorfismos 1772C/T (HIF1A)**

- *primer sense* HIF1A1: 5' - AAGGTGTGGCCATTGTAAACTC - 3'

- *primer antisense* HIF1A2: 5' - GCACTAGTAGTTTCTTTATGTATG - 3'

Mistura preparada para cada tubo de reação com volume final de 25 µL:

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| H <sub>2</sub> O Mili Q .....      | 11,3 µL. |
| Tampão sem MgCl <sub>2</sub> ..... | 2,5 µL.  |
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....      | 1,25 µL. |
| DMSO 100% .....                    | 0,75 µL. |
| dNTP 5 mM .....                    | 2,0 µL.  |
| <i>Primer</i> HIF1A1 10 µM .....   | 2,5 µL.  |
| <i>Primer</i> HIF1A2 10 µM .....   | 2,5 µL.  |
| Taq Polimerase 5U .....            | 0,2 µL.  |
| DNA 150 ng/µL .....                | 2,0 µL.  |

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 30 repetições
- Desnaturação durante 30 segundos a 95°C.
- Anelamento durante 30 segundos a 64°C.
- Extensão de 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 346 pb foi digerido de acordo com o protocolo:

*Digestão para identificação da mutação 1772C/T*

|                                                          |         |
|----------------------------------------------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O Mili Q .....                            | 8,5 µL. |
| Tampão Fast Digest .....                                 | 1,0 µL. |
| Enzima Fast Digest <i>Tsp45I</i> (5' - ↓GTSAC -3') ..... | 0,5 µL. |
| Produto da PCR .....                                     | 5,0 µL. |

Digestão em banho maria a 37°C por 5 minutos.

Para o polimorfismo 1772C/T, na presença do alelo C, foram originados três fragmentos (124 pb, 139 pb e 83 pb), enquanto o alelo T elimina um dos sítios reconhecidos pela enzima de restrição, gerando, então, apenas dois fragmentos (263 pb e 83 pb). A visualização dos fragmentos digeridos foi realizada em gel de agarose a 2,5% submetido à eletroforese sob corrente constante de 80 V por 35 minutos, e corado com brometo de etídio.

### **3.3.3. Avaliação dos níveis de proteínas relacionadas a angiogênese por *Western Blotting***

As amostras de plasma dos pacientes, que estavam armazenadas em freezer (-80°C), foram diluídas 10 vezes em solução fisiológica para a quantificação de proteína total, pelo método de Bradford/BSA. Após essa quantificação, cada amostra foi diluída, em solução fisiológica, para chegar a uma concentração final de 1 ug/ml. Posteriormente, 30 ul da amostra foram misturadas a 30 ul do tampão de amostra (*Laemmli sample buffer*), para serem aplicadas em um gel de poliacrilamida, com 12% de concentração.

Foram aplicados aproximadamente 10 ug de proteína total em cada poço do gel, sendo a corrida realizada a 150 V por 1 hora e 30 minutos. Após a separação das proteínas no gel, elas foram transferidas para a membrana de fluoreto polivinilideno (PVDF), em 100 V por 1 hora e 30 minutos. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de BSA em T-TBS para, posteriormente, ser colocada para reagir com um dos anticorpos primários, sendo eles: *mouse monoclonal Anti-VEGF antibody* (0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA), *mouse monoclonal Anti-TGFB1 antibody* (10 ug/ul, Sigma-Aldrich, USA), *rabbit monoclonal Anti-HIF1A antibody* (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA) e *mouse monoclonal Anti-GAPDH antibody* (2 mg/ml, Abcam, USA).

Após a incubação *overnight* com os anticorpos primários, a membrana foi incubada com seu respectivo anticorpo secundário, *Goat anti-mouse IgG-AP* ou *Goat anti-rabbit IgG-AP* (1 mg/ml, BioRad, USA), por 1 hora. Após a incubação com os anticorpos, a membrana foi submetida a coloração por método quimioluminescente (kit AP da BioRad) e a detecção das bandas foi feita pelo software *ImageLab* (BioRad, USA). A identificação das proteínas de interesse foi realizada levando em consideração o tamanho de cada proteína, sendo assim: VEGFA1 foi identificado pela banda próxima a região de 42 kDa; o TGFB1 foi identificado pela banda próxima a região de 25 kDa; o HIF1A, pela banda de aproximadamente 132 kDa; e, por fim, GAPDH, pela banda de aproximadamente 37 kDa. A intensidade de cada banda foi quantificada por densitometria e o valor encontrado para cada proteína foi normalizado pelo valor de GAPDH correspondente.

### 3.3.4. Análise dos marcadores de hemólise

As informações sobre os dados hemolíticos dos pacientes foram obtidas por meio da consulta a seus prontuários médicos. As análises foram realizadas pelos laboratórios dos hemocentros, onde foram coletadas as amostras de sangue. A dosagem de hemoglobina foi feita por método colorimétrico (Cell-Dyn Ruby), enquanto que os parâmetros bioquímicos como LDH, AST e BI foram medidos pelo método 2,4 – diclorofenil diazônio (Beckman coulter AV680). Os dados coletados nos prontuários médicos são referentes ao período da coleta de sangue total.

### 3.3.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico *Statistica 7.0* (Statsoft Inc.), *GraphPad Prism 5* e *SNPassoc R package* (R software v. 3.1.1). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e foram testados para distribuição normal utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados também foram testados para homogeneidade das variâncias pelo teste de *Levene*. A verificação da influência do gênero e do uso de medicação específica sobre os valores dos marcadores hemolíticos foi realizado por meio do teste de *ANOVA one-way*. As médias entre os grupos foram comparados pelo *test t* ou *ANOVA* seguida do teste *post hoc* de *Bonferroni* para dados paramétricos, e os testes de *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *post hoc* de *Dunn* para os dados não paramétricos. Para a análise das frequências genotípicas e alélicas foi realizado o teste de *Chi-quadrado*, complementado pelo teste de *exato de Fisher*. Um teste de *regressão logística multivariada* foi realizado para avaliar o risco ou proteção conferida aos alelos, ajustando para características que poderiam influenciar a análise. Foi feito um teste de *regressão linear multivariada*, ajustado para variáveis que poderiam interferir a análise, para verificar o grau de associação entre as proteínas estudadas. Para comparação entre os níveis das proteínas avaliadas foi realizado um teste de *regressão logística multivariada*, ajustada para variáveis que poderiam interferir na análise. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

---

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização das amostras

Das 57 amostras de sangue coletadas de pessoas com AF, 34 (60%) eram do sexo feminino e 23 (40%) do sexo masculino. Desse total de amostras, 24 (42,1%) foram de pacientes que estavam com úlcera de perna ativa no momento da coleta e, dessa forma, compuseram o grupo de estudo (AFUP+); e 33 amostras (57,1%) foram de pacientes que não apresentavam úlcera de perna no momento da coleta e que não possuíam histórico dessa complicação clínica ao longo da vida, caracterizando o grupo AFUP-. As características gerais dos grupos, como a porcentagem de indivíduos de cada gênero e as medianas das idades, estão detalhadamente demonstradas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização dos grupos em estudo.

| Características | AFUP+        | AFUP-        |
|-----------------|--------------|--------------|
|                 | n = 24       | n = 33       |
| Idade           | 40 (13 – 63) | 19 (11 – 56) |
| Sexo [n (%)]    |              |              |
| Feminino        | 14 (58,3)    | 20 (60,6)    |
| Masculino       | 10 (41,7)    | 13 (39,4)    |

Idade: mediana, idade mínima e máxima. AFUP+: pessoas com anemia falciforme e úlcera de perna / AFUP-: pessoas com anemia falciforme e sem úlcera de perna.

### 4.2. Marcadores hemolíticos

Sabendo da influência que o gênero e o uso de hidroxiureia (HU) poderiam ter sobre os valores dos marcadores hemolíticos avaliados, uma análise prévia foi feita para verificar se, de fato, essas variáveis estariam influenciando os resultados em nossos grupos. Para isso, foi feito um *test t de Student* para avaliar, separadamente, se o gênero ou o uso de HU influenciariam os resultados obtidos e, posteriormente, uma *ANOVA one-way* para saber se a combinação das variáveis poderia influenciar nesses resultados. Nenhuma das análises foi estatisticamente significativa, sendo assim, gênero e uso de HU não interferiram em nossos resultados.

A avaliação dos marcadores hemolíticos entre os grupos do nosso estudo, demonstrou que as pessoas com AF e úlcera de perna apresentaram anemia mais grave ( $p < 0,01$ ), indicada pelos valores de Hb entre os grupos AFUP+ ( $7,36 \pm 0,25\text{g/dL}$ ) e AFUP- ( $8,11 \pm 0,17\text{g/dL}$ ), sendo que essa diminuição não foi acompanhada pelos demais marcadores de hemólise. Assim, LDH e RET não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,1$ ), enquanto que a AST e a BI foram menores no grupo AFUP+ ( $p < 0,01$ ), como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Avaliação dos marcadores de hemólise entre os grupos AFUP+ e AFUP-.

| Marcadores hemolíticos | AFUP+<br>$\bar{x} \pm \text{EP}$ | N  | AFUP-<br>$\bar{x} \pm \text{EP}$ | N  | p                |
|------------------------|----------------------------------|----|----------------------------------|----|------------------|
| Hb (g/dL)              | $7,36 \pm 0,25$                  | 19 | $8,11 \pm 0,17$                  | 31 | <b>&lt; 0,01</b> |
| LDH (U/L)              | $421,8 \pm 32,2$                 | 16 | $632,9 \pm 77,4$                 | 27 | 0,19             |
| AST (U/L)              | $30,06 \pm 2,54$                 | 18 | $42,38 \pm 3,48$                 | 29 | <b>&lt; 0,01</b> |
| BI (mg/dL)             | $1,45 \pm 0,22$                  | 16 | $2,73 \pm 0,27$                  | 24 | <b>&lt; 0,01</b> |
| RET (%)                | $9,96 \pm 0,94$                  | 10 | $10,7 \pm 1,70$                  | 19 | 0,99             |

$\bar{x} \pm \text{EP}$ : média  $\pm$  erro padrão. AFUP+: pessoas com anemia falciforme e úlcera de perna / AFUP-: pessoas com anemia falciforme e sem úlcera de perna. Hb: hemoglobina / LDH: lactato desidrogenase / AST: aspartato aminotransferase / BI: bilirrubina indireta / RET: valor relativo de reticulócitos. Testes estatísticos utilizados: teste *t*, para dados paramétricos, e *Mann-Whitney*, para dados não paramétricos. Nível de significância adotado  $p < 0,05$ .

#### 4.3. Avaliação dos polimorfismos genéticos relacionados a angiogênese

Em relação aos marcadores genéticos, avaliamos as frequências genotípicas e alélicas de cada polimorfismo e fizemos um teste de *Chi-quadrado* para verificar se havia alguma diferença nas frequências entre os grupos com e sem úlcera de perna. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada, como demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -2578C/A no gene *VEGFA*, -509C/T no gene *TGFβ1* e -1772C/T no gene *HIF1α*, observadas nos grupos em estudo, pelo teste de *Chi-quadrado*.

| <i>Polimorfismo</i>                       | <i>AFUP+</i>  | <i>AFUP-</i>  | <i>P</i> |
|-------------------------------------------|---------------|---------------|----------|
| <i>VEGFA1 -2578C &gt; A (rs 699947)</i>   |               |               |          |
| <b>Genótipo</b>                           | <b>N (%)</b>  | <b>N (%)</b>  |          |
| C/C                                       | 12 (50)       | 9 (37,5)      |          |
| C/A                                       | 12 (50)       | 12 (50)       |          |
| A/A                                       | 0 (0)         | 3 (12,5)      | 0,54     |
| <b>Alelo</b>                              | <b>N (FA)</b> | <b>N (FA)</b> |          |
| C                                         | 37 (0,7)      | 30 (0,6)      |          |
| A                                         | 12 (0,3)      | 18 (0,4)      |          |
| <i>TGFβ1 - 509C &gt; T (rs 1800469)</i>   |               |               |          |
| <b>Genótipo</b>                           | <b>N (%)</b>  | <b>N (%)</b>  |          |
| C/C                                       | 14 (58,3)     | 17 (53,1)     |          |
| C/T                                       | 8 (33,3)      | 12 (37,5)     |          |
| T/T                                       | 2 (8,4)       | 3 (9,4)       | 0,25     |
| <b>Alelo</b>                              | <b>N (FA)</b> | <b>N (FA)</b> |          |
| C                                         | 36 (0,7)      | 46 (0,7)      |          |
| T                                         | 12 (0,3)      | 18 (0,3)      |          |
| <i>HIF1α - 1772C &gt; T (rs 11549465)</i> |               |               |          |
| <b>Genótipo</b>                           | <b>N (%)</b>  | <b>N (%)</b>  |          |
| C/C                                       | 21 (84,0)     | 27 (68,0)     |          |
| C/T                                       | 2 (16,0)      | 5 (15,6)      |          |
| T/T                                       | 0 (0,0)       | 1 (3,4)       | 0,12     |
| <b>Alelo</b>                              | <b>N (FA)</b> | <b>N (FA)</b> |          |
| C                                         | 44 (0,9)      | 46 (0,7)      |          |
| T                                         | 4 (0,1)       | 18 (0,3)      |          |

FA: Frequência Alélica. Testes estatísticos utilizados: *Chi-quadrado* e exato de Fisher. Nível de significância adotado:  $p < 0,05$ .

Posteriormente às análises de frequências genotípicas e alélicas, foi realizada uma análise de *regressão logística multivariada* para avaliar a relação de risco ou proteção conferida a cada alelo dos três polimorfismos avaliados, ajustando a análise para a idade e o gênero, fatores que influenciam as chances de risco de ocorrência de úlcera de perna, por se tratar de uma condição mais frequente em homens do que em mulheres e, comumente, a partir dos 10 anos de idade. Todos os modelos testados estão detalhadamente demonstrados na Tabela 4, sendo que nenhum deles mostrou relação significativa com o risco de ter úlcera de perna nesses indivíduos.

**Tabela 4.** Associação dos polimorfismos -2578C/A no gene *VEGFA*, -509C/T no gene *TGFβ1* e -1772C/T no gene *HIF1α*, com a úlcera de perna em indivíduos com AF. Utilizando regressão logística multivariada, ajustada para o gênero e idade.

| <b><i>VEGFA1 -2578C &gt; A (rs 699947)</i></b>   |                 | <b>AFUP+</b> | <b>AFUP-</b> | <b>OR</b>       | <b>P</b> |
|--------------------------------------------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|----------|
| <b>Modelo</b>                                    | <b>Genótipo</b> | <b>N (%)</b> | <b>N (%)</b> |                 |          |
| C                                                | C/C             | 12 (50)      | 9 (37,5)     | 0,75(0,23-2,44) | 0,10     |
|                                                  | C/A             | 12 (50)      | 12 (50)      |                 |          |
|                                                  | C/C             | 0 (0)        | 3 (12,5)     |                 |          |
| D                                                | C/C             | 12 (50)      | 9 (37,5)     | 0,59(0,19-1,88) | 0,37     |
|                                                  | C/A-A/A         | 12 (50)      | 15 (62,5)    |                 |          |
| R                                                | A/A             | 0 (0)        | 3 (12,5)     | -               | 0,04     |
|                                                  | C/C-A/A         | 24 (100)     | 21 (87,5)    |                 |          |
| H                                                | C/A             | 12 (50)      | 12 (50)      | 0,98(0,31-3,06) | 0,97     |
|                                                  | C/C-A/A         | 12 (50)      | 12 (50)      |                 |          |
| <b><i>TGFβ1 - 509C &gt; T (rs 1800469)</i></b>   |                 | <b>AFUP+</b> | <b>AFUP-</b> | <b>OR</b>       | <b>P</b> |
| <b>Modelo</b>                                    | <b>Genótipo</b> | <b>N (%)</b> | <b>N (%)</b> |                 |          |
| C                                                | C/C             | 12 (50)      | 17 (53,1)    | 0,79(0,25-2,50) | 0,91     |
|                                                  | C/T             | 12 (50)      | 12 (37,5)    |                 |          |
|                                                  | T/T             | 0 (0)        | 3 (9,4)      |                 |          |
| D                                                | C/C             | 14 (58,3)    | 17 (53,1)    | 0,79(0,27-2,33) | 0,67     |
|                                                  | C/T-T/T         | 10 (41,7)    | 15 (46,9)    |                 |          |
| R                                                | T/T             | 2 (8,3)      | 3 (9,4)      | 0,88(0,14-5,73) | 0,89     |
|                                                  | C/C-C/T         | 22 (91,7)    | 29 (90,6)    |                 |          |
| H                                                | C/T             | 8 (33,3)     | 12 (37,5)    | 0,81(0,26-2,50) | 0,72     |
|                                                  | C/C-T/T         | 16 (66,7)    | 20 (62,5)    |                 |          |
| <b><i>HIF1α - 1772C &gt; T (rs 11549465)</i></b> |                 | <b>AFUP+</b> | <b>AFUP-</b> | <b>OR</b>       | <b>P</b> |
| <b>Modelo</b>                                    | <b>Genótipo</b> | <b>N (%)</b> | <b>N (%)</b> |                 |          |
| C                                                | C/C             | 21 (91,3)    | 27 (81,8)    | 0,52(0,09-2,94) | 0,43     |
|                                                  | C/T             | 2 (8,7)      | 5 (15,2)     |                 |          |
|                                                  | T/T             | 0 (0)        | 1 (3,0)      |                 |          |
| D                                                | C/C             | 21 (91,3)    | 27 (81,8)    | 0,43(0,08-2,34) | 0,30     |
|                                                  | C/T-T/T         | 2 (8,7)      | 6 (18,2)     |                 |          |
| R                                                | T/T             | 0 (0)        | 1 (3,0)      | -               | 0,30     |
|                                                  | C/C-C/T         | 23 (100)     | 32 (97,0)    |                 |          |
| H                                                | C/T             | 2 (8,7)      | 5 (15,2)     | 0,53(0,09-3,02) | 0,46     |
|                                                  | C/C-T/T         | 21 (91,3)    | 28 (84,8)    |                 |          |

C: modelo codominante; D: modelo dominante; R: modelo recessivo; H: modelo heterozigoto. Nível de significância adotado:  $p < 0,05$ .

A análise de interações entre os polimorfismos também foi realizada e não produziu informações adicionais além das que foram obtidas pela análise individual de cada polimorfismo.

#### **4.4. Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao processo angiogênico**

Inicialmente, para avaliarmos os níveis das proteínas entre os indivíduos estudados, foi realizado um teste de *regressão logística multivariada* para verificar se o gênero ou a idade poderiam influenciar os valores observados entre os grupos. Foi verificado que, nos pacientes com úlcera de perna, o gênero e a idade dos indivíduos influenciaram na expressão proteica e, dessa forma, todas as análises seguintes foram ajustadas para essas características.

Com relação a influência dos polimorfismos na expressão das proteínas estudadas, foi observado maior expressão de VEGFA1 ( $p = 0,03$ ) nos indivíduos com genótipo selvagem ( $14,1 \pm 1,30$ ), no grupo AFUP+, quando comparados aos indivíduos com a presença do alelo mutante ( $12,7 \pm 1,04$ ). Não houve diferenças estatísticas para os demais polimorfismos em nenhum dos grupos estudados. Para essa análise, foi realizado um teste de *regressão logística multivariada*, ajustado para gênero e idade, para os grupos AFUP+ e AFUP-, apresentadas nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Na tabela 5, em decorrência da ausência de indivíduos AFUP+ com o genótipo mutante para o *VEGFA1* (AA) e para o *HIF1A* (TT), os modelos que utilizam o genótipo mutante para a análise - dominante (D), recessivo (R) e heterozigoto (H) - não foram realizados. Por motivos técnicos, como a falta de material biológico para análise de síntese proteica, para alguns indivíduos, mesmo tendo sido feito a análise dos polimorfismos, não foi realizada a avaliação dos níveis das proteínas relacionadas a angiogênese. Dessa forma, na tabela 6, por termos avaliado apenas indivíduos AFUP- com o genótipo selvagem (CC), em decorrência da ausência de indivíduos com o genótipo mutante (TT) e da avaliação dos níveis das proteínas para os indivíduos CT, não foi possível analisar nenhum dos modelos para esse polimorfismo.

**Tabela 5.** Regressão logística multivariada para verificar a influência dos genótipos nos níveis das proteínas relacionadas a angiogênese, nos pacientes com úlcera de perna, corrigido para gênero e idade.

| VEGFA1 em AFUP+ |          |    |                    |               |      |
|-----------------|----------|----|--------------------|---------------|------|
| Modelo          | Genótipo | N  | Níveis da proteína | IC            | p    |
|                 |          |    | média ± EP         |               |      |
| C               | CC       | 10 | 14,1 ± 1,30        | (-2,86 -0,28) | 0,03 |
|                 | CA       | 9  | 12,7 ± 1,04        |               |      |
| TGFB1 em AFUP+  |          |    |                    |               |      |
| Modelo          | Genótipo | N  | Níveis da proteína | IC            | p    |
|                 |          |    | média ± EP         |               |      |
| C               | CC       | 11 | 10,93 ± 1,50       | (-2,89 4,74)  | 0,89 |
|                 | CT       | 6  | 13,86 ± 0,45       |               |      |
|                 | TT       | 1  | 14,75 ± 0,00       |               |      |
| D               | CC       | 11 | 10,93 ± 1,50       | (-2,63 4,38)  | 0,63 |
|                 | CT-TT    | 7  | 13,9 ± 0,40        |               |      |
| R               | CC-CT    | 17 | 11,9 ± 1,02        | (-6,49 6,94)  | 0,94 |
|                 | TT       | 1  | 14,75 ± 0,00       |               |      |
| H               | CC-TT    | 12 | 11,25 ± 1,40       | (-2,74 4,45)  | 0,64 |
|                 | CT       | 6  | 13,86 ± 0,45       |               |      |
| HIF1A em AFUP+  |          |    |                    |               |      |
| Modelo          | Genótipo | N  | Níveis de proteína | IC            | p    |
|                 |          |    | média ± EP         |               |      |
| C               | CC       | 15 | 1,43 ± 0,23        | (-0,55 2,43)  | 0,23 |
|                 | CT       | 12 | 2,68 ± 1,61        |               |      |

C: modelo codominante; D: modelo dominante; R: modelo recessivo; H: modelo heterozigoto. AFUP+: pessoas com anemia falciforme e úlcera de perna. AFUP-: pessoas com anemia falciforme sem a presença de úlcera de perna. N: número de indivíduos. IC: intervalo de confiança. Dados apresentados como média ± EP (erro padrão). Nível de significância adotado:  $p < 0,05$ .

**Tabela 6.** Regressão logística multivariada para verificar a influência dos genótipos nos níveis das proteínas relacionadas a angiogênese, nos pacientes sem úlcera de perna, corrigido para gênero e idade.

| VEGFA1 em AFUP- |          |    |                    |               |      |
|-----------------|----------|----|--------------------|---------------|------|
| Modelo          | Genótipo | N  | Níveis da proteína | IC            | p    |
|                 |          |    | média ± EP         |               |      |
| C               | CC       | 5  | 9,51 ± 0,81        |               |      |
|                 | CA       | 5  | 8,51 ± 0,58        | (-2,49 1,46)  | 0,43 |
|                 | AA       | 1  | 7,45 ± 0,00        | (-6,50 1,18)  |      |
| D               | CC       | 5  | 9,51 ± 0,81        |               | 0,40 |
|                 | CA-AA    | 6  | 8,34 ± 0,50        | (-2,73 1,03)  |      |
| R               | CC-CA    | 10 | 9,01 ± 0,50        |               | 0,21 |
|                 | AA       | 1  | 7,45 ± 0,00        | (-6,04 1,09)  |      |
| H               | CC-AA    | 6  | 9,16 ± 0,74        |               | 0,80 |
|                 | CA       | 5  | 8,51 ± 0,58        | (-2,32 1,79)  |      |
| TGFB1 em AFUP-  |          |    |                    |               |      |
| Modelo          | Genótipo | N  | Níveis da proteína | IC            | p    |
|                 |          |    | média ± EP         |               |      |
| C               | CC       | 8  | 5,85 ± 1,60        |               |      |
|                 | CT       | 8  | 5,56 ± 1,74        | (-1,74 6,72)  | 0,20 |
|                 | TT       | 1  | 3,44 ± 0,00        | (-14,35 2,38) |      |
| D               | CC       | 8  | 5,85 ± 1,60        |               | 0,67 |
|                 | CT-TT    | 9  | 5,35 ± 1,55        | (-3,29 5,15)  |      |
| R               | CC-CT    | 16 | 5,70 ± 1,14        |               | 0,16 |
|                 | TT       | 1  | 3,44 ± 0,00        | (-14,81 2,07) |      |
| H               | CC-TT    | 9  | 5,58 ± 1,43        |               | 0,24 |
|                 | CT       | 8  | 5,56 ± 1,74        | (-1,65 7,10)  |      |

C: modelo codominante; D: modelo dominante; R: modelo recessivo; H: modelo heterozigoto. AFUP+: pessoas com anemia falciforme e úlcera de perna. AFUP-: pessoas com anemia falciforme sem a presença de úlcera de perna. N: número de indivíduos. IC: intervalo de confiança. Dados apresentados como média ± EP (erro padrão). Nível de significância adotado:  $p < 0,05$ .

Com o intuito de evidenciar se a diferença observada na expressão proteica entre os genótipos de *VEGFA1* era exclusiva dos indivíduos com úlcera de perna (AFUP+), como demonstrado na tabela 5, foi realizado um teste de *regressão logística multivariada*, ajustado para gênero, idade e presença de úlcera de perna. Os resultados obtidos mostram que o genótipo selvagem (CC), do polimorfismo *VEGFA1*, aumenta significativamente ( $p < 0,01$ ) os níveis de expressão da proteína VEGFA1. Não foram observadas diferenças na expressão proteica entre os demais genótipos dos outros polimorfismos estudados, como demonstrado na tabela 7.

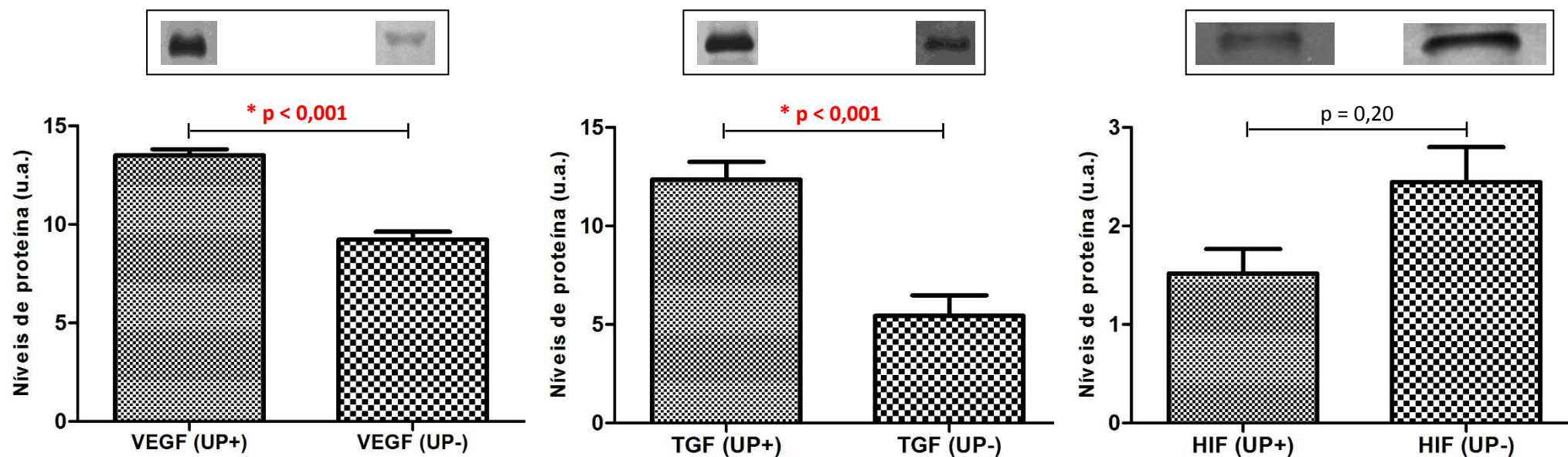
Para verificar se os níveis das proteínas estudadas diferiam entre os grupos AFUP+ e AFUP-, independentemente do genótipo dos polimorfismos que poderiam modular sua expressão, foi realizado um teste de *regressão logística multivariada*, ajustado para gênero, idade e presença dos polimorfismos, como demonstrado na figura 5. De acordo com essa análise, os níveis de VEGFA1 apresentam-se 1,5 vezes mais elevados em pacientes com úlcera de perna do que nos pacientes sem essa complicação clínica ( $p < 0,01$ ). Além disso, os níveis de TGFB1 também estão elevados, cerca de 2,3 vezes mais, no grupo de pacientes com úlcera de perna do que no grupo de pacientes sem essa complicação clínica ( $p < 0,01$ ).

Para verificar a existência de relação na expressão proteica entre as proteínas avaliadas, foi realizado um teste de *regressão linear multivariada*, ajustado para gênero, idade e presença de úlcera de perna, em que foi possível observar uma relação inversa entre os níveis das proteínas HIF1A e TGFB1 ( $p < 0,01$ ). As demais proteínas não apresentaram relação estatisticamente significativa, VEGFA1 x HIF1A ( $p = 0,54$ ) e VEGFA1 x TGFB1 ( $p = 0,36$ ).

**Tabela 7.** Regressão logística multivariada para verificar a influência dos genótipos nos níveis das proteínas relacionadas a angiogênese, corrigindo para gênero, idade e presença de úlcera de perna.

| VEGFA1 |          |    |                                  |               |        |
|--------|----------|----|----------------------------------|---------------|--------|
| Modelo | Genótipo | N  | Níveis da proteína<br>média ± EP | IC            | p      |
| C      | CC       | 15 | 12,56 ± 0,69                     |               | 0,02   |
|        | CA       | 13 | 11,05 ± 0,65                     | (-2,31 -0,29) |        |
|        | AA       | 1  | 7,45 ± 0,00                      | (-5,62 0,20)  |        |
| D      | CC       | 15 | 12,56 ± 0,69                     |               | < 0,01 |
|        | CA-AA    | 14 | 10,79 ± 0,66                     | (-2,38 -0,42) |        |
| R      | CC-CA    | 28 | 11,86 ± 0,49                     |               | 0,19   |
|        | AA       | 1  | 7,45 ± 0,00                      | (-5,40 1,00)  |        |
| H      | CC-AA    | 16 | 12,24 ± 0,72                     |               | 0,03   |
|        | CA       | 13 | 11,05 ± 0,65                     | (-2,22 -0,13) |        |
| TGFB1  |          |    |                                  |               |        |
| Modelo | Genótipo | N  | Níveis da proteína<br>média ± EP | IC            | p      |
| C      | CC       | 19 | 8,79 ± 1,22                      |               | 0,85   |
|        | CT       | 14 | 9,11 ± 1,50                      | (-2,51 4,45)  |        |
|        | TT       | 2  | 9,09 ± 5,65                      | (-5,77 7,40)  |        |
| D      | CC       | 19 | 8,79 ± 1,22                      |               | 0,57   |
|        | CT-TT    | 16 | 9,11 ± 1,40                      | (-2,30 4,18)  |        |
| R      | CC-CT    | 33 | 8,93 ± 0,93                      |               | 0,88   |
|        | TT       | 2  | 9,09 ± 5,65                      | (5,92 6,84)   |        |
| H      | CC-TT    | 21 | 8,82 ± 1,16                      |               | 0,60   |
|        | CT       | 14 | 9,11 ± 1,50                      | (-2,47 4,24)  |        |
| HIF1A  |          |    |                                  |               |        |
| Modelo | Genótipo | N  | Níveis de proteína<br>média ± EP | IC            | p      |
| C      | CC       | 32 | 2,00 ± 0,24                      |               | 0,29   |
|        | CT       | 2  | 2,68 ± 1,61                      | (-0,98 3,29)  |        |

C: modelo codominante; D: modelo dominante; R: modelo recessivo; H: modelo heterozigoto. AFUP+: pessoas com anemia falciforme e úlcera de perna. N: número de indivíduos. IC: intervalo de confiança. Dados apresentados como média ± EP (erro padrão). Nível de significância adotado: p<0,05.



**Figura 5.** Resultado de análise por *regressão logística multivariada*, ajustada para gênero, idade e presença dos polimorfismos, para avaliar a existência de diferenças na expressão proteica, das proteínas relacionadas a angiogênese, entre os grupos AFUP+ e AFUP-. UP+: pacientes com anemia falciforme e presença de úlcera de perna. UP-: pacientes com anemia falciforme sem úlcera de perna. Níveis das proteínas, em unidades arbitrárias (u.a.), por meio da técnica de *western blotting*. Nível de significância adotado:  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

---

## 5. Discussão

Os estudos que visam compreender a úlcera de perna na AF são antigos, levando em consideração que o primeiro caso de AF descrito na literatura inglesa, há mais de 100 anos, era de um paciente com úlcera de perna (HERRICK, 1910; MINNITI et al., 2015). No entanto, mais de um século depois, essa questão permanece mal compreendida. Esse trabalho avaliou, por meio de marcadores específicos, a influência da hemólise e da angiogênese na úlcera de perna em pessoas com AF, complicação clínica frequente nesses indivíduos e de causa multifatorial.

Muitos trabalhos buscaram avaliar a influência da hemólise na úlcera de perna de pessoas com AF, sendo que a grande maioria deles encontrou uma relação entre o risco de desenvolver a úlcera de perna com a gravidade da anemia hemolítica do indivíduo. Assim, pacientes com Hb baixa e os demais marcadores elevados (LDH, BI, RET e AST) são considerados grupo de risco para o desenvolvimento de úlcera de perna (KATO et al., 2007; NOLAN et al., 2006). Esses achados fortalecem a proposta de alguns autores que classificam a úlcera de perna como pertencente a um subfenótipo hemolítico, juntamente com acidente vascular encefálico (AVE), priapismo e hipertensão pulmonar (STEINBERG, 2001; OHENE-FREMPONG et al, 1998; SARNAIK & BALLAS, 2001).

Os resultados obtidos com os marcadores de hemólise, neste trabalho (Tabela 2), mostraram que, de fato, os pacientes com úlcera de perna apresentam anemia mais grave, representada pela diminuição dos valores de Hb, em comparação com os pacientes que não possuem essa complicação clínica. No entanto, diferentemente do que é apontado pela literatura, não foi notado, em nosso grupo, diferenças estatísticas nos valores de LDH e RET e, além disso, BI e AST apresentaram-se diminuídos nos pacientes com úlcera de perna.

Existem algumas razões que podem explicar essa variação observada em nossos dados com relação ao que é proposto na literatura. Segundo Minniti *et al* (2015), existem três padrões distintos de úlcera de perna nas pessoas com a AF: a úlcera única, experimentada por aproximadamente metade dos pacientes com úlcera de perna, que desenvolvem uma única úlcera

ao longo de suas vidas e que é cicatrizada em alguns meses de tratamento; úlceras recorrentes, caracterizadas por pequenas úlceras que reaparecem a cada 6 ou 12 meses, durante anos; e, por fim, as úlceras crônicas, recorrentes e debilitantes, que permanecem abertas por anos e reaparecem no mesmo local ou em regiões próximas. De acordo com os autores, cada um desses padrões apresentam uma taxa hemolítica específica que, de certa forma, poderia determinar a complexidade da manifestação clínica. Por se tratar de uma distinção proposta recentemente na literatura, esse tipo de caracterização das úlceras ainda não foi adotado pelos serviços em que foram realizadas as coletas das amostras, sendo essa informação de difícil acesso nos prontuários médicos. Assim, não sabemos em quais grupos estariam inseridos os pacientes com úlcera de perna do nosso estudo, o que poderia, de certa forma, ter influenciado os resultados de hemólise encontrados.

Outra possível explicação para a variação encontrada em nossos dados de hemólise é que a maioria dos artigos disponíveis na literatura, que estudaram essa complicação clínica em pessoas com AF, não fez a distinção entre pacientes com úlcera ativa e histórico de úlcera, sendo muito comum, em alguns trabalhos, agruparem essas duas condições em uma única categoria, sendo considerada como presença de úlcera de perna (CONNES et al, 2013; MINNITI et al., 2015). Neste trabalho, foi considerado para compor o grupo com úlcera de perna apenas pessoas com úlcera ativa, o que pode ter contribuído para a diferença observada em nosso estudo.

A úlcera de perna em pessoas com AF, na grande maioria das vezes, é resultante de algum trauma que, por características multifatoriais ainda desconhecidas, enfrenta certa resistência à cura (MINNITI et al., 2015; MACMAHON *et al*, 2010). Sabe-se que a angiogênese é uma etapa crucial para o processo bem-sucedido de cura da ferida e que a falta dela é um importante fator para o desenvolvimento de úlceras crônicas (BREM et al., 2009; MINNITI et al., 2015). Nolan *et al* (2006), sugeriram que a úlcera de perna em pessoas com AF seria afetada por genes que modulam os subfenótipos da doença e, com isso, investigou a relação de centenas

de polimorfismos em genes candidatos, encontrando relação com polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que participam dos mecanismos da angiogênese.

No nosso conhecimento, o presente trabalho foi o primeiro a avaliar a influência desses três genes (*VEGFA1*, *HIF1  $\alpha$*  e *TGF $\beta$ 1*) relacionados à angiogênese, com a ocorrência de úlcera de perna em pessoas com AF. Assim, com exceção do *TGF $\beta$ 1*, em que um estudo na literatura mostra uma relação de seus SNPs com a úlcera de perna em pessoas com AF (NOLAN et al, 2006) – o que não foi observado em nossos resultados -, não há estudos que evidenciem a relação dos demais polimorfismos com essa complicação clínica na doença.

De acordo com os dados disponíveis na literatura, alguns estudos com o polimorfismo -2578 do *VEGFA1* (rs 699947), em outras doenças, mostraram que pessoas com o genótipo CC apresentaram maior produção dessa citocina, o que promoveria uma resposta angiogênica adequada a esses indivíduos (MARTINEZ-FIERRO et al., 2013; SHAHBAZI et. al., 2002). No caso das pessoas com AF, a herança dessa condição poderia ser considerada um fator protetor ao desenvolvimento de úlceras de perna nos indivíduos com esse genótipo. No entanto, nossos resultados não mostraram nenhuma relação, de risco ou proteção, desse polimorfismo com a ocorrência de úlcera de perna em pessoas com AF (Tabelas 3 e 4). Ao avaliarmos a influência do polimorfismo -2578 do *VEGFA1* (rs 699947) na expressão proteica de *VEGFA1* (Tabela 7), observamos que, nas pessoas com AF, independentemente de gênero, idade ou presença de úlcera de perna, o genótipo selvagem (CC) aumentou significativamente os níveis dessa proteína, estando de acordo com o que é apresentado na literatura.

Nenhuma relação foi observada, também, com o polimorfismo – 1772C/T do *HIF1A* (rs 11549465) e a ocorrência de úlcera de perna nesses pacientes. Os dados na literatura, de estudos que avaliaram o polimorfismo – 1772C/T do *HIF1A* em outras doenças, mostram que as pessoas com genótipo mutante (TT) apresentam maior expressão do HIF (VAINRIB, 2012; FRAGA, 2012; RANASINGHE, 2015) – fato não observado em nosso estudo, como demonstrado na Tabela 7 - o que, de certa forma, levaria ao aumento de outras citocinas

importantes no processo da angiogênese e, dessa forma, promoveria a homeostase do processo. De acordo com a nossa hipótese, essa condição favoreceria um efeito protetivo, nos pacientes, a ocorrência de úlcera de perna. No entanto, essa relação não foi observada em nossos resultados, refutando assim, a nossa hipótese.

Com relação ao polimorfismo – 509C/T do *TGFB1* (rs 1800469), nossos dados não mostraram qualquer relação com a ocorrência de úlcera de perna nos indivíduos com AF, não havendo diferenças genotípicas ou alélicas entre os grupos e nem relação de risco ou proteção com algum dos alelos, como demonstrado nas Tabelas 3 e 4. Alguns estudos, mostram que pessoas com o genótipo mutante (TT) possuem maior expressão de TGFβ1 (CAO, 2014; PANEK, 2014; LUEDECKING, 2000) – fato não observado em nosso estudo, como demonstrado na Tabela 7 - o que, de acordo com as funções dessa citocina, favoreceria uma regulação adequada do processo de cura de feridas e, em nosso estudo, protegeria os pacientes com esse genótipo a desenvolverem a úlcera de perna. No entanto, essa relação não foi observada.

Sabendo da importância do processo angiogênico para a cura bem-sucedida de feridas e considerando que esse processo é altamente regulado, tendo, portanto, início e fim, esperávamos que, de alguma maneira, essa etapa estivesse prejudicada nos indivíduos com úlcera de perna, em nosso estudo. Nossos resultados mostram que, nos indivíduos AFUP+, os níveis plasmáticos de VEGFA1 estão aumentados 1,5 vezes, em comparação com os pacientes sem essa complicação clínica, como demonstrado na Figura 5.

O VEGFA1 é fundamental para a angiogênese, no processo de cura de feridas, durante a etapa proliferativa. Essa citocina participa de cada etapa do processo angiogênico, promovendo a vasodilatação dos vasos sanguíneos, a degradação da membrana de base, a migração e proliferação de células endoteliais, no local da lesão. Estudos que avaliaram feridas em pacientes diabéticos e na população geral, mostram que durante o processo de cura da ferida aguda, os níveis de VEGFA1 alcançam seu pico de expressão entre o terceiro e o sétimo dia

imediatamente após a lesão, sendo que, assim que se completa a formação do tecido de granulação, a produção dessa citocina é interrompida (BAO et al, 2009). No entanto, durante o processo de cura de ferida crônica, os níveis de VEGFA1 permanecem elevados, implicando em prejuízo ao processo de cura (BAO et al, 2009; KONDO et al, 2010; RAM et al, 2015), fato observado em nosso estudo.

Além do VEGFA1, outras citocinas participam do processo de cura de feridas, dentre elas, o TGFB1 é considerado crucial para homeostase desse processo, por regular os eventos moleculares e celulares que ocorrem ao longo de cada etapa. Assim, imediatamente após o dano, o TGFB1 é secretado pelas plaquetas e participa do recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão. Na etapa proliferativa, participa do processo de angiogênese, auxiliando na migração e proliferação das células endoteliais. Por fim, na fase de maturação, o TGFB1 é responsável por induzir os fibroblastos a produzirem a matriz extracelular, além de ativar o seu desenvolvimento em miofibroblastos, que são responsáveis pela contração da ferida e maturação (FALLER et al., 2006). Devido a essa intensa atuação, os níveis dessa citocina estão elevados durante todo o processo de cura das feridas (FALLER et al., 2006; RAM et al, 2015), como pode ser observado em nosso estudo, em que os pacientes AFUP+ apresentaram 2,3 vezes mais TGFB1 que os indivíduos AFUP- (Figura 4).

A expressão proteica de VEGFA1 e de TGFB1, assim como a produção de outros mediadores da angiogênese (IL-8, NOS e PDGF), é significativamente elevada em resposta a hipóxia, por meio da ação do HIF1A (CONWAY et al., 2000; SEMENZA, 2000; JIANG et al., 2007). Assim, devido a hipóxia tecidual presente na região da ferida, ocorre acentuado aumento da expressão de HIF1A e, conseqüentemente, estímulo de seus genes alvo, gerando uma potente resposta angiogênica (LOPES et al., 2014). Em nosso estudo, ao avaliarmos a relação da expressão proteica entre HIF1A, VEGFA1 e TGFB1, verificamos uma relação inversa entre os baixos níveis de HIF1A e os altos níveis de TGFB1. Como a metodologia utilizada em nosso trabalho detecta os níveis da proteína livre no plasma, esse resultado, possivelmente, indica que a

diminuição nos níveis de HIF1A é decorrente de sua atuação como fator de transcrição, tornando-o menos disponível no plasma, e dessa forma, a medida que o HIF1A diminui, aumenta a expressão proteica de TGFB1.

Dessa forma, nossos resultados mostram que a úlcera de perna em pessoas com anemia falciforme é caracterizada pela persistência de um ambiente pró-angiogênico, evidenciado pelos altos níveis de VEGFA1 e TGFB1. Por se tratar de um processo altamente regulado, essa condição de desequilíbrio da angiogênese causa prejuízo para as etapas seguintes do processo, resultando em atraso na cura da ferida.

Em um estudo recente, em que foi observada características histopatológicas da úlcera de perna de pessoas com anemia falciforme, Minniti et al. (2013), observaram que o leito da úlcera apresentava intenso fluxo sanguíneo, se comparado às regiões ao redor do leito ou da borda. No entanto, foram observadas algumas alterações, como a formação de tecido de granulação com a presença de infiltrado inflamatório crônico, além de alterações vasculares, como estreitamento do lúmen e progressiva vasoclusão. Houve, ainda, alterações na superfície dermal do tecido em reparo, como a proliferação de pequenos capilares e de vasos sanguíneos com alterações microangiopáticas, incluindo a necrose fibrinoide e a presença de fragmentos de eritrócitos dentro da parede dos vasos sanguíneos. Esses resultados sugerem que a úlcera de perna nesses pacientes com anemia falciforme respondeu aos estímulos angiogênicos, no entanto, houve a ocorrência de vasculopatia, prejudicando a cura da ferida.

Assim, podemos sugerir que a úlcera crônica nas pessoas com anemia falciforme está associada a persistência de um estado pró-angiogênico, como evidenciado por nosso trabalho, podendo acarretar em alterações no desenvolvimento de etapas cruciais do processo, comprometendo o reparo do dano tecidual. Dessa forma, evidenciamos a necessidade de mais estudos para esclarecer, principalmente, se há algum desequilíbrio na regulação dos complexos eventos moleculares e celulares que envolvem o processo da cura de feridas.

## 6. CONCLUSÕES

---

## 6. Conclusões

- Não há relação de predisposição à ocorrência de úlcera de perna em pessoas com a anemia falciforme com a presença dos polimorfismos genéticos -2578C/A do gene *VEGFA1*, -1772C/T do gene *HIF1A* e -509C/T do gene *TGFB1*, que regulam a expressão de proteínas participantes dos processos de angiogênese;
- A gravidade da anemia hemolítica é um fator de risco para a ocorrência de úlcera de perna em pessoas com anemia falciforme;
- Os níveis plasmáticos de *VEGFA1*, nas pessoas com anemia falciforme e úlcera de perna, estão 1,5 vezes maiores, em comparação às pessoas com anemia falciforme que não apresentam essa complicação clínica;
- Os níveis plasmáticos de *TGFB1*, nas pessoas com anemia falciforme e úlcera de perna, estão 2,3 vezes maiores, em comparação às pessoas com anemia falciforme que não apresentam essa complicação clínica;
- A úlcera crônica na anemia falciforme está associada a persistência de um estado pró-angiogênico, que dificulta o progresso das etapas no processo de cura da ferida.

### Referências bibliográficas

- AKINSHEYE, I.; KLINGS, E.S. Sick Cell Anemia and Vascular Dysfunction: The Nitric Oxide Connection. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, p. 620-625, 2010.
- ALMEIDA, A.; ROBERTS, I. Bone involvement in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 129, no. 4, p. 482-490, 2005.
- BAIN, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. **Blood Rev**, v. 25, p. 205-213, 2011.
- BALLAS, S. *et al.* Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **The Scientific World Journal**, v. 94, p. 95-101, 2012.
- BALLAS, S. *et al.* Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American journal of hematology**, v.85, p. 6-13, 2009.
- BAO, P.M.D., KODRA, A. B.A., TOMIC-CANIC, M. *et al.* The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. **Journal of Surgical Research**, v. 153, p. 347-358, 2009.
- BONINI-DOMINGOS, C.R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias.**, São José do Rio Preto-SP: HN Editora, 2006.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial.** 232 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 1993.
- BOWERS AS, REID HL, GREENIDGE A, LANDIS C, REID M. Blood Viscosity and the Expression of Inflammatory and Adhesion Markers in Homozygous Sickle Cell Disease Subjects with Chronic Leg Ulcers. **PLoS ONE**. 2013.
- CAO H, ZHOU Q, LAN R, RØE OD, CHEN X, CHEN Y, *et al.* (2014) A Functional Polymorphism C-509T in TGFβ-1 Promoter Contributes to Susceptibility and Prognosis of Lone Atrial Fibrillation in Chinese Population. **PLoS ONE** 9(11): e112912.
- CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; COSTA, F.F. Newer Aspects of the Pathophysiology of Sickle Cell Disease Vaso-Occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, p. 1-16, 2009.
- CONNES P, LAMARRE Y, HARDY-DESSOURCES M-D, LEMONNE N, WALTZ X, MOUGENEL D, *et al.* (2013) Decreased Hematocrit-To-Viscosity Ratio and Increased Lactate Dehydrogenase Level in Patients with Sickle Cell Anemia and Recurrent Leg Ulcers. **PLoS ONE** 8(11): e79680.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, 2007.
- CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, p. 507-521, 2001.
- DEHGHANIAN, F.; HAJATI, Z.; KAY, M. New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 6, n.4, 2014.

- DRISS, A.; ASARE, K.O.; HIBBERT, J.M. et al. Sick Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**, v. 2, p. 23-30, 2009.
- DUITS, A.; RODRIGUEZ, T.; SCHNOG, J. J. B. Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease. **British Journal of Hematology**, v. 134, p. 116-119, 2006.
- FRAGA, C. A.; DE OLIVEIRA, M. V.; DE OLIVEIRA, É. S.; BARROS, L. O., SANTOS, F. B.; GOMEZ, R. S.; DE-PAULA, A. M.; GUIMARÃES, A. L. A high HIF-1 $\alpha$  expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. **Oral Oncology**, v. 48, p. 130–135, 2012
- FALER, B. J.; MACSATA, R. A.; PLUMMER, D. et al. Transforming Growth Factor- $\beta$  and wound healing. **Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy**, v. 18, p. 55-62, 2006.
- FRENETTE, P.S. & ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 850–858, 2007.
- HEBBEL, R.P., VERCELLOTTI, G. & NATH, K.A. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multimodality chemo-prophylaxis. **Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets**, v. 9, p. 271–292, 2009.
- HERRICK JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch Intern Med**, v. 6, p. 517–521, 1910.
- HOEPER MM, NIEDERMEYER J, HOFFMEYER F, FLEMMING P, FABEL H. Pulmonary hypertension after splenectomy? **Annals of Internal Medicine**, v. 130, p. 506–509, 1999.
- HONIG, G.R.; ADAMS III, J. G. **Human hemoglobin genetics**, Wien: Springer, 1986.
- INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante  $\beta$ -Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 1999.
- JIANG, Y.; DAI, A.; QIFANG, L. I.; RUICHENG, H. U. Hypoxia Induces Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Gene Expression in the Pulmonary Artery of Rats via Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ . **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, p. 73-80, 2007.
- KATO, G., GLADWIN, M. & STEINBERG, M. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood reviews** (2012).
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology wound healing. **Forensic Science International**, p. 93-98, 2010.
- LADIZINSKI, B.; BAZAKAS, A.; MISTRY, N.; ALAVI, A.; SIBBALD, R.G.; SALCIDO, R. Sickle cell disease and leg ulcer. **Wound care journal**, v. 25, p. 420 – 428, 2012.
- LOPES, F. C. M.; FERREIRA, R.; ALBUQUERQUE, D. M. et al. In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea. **Microvascular Research**, v. 94, p. 106-113, 2014.
- LUEDECKING EK, DEKOSKY ST, MEHDI H, GANGULI M, KAMBOH MI. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. **Hum Genet**, v. 106, p. 565–569, 2000.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. **IUBMB Life**, v. 60, p. 94-111, 2008.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J Clin Pathol**, v. 18, p. 790-792, 1965.

MARTINEZ-FIERRO, M. I., GARZA-VELOZ, I., ROJAS-MARTINEZ, A. et al. Positive association between vascular endothelial growth factor (VEGF) -2578 C/A variant and prostate cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 13, p. 235-241, 2013.

MCMAHON, L. et al. A randomized phase II trial of Arginine Butyrate with standard local therapy in refractory sickle cell leg ulcers. **British journal of haematology**, v. 151, p. 516-24, 2010.

MINNITI, C. et al. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. **American journal of hematology** (2013).

MINNITI, C. P. AND KATO, G. J. (2015). How we treat sickle cell patients with leg ulcers. **Am. J. Hematol.** doi: 10.1002/ajh.24134

NOLAN, V. et al. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. **British journal of haematology**, v. 133, p. 570-8, 2006.

OHENE-FREMPPONG, K., WEINER, S.J., SLEEPER, L.A., et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, v. 91, 288-294, 1998.

PANEK, M., PIETRAS, T., FABIJAN, A., ZIOŁO, J., WIETESKA, Ł., MAŁACHOWSKA, B., KUNA, P. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms, C-509T, C+466T and T+869C, of the TGF-β1 gene in patients with asthma and their influence on the mRNA expression level of TGF-β1. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, p. 975-986, 2014.

PASTAR, I.; STOJADINOVIC, A.; KRZYŻANOWSKA, A.; BARRIENTOS, S.; STUELLEN, C.; ZIMMERMAN, K.; BLUMENBERG, M.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Attenuation of the Transforming Growth Factor β-signalling pathway in chronic venous ulcer. **MOL. MED.** v. 16, p. 92-101, 2001.

RAM, M.; SINGH, V.; KUMAWAT, S.; KANT, V. et al. Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats. **International Immunopharmacology**, v. 30, p. 137-149, 2016.

RANASINGHE, W. K. B.; BALDWIN, G. S.; BOLTON, D.; SHULKES, A.; ISCHIA, J.; PATEL, O. HIF1α Expression under Normoxia in Prostate Cancer-Wich Pathways to Target? **The Journal of Urology** (2015). 0022-5347/15/1933-0763/0

REES, D.C., WILLIAMS, T.N. & GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet**, 376, 2018-2031 (2010).

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. et al. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E. F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARNAIK, S.A. & BALLAS, S.K. (2001) Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. **American Journal of Hematology**, 67, 179–182.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. **Genes and Development**, v. 14, p. 1983-1991, 2000.

SHAHBAZI, M., FRYER, A. A., PRAVICA, V., BROGAN, I. J. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms Are Associated with Acute Renal Allograft Rejection. **J Am Soc Nephrol** v. 13; p. 260–264, 2002.

SIMÕES, B. P.; PIERONI, F.; BARROS, G.M.N. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comite de hemoglobinopatias. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 46-53, 2010.

SPARKENBAUGH, E. & PAWLINSKI, R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. **British journal of haematology**, v. 162, p. 3–14, 2013.

STEINBERG, M.H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 465–481, 2005.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **The scientific world journal**, v. 8, p. 1295-1324, 2008.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **Scientific World Journal**, v. 9, p. 46-67, 2009.

STEINBERG, M.H. et al. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management, New York: **Cambridge University Press**, 2001.

STEINBERG, M.H. (2001) Compound heterozygous and other hemoglobinopathies. In: Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management (ed. by M.H. Steinberg, B.G. Forget, D.R. Higgs, & R.L. Nagel), pp. 786–810. **Cambridge University Press**, Cambridge.

TAIMEH, Z., LOUGHRAN, J., BIRKS, E. & BOLLI, R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, p. 519–30, 2013.

VAINRIB, M.; GOLAN, M.; AMIR, S.; DANG, D. T.; DANG, L. H.; BAR-SHIRA, A.; ORR-URTREGER, A.; MATZKIN, H.; MABJEESH, N. J. HIF1A C1772T polymorphism leads to HIF-1 $\alpha$  mRNA overexpression in prostate cancer patients. **Cancer Biol Ther**. 2012

VELLA, F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **Am J Clin Pathol**, v. 49, p. 440-442, Mar 1968.

ZAGO, M. A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 207-214, 2007.