

Paula Angeleli Bueno de Camargo

Perfil global de expressão de micro-RNA's em adultos com Síndrome de Klippel-Trenaunay

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira

Coorientadores: Profa. Dra. Regina Moura

Prof. Dr. Matheus Bertanha

Botucatu

2018

Paula Angeleli Bueno de Camargo

Perfil global de expressão de micro-RNA's
em adultos com Síndrome de Klippel-Trenaunay

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Bases Gerais da Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira

Coorientadores: Profa. Dra. Regina Moura

Prof. Dr. Matheus Bertanha

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Camargo, Paula Angeleli Bueno de.

Perfil global de expressão de micro-RNA's em adultos com
Síndrome de Klippel-Trenaunay / Paula Angeleli Bueno de Camargo.
- Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marcone Lima Sobreira

Coorientador: Regina Moura

Coorientador: Matheus Bertanha

Capes: 40102041

1. Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber. 2. MicroRNAs. 3.
Indutores da angiogênese. 4. Angiodisplasia. 5. Malformações
vasculares.

Palavras-chave: Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber; microRNA;
angiodisplasia; indutores da angiogênese; malformações vasculares.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais
Estela Maria Angeleli de Camargo e Luiz Bonifácio Bueno de Camargo
por cada vitória alcançada ao longo de nossas vidas,
sempre com muito amor e dedicação.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha irmã

Bruna Angeleli Bueno de Camargo

pelo amor e companheirismo em todos os momentos de nossas vidas.

Ao meu noivo

Flávio Scarparo

pelo amor incondicional, incentivo constante e paciência.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador

Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira

*não só por ter sido meu orientador nesta jornada mas
sim por ser um amigo e exemplo de competência e caráter.*

A minha coorientadora

Profa. Dra. Regina Moura

*por todos os ensinamentos ao longo da residência de Cirurgia
Vascular e, especialmente, por me acolher e orientar no
Ambulatório de Malformações Vasculares.*

Ao meu coorientador

Prof. Dr. Matheus Bertanha

*por estimular meu interesse à pesquisa e pelos ensinamentos, amizade
e parceria na superação das dificuldades para a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus,
por me proporcionar serenidade e resiliência para a realização deste trabalho.*

*Aos meus pacientes
que confiaram na seriedade deste trabalho e sem os quais nada seria possível.*

*Aos meus amigos
pelas palavras de carinho e de apoio em todos os momentos.*

*Aos professores da disciplina de Cirurgia Vascular da FMB-UNESP
Prof. Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei,
Prof. Dr. Hamilton de Almeida Rollo e Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida,
pelos ensinamentos, experiências e
por me mostrar o quanto a cirurgia vascular é encantadora.*

*À Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis
pelo apoio e suporte quanto às questões genéticas presente neste trabalho.*

*À Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho
pela dedicação e contribuição para a realização deste trabalho,
por meio das análises estatísticas realizadas com incrível prontidão.*

*Aos meus amigos e colegas de trabalho,
médicos assistentes da disciplina de Cirurgia Vascular da FMB-UNESP,
Dr. Rafael Elias Farres Pimenta, Dr. Rodrigo Gibin Jaldin,
Dra. Karina Marcellino Baldon e Dr. Jamil Victor de Oliveira Mariúba
pelo apoio ao longo deste trabalho.*

*Aos meus amigos e colegas de trabalho,
médicos residentes da disciplina de Cirurgia Vascular da FMB-UNESP,
pelo apoio ao longo deste trabalho.*

*As minhas colegas do Laboratório NeoGene
Natália Bertoni e Tainara Felix
pelo apoio e participação essencial ao longo deste trabalho.*

*Aos professores da Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da FMB-UNESP,
pela disponibilidade e dedicação.*

*À secretária da pós-graduação Márcia Fonseca Piagentini Cruz,
pela dedicação, apoio e disposição constante em ajudar.*

*À funcionária da Biblioteca da FMB-UNESP Rosângela Aparecida Lobo,
pela confecção da ficha catalográfica deste trabalho.*

*Aos ex-funcionários e funcionários do Laboratório Vascular do HC FMB/ UNESP,
pela amizade e apoio ao longo deste trabalho.*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: microlitro

AGGF5: angiogenic factor with G-patch and FHA domains 1

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

cm: centímetro

cM: centimorgan

DL: dislipidemia

DM: diabetes mellitus

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FAV: fístula arteriovenosa

FC: Fold Change

FMB: Faculdade de Medicina de Botucatu

GnPnAnCn: relativo ao número de: Gestações/ Partos/ Abortos/ Cesáreas

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HC: Hospital das Clínicas

hsa: relativo à espécie *Homo sapiens*

IMC: índice de massa corpórea

ING5: inhibitor of growth family member 5

kg/m²: quilograma por metro quadrado

kg: quilograma

KTS: Syndrome Klippel-Trenaunay

log: logaritmo

m: metro

MAV: malformação arteriovenosa

MC: malformação capilar

MID: membro inferior direito

MIE: membro inferior esquerdo

min: minuto

miR: microRNA maduro

miRNA: microRNA

ML: malformação linfática

mL: mililitro

MMII: membros inferiores

mRNA: RNA mensageiro

MSD: membro superior direito

MV: malformação venosa

n: número

°C: graus Celsius

p (valor p): probabilidade de significância

PCR: reação em cadeia de polimerase

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

pré-miRNA: miRNA precursor

pri-miRNA: miRNA primário

RISC: complexo silenciador RNA induzido

RNA: ácido ribonucleico

RNase: ribonuclease

RNM: ressonância nuclear magnética

rpm: rotações por minuto

RT-qPCR: PCR quantitativa em tempo real

RX: raio-X

s: segundo

SKT: Síndrome de Klippel-Trenaunay

TA: temperatura ambiente

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

US: ultrassonografia

UTR: untranslated region

VFSE: veia femoral superficial esquerda

VG5G: vasculogenesis gene on 5q

VSMD: veia safena magna direita

VSME: veia safena magna esquerda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações presentes na SKT. A - veias varicosas; B - hipertrofia do membro acometido (MIE > MID) e C - malformação capilar (mancha “vinho do porto”) . 22
Figura 2	Processos de formação e ação do miRNA..... 27
Figura 3	Estrutura de uma molécula típica de mRNA de proteína humana, contendo regiões não traduzidas (UTRs)..... 27
Figura 4	Modelo de diagrama tipo Volcano plot 37
Figura 5	Grupo “Pacientes com SKT”: triagem dos pacientes e etapas realizadas nas consultas. 39
Figura 6	Grupo “Referência”: triagem dos doadores de sangue, etapas realizadas na ocasião da doação e escolha aleatória dentre os participantes..... 41
Figura 7	Diagrama tipo volcano plot: comparação do perfil global de expressão dos miRNA’s entre os indivíduos dos grupos “Pacientes com SKT” e “Referência” 49
Figura 8	Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e angiogênese..... 51
Figura 9	Biblioteca BioPlex 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e gene AGGF1. 51
Figura 10	Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese 52
Figura 11	Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese – gráfico de barras..... 52
Figura 12	Biblioteca BioPlex 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e gene AGGF1..... 53
Figura 13	Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e angiogênese 53
Figura 14	Biblioteca BioPlex 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e gene AGGF1..... 54
Figura 15	Biblioteca GO Biological Process 2017b: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e angiogênese..... 55
Figura 16	Biblioteca MGI Mammalian Phenotypr 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e angiogênese . 55

Figura 17	Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e SKT 55
Figura 18	Biblioteca GO Biological Process 2017b: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese 56
Figura 19	Biblioteca MGI Mammalian Phenotype 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese 56
Figura 20	Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e SKT..... 57
Figura 21	Biblioteca MGI Mammalian Phenotype 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e angiogênese 57
Figura 22	Biblioteca GO Biological Process 2017b: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e angiogênese. 58
Figura 23	Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e SKT..... 58
Figura 24	Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e angiogênese 61
Figura 25	Biblioteca MGI Mammalian Phenotype 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e angiogênese 62
Figura 26	Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e SKT – gráfico de barras 62
Figura 27	Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e SKT..... 63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Exames de imagens solicitados a todos os pacientes quando diagnosticados como SKT 31
Quadro 2	Características dos indivíduos do grupo “Pacientes com SKT”: local de acometimento da síndrome e sinais apresentados para o seu diagnóstico..... 44
Quadro 3	Características dos indivíduos do grupo “Pacientes com SKT” referentes à malformação capilar 46
Quadro 4	Características dos indivíduos do grupo “Pacientes com SKT” referentes às malformações venosas..... 47
Quadro 5	Características dos indivíduos do grupo “Pacientes com SKT” referentes às dimensões dos MMII..... 48
Quadro 6	Pesquisa relacionadas às vias moleculares nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr..... 50
Quadro 7	Pesquisa relacionadas à ontologia nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr..... 54
Quadro 8	Relação do transcritos alvos comuns aos 3 miRNA com expressão diminuídas entre os pacientes com SKT 59
Quadro 9	Pesquisa relacionadas às vias moleculares nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr..... 60
Quadro 10	Pesquisa relacionadas à ontologia nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr..... 61
Quadro 11	Resumo das associações dos 3 miRNA’s com expressão diminuída no grupo “Pacientes com SKT” com as vias moleculares e com a ontologia, encontradas na base de dados Enrichr 63
Quadro 12	Resumo das associações dos 3 microRNA’s com expressão diminuída no grupo “Pacientes com SKT” com os transcritos alvos preditos, encontradas na base de dados Enrichr, 64
Quadro 13	Diagrama de Venn ilustrando os genes que mantém relação com SKT e com os transcritos alvos preditos dos três miRNA’s, na biblioteca Jensen DISEASES..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teste de Fisher – Comparação entre percentual de indivíduos referentes às variáveis de caracterização, segundo grupo.....	42
Tabela 2	Teste t de student – Comparação entre média e desvio-padrão referentes às variáveis, segundo grupo.	43
Tabela 3	miRNA's com expressão diminuída no grupo “Pacientes com SKT”	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
2.1 DESENHO DO ESTUDO	30
2.2 LOCAL	30
2.3 PROCEDIMENTOS ÉTICOS	30
2.4 MÉTODOS.....	30
2.4.1 Critérios de Inclusão.....	32
2.4.2 Critérios de Exclusão	33
2.4.3 Registro fotográfico	33
2.4.4 Coleta das amostras	33
2.5 POTENCIAIS EFEITOS ADVERSOS	34
2.6 EXTRAÇÃO DO RNA.....	34
2.7 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DE miRNA'S.....	35
2.8 ANÁLISE DE DADOS	36
2.8.1 Análise da expressão de miRNA's	36
2.8.2 Processamento dos dados de expressão.....	36
2.8.3 Base de dados para análise dos miRNA's com expressão alterada	38
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
3. RESULTADOS.....	39
3.1 ASPECTOS GERAIS	39
3.1.1 Grupo "Pacientes com SKT"	39
3.1.2 Grupo "Referência"	41
3.2 ASPECTOS RELACIONADOS A SKT	44
3.3 RESULTADOS DA ANÁLISE DOS miRNA'S	49
4. DISCUSSÃO	65
5. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES.....	74
APÊNDICE A – Dados demográficos e epidemiológicos: Grupo "Pacientes com SKT"	74
APÊNDICE B - Dados epidemiológicos: Grupo "Pacientes com SKT"	75
APÊNDICE C – Dados demográficos e epidemiológicos: Grupo "Referência"	76
APÊNDICE D – Dados epidemiológicos: Grupo "Referência"	77
APÊNDICE E – Termo de consentimento livre e esclarecido	78
ANEXOS	79
ANEXO A – Classificação de Hamburgo para Malformações Vasculares Congênitas.....	79
ANEXO B – Classificação da International Society for Studies of Vascular Anomalies (ISSVA) para Malformações Vasculares Congênitas	80

RESUMO

Introdução: A Síndrome de Klippel Trenaunay (SKT) é uma anomalia vascular caracterizada por ser uma doença rara, com prevalência estimada em 1 caso para cada 100.000 pessoas, diagnosticada clinicamente pela presença de pelo menos dois dos seguintes achados: malformação capilar, malformações venosas e hipertrofia dos tecidos afetados. A literatura científica respalda o manejo dos sintomas e tratamento das veias varicosas em alguns casos selecionados. A melhor abordagem terapêutica é crucial para esses pacientes, tornando-se necessário o melhor conhecimento da história natural da doença, o que justifica o estudo do perfil genético desses pacientes, visto que alguns autores revelaram o papel crucial dos microRNAs na regulação da angiogênese, que parece ser o ponto-chave da SKT.

Objetivos: Determinar o perfil global de expressão de miRNA's em pacientes com SKT em comparação com amostras de sangue de pessoas saudáveis, sem a síndrome. **Métodos:** A amostra foi constituída por pacientes adultos (≥ 18 anos) com diagnóstico clínico de SKT, acompanhados no Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu da Faculdade de Medicina de Botucatu/ UNESP. Como referência, foram utilizadas amostras de sangue de adultos saudáveis (≥ 18 anos), doadores de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu/ UNESP Botucatu. **Resultados:** Entre os pacientes com SKT, foram encontrados 3 miRNA com expressão diminuída em comparação com os controles: hsa-miR-320a, hsa-miR-486-5p e hsa-miR-574-3p. Através de busca em bases de dados genéticas, observou-se que todos estes miRNA's guardam relação com angiogênese e apenas dois guardam relação com AGGF1, elemento sabidamente envolvido na SKT. Através dessas mesmas buscas observou-se a menção a outros 5 genes como tendo relação com SKT, sendo o ING5 comum a todos os miRNA's de interesse. **Conclusão:** Os pacientes com SKT apresentaram alterações em seu perfil global de expressão de miRNA, com 3 miRNA's apresentando expressão diminuída, relacionados a angiogênese, AGGF1 e outros genes, em especial ING5.

Palavras-chave: Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, microRNAs, indutores da angiogênese, angiodisplasia, vasos sanguíneos, doenças vasculares, malformações vasculares

ABSTRACT

Introduction: Klippel Trenaunay Syndrome (KTS) is a vascular malformation characterized by being a rare disease, with a prevalence estimated in 1 case per 100,000 people, diagnosed clinically by the presence of at least two of the following findings: capillary malformation, venous malformations, and hypertrophy of affected tissues. The scientific literature supports the management of symptoms, treatment of varicose veins in selected cases and, rarely, amputations. The best therapeutic approach is crucial for these patients, making it necessary to have a better knowledge of the natural history of the disease, which justifies the study of the genetic profile of these patients, since some authors have revealed the crucial role of microRNAs in the regulation of angiogenesis, which seems to be the key point of KTS.

Objectives: To determine the overall expression profile of miRNA's in patients with KTS compared to blood samples from healthy people without the syndrome. **Methods:** The sample consisted of adult patients (> 18 years) with clinical diagnosis of KTS, followed at the Vascular Malformation Outpatient Service of the Vascular and Endovascular Surgery Service of Botucatu Medical School, Botucatu Medical School / UNESP. Blood samples from healthy adults (> 18 years old), blood donors from the Botucatu Medical School / UNESP Botucatu Blood Center were used as reference. **Results:** Among the patients with SKT, 3 miRNA's with decreased expression were found compared to subjects without the disease: hsa-miR-320a, hsa-miR-486-5p and hsa-miR-574-3p. Through search in genetic databases, it was observed that all these miRNA are related to angiogenesis and only two closely relate to AGGF1, elements known to be involved in SKT. Through these same searches, mention was made of the other 5 genes as being related to KTS, with ING5 being common to all miRNA's of interest. **Conclusion:** Patients with KTS presented alterations in their overall expression profile of miRNA, with 3 miRNA having decreased expression related to angiogenesis, AGGF1 and other genes, especially ING5.

Keywords: Klippel-Trenaunay-Weber Syndrome, microRNAs, angiogenesis inducing agents, angiodysplasia, blood vessels, vascular diseases, vascular malformations

1. INTRODUÇÃO

O sistema vascular é constituído por vasos sanguíneos e vasos linfáticos e o seu desenvolvimento é essencial para o desenvolvimento embrionário.¹ A conexão entre artérias e veias formando uma circulação fechada foi descrita pela primeira vez por William Harvey, em 1628. Embora Harvey não tenha sido capaz de visualizar os capilares, lançou como hipótese a sua existência, que foi confirmada por Marcello Malpighi, em 1661.²

Vasos e células sanguíneas se desenvolvem em paralelo durante a embriogênese dos mamíferos para formar um sistema circulatório que oferece nutrientes e oxigênio para todos os tecidos, remove produtos do metabolismo, favorece o crescimento e previne toxicidade. A formação de vasos sanguíneos durante a embriogênese começa com vasculogênese seguida de angiogênese.^{1, 2}

É dado o nome de vasculogênese ao processo de formação de vasos sanguíneos durante a organogênese, etapa em que as novas células se originam a partir de angioblastos, células indiferenciadas da mesoderme esplâncnica.^{1, 2} A vasculogênese também pode ser definida como a diferenciação *in situ* do plexo vascular primitivo, a partir de seus precursores. O plexo capilar primário passa por angiogênese, o que ocorre no estágio pós-embrionário, para formar uma rede vascular complexa.^{1, 2} O desenvolvimento posterior, acompanhado do recrutamento de pericitos e células musculares lisas, mudanças de tamanho e estrutura mural conduz à formação de artérias, capilares e veias, cada uma com suas próprias funções e características.²

Os vasos linfáticos originam-se de vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário e são responsáveis por transportarem linfa, participando dos processos nutricionais dos órgãos.²

O descontrole da formação e desenvolvimento dos vasos resulta na formação de um grupo heterogêneo de anomalias vasculares, que podem ser definidas como aberrações estruturais e funcionais durante o processo de organogênese, resultando em alterações morfológicas e funcionais.

Em 1982, Mulliken e Glowacki propuseram a primeira classificação de malformações vasculares ressaltando a existência de dois grandes grupos de lesões com características biológicas distintas: os hemangiomas e as malformações vasculares, que foi aceita pela Sociedade Internacional para o Estudo das Anomalias Vasculares (ISSVA).³ Esta

classificação foi primeiramente revisada para contemplar outras lesões descritas pela literatura, criando-se um grupo denominado tumores vasculares que substituíram o grupo hemangioma e mantiveram o grupo denominado malformações vasculares. Alterações dessa classificação foram propostas pela Classificação de Hamburgo, em 1988, em que foi adotada uma perspectiva embriológica para auxiliar na classificação das malformações vasculares. As lesões são identificadas primeiro, com base na estrutura vascular prevalente envolvida – arterial, venosa, linfática ou capilar, considerando também fístulas arteriovenosas e defeitos vasculares combinados.⁴ O contexto embriológico da lesão é, então, considerado, para a delimitação adicional (ANEXO A).⁵ As lesões extratrucares resultam da interrupção do desenvolvimento dos troncos vasculares no estágio embrionário reticular precoce, que podem ser infiltradas e difusas ou limitadas e localizadas. As lesões trucares resultam de um defeito ocorrido durante o desenvolvimento fetal após o desenvolvimento dos troncos vasculares, constituídas por estenoses ou obstruções dos troncos vasculares, resultando em hipoplasia ou dilatação, localizada ou difusa.⁶ Paralelamente, uma última revisão da classificação da ISSVA foi realizada em 2014 (ANEXO B).⁷ A medida que novas entidades histologicamente distintas foram reconhecidas, bem como avanços no entendimento do comportamento e da genética relacionadas às lesões, ocorreu essa revisão. Ela manteve as duas categorias originais, subdividindo o grupo tumoral em benignas, localmente agressivas ou limítrofes e malignas; e o grupo de malformações foi dividido em simples, combinadas, anomalias associadas aos vasos maiores e nominados ou malformações vasculares trucais, e, por fim, malformações associadas a outras anomalias.^{7, 8}

Dentre as malformações vasculares, no subgrupo daquelas associadas a outras anomalias, encontra-se a Síndrome de Klippel-Trenaunay (SKT). A dupla de franceses Maurice Klippel e Paul Trenaunay⁹ definiu, em 1900, uma coorte de pacientes que apresentava uma tríade caracterizada por hipertrofia assimétrica de membros, malformação capilar localizada (mancha “vinho do porto”) e varizes congênitas das extremidades inferiores (Figura 1). Pouco após essa descrição, Weber designou uma síndrome vascular semelhante que contempla, além da tríade presente na SKT, a presença de fístulas arteriovenosas, denominada Síndrome de Parkes Weber, que também se enquadra na mesma classificação.¹⁰

Figura 1 – Alterações presentes na SKT. **A** - veias varicosas; **B** - hipertrofia do membro acometido (MIE > MID) e **C** - malformação capilar (mancha “vinho do porto”)



Fonte: material elaborado pelo autor

A SKT é uma doença rara, esporádica, descrita na literatura como sendo sem predileção por raça e gênero, com prevalência estimada em 1 caso para cada 100.000 pessoas.^{11, 12} Usualmente, afeta os membros inferiores de forma unilateral, sendo raro o acometimento dos membros superiores, do tronco, a apresentação bilateral ou mesmo visceral.¹³ Seu diagnóstico é baseado na presença de duas das três seguintes características: malformações capilares, malformações venosas ou varizes e hipertrofia dos tecidos afetados e é firmado apenas pelos achados clínicos, não havendo testes complementares patognomônicos. A manifestação completa da tríade ocorre em apenas 63% dos pacientes com SKT.¹⁴

O achado clínico mais frequente é a malformação capilar, estando presente na quase totalidade dos casos, cursando como manchas vinho do porto notadas já ao nascimento, causadas por ectasia de pequenos vasos sanguíneos perto da superfície da pele. As manchas são tipicamente planas, com coloração variando de rosa pálido a marrom profundo, podendo ficar mais claras ou escuras com o passar da idade.^{11, 15} As malformações venosas também são frequentes e podem acometer tanto o sistema profundo, manifestando-se como aneurismas, aplasia, hipoplasia, duplicações e incompetência venosa, quanto o sistema superficial através

de varizes ou mesmo veias embrionárias persistentes e ectasiadas. A hipertrofia é a mais variável das três clássicas características da SKT sendo que o alargamento da extremidade consiste em alongamento ósseo, hipertrofia circunferencial de tecidos moles ou ambos processos, podendo levar a discrepâncias no comprimento do membro que, quando muito acentuadas, necessitam de intervenção ortopédica.¹⁵ A relação do crescimento ósseo com as alterações vasculares não é bem estabelecida, mas se acredita que o fluxo sanguíneo arterial esteja aumentado nas epífises devido ao aumento dos capilares nesse local, levando a hipertrofia óssea.¹⁶ Entretanto, em alguns casos é possível ocorrer a hipotrofia do membro acometido.¹⁷

Embora o envolvimento visceral seja incomum, ele pode ser fonte significativa de complicações e, até mesmo, mortalidade.¹² Alguns órgãos como rins, bexiga, pênis, uretra, vulva, vagina, pulmões, baço, fígado e intestinos podem ser acometidos por anormalidades como, por exemplo, aumento de suas dimensões, presença de veias dilatadas e tortuosas, flebólitos, fragilidade de mucosas, hemangiomas e linfangiomas, sendo que a ausência de varicosidades ou malformações venosas dos membros não impede o envolvimento pélvico.^{12, 15, 18} Há relatos contraditórios sobre alterações acometendo o sistema nervoso central, sendo que na maioria das referências exclui-se a ocorrência dessas alterações.^{12, 14}

Na grande maioria dos pacientes com SKT, a doença apresenta curso benigno, podendo ser conduzida com medidas conservadoras, como elastocompressão e repouso na posição de Trendelenburg.¹⁹ Porém, alguns pacientes podem apresentar dor, edema, hiperpigmentação, tromboflebites, ulcerações e alterações linfáticas no membro afetado além de macrodactilia, coagulopatias, insuficiência cardíaca, embolia pulmonar, sangramentos oriundos de vasos alterados, geralmente presentes nos tratos gastrointestinal e genitourinário, além de disfunção erétil predisposta por veias penianas anormais.^{12, 20} A presença concomitante de hemangiomas pode ocasionar sequestro plaquetário, levando a coagulopatia de consumo e piora dos episódios de sangramento e para estas situações, há necessidade de tratamentos mais agressivos e resolutivos.¹⁹

A extração dos grandes grupos de varizes foi condenada por alguns autores no passado, pois observaram um agravamento dos sintomas após a excisão dos plexos venosos superficiais. Cerca de 8% dos pacientes com SKT possuem atresia ou hipoplasia do sistema venoso profundo e, nesses casos, a excisão cirúrgica dos plexos superficiais é contra-indicada. No entanto, quando os sintomas são acenuados e o sistema venoso profundo é patente, a cirurgia

pode ser benéfica.¹⁹ As terapias minimamente invasivas, como a escleroterapia com espuma, guiada por ultra-som, vêm sendo utilizadas com bons resultados.²¹

Para a confirmação da assimetria entre os membros, realiza-se a escanometria, que é um exame de imagem preciso para se avaliar a diferença entre os membros inferiores. O exame é realizado em duas etapas, sendo que na primeira etapa o paciente é posicionado em decúbito dorsal com os pés juntos, alinhados em supina 90° com a mesa. Alinha-se o feixe central longitudinal do colimador do aparelho de raio-X (RX) de maneira que ele passe exatamente entre os tornozelos e na sínfise púbica do indivíduo. Utilizando-se duas placas de chumbo, divide-se o filme em 3 segmentos que são radiografados separadamente: no primeiro, realiza-se a radiografia dos quadris; no segundo, a dos joelhos; e no terceiro, a dos tornozelos. O numerador posicionado a direita, indica o lado. O paciente deve permanecer imóvel até o término desta fase do exame. A segunda etapa é realizada para se proceder a medida dos pés. Realiza-se então uma radiografia em anteroposterior dos tornozelos com o paciente em ortostatismo e os pés rodados internamente 30°. Essa segunda etapa muitas vezes é omitida por desconhecimento ou por ausência de diferenças significativas entre as alturas dos pés. Quando há uma diferença pouco superior a 1,5cm no comprimento entre os membros inferiores, pode-se lançar mão do uso de palmilhas ou sapatos ortopédicos compensatórios para evitar-se a escoliose. Quando a diferença supera 2 a 2,5cm pode-se eventualmente lançar mão de intervenções cirúrgicas na forma de osteotomias ou epifisiodeses.^{22, 23}

A mortalidade devido SKT é baixa, aproximando-se de 1%, tendo como principais causas hemorragias, viscerais ou pós-operatórias, embolia pulmonar secundária a trombose venosa e, raramente, desenvolvimento de neoplasia vascular, como angiossarcoma associado a linfedema crônico.²⁰

Embora seja uma doença rara, alguns centros especializados ao redor do mundo vem apresentando casuística crescente. Contudo, a literatura científica respalda apenas o manejo dos sintomas e o tratamento cirúrgico das veias varicosas em alguns casos selecionados e, raramente, amputações,^{16, 17, 24} sem possibilidade de tratamento específico para a doença.

A caracterização de anormalidades citogenéticas como translocações associadas a doenças é uma abordagem muito útil para identificar genes de doenças humanas.²⁵ A maioria dos casos de SKT são esporádicos, sendo que algumas anormalidades cromossômicas foram relatadas: duas translocações balanceadas t (5; 11) (q13.3; p15.1) e t (8; 14) (q22.3; q13) e um extra cromossomo de anel supernumerário 18, o que sugere fortemente que os fatores genéticos

contribuem para a patogênese da SKT.²⁶ Algumas publicações também sugerem a possibilidade de a SKT ter relação com mutações no gene PIK3CA.²⁷

Para a translocação t (8; 14) (q22.3; q13), o ponto de interrupção no cromossomo 8q22.3 foi definido para um intervalo menos que 5cM (centimorgans) e o ponto de interrupção 14q13 dentro de uma região de 1 cM.²⁵ O gene vascular específico interrompido por pontos de interrupção 8q22.3 ou 14q13 continua a ser identificado. O cromossomo do anel 18 r (18) foi derivado principalmente do braço curto do cromossomo 18, e outras análises dos genes no r (18) podem levar à identificação de um gene vascular que, por enquanto, também permanece não identificado.²⁵ Mutações do gene PIK3CA ocorrem em alguns cânceres, favorecendo o crescimento de células tumorais, e também foram observadas em alguns pacientes com malformações vasculares, incluindo SKT; porém, o mecanismo pela qual essa mutação está envolvida no surgimento das malformações vasculares ainda não é compreendido, julgando-se ter, provavelmente, relação com fatores de crescimento endotelial e fibroblastos.²⁷

Os pontos de ruptura cromossômicos envolvidos na translocação t (5; 11) (q13.3; p15.1) foram completamente caracterizados, o que levou à identificação de um gene de susceptibilidade, AGGF1 (anteriormente conhecido como VG5Q), para SKT. O AGGF1 é localizado no cromossomo 5q13.3 e codifica um fator angiogênico.²⁵ A proteína AGGF1 contém um motivo de bobina enrolada (aminoácidos 19-85), um motivo OCRE (OCtamer REpeat) (aminoácidos 197-256), um domínio associado ao forkhead (FHA, aminoácidos 435 a 508) e um domínio de *patch G* (aminoácidos 619-663), mas a função exata de cada domínio continua sem definição.²⁸ O ponto de ruptura do cromossomo 5q13.3 está localizado na região promotora de AGGF1 e aumenta a expressão de AGGF1 em três vezes.²⁸ Uma mutação, E133K, em AGGF1, foi identificada e mais tarde mostrou aumentar a atividade angiogênica de AGGF1. A mutação E133K foi estabelecida para ser associada à SKT usando um estudo de associação caso-controle (a frequência do alelo K, 3,8% nos casos vs. 0% nos controles, P = 0,009).²⁹ Esses resultados estabelecem AGGF1 como o primeiro gene de susceptibilidade que confere um risco para o desenvolvimento de SKT e sugerem que o mecanismo molecular para a patogênese da SKT é a angiogênese "aumentada" e são consistentes com estudos histológicos que mostraram aumento no número e no diâmetro das vênulas na derme e na gordura subdérmica dos tecidos SKT.²⁹

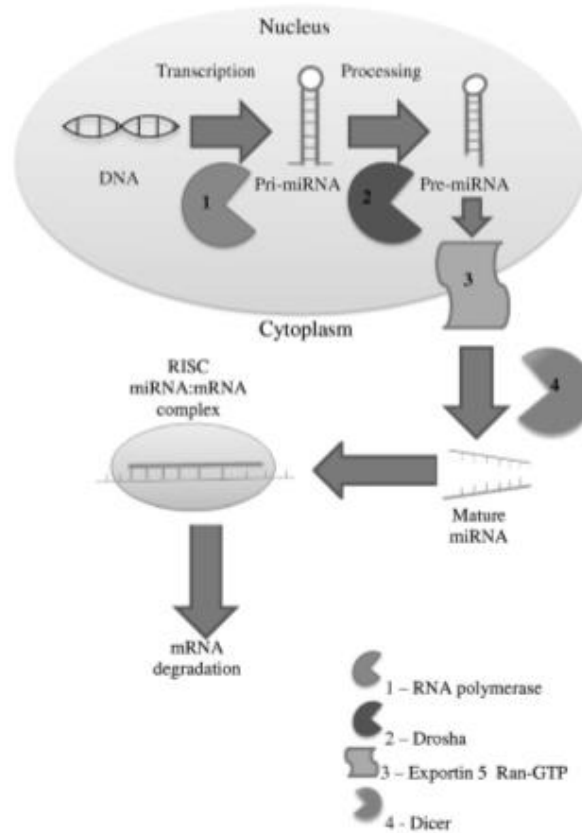
A angiogênese é considerada um processo biológico complexo e dinâmico, essencial durante o desenvolvimento embrionário e particularmente quiescente na vida adulta.³⁰

No entanto, de forma notável, as células endoteliais mantêm sua capacidade de se dividir rapidamente em resposta a estímulos fisiológicos, como, por exemplo, durante a função reprodutiva feminina normal.³⁰ A angiogênese também é rapidamente reativada durante a cicatrização de feridas para promover o reparo tecidual. Em muitos distúrbios, o equilíbrio entre estimuladores angiogênicos ou inibidores é inclinado, resultando em estímulo angiogênico excessivo ou defeituoso. Também está bem estabelecido que o estado de doença pro ou anti-angiogênico resultante contribui para vários cânceres e várias doenças isquêmicas e inflamatórias³⁰⁻³²

Estudos iniciais também revelaram um papel crucial para os microRNAs (miRNA's) na estimulação ou redução da angiogênese.³³ Eles são importantes reguladores da expressão gênica e têm sido implicados na patogênese de várias doenças humanas e apontados como biomarcadores prognósticos e preditivos.

Os miRNA's são RNAs pequenos (18-24 nucleotídeos), não codantes, transcritos a partir do DNA, que não são traduzidos em proteínas e regulam uma proporção significativa dos genes no genoma humano, ligando-se a RNA mensageiro (mRNA) e impedindo a síntese de proteínas.³⁴⁻³⁶ Os miRNA's maduros são formados através de um processo de três passos: inicialmente, genes de miRNA são transcritos em miRNA's primários (pri-miRNA).³⁶ Em seguida, o pri-miRNA é clivado em precursor-miRNA (pré-miRNA) e transportado para o citoplasma. O pré-miRNA em dupla fita é, então, clivado formando microRNA maduro e proteínas *Argonaute*, componentes principais do complexo silenciador RNA induzido (RISC) que ligam-se à região de cadeia simples funcional do miRNA, enquanto a cadeia complementar normalmente é liberada e degradada. Raramente, a cadeia complementar também é funcional, tornando-se seu próprio miRNA e afetando um outro mRNA. Os complexos de miRNA-RISC se ligam ao mRNA, regulando assim sua expressão (Figura 2). Como a interação entre miRNA e mRNA ocorre entre a 5'-UTR (untranslated region) do miRNA e a região de 3'-UTR do mRNA, um único miRNA pode regular centenas de genes e um único gene pode ser regulado por vários miRNA's (Figura 3).^{36, 37}

Figura 2 – Processos de formação e ação do miRNA



Fonte: Stather P, Wild J, Sylvius N, et al. MicroRNAs associated with the pathways involved in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Artery Research* 2013;7:28-35 – material adaptado pelo autor

Figura 3 – Estrutura de uma molécula típica de mRNA de proteína humana, contendo regiões não traduzidas (UTRs)



Fonte: Google Imagens

A concentração de miRNA's maduros nas células depende da regulação da transcrição, maturação e degradação. Foi proposto que são necessárias, aproximadamente, 100

cópias de um miRNA maduro, por célula, para a repressão biologicamente relevante da tradução de genes. A regulação da concentração do miRNA, portanto, desempenha papel importante no controle da sua função reguladora.³⁷

Para os miRNA's são conhecidos dois mecanismos de ação: degradação do mRNA e inibição de sua tradução. O primeiro mecanismo ocorre quando há pareamento perfeito entre o miRNA e o gene alvo e o segundo quando o pareamento é imperfeito, podendo inibir a tradução através do bloqueio da inicialização, retirada de ribossomos e inibição de alongamento.³⁸

Os miRNA's mostram alta estabilidade em células e plasma. Eles também são encontrados em praticamente todos os fluidos biológicos incluindo líquido cérebro-espinhal, lágrimas, saliva, leite materno, líquido amniótico, urina e fezes, o que demonstra sua alta estabilidade, variável de um miRNA para outro, e apoiando seu grande potencial como biomarcador não invasivo. No plasma, os miRNA são transportados e protegidos contra a degradação dependente de RNase por vários transportadores tais como proteínas de ligação de RNA e lipoproteínas.³⁹

O genoma humano contém, aproximadamente, 2.588 miRNA's que foram identificados e caracterizados quanto à sua sequência e função.⁴⁰⁻⁴² Genes regulados por miRNA's participam de um grande número de processos biológicos, fundamentais no controle de processos celulares importantes tais como homeostase celular, desenvolvimento, diferenciação, reprogramação celular e oncogênese.⁴³ Alterações na expressão do miRNA's induzem fenótipos alterados, tais como o que ocorre em inúmeras condições fisiológicas e patológicas,⁴⁴ podendo ainda servir como biomarcadores aplicados para melhorar o diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças.^{39, 40, 45} Conhecer as vias moleculares associadas à gênese ou possíveis genes envolvidos na SKT poderia ajudar a tomada de estratégias diagnósticas e terapêuticas.

OBJETIVOS

Nesse estudo, pretendemos:

- identificar o perfil global de expressão de miRNA's em pacientes portadores da SKT;
- prever os transcritos alvos relacionados a possíveis miRNA's com expressão alterada.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Conflito de interesses

Não há potenciais conflitos de interesses no que diz respeito à pesquisa ou autoria deste trabalho.

2.1 Desenho do estudo

Estudo de caso-controle, translacional, de centro único de uma série de casos.

2.2 Local

Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP) e Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP).

2.3 Procedimentos Éticos

Este ensaio foi realizado de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki, ISO14155 e diretrizes para Boas Práticas Clínicas. Aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com o número 35070814.6.0000.5411, na data de 23/02/2015, com emenda aprovada na reunião extraordinária realizada em 20/11/2017.

2.4 Métodos

Os pacientes foram convidados a participar do estudo, ao comparecerem à consulta ambulatorial, e receberam todas as informações detalhadas referentes à pesquisa – estes integraram o grupo “Pacientes com SKT”. Seguindo o protocolo vigente no Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP), para todos os pacientes com SKT, indica-

se a realização sistemática dos seguintes exames de imagem no intuito de se pesquisar a coexistência de possíveis alterações relacionadas à síndrome (Quadro 1):

Quadro 1 – Exames de imagens solicitados a todos os pacientes quando diagnosticados como SKT

Exame solicitado	Parâmetro avaliado
Ultrassonografia (US) duplex venoso dos membros inferiores (mapeamento do sistema venoso superficial e do profundo)	- Hipoplasia/aplasia do sistema venoso profundo - Competência do sistema venoso superficial - Competência do sistema venoso profundo - Presença de aneurismas venosos - Presença de fístula arteriovenosa - Aumento de tecidos adjacentes
Escanometria dos membros inferiores	- Simetria no comprimento do fêmur e da tíbia

Todos os pacientes incluídos já haviam realizado previamente esses exames, indicados em suas primeiras consultas, porém os exames foram solicitados, novamente, conforme tenha sido notado surgimento de sinais e sintomas recentemente.

Os diâmetros dos membros acometidos pela SKT foram medidos em 3 topografias, configurando segmentos de estudo, a saber:

- “coxa”: ponto médio entre a prega inguinal e a borda superior da patela;
- “perna”: 10cm abaixo da prega poplítea;
- “tornozelo”: logo acima dos maléolos.

Os dados provenientes de exame físico e exames de imagem foram catalogados nos registros de participação de cada paciente e, também, foram registrados dados atuais de peso, altura, índice de massa corpórea (IMC) e outras informações demográficas e epidemiológicas.

Os doadores de sangue que compareceram ao hemocentro a fim de realizarem doações voluntárias de sangue também foram convidados a participar do estudo e receberam todas as informações detalhadas referentes à pesquisa – estes integraram o grupo “Referência”.

Mediante a concordância da participação, um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE E) foi obtido de todos os participantes, de ambos os grupos, antes da sua inclusão no estudo e da realização das etapas do estudo pertinente a cada grupo, a saber:

- “Pacientes com SKT”: confirmação de dados cadastrais, demográficos e epidemiológicos, registro fotográfico e coleta de amostra de sangue periférico;

- “Referência”: coleta de dados demográficos e epidemiológicos e coleta de amostra de sangue periférico a partir da mesma punção venosa que seria utilizada para realizar a doação de sangue.

O TCLE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma dessas cópias foi entregue ao participante e a outra cópia foi anexada aos seus registros de participação no estudo. Os indivíduos poderiam se retirar desta pesquisa sempre que quisessem, independente da etapa em que o estudo estivesse.

2.4.1 Critérios de Inclusão

Para os pacientes acompanhados no Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP), os seguintes critérios foram utilizados:

- diagnóstico de SKT;
- idade $\geq$ 18 anos;
- ambos os gêneros;
- concordantes com os termos de execução da pesquisa, assinando o TCLE - a aplicação do termo de consentimento segue as diretrizes e normas regulatórias de projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde.

Para os doadores de amostras controle, os seguintes critérios foram utilizados:

- idade $\geq$ 18 anos;
- ambos os gêneros;
- estarem hígidos;
- não apresentarem nenhuma comorbidade;
- concordantes com os termos de execução da pesquisa, assinando o TCLE - a aplicação do termo de consentimento segue as diretrizes e normas regulatórias de projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde.

2.4.2 Critérios de Exclusão

Para os pacientes acompanhados no Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP), os seguintes critérios foram utilizados:

- portadores de outras anomalias vasculares;
- portadores de outras doenças em atividade que pudessem comprometer a análise de miRNA's (doenças virais ou cânceres em atividade);

Os doadores de amostras controle já haviam passado pela triagem realizada pela equipe do Hemocentro para avaliar a viabilidade da doação. Portanto, o único critério de exclusão adicional foi o fato de serem o.

2.4.3 Registro fotográfico

Para os pacientes do Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP) participantes do estudo, e após o seu consentimento, foi realizado registro fotográfico das áreas corpóreas com alterações relacionadas à SKT. Uma câmera de alta definição (D7000 Nikon Lens™: AF-S Nikkor 18-105 mm™ 1: 3.5-5.6G) foi utilizada para obter estas imagens.

2.4.4 Coleta das amostras

Todos os participantes foram submetidos à coleta de 10 mL de sangue periférico em tubo BD Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) com EDTA. O sangue foi processado em laboratório para obtenção do plasma livre de células, por centrifugação a 1.200 rpm, por 20 minutos (min) a 4°C. A fração plasmática (fase superior) foi aliqüotada e transferida para novos tubos eppendorf de 1,5 mL e, então, armazenada em freezer, a -80°C até sua utilização.

As amostras foram avaliadas em *pools*, tendo sido agrupados 100 µL de cada amostra de plasma de cada indivíduo incluídos no estudo, agrupados da seguinte maneira: os 10 indivíduos do grupo “Pacientes com SKT” foram divididos em 3 *pools* e 3 indivíduos do grupo “Referência” foram escolhidos aleatoriamente para constituir o *pool* relativo a este grupo.

De cada *pool*, foi utilizada uma alíquota de 200 μ L, o qual foi então homogeneizado e utilizado para extração do RNA, segundo protocolo do fabricante.

2.5 Potenciais efeitos adversos

O procedimento de coleta de sangue periférico por venóclise convencional é uma prática rotineira e praticamente não implica em riscos para o paciente. A doação de sangue é uma prática comum, voluntária no Brasil e incentivada, que apresenta riscos mínimos severamente controlados pela equipe coletora, inclusive com material emergencial facilmente disponível se algum paciente apresentar problemas durante a doação. Dessa forma, os riscos envolvidos foram muito pequenos.

2.6 Extração do RNA

A extração dos miRNA's e outros pequenos RNAs circulantes livres foi realizada utilizando o miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo protocolo do fabricante. As amostras de plasma coletadas e congeladas a -80°C foram descongeladas gradualmente em gelo ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) por 30 min e, em seguida, colocadas em temperatura ambiente (TA) ($15-25^{\circ}\text{C}$) até o completo descongelamento. Após homogeneização completa, foram utilizados 200 μ L de plasma para extração do RNA. O protocolo seguiu as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados 1000 μ L de reagente de lise (fornecido pelo kit) a cada amostra, as quais foram incubadas por 5 min em TA, a fim de desnaturar complexos de proteínas e RNases e remover qualquer DNA residual. Logo após, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio a cada amostra, as quais foram incubadas por 3 min em TA e em seguida centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 min a 4°C . A centrifugação permitiu que cada amostra fosse separada em três fases, sendo duas fases orgânicas e uma aquosa, sendo que a fase inferior contivesse proteínas, a interfase contivesse DNA e a fase superior (aquosa), o RNA de interesse. A fase aquosa contendo o RNA de cada amostra foi transferida para novos tubos eppendorf e foram adicionados 900 μ L de etanol 100% a cada amostra para fornecer condições de ligação adequadas para todas as moléculas de RNA que contivessem ~ 18 nucleotídeos ou mais. As próximas etapas consistiram na purificação do RNA utilizando colunas com filtro, onde o RNA total (incluindo os miRNA's) aderiram à membrana e os contaminantes foram descartados no

material filtrado. A fase aquosa contendo etanol de cada amostra foi transferida para as colunas com filtro, as quais foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. A seguir, foram adicionados 700 µL da solução de lavagem *Buffer RWT* (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Foram adicionados 500 µL da solução de lavagem *Buffer RPE* (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Foram adicionados 500 µL de etanol 80%, seguido de centrifugação a 10.000 rpm, por 2 min a 25°C e o filtrado foi desprezado. Uma nova centrifugação foi realizada para secagem das colunas a 14.000 rpm, por 5 min a 25°C. A coluna com filtro foi, então, transferida para um novo tubo coletor, fornecido pelo kit, para a eluição do RNA. Foram adicionados 7 µL de água estéril e livre de RNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no centro do filtro, seguida de incubação por 1 min em temperatura ambiente e centrifugação por 1 min a 14.000 rpm a 25°C. Essa etapa de eluição foi repetida uma vez. O RNA total obtido (incluindo os miRNA's) foi armazenado em freezer a -80°C. As amostras de RNA foram quantificadas e avaliadas quanto à qualidade utilizando o *NanoDrop 8000* (Thermo Scientific), o qual permite quantificar o RNA total contido em cada amostra, verificando também a presença de contaminação por proteínas e/ou resíduos de solventes orgânicos, disponível no laboratório de pesquisa.

2.7 Reação de Transcrição Reversa de miRNA's

A transcrição reversa dos miRNA's foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA) combinado com o Megaplex™ RT Primers Pool A v2.1 (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas dos miRNA's maduros inclusos no cartão *Taqman Low Array Density Card A* (Life Technologies, EUA). Na reação foram adicionados ao RNA total (600ng) os seguintes componentes do kit: Megaplex™ RT Primers (10X), dNTPs com dTTP (100mM), MultiScribe™ *Reverse Transcriptase* (50U/µL), 10X RT Buffer, inibidor de RNase (*RNase Inhibitor*) (20U/µL). A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de 16°C por 2 min., 42°C por 1 min. e 50°C por 1 s; seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min. O produto da transcrição reversa foi armazenado no -20°C até o momento da utilização.

2.8 Análise de dados

2.8.1 Análise da expressão de miRNA's

A análise de expressão global de miRNA's foi realizada utilizando a plataforma TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies), um cartão de microfluidos contendo 384 miRNA's e otimizado para o uso com amostras de arquivo (FFPE). A plataforma incluiu três controles (miRNA's endógenos) para normalização dos dados, e um ensaio não humano como controle negativo.

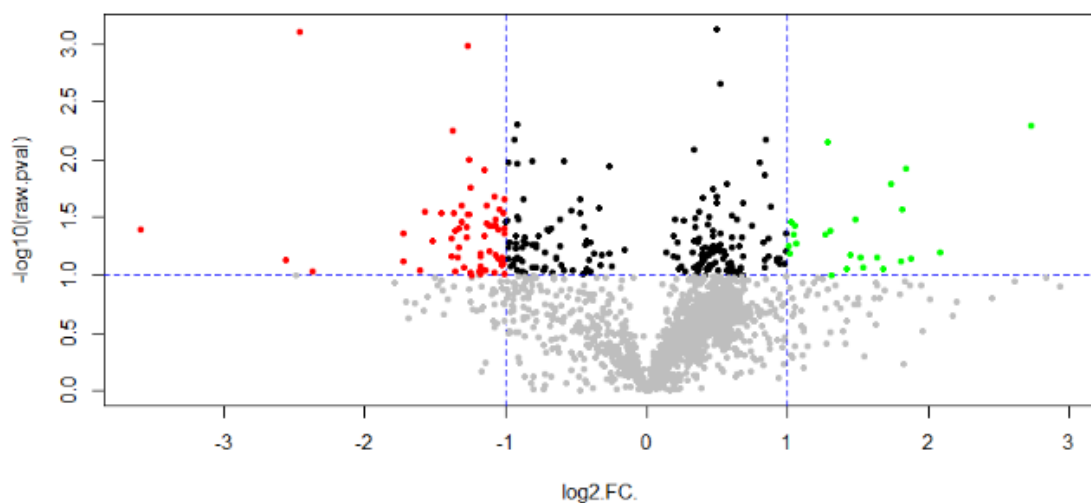
Para o preparo da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram utilizados: 450 µL de master mix Taqman® Universal Master Mix II, no UNG (Life Technologies); 6 µL de cDNA (produzido em etapa anterior) e 444 µL de água livre de nuclease (Sigma ddH₂O). Foram adicionados 100 µL desse mix em cada poço da placa; seguido por centrifugação da placa a 1.200 rpm por 1 min, duas vezes. A RT-qPCR foi realizada no equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). Os dados de expressão de miRNA's foram analisados no programa Expression Suite (Life Technologies) que é componente do equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). Os dados de expressão de miRNA's foram normalizados utilizando controles endógenos, os quais constituem controles internos que não devem variar significativamente em níveis de expressão nas amostras teste e controle normal. Os controles endógenos mais utilizados em análises de expressão de miRNA's e presentes no cartão TLDA são o RNU-44, RNU-48 e U6 (RNA nucleolar pequeno). A análise dos controles endógenos indica a qualidade das reações de amplificação. Assim, esta análise é fundamental e um dos primeiros passos a serem realizados em estudos de expressão de miRNA's.

2.8.2 Processamento dos dados de expressão

Os dados de expressão foram extraídos do equipamento QuantStudio™ 12K Flex, utilizando o programa *ExpressionSuite Software v1.0.3 for Microsoft® Windows®*, uma ferramenta de análise de dados que utiliza o método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$). Esta plataforma permite quantificar a expressão gênica relativa através de um grande número de genes bem como permite o cálculo do Fold Change (FC), medida frequentemente utilizada na análise de dados de expressão gênica para medir a mudança no nível de expressão de um gene.

A expressão dos miRNA's foi ilustrada através de um *volcano plot*, um tipo de diagrama que avalia a dispersão de dados, traçando significância *versus* FC no eixos y e x, respectivamente, combinando uma medida de significância estatística a partir de um teste estatístico (por exemplo, um valor p) com a magnitude da mudança, permitindo a identificação visual rápida de pontos que apresentam grande magnitude e que também são estatisticamente significativos (Figura 4). Um *volcano plot* é construído ao traçar o logaritmo ($\log$) negativo do valor p no eixo y – geralmente base 10, resultando em pontos de dados com baixos valores de p (altamente significativos) que aparecem em direção ao topo do gráfico – e no eixo x, traçando o $\log$ do FC (geralmente base 2). O registro do FC é usado para que mudanças nas duas direções apareçam equidistantes do centro. Os pontos de traçado desse modo resultam em duas regiões de interesse: os pontos que são encontrados em direção ao topo da parcela e que são distantes para os lados esquerdo ou direito. Estes representam valores que exibem FC de grande magnitude (portanto, sendo esquerdo ou direito em relação ao centro), bem como alta significância estatística (portanto, está em direção ao topo).⁴⁶

Figura 4 – Modelo de diagrama tipo Volcano plot



Fonte: Google Imagens

Todos os equipamentos e programa de análise de dados requeridos estão disponíveis no laboratório de pesquisa NeoGene, da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/ UNESP).

2.8.3 Base de dados para análise dos miRNA's com expressão alterada

Os miRNA's com expressão significativamente alterada (níveis de expressão ≥ 2 e $p < 0,05$) nas amostras do grupo “Pacientes com SKT” comparadas com as amostras do grupo “Referência” foram analisados em bases de dados, sendo pesquisada a existência de correlação entre estes miRNA's e transcritos alvos. Utilizou-se para isso algoritmos de predição de alvos de miRNA, disponíveis para livre acesso, a saber:

- miRWalk 2.0: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>

miRWalk 2.0 é uma base de dados abrangente que fornece a maior coleção disponível de interações miRNA-transcritos alvos previstos e experimentalmente verificadas.

Em seguida procedeu-se à pesquisa de correlação destes transcritos alvos dos miRNA com angiogênese ou a própria doença SKT, utilizando-se bases de dados disponíveis para livre acesso, a saber:

- Enrichr: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Enrichr é uma ferramenta de análise de enriquecimento de conjunto de genes de mamíferos. Ela contém bibliotecas de fundo para regulação de transcrição, interações de caminhos e proteínas, ontologias, assinaturas de células tratadas com drogas e expressão de genes em diferentes células e tecidos. As bibliotecas de fundo apresentam mais de 70 recursos e contêm mais de 200.000 conjuntos de genes anotados. A ferramenta fornece diferentes maneiras de visualizar os resultados.

2.9 Análise estatística

As variáveis categóricas de ambos os grupos foram descritas usando frequências e porcentagens e as variáveis contínuas, utilizando média e mediana. Foram utilizados o teste t-student e o teste exato de Fisher para comparações entre os grupos. As análises estatísticas utilizaram o *software* SAS versão 9.3 para *Windows* (SAS, Institute Inc., Cary, NY, EUA). Diferenças estatísticas significantes foram definidas como $p < 0,05$.

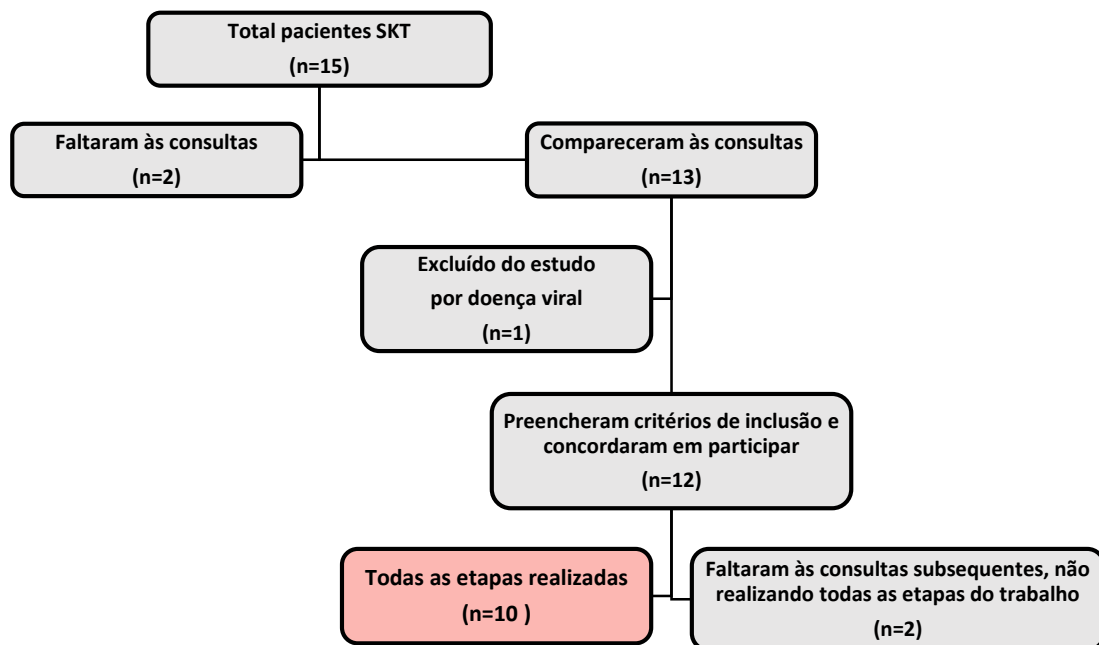
3. RESULTADOS

3.1 Aspectos gerais

3.1.1 Grupo “Pacientes com SKT”

Atualmente, o Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP) realiza acompanhamento de 15 pacientes portadores de SKT com idade ≥ 18 anos. Treze pacientes compareceram a todas as suas consultas de rotina, geralmente realizadas a cada 6 meses. Um paciente preenchia critério de exclusão ao estudo por apresentar doença viral concomitante (HIV), o que poderia comprometer a análise de miRNA's. Portanto, inicialmente, 12 pacientes foram incluídos no estudo porém apenas 10 concluíram todas as etapas pertinentes e integraram o grupo “Pacientes com SKT” já que 2 pacientes faltaram às consultas subsequentes onde alguma etapa seria cumprida (Figura 5).

Figura 5 – Grupo “Pacientes com SKT”: triagem dos pacientes e etapas realizadas nas consultas.



Fonte: material elaborado pelo autor

Dentre os participantes, notou-se uma predominância de pacientes do gênero feminino (80%) sendo 62,50% nulíparas. Quanto à etnia, houve predomínio da raça branca (80%). Sete pacientes (70%) eram naturais de Botucatu ou cidades adjacentes (APÊNDICE A).

Os pacientes apresentaram média de idade de 32 anos. A média de peso foi de 72kg, com IMC médio de 26,57kg/m². A altura média foi de 1,64m (APÊNDICE A).

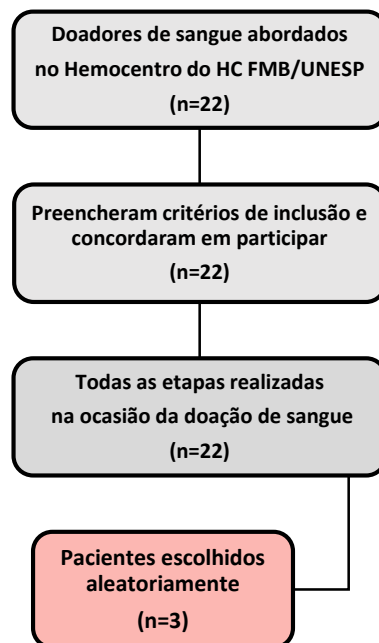
Três pacientes apresentavam comorbidades autoimunes sendo 2 pacientes com Tireoidite de Hashimoto e 1 paciente com líquen plano e todos faziam uso regular das medicações necessárias para o controle destas comorbidades. Apenas 1 paciente apresentava antecedente familiar de neoplasia (neoplasia pulmonar) (APÊNDICE B).

Nenhum paciente apresentava hábito pregresso ou atual de tabagismo e etilismo (APÊNDICE B).

3.1.2 Grupo “Referência”

Vinte e dois doadores de sangue foram abordados no Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB UNESP) ao comparecem para realizar as doações voluntárias, constituindo a totalidade deste grupo. Posteriormente, foi feita escolha aleatória de 3 indivíduos do grupo “Referência” para compor o *pool* que será utilizado na comparação entre o perfil global de expressão de miRNA (Figura 6).

Figura 6 – Grupo “Referência”: triagem dos doadores de sangue, etapas realizadas na ocasião da doação e escolha aleatória dentre os participantes



Fonte: material elaborado pelo autor

Dentre os participantes, notou-se uma predominância de indivíduos do gênero masculino (68,19%). Quanto à etnia, houve predomínio da raça branca (77,27%). Dezesete (77,27%) pacientes eram naturais de Botucatu ou cidades adjacentes (APÊNDICE C).

Os participantes apresentaram média de idade de 37,09 anos. A média de peso foi de 83,41kg, com IMC médio de 28,74kg/m². A altura média foi de 1,71m (APÊNDICE C).

Três (13,63%) indivíduos apresentavam comorbidades sendo apenas 1 (33,33%) de caráter autoimune (Tireoidite de Hashimoto). Todos faziam uso regular das medicações necessárias para o controle destas comorbidades. Apenas 1 (4,55%) participante apresentava antecedente familiar de neoplasia (neoplasia gástrica).

Dezenove (86,36%) indivíduos não apresentavam hábito pregresso ou atual de tabagismo e 3 (13,64%) eram tabagistas ativos. Nenhum indivíduo apresentava hábito pregresso ou atual de etilismo (APÊNDICE D).

Pelo Teste de Fisher, a comparação entre os grupos comprovou que foram semelhantes quanto aos parâmetros avaliados não havendo, portanto, viés de seleção (Tabela 1).

Tabela 1 – Teste de Fisher – Comparação entre percentual de indivíduos referentes às variáveis de caracterização, segundo grupo.

Variável	Grupo		
	Referência	Pacientes com SKT	P
Tabagismo	13,60	0,00	0,53
Uso de medicamentos	13,60	40,0	0,16
Comorbidades	13,60	30,0	0,35
Antecedente familiar neoplasia	4,50	10,0	0,53
Gênero feminino	31,80	80,0	0,02
Raça branca	77,30	80,0	0,58
Multiparidade	14,30	37,5	0,57

Legenda: p = quando $< 0,05$, indica ser estatisticamente significativo

Pelo Teste t de student, a comparação entre os grupos comprovou que foram semelhantes quanto aos parâmetros avaliados, não havendo, portanto, viés de seleção, exceto quanto a variável peso que mostrou discreta diferença nesta comparação mas não foi levada em consideração nas análises (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste t de student – Comparação entre média e desvio-padrão referentes às variáveis, segundo grupo.

Grupo			
Variável	Referência	Pacientes com SKT	P
Idade	37,1	32,20	0,23
	8,90	13,60	
Peso	83,40	72,00	0,03
	12,20	15,30	
Altura	1,71	1,64	0,07
	0,09	0,07	
IMC	28,7	26,60	0,22
	4,30	5,20	

Legenda: p = quando $< 0,05$, indica ser estatisticamente significativo

Tendo em vista essas características, para compor o *pool* do grupo “Referência”, realizamos escolha aleatória de 3 indivíduos. A comparação entre os grupos foi realizada através de *pools*, e não de forma individualizada, devido a disponibilidade de pouco kits no Laboratório NeoGene. Entretanto, esta técnica é bastante utilizada na literatura.

3.2 Aspectos relacionados a SKT

A maioria dos pacientes (60%) iniciou acompanhamento no Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP) quando adultos, tendo sido firmado o diagnóstico de SKT apenas nesta ocasião.

Oitenta por cento dos pacientes apresentavam todos os componentes da tríade clássica para o diagnóstico de SKT. Dois pacientes apresentavam apenas a malformação capilar e a hipertrofia como critérios para o diagnóstico da síndrome. Em todos os pacientes, a SKT acometia os membros inferiores, com predominância no membro inferior esquerdo (80%). Apenas 1 (10%) paciente apresentava acometimento do membro inferior esquerdo e também do dorso e face posterior do braço direito (Quadro 2).

Quadro 2 – Características dos indivíduos do grupo “Pacientes com SKT”: local de acometimento da síndrome e sinais apresentados para o seu diagnóstico

	Localização		Malformação Capilar	Malformação Venosa	Hipertrofia
	MMII	Outros			
1	MID	-	Sim	-	Sim
2	MID	-	Sim	-	Sim
3	MIE	-	Sim	Sim	Sim
4	MIE	-	Sim	Sim	Sim
5	MIE	-	Sim	Sim	Sim
6	MIE	-	Sim	Sim	Sim
7	MIE	dorso, MSD	Sim	Sim	Sim
8	MIE	-	Sim	Sim	Sim
9	MIE	-	Sim	Sim	Sim
10	MIE	-	Sim	Sim	Sim
MID= 2 (20%) MIE= 8 (80%)		Sim= 1 (10%)	100%	80%	100%

Legenda: MMII = membros inferiores; MID = membro inferior direito; MIE = membro inferior esquerdo; MSD = membro superior direito

Nenhum paciente apresentava antecedente familiar de SKT mas 2 (20%) relataram ter membros da família com “hemangioma”, diagnosticados ao nascimento e sem regressão com o passar da idade.

Todos os pacientes apresentavam malformações capilares (“mancha vinho do porto) planas, variáveis quanto à extensão e à tonalidade (eritemato-violácea, rósea ou

violácea), sendo que este foi o primeiro sinal notado pela família, já ao nascimento, e sem involução ao longo dos anos. Nenhuma malformação capilar apresentava sopro, pulso ou frêmito associados, sinais que poderia sugerir presença de fístulas arteriovenosas (FAV) e todas desapareciam com a compressão digital (Quadro 3).

Malformações venosas foram notadas em 8 (80%) pacientes. Um paciente apresentava hipoplasia de veia femoral superficial esquerda e 7 apresentavam varizes sendo que, na maioria dos casos, estas surgiram na adolescência. Apenas 1 paciente multípara referia piora das varizes ao longo da gestação. Nenhum paciente apresentava fístulas arteriovenosas. Dois pacientes já haviam sido submetidos à safenectomia interna total no membro acometido pela SKT, sem intercorrências, e 4 pacientes a tratamento escleroterápico de varizes com espuma de polidocanol, também sem intercorrências (Quadro 4).

Quanto à assimetria nos diâmetros dos membros, 6 (60%) pacientes mostraram valores maiores em todos os segmentos aferidos no membro acometido pela SKT (“coxa”, “perna” e “tornozelo”). Dois pacientes mostraram assimetria entre os diâmetros de apenas 2 segmentos (“coxa” e “perna”) e 2 pacientes em apenas 1 segmento (um paciente no segmento “coxa” e 1 paciente no segmento “tornozelo”). O segmento “coxa” foi o mais envolvido quanto à assimetria, com aumento de suas dimensões em 9 (90%) pacientes e o segmento “perna” foi o que apresentou a maior média de diferença nos valores de diâmetro. Um paciente apresentou comportamento variado entre todos os segmentos aferidos já que no seu membro acometido pela SKT, foi constatado diâmetro igual no segmento “coxa”, diâmetro menor no segmento “perna” e diâmetro maior no segmento “tornozelo”, comparado com o membro contralateral (Quadro 5).

Foi constatada diferença no comprimento dos membros inferiores em 3 pacientes, sendo que os membros acometidos pela SKT eram mais longos. A diferença variou de 0,3cm a 0,8cm, não havendo necessidade de uso de órteses tão pouco cirurgias ortopédicas corretivas em nenhum caso.

O sintoma mais referido foi edema (80% dos casos) e dor (70% dos casos) porém sem que trouxessem limitações às atividades de vida diária. Apesar de rotineiramente prescritos, apenas 3 pacientes utilizavam flebotônicos e 5 pacientes mantinham o uso diário de meias de compressão.

Nenhum paciente apresentou episódios sugestivos de acometimento visceral pela SKT durante todo o período de acompanhamento no Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP).

Quadro 4 – Características dos indivíduos do grupo “Pacientes com SKT” referentes às malformações venosas

Paciente	Varizes	Momento percepção Varizes	Piora na Gestação	Alterações sistema venoso superficial	Tratamentp cirúrgico	Tratamento escleroterápico	Alterações sistema venoso profundo
1	-	-	Nulípara	-	-	-	-
2	-	-	Nulípara	-	-	-	-
3	Sim	Adolescência	Sim	Insuficiência VSME	-	-	-
4	Sim	Adolescência	-	Insuficiência VSMD e VSME	Safenectomia VSME	Sim	-
5	-	-	Nulípara	-	-	-	Hipoplasia VFSE
6	Sim	Adolescência	Nulípara	-		Sim	-
7	Sim	Adolescência	Não se aplica	-	-	Sim	-
8	Sim	Infância	-	-	-	Sim	-
9	Sim	Adolescência	Nulípara	-	-	-	-
10	Sim	Infância	Não se aplica	Insuficiência VSME	Safenectomia VSME	-	-
Sim= 7 (70%)			Sim= 1 (33,33%)	3 (30%)	2 (20%)	Sim= 4 (40%)	

Legenda: VSMD = veia safena magna direita; VSME = veia safena magna esquerda; VFSE = veia femoral superficial esquerda

Quadro 5 – Características dos indivíduos do grupo “Pacientes com SKT” referentes às dimensões dos MMII

Paciente	Localização	Diâmetro coxa (cm)			Diâmetro perna (cm)			Diâmetro tornozelo (cm)			Comparação diâmetro por segmento membro SKT x membro contralateral (sem SKT)		
		esquerda	direita	diferença	esquerda	direita	diferença	esquerdo	direito	diferença	coxa	Perna	tornozelo
1 *	MID	50	52	2	37	39	2	22	23	1	Maior	Maior	Maior
2	MID	53	56	3	38	39	1	23	23	0	Maior	Maior	Igual
3	MIE	55	54,5	0,5	39	39	0	22,5	22,5	0	Maior	Igual	Igual
4 *	MIE	45,5	44	1,5	36	34	2	23	21,5	1,5	Maior	Maior	Maior
5 *	MIE	53	52	1,0	36,5	34,5	2	21,5	20	1,5	Maior	Maior	Maior
6 *	MIE	58	55	3	41	39	2	26	25	1	Maior	Maior	Maior
7 *	MIE	58	54	4	46	42	4	30	26	4	Maior	Maior	Maior
8 **	MIE	54	54	0	38,5	40	- 1,5	24	23	1	Igual	Menor	Maior
9	MIE	46	45	1	32,5	32	0,5	21	21	0	Maior	Maior	Igual
10 *	MIE	48	47	1	37	35	2	23	22	1	Maior	Maior	Maior
MID= 2 (20%) MIE= 8 (80%)		Média= 52,05cm	Média= 51,35cm	Média= 1,89cm †	Média= 38,15cm	Média= 37,35cm	Média= 1,94 cm †	Média= 23,60cm	Média= 22,70cm	Média= 1,57cm †	Menor= 0 Igual= 1 Maior= 9 (90%)	Menor= 1 Igual= 1 Maior= 8 (80%)	Menor= 0 Igual= 3 Maior= 7 (70%)

Legenda: SKT = Síndrome de Klippel-Trenaunay; MID = membro inferior direito; MIE = membro inferior esquerdo.

As áreas hachuradas em rosa destacam as medidas de cada segmento do membro acometido pela síndrome bem como a condição deste apresentar diâmetro maior comparado ao membro contralateral.

(*) pacientes que apresentam todo os segmentos do membro acometido pela SKT com diâmetros maiores que os do membro contralateral.

(**) paciente que apresenta comportamento diferente em cada segmento do membro acometido pela SKT comparado ao membro contralateral.

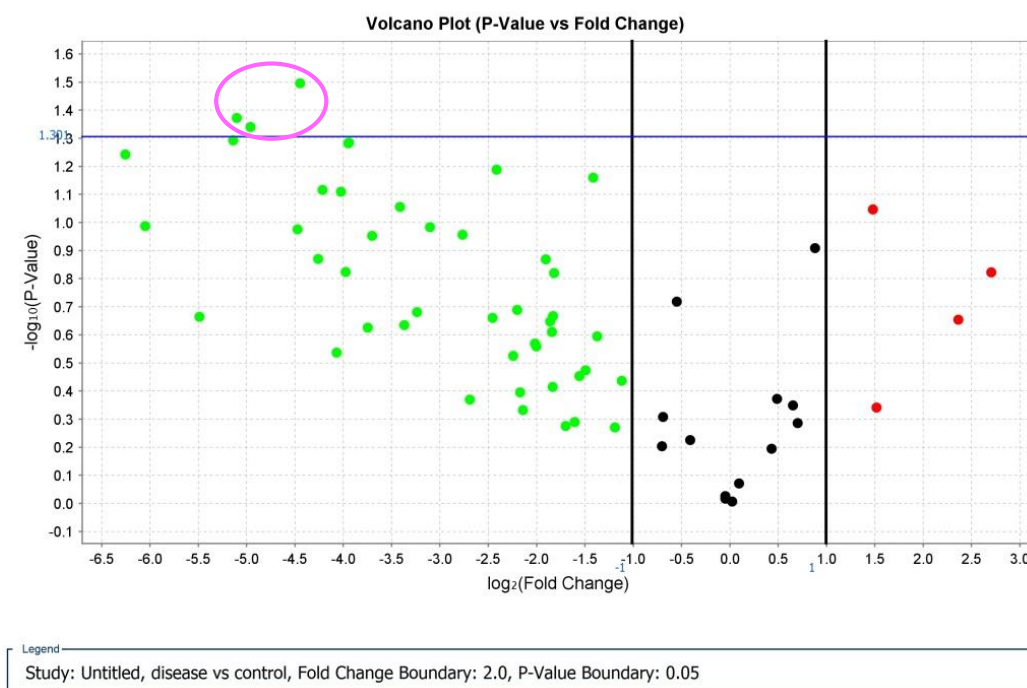
(†) média das diferenças dos diâmetro entre membro acometido pela SKT e membro contralateral, por segmento do membro.

3.3 Resultados da análise dos miRNA's

A análise e a comparação do perfil global de expressão dos miRNA's entre os indivíduos dos grupos “Pacientes com SKT” e “Referência” está representada no diagrama tipo *volcano plot* abaixo (Figura 7):

Foram identificados 3 miRNA's com expressão diminuída e estatisticamente significativa ($FC \geq 2$ e $p < 0,05$) no grupo “Pacientes com SKT”: hsa-miR-320a, hsa-miR-486-5p e hsa-miR-574-3p (Tabela 3). Não foram encontrados miRNA com expressão aumentada e significância estatística.

Figura 7 – Diagrama tipo volcano plot: comparação do perfil global de expressão dos miRNA's entre os indivíduos dos grupos “Pacientes com SKT” e “Referência”



Fonte: material elaborado pelo autor

Tabela 3 – miRNA's com expressão diminuída no grupo “Pacientes com SKT”

miRNA	FC	p
hsa-miR-486-5p	0.046	0.032
hsa-miR-574-3p	0.029	0.042
hsa-miR-320a	0.032	0.046

Legenda: miRNA = microRNA; FC = fold change; p = quando $< 0,05$, indica ser estatisticamente significativo; hsa = relativo à espécie *Homo sapiens*; miR = microRNA maduro

Iniciou-se, então, a pesquisa em bases de dados para analisar a existência de correlação entre estes miRNA e seus transcritos alvos preditos, através de algoritmos de predição.

A primeira base de dados consultada foi a **miRWalk 2.0**. Nesta busca foram identificados diversos transcritos alvos preditos para cada um dos microRNA pesquisados.

Em seguida, utilizou-se a base de dados **Enrichr** que contém diversas bibliotecas e permite a pesquisa de várias tópicos relacionados ao item de interesse, fornecendo diferentes maneiras de visualizar os resultados. Nesta base de dados, a partir do link “*pathways*”, foi pesquisada a hipótese de haver correlações entre os transcritos alvos preditos de cada um dos três miRNA de interesse com vias moleculares relacionadas a alguns genes já descritos como tendo envolvimento na SKT (PIK3CA e AGGF1), e relacionadas à angiogênese, processo potencialmente exacerbado na SKT.

Na base de dados Enrichr, há 20 bibliotecas de dados relacionada à vias moleculares. Destas, 13 (65%) guardavam alguma relação com os termos pesquisados sendo que o maior número de associações estavam presentes entre os transcritos alvos preditos do hsa-miR-320a e hsa-miRNA-486-5p (Quadro 6).

Quadro 6 – Pesquisa relacionadas às vias moleculares nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr

Biblioteca	hsa-miR-320a			hsa-miR-486-5p			hsa-miR-574-3p		
	angiogênese	PIK3CA	AGGF1	angiogênese	PIK3CA	AGGF1	angiogênese	PIK3CA	AGGF1
WikiPathways 2016	X			X				X	
ARCHS4 Kinases Coexp		X			X				
BioCarta 2016	X			X					
NCI-Nature 2016	X			X			X		
Panther 2016	X			X			X		
BioPlex 2017		X	X		X	X			
PPI Hub Proteins		X			X			X	
KEA 2015		X			X			X	
LINCS L1000 Kinase Perturbations down		X			X			X	
LINCS L1000 Kinase Perturbations up		X			X			X	
Kinase Perturbations from GEO down		X			X			X	
Kinase Perturbations from GEO up		X			X				
CORUM		X			X				

Legenda: x = apresenta associação

A associação entre os transcritos alvos preditos do hsa-miRNA-320a mostrou-se positiva para angiogênese em algumas bibliotecas, incluindo a biblioteca *Panther 2016*, porém sem ser estatisticamente significativa (Figura 8). Ocorre associação positiva para o AGGF1 quando pesquisada na biblioteca *BioPlex 2017*, porém também ser estatisticamente significativa (Figura 9).

Figura 8 – Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e angiogênese.

Panther 2016 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
36	Angiogenesis_Homo sapiens_P00005	0.1682	0.4038	2.27	-4.05

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 9 – Biblioteca BioPlex 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e gene AGGF1.

BioPlex 2017 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: AGGF1

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
3418	AGGF1	0.5113	0.9812	73.11	-49.04

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Dentre as associações referentes ao hsa-miRNA-486-5p, houve associação positiva com angiogênese em 4 bibliotecas porém apenas 2 destas relações foram estatisticamente significativas. Na biblioteca *Panther 2016* houve forte representação da relação com angiogênese, configurando como a principal via envolvida (primeira a ser citada) (Figura 11).

Figura 10 – Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese

Panther 2016 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

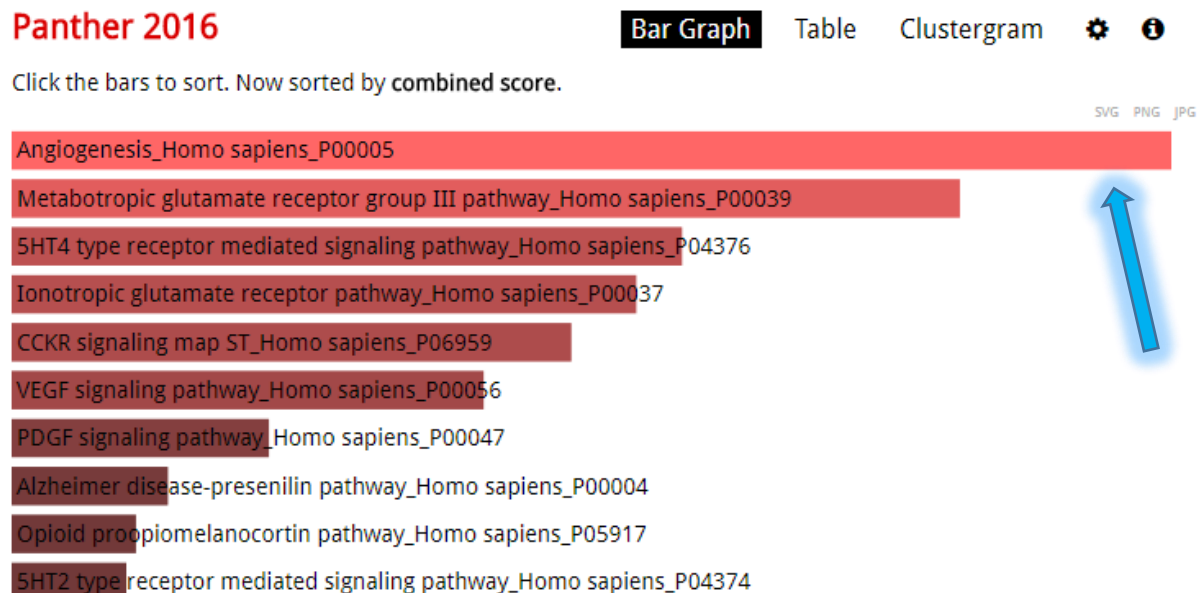
Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	Angiogenesis_Homo sapiens_P00005	0.0001352	0.01298	-1.66	14.81

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 11 – Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese – gráfico de barras



Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Ainda referente aos transcritos alvos do hsa-486-5p, foi encontrada associação positiva com o AGGF1 na biblioteca *BioPlex 2017*, porém de forma estatisticamente não significativa.

Figura 12 – Biblioteca BioPlex 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e gene AGGF1

BioPlex 2017 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: AGGF1

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
2744	AGGF1	0.5749	0.8909	68.19	-37.75

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Os transcritos alvos preditos do hsa-miRNA-574 foram os que guardaram menor número de associações. Houve associação positiva com a angiogênese em 2 bibliotecas sendo que na biblioteca *Panther 2016*, esta associação mostrou ser estatisticamente significativa. Não houve associação com o AGGF1 na biblioteca *BioPlex 2017* assim como em nenhuma outra.

Figura 13 – Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e angiogênese

Panther 2016 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

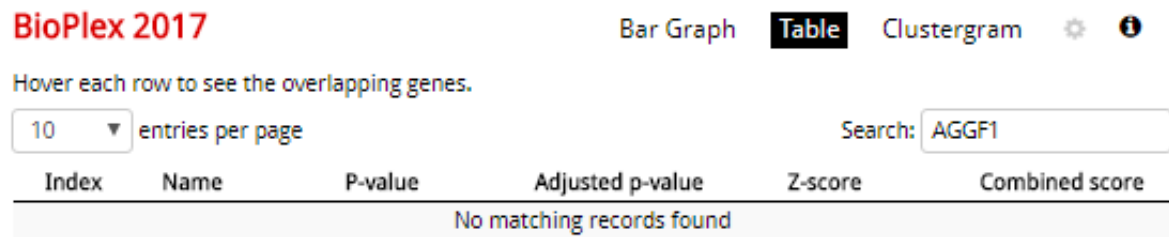
Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
14	Angiogenesis_Homo sapiens_P00005	0.03379	0.1229	-0.13	0.43

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 14 – Biblioteca BioPlex 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e gene AGGF1



Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Nesta mesma base de dados, a partir do link “*ontologies*” foi pesquisada a hipótese de haver correlações ontológicas com angiogênese e a própria SKT.

Na base de dados Enrichr, há 8 bibliotecas de dados relacionadas a ontologia. Destas, apenas 3 (37,5%) apresentaram alguma relação com os termos da pesquisa. Houve o mesmo número de associações para todos os miRNA’s (Quadro 7).

Quadro 7 – Pesquisa relacionadas à ontologia nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr

Bibliotecas	hsa-miR-320a		hsa-miR-486-5p		hsa-miR-574-3p	
	angiogênese	SKT	angiogênese	SKT	angiogênese	SKT
GO Biological Process 2017b	X		X		X	
MGI Mammalian Phenotype 2017	X		X		X	
Jensen DISEASES		X		X		X

Legenda: x = apresenta associação

Dentre as associações referentes ao hsa-320a, houve relação estatisticamente significativa com angiogênese em 2 bibliotecas - *GO Biological Process 2017b* e *MGI Mammalian Phenotype 2017* – sendo que nesta última a relação foi com a angiogênese anormal. Na biblioteca *Jensen DISEASES*, foi encontrada associação positiva com SKT de forma estatisticamente significativa – aqui, chama a atenção a associação com os genes ING5, SALL3, RASA1, AKT3, além da associação com AGGF1.

Figura 15 – Biblioteca GO Biological Process 2017b: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e angiogênese

GO Biological Process 2017b Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

25 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
407	positive regulation of angiogenesis (GO:0045766)	0.001468	0.03455	-2.09	13.64

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 16 – Biblioteca MGI Mammalian Phenotype 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e angiogênese

MGI Mammalian Phenotype 2017 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
156	MP:0000260_abnormal_angiogenesis	0.01404	0.3022	1.72	-7.32

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 17 – Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-320a e SKT

Jensen DISEASES Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: Klippel-Trenaunay

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
318	KLIPPEL-TRENAUNAY SYNDROME	0.04774	0.6897	4.76	-14.48

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Dentre as associações referentes ao hsa-486-5p, houve relação com angiogênese em 2 bibliotecas sendo que na biblioteca *GO Biological Process 2017b* e na biblioteca *MGI Mammalian Phenotype 2017* a associação foi estatisticamente significativa. Na biblioteca *Jensen DISEASES*, foi encontrada associação positiva com SKT porém de forma não

estatisticamente significativa – aqui, chama a atenção a associação com os genes ING5 e MYZAP, sem apresentar associação com AGGF1.

Figura 18 – Biblioteca GO Biological Process 2017b: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese

GO Biological Process 2017b Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
259	cell migration involved in sprouting angiogenesis (GO:0002042)	0.006220	0.2395	-2.11	10.72
350	positive regulation of angiogenesis (GO:0045766)	0.01667	0.3343	-2.12	8.66
417	positive regulation of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:1903589)	0.02476	0.3914	-1.48	5.46
700	positive regulation of sprouting angiogenesis (GO:1903672)	0.08480	0.5782	-0.33	0.83
758	regulation of angiogenesis (GO:0045765)	0.02990	0.4126	-0.08	0.29
1030	regulation of sprouting angiogenesis (GO:1903670)	0.04092	0.4674	0.31	-0.98

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 19 – Biblioteca MGI Mammalian Phenotype 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e angiogênese

MGI Mammalian Phenotype 2017 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
144	MP:0005602_decreased_angiogenesis	0.01982	0.4769	1.66	-6.50
538	MP:0000260_abnormal_angiogenesis	0.1969	0.6782	16.06	-26.10
1895	MP:0005601_increased_angiogenesis	0.2246	0.6861	53.32	-79.63
2650	MP:0008778_abnormal_lymphangiogenesis	0.5033	0.7393	263.86	-181.14

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 20 – Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-486-5p e SKT

Jensen DISEASES Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: klippel-trenaunay

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
582	Klippel-Trenaunay syndrome	0.2818	0.8383	22.39	-28.35

ING5, MYZAP

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Os transcritos alvos preditos do hsa-miR-574-3p também manifestaram relação com angiogênese e SKT nas mesmas bibliotecas: *GO Biological Process 2017b*, *MGI Mammalian Phenotype 2017* e *Jensen DISEASES*. Porém, estas associações não foram estatisticamente significativas. Chama a atenção a associação com o gene ING5, sem apresentar associação com AGGF1.

Figura 21 – Biblioteca MGI Mammalian Phenotype 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e angiogênese

MGI Mammalian Phenotype 2017 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▾ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
181	MP:0000260_abnormal_angiogenesis	0.7222	0.7406	36.64	-11.93
620	MP:0005602_decreased_angiogenesis	0.09405	0.2944	15.78	-37.30
1233	MP:0005601_increased_angiogenesis	0.3128	0.4374	68.36	-79.43

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 22 – Biblioteca GO Biological Process 2017b: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e angiogênese

GO Biological Process 2017b Bar Graph **Table** Clustergram  

Hover each row to see the overlapping genes.

25 entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
882	negative regulation of angiogenesis (GO:0016525)	0.1150	0.4141	0.07	-0.16
1345	positive regulation of sprouting angiogenesis (GO:1903672)	0.7535	0.7923	6.99	-1.98
1929	angiogenesis involved in wound healing (GO:0060055)	0.1348	0.4288	1.79	-3.59
1931	positive regulation of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:1903589)	0.6220	0.6844	7.58	-3.60
1981	positive regulation of angiogenesis (GO:0045766)	0.5060	0.6049	5.43	-3.70
2520	negative regulation of sprouting angiogenesis (GO:1903671)	0.2007	0.4449	2.99	-4.80
2723	cell migration involved in sprouting angiogenesis (GO:0002042)	0.4771	0.5857	9.07	-6.71
2927	positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis (GO:0090050)	0.3797	0.5377	9.07	-8.79
3014	negative regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis (GO:0090051)	0.3582	0.5349	9.64	-9.90
3018	negative regulation of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:1903588)	0.3582	0.5349	9.70	-9.96
3030	regulation of sprouting angiogenesis (GO:1903670)	0.3582	0.5349	9.85	-10.11
3128	regulation of angiogenesis (GO:0045765)	0.3359	0.5254	10.27	-11.21

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 23 – Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos do hsa-miR-574-3p e SKT

Jensen DISEASES Bar Graph **Table** Clustergram  

Hover each row to see the overlapping genes.

10 entries per page Search: Klippel-Trenaunay

Index	Name	ING5	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
290	Klippel-Trenaunay_syndrome		0.2123	0.3865	17.09	-26.48

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Após as análises individualizadas, optamos por avaliar quais transcritos alvos preditos eram semelhantes entre os 3 miRNA's de interesse, chegando-se a um total de 24 transcritos alvos (Quadro 8). Optamos por especificar apenas os transcritos alvos em comum por ser um montante bem menor comparado à quantidade de transcritos alvos de cada microRNA de interesse (o hsa-miR-320a relacionou-se a 7.931 transcritos alvos, o hsa-miR-486-5p a 2.817 e o hsa-miR-574-3p a 891).

Quadro 8 – Relação do transcritos alvos comuns aos 3 miRNA com expressão diminuídas entre os pacientes com SKT

Símbolo	Nome	Função	Identificação
ATF6	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF6-alpha	Transcrição	22926
ATMIN	ATM interactor	Transcrição	23300
ATP2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	Transporte de cálcio e íons	488
ATXN1	Ataxin-1-like	Transcrição e regulação Da transcrição	342371
BACE1	Beta-secretase 1	Protease	23621
BACE2	Beta-secretase 2	Protease	25825
BMP3	Bone morphogenetic protein 3	Osteogênese, condrogênese, diferenciação	651
CASK	Kappa-casein	Transporte transmembrana, lactação	1448
COL4A4	Collagen alpha 1(IV) chain	Angiogênese	1282
DIDO1	Death-inducer obliterator 1	Apoptose	11083
ELL2	RNA polymerase EE elongation fator ELL2	Regulação e transcrição	22936
ERG	Transcriptional regulator ERG	Regulação e transcrição	2078
ING5	Inhibitor of growth protein 5	Regulação e transcrição	84289
KIAA1549	UPF 0606 protein KIAA1549	Disfunção envolvido no astrocitoma	57670
KLF13	Krueppel like fator 13	Regulação e transcrição	51621
KLHL3	Kelch-like protein 3	Envolvido no pseudohipoaldosteronismo	26249
NIPA1	Magnesium transporter NIPA 1	Transporte de íons	123606
NR2C2	Nuclear reception sufamily 2 group C member 2	Espermatogênese, regulação, transcrição, diferenciação	7182
OSMR	Oncostation M specific receptor subunit beta	Receptor de membrana, envolvido na amiloidose	9180

Quadro 8 – Relação do transcritos alvos comuns aos 3 miRNA com expressão diminuídas entre os pacientes com SKT (continuação)

PDK3	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 3, mitochondrial	Metabolismo de carboidrato e glicose	5165
SLC24A4	Sodium/ potassium/ calcium exchanger 4	Transporte de sódio, potássio e cálcio	123041
SWAP70	Switch associated protein 70	Ligantes de DNA	23075
WWTR1	Ww domain-containing transcription regulator protein 1	Regulação e transcrição	25937
ZNF652	Zinc finger protein 652	Transcrição	22834

Estes transcritos alvos comuns entre os 3 miRNA com expressão diminuída foram encarados como um conjunto de transcritos alvos relacionados, hipoteticamente, ao “hsa-miR-320a + hsa-miR-486-5p + hsa-miR-574-3p”. Realizamos as mesmas pesquisas feitas anteriormente, nas mesmas bibliotecas da base de dados Enrichr, para verificarmos a ocorrência das mesmas associações.

Quadro 9 – Pesquisa relacionadas às vias moleculares nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr

Bibliotecas	hsa-miR-320a + hsa-miR-486-5p + hsa-miR-574-3p		
	angiogênese	PIK3CA	AGGF1
ARCHS4 Kinases Coexp		X	
NCI-Nature 2016	X		
LINCS L1000 Kinase Perturbations down		X	
LINCS L1000 Kinase Perturbations up		X	
Kinase Perturbations from GEO down		X	
Kinase Perturbations from GEO up		X	

Legenda: x = apresenta associação

A partir do link “*pathways*”, foi pesquisada a hipótese de haver correlações entre os transcritos alvos preditos em comum com vias moleculares relacionadas a alguns genes já descritos como tendo envolvimento na SKT (PIK3CA e AGGF1), e relacionadas à angiogênese,

processo potencialmente exacerbado na SKT (Quadro 9). Nesta pesquisa, encontrou-se associação positiva com a angiogênese apenas na biblioteca NCI-Nature 2016, porém sem ser estatisticamente significativa, e não houve relação com o AGGF1 em nenhuma biblioteca pesquisada.

Figura 24 – Biblioteca Panther 2016: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e angiogênese

NCI-Nature 2016 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙ ℹ

Hover each row to see the overlapping genes.

10 entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
8	Integrins in angiogenesis_Homo sapiens_2ddeac89-6194-11e5-8ac5-06603eb7f303	0.08296	0.08296	-1.33	3.30

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

A partir do link “*ontologies*” foi pesquisada a hipótese de haver correlações ontológicas com angiogênese, e a própria SKT (Quadro 10). Nesta pesquisa, encontrou-se associação positiva com a angiogênese apenas em uma biblioteca, chamada Mammalian Phenotype 2017, porém sem ser estatisticamente significativa. Na biblioteca Jensen DISEASES, foi encontrada forte associação positiva com SKT de forma estatisticamente significativa, sendo a quinta associação mencionada – nesta associação, chama a atenção a menção apenas ao gene ING5 como relacionado à SKT, sem apresentar associação com AGGF1.

Quadro 10 – Pesquisa relacionadas à ontologia nas bibliotecas encontradas na base de dados Enrichr

Bibliotecas	(320a) + (486-5p) + (574-3p)	
	angiogênese	Klippel-Trenaunay
MGI Mammalian Phenotype 2017	X	
Jensen DISEASES		X

Legenda: x = apresenta associação

Figura 25 – Biblioteca MGI Mammalian Phenotype 2017: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e angiogênese

MGI Mammalian Phenotype 2017 Bar Graph **Table** Clustergram ⚙️ ⓘ

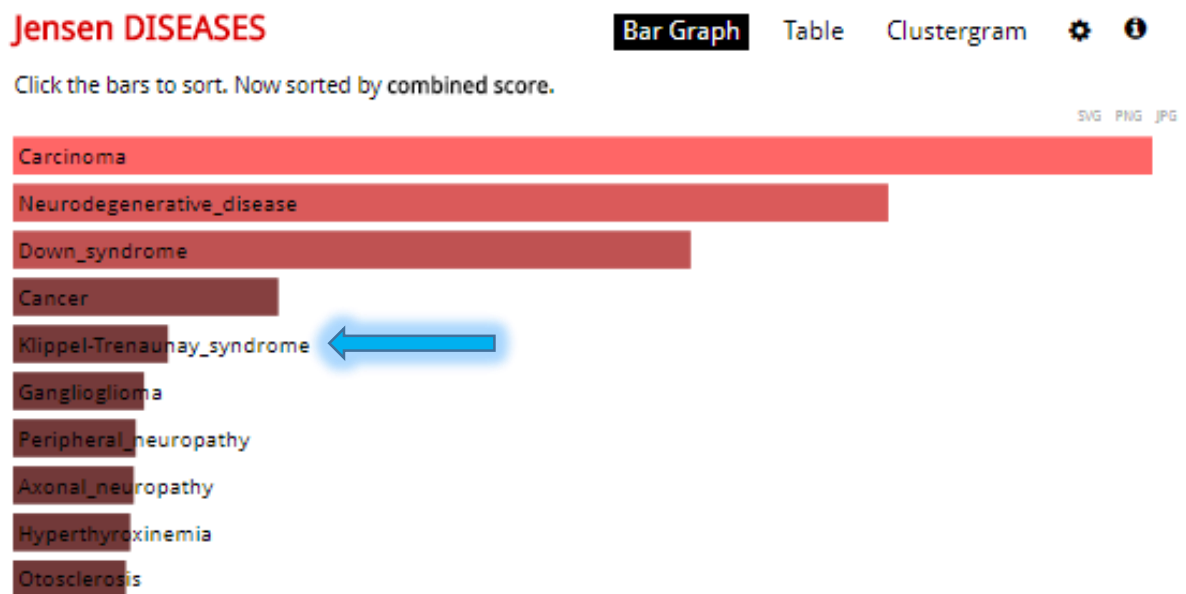
Hover each row to see the overlapping genes.

10 ▼ entries per page Search: angiogenesis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
259	MP:0005602_decreased_angiogenesis	0.07408	0.1099	5.26	-13.70

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 26 – Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e SKT – gráfico de barras



Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Figura 27– Biblioteca Jensen DISEASES: resultado da pesquisa quanto existência de associação entre transcritos alvos comuns aos três miRNA's e SKT

Jensen DISEASES

Bar Graph

Table

Clustergram



Hover each row to see the overlapping genes.

10 entries per page

Search: Klippel-Trenaunay

Index	Name	ING	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
5	Klippel-Trenaunay_syndrome		0.01667	0.04624	-1.49	6.10

Fonte: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Quadro 11 – Resumo das associações dos 3 miRNA's com expressão diminuída no grupo “Pacientes com SKT” com as vias moleculares e com a ontologia, encontradas na base de dados Enrichr

	hsa-miR-320a	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-320a + hsa-miR-486-5p + hsa-miR-574-3p
Vias moleculares				
Angiogênese	X	X	X	X
Estatisticamente Significativo	não	Sim	Sim	Não
AGGF1	X	X		
Estatisticamente Significativo	não	Não		
Ontologia				
Angiogênese	X	X	X	X
Estatisticamente Significativo	sim	sim	Não	Não
SKT	X	X	X	X
Estatisticamente Significativo	Sim	não	Não	Sim

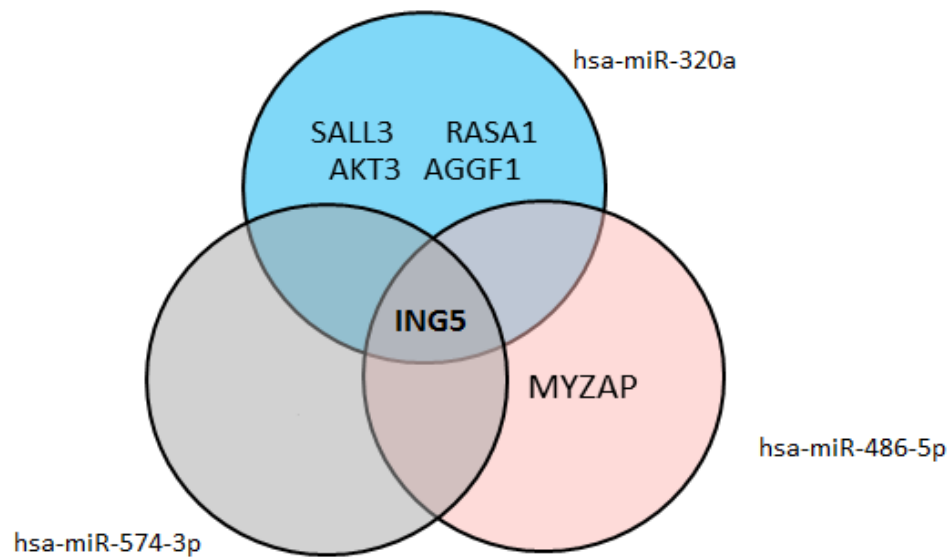
Legenda: x = apresenta associação

Quadro 12 – Resumo das associações dos 3 miRNA's com expressão diminuída no grupo “Pacientes com SKT” com os transcritos alvos preditos, encontradas na base de dados Enrichr

	hsa-miR-320a	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-574-3p	(hsa-miR-320a) + (hsa-miR-486-5p) + (hsa-miR-574-3p)
Ontologia				
SKT	X	X	X	X
significância estatística	sim	não	Não	X
Genes	ING5, SALL3, RASA1, AKT3, AGGF1	ING5, MYZAP	ING5	ING5

Legenda: x = apresenta associação

Quadro 13 – Diagrama de Venn ilustrando os genes que mantêm relação com SKT e com os transcritos alvos preditos dos três miRNA's, na biblioteca Jensen DISEASES



4. DISCUSSÃO

Os dados coletados e tabulados referentes ao grupo “Pacientes com SKT” vão de encontro a algumas informações já relatadas na literatura. Em todos os pacientes, o diagnóstico correto quanto a ser portador da SKT só foi firmado na fase adulta, ao iniciar o acompanhamento no Ambulatório de Malformações Vasculares, o que pode refletir o desconhecimento sobre a síndrome, já que se trata de uma doença rara. Nenhum paciente apresentava antecedente familiar de SKT e 2 relatavam casos de “hemangioma” em sobrinhos.^{11, 20, 47}

Embora relatado por várias fontes que não há predileção por raça e gênero houve predominância de indivíduos da raça branca e de mulheres, o que pode ter sido influenciado pelo pequeno tamanho da amostra.^{15, 20} Dentre as mulheres multíparas, 1 relatou piora do quadro de varizes durante a gestação, o que associamos às alterações corpóreas típicas da gestação e, também, a uma possível resposta aos níveis hormonais aumentados neste período.^{17, 47} Houve também, em todos os casos, relato de início ou piora do quadro de varizes a partir da puberdade e adolescência, o que também pode estar relacionado com a mudança no padrão hormonal deste período da vida.^{48, 49}

Em todos os pacientes do grupo houve acometimento dos membros inferiores de forma unilateral, predominantemente no membro inferior esquerdo. Apenas 1 paciente apresentou acometimento concomitante do dorso e face posterior do membro superior direito, o que reforça a relação com dados relatados em outros trabalhos a respeito do comportamento habitual da SKT ser em membros inferiores e de forma unilateral^{13, 23, 47}

Oitenta por cento dos pacientes apresentavam todos os critérios para diagnóstico da SKT, porcentagem maior do que a relatada em trabalhos epidemiológicos que abordam a síndrome.^{16, 47} A malformação capilar, percebida já ao nascimento ou na infância, estava presente em todos os pacientes. Apesar de a hipertrofia ser o sintoma de menor frequência, todos os pacientes a manifestavam.^{13, 50} Frente ao fato de as varizes serem patologia frequente, acreditamos que isto possa contribuir para que a SKT seja negligenciada.

Nenhum paciente apresentava relato de hemorragias cutâneas relacionadas às malformações capilares. Dois pacientes relatavam já ter sofrido ao menos 2 episódios de celulite, com boa resposta a ciclos curtos de antibióticos. Um paciente apresentava malformação linfática cutânea microcística próxima à malformação capilar tendo esta área também acometida pelos sinais e sintomas de celulite quando de um dos episódios desenvolvidos.^{15, 20,}

Foram notados diversos comportamentos quanto à hipertrofia. Como já mencionado na literatura, este é o sinal cardinal da SKT com maior variabilidade quanto a sua apresentação.^{15, 50} Seis pacientes apresentavam aumento no diâmetro do membro em todos os segmentos compartimentalizados para análise, sendo o segmento “coxa” o mais acometido. Os demais pacientes apresentaram apenas um ou dois compartimentos (“perna” ou “tornozelo”) com maior diâmetro, sendo que o compartimento “perna” foi o de diâmetro mais variável. Um paciente apresentou a maior variabilidade quanto à hipertrofia do membro acometido pela SKT pois apresentava redução no diâmetro de um dos compartimentos quando comparado ao membro contralateral. Embora mais rara, a hipotrofia no membro acometido pela SKT pode ocorrer.^{20, 26}

Três pacientes apresentavam discrepância quanto ao comprimento dos membros inferiores, com o membro envolvido na SKT sendo mais longo que o contralateral, com diferença variando de 0,3cm a 0,8cm. Nenhum paciente necessitava de uso habitual de órteses ou mesmo cirurgias ortopédicas corretivas, já que estas tem suas indicações quando há discrepâncias maiores que 2cm entre o comprimento dos membros inferiores.^{13, 16, 47}

Três pacientes apresentavam macrodactilia em algum pododáctilo do membro acometido sendo que 2 deles já tinham sido submetidos a amputações parciais do dedo devido desconforto que isso acarretava quanto ao uso de calçado, porcentagem de acometimento e manejo desta condição semelhante ao postulado por outros serviços.⁴⁷

Oito pacientes apresentavam malformações venosas no membro acometido pela SKT, números próximo ao relatado em alguns trabalhos, inclusive epidemiológicos, quanto à síndrome.^{16, 17, 26, 50} Sete pacientes eram portadores de varizes e 1 paciente tinha hipotrofia de veia femoral superficial.¹⁵ Dois pacientes já haviam sido submetidos à safenectomia interna total e 4 a escleroterapia com espuma de polidocanol sendo que nenhum dos pacientes submetidos a algum destes procedimentos desenvolveu hemorragias ou complicações, o que apoia a ideia de que a doença varicosa possa ser abordada cirurgicamente ou com técnicas minimamente invasivas no paciente com SKT que apresentem o sistema venoso patente.^{13, 47, 48} Não houve casos relatados de trombose venosa profunda ou mesmo embolia pulmonar em nenhum dos pacientes e mesmo aqueles submetidos a algum procedimento cirúrgico apenas utilizaram a profilaxia padrão recomendada, adequada ao grau da cirurgia que seria realizada.¹³

O sintoma referido com mais frequência foi dor em peso no membro envolvido na SKT, como já reportado na literatura.^{13, 17, 47} No entanto, tanto este sintoma quanto a malformação capilar, a hipertrofia do membro e as alterações venosas, sinais próprios da SKT, não eram limitantes ou influenciavam na qualidade de vida de nenhum paciente, aspecto sempre

indagado nas consultas frente ao potencial impacto psicológico que a síndrome pode trazer.⁴⁷ Embora prescritos de forma rotineira, apenas 3 pacientes faziam uso de flebotônico de forma habitual assim como apenas 5 faziam uso de meias de compressão de forma também habitual.^{13,}
47

Na avaliação inicial de todos os pacientes, foram submetidos os exames que habitualmente fazem parte da abordagem ambulatorial dos pacientes com SKT. Dessa forma, foram solicitados US duplex venoso de membros inferiores, já que é um método não invasivo e que traz informações a respeito da anatomia, perviedade e competência dos sistemas venosos superficial e profundo, e a escanometria para avaliar possíveis discrepâncias no comprimento dos membros inferiores. Ressaltamos que a escanometria tem sua melhor aplicabilidade no período em que o crescimento ósseo ainda está em curso mas optamos por solicitá-lo, mesmo frente ao fato de os pacientes já iniciarem o acompanhamento na fase adulta, como parte de sua documentação clínica.¹³ Ao longo de todo o período de acompanhamento no ambulatório, nenhum paciente foi submetido a exames de imagem voltados para a pesquisa de acometimento visceral pela SKT já que, habitualmente, solicitamos tais exames apenas quando relatados sinais ou sintomas sugestivos deste cenário.^{12, 15} Nenhum paciente foi submetido a US arterial, ressonância nuclear magnética (RNM) ou mesmo arteriografia pois seguindo o fluxograma vigente no Ambulatório de Malformações Vasculares do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (HC FMB/ UNESP), solicitamos tais exames apenas em casos sugestivos de fístula arteriovenosa, o que não se configurou entre os pacientes do estudo.

Devido à natureza esporádica e familiar infrequente, é tecnicamente desafiador identificar as anormalidades cromossômicas e genéticas associadas a SKT já que a maioria dos pacientes com SKT apresentam cariótipo normal.²⁰ No entanto, a caracterização de anormalidades citogenéticas como translocações associadas a doenças é uma abordagem muito útil para identificar genes de doenças humanas.²⁵

Algumas anormalidades cromossômicas foram relatadas em alguns pacientes com SKT mais ainda necessitam de maiores estudos para firmarem sua relação com a síndrome. É o caso da translocação balanceada t (8; 14) (q22.3; q13), do extra cromossomo de anel supernumerário 18 e de mutações do gene PIK3CA. Mais análises poderão levar à identificação de um outros genes envolvido na SKT.²⁶

A existência de um gene de susceptibilidade para SKT foi pautada a partir da observação da translocação t (5; 11) (q13.3; p15.1), já que o ponto de interrupção da translocação 5q13.3 é localizado no promotor de AGGF1, aumentando significativamente a sua

transcrição. Anteriormente chamado VG5G e mais recentemente nomeado como AGGF1, sua proteína atua como potente fator angiogênico e foi claramente detectada em células relevantes para SKT, incluindo células endoteliais, vasculares, células musculares lisas e osteoblastos, o que estabeleceu AGGF1 como um gene de susceptibilidade para SKT, e mostram que o aumento da angiogênese é o mecanismo patogênico molecular da síndrome.²⁶

Por conta do que já foi esclarecido como tendo relação com a SKT, nos detivemos a direcionar a discussão sobre os miRNA encontrados alterados no estudo baseados nas relações com angiogênese, AGGF1 e a própria SKT.

Atualmente, a angiogênese é considerada um processo biológico complexo e dinâmico. Evidências mostram que a angiogênese é essencial durante o desenvolvimento embrionário, mas torna-se particularmente quiescente na idade adulta; porém, as células endoteliais mantêm sua capacidade de se dividir rapidamente em resposta a estímulos fisiológicos, como, por exemplo, durante a função reprodutiva feminina e a cicatrização de feridas para promover a reparação dos tecidos.³³

O equilíbrio entre estimuladores e os inibidores da angiogênese podem resultar em muitos distúrbios como vários tipos de câncer, doenças isquêmicas e inflamatórias, determinando a progressão da doença. Observações recentes sugerem que alguns miRNA's são necessários durante a angiogênese e, através dos perfis de expressão, guardam relação com a sua regulação.³³

No estudo, 3 miRNA's apresentaram expressão diminuída entre os indivíduos do grupo "Pacientes com SKT": hsa-miR-320a, hsa-miR-486-5p e hsa-miR-574-3p. Dessa forma, pelo fato de os miRNA's regularem uma proporção significativa dos genes no genoma humano, ligando-se ao mRNA e impedindo a síntese de proteínas, espera-se que em um cenário onde determinado miRNA esteja com sua expressão diminuída, encontremos uma maior expressão do gene regulado por este miRNA.³⁴⁻³⁶

Através de pesquisa nas bases de dados e suas respectivas bibliotecas, pudemos verificar que os 3 miRNA's em questão guardam relação com vias moleculares envolvidas na angiogênese, sendo a maior parte destas relações estatisticamente significativas. Seguindo o mesmo raciocínio quanto a regulação "miRNA x gene", em um cenário onde determinado miRNA esteja com sua expressão diminuída poderá existir uma maior atividade de vias moleculares que mantenham alguma relação com ele, no caso, uma maior atividade angiogênica.

Quanto à relação aos 3 miRNA de interesse no estudo, quando pesquisados individualmente, nenhum mostrou associação estatisticamente significativa com o AGGF1,

gene já comprovadamente relacionado a SKT. Ao mesmo tempo, observamos uma forte associação de seus transcritos alvos em comum com o gene ING5, o que nos fez pensar na possibilidade de novos genes regulados por estes miRNA guardarem relação com a SKT.

Quando analisamos se os transcritos alvos de cada miRNA guardavam relação com a SKT, pesquisando-se diretamente o termo “Klippel-Trenaunay” na biblioteca de dados voltada a pesquisa por doenças (Jensen DISEASES), encontramos a citação de 5 outros transcritos alvos preditos, além do AGGF1: ING5, SALL3, RASA1, AKT3, MYZAP. Há relato recente da possível associação entre SALL3, RASA 1 e ING5 com a SKT baseado nos achados da primeira investigação do genoma na SKT. Nesta investigação, foram encontrados alguns defeitos envolvendo estes transcritos alvos, os quais atuam na regulação da angiogênese durante o desenvolvimento embrionário⁵¹. Salientamos que, no estudo, o ING5 foi comum a todos os miRNA pesquisados, o que possibilita levantarmos a hipótese de que especialmente o ING5 possa guardar íntima relação com a SKT.

Vale ressaltar que o estudo encontrou alguns fatores que impuseram dificuldades para a sua realização como a escassez de recursos financeiros e o número limitado de kits disponíveis para a realização das análises, o que nos levou a organizá-las e analisá-las em *pools*.

5. CONCLUSÃO

Através do perfil global de expressão de miRNA's em pacientes adultos com SKT, pode-se observar que 3 miRNA's apresentaram expressão diminuída, comparados com adultos sem a síndrome. Estes miRNA's relacionavam-se com a angiogênese, AGGF1 e outros genes, em especial o ING5. Estes achados podem contribuir com o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas para o tratamento da SKT. Estudos adicionais utilizando nossas amostras, com a análise individualizada das mesmas, poderão revelar novas correlações genéticas e estudos com casuísticas maiores poderão definir mecanismos mais apurados das interações genéticas.

REFERÊNCIAS

1. Moore K, Persaud TVN. Embriología clínica: Elsevier Brasil, 2016.
2. Maffei Fea. Doenças Vasculares Periféricas. Rio de Janeiro, 2016.
3. Mulliken JB, Glowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. Plastic and reconstructive surgery 1982;69:412-420.
4. Belov S. Classification of congenital vascular defects. International angiology: a journal of the International Union of Angiology 1990;9:141-146.
5. Lee B, Laredo J, Lee T, et al. Terminology and classification of congenital vascular malformations. Phlebology 2007;22:249-252.
6. Lee B, Lardeo J, Neville R. Arterio-venous malformation: how much do we know? 2009.
7. Anomalies vascular. ISSVA classification for vascular anomalies, 2014.
8. Merrow AC, Gupta A, Patel MN, et al. 2014 revised classification of vascular lesions from the international society for the study of vascular anomalies: radiologic-pathologic update. RadioGraphics 2016;36:1494-1516.
9. Klippel M TP. Naevus variqueux osteohypertrophique. Arch Gen Med 1900:641.
10. Weber FP. Angioma-formation in connection with hypertrophy of limbs and hemi-hypertrophy. J. Dermatol. 1907;19:231-235.
11. Medicine UNLo. Genetics Home Reference. Volume 2017, 2017.
12. Tetangco EP, Arshad HMS, Silva R. Klippel-Trenaunay syndrome of the rectosigmoid colon presenting as severe anemia. ACG case reports journal 2016;3.
13. Wang SK, Drucker NA, Gupta AK, et al. Diagnosis and management of the venous malformations of Klippel-Trénaunay syndrome. Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders 2017;5:587-595.
14. Spasić M, Radovanović D, Čanović D, et al. Combined lymphangioma and hemangioma of the spleen in a patient with Klippel-Trénaunay syndrome. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo 2012;140:777-781.
15. Cha SH, Romeo MA, Neutze JA. Visceral manifestations of Klippel-Trenaunay syndrome. RadioGraphics 2005;25:1694-1697.
16. Villela ALC, Guedes LGS, Paschoa VVA, et al. Perfil epidemiológico de 58 portadores de síndrome de Klippel-Trénaunay-Weber acompanhados no Ambulatório da Santa Casa de São Paulo. Jornal Vascular Brasileiro 2009;8.
17. Jacob AG, Driscoll DJ, Shaughnessy WJ, et al. Klippel-Trenaunay syndrome: spectrum and management, In Mayo Clinic Proceedings, Elsevier, 1998.
18. Deepinder F. GI Bleeding, Colon Varicosities, and Visceral Enlargement as a Manifestation of Klippel-Trénaunay Syndrome. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2011;9:e126-e127.

19. Cronenwett JL, Johnston KW. Rutherford's Vascular Surgery: Elsevier Health Sciences, 2014.
20. Karunamurthy A, Pantanowitz L, Lepe JG, et al. Lethal outcomes in Klippel-Trenaunay syndrome. *Pediatric and Developmental Pathology* 2013;16:337-342.
21. Nitecki S, Bass A. Ultrasound-guided foam sclerotherapy in patients with Klippel-Trenaunay syndrome. *IMAJ-RAMAT GAN*- 2007;9:72.
22. Werlang HZ, de Oliveira GA, Tamelini AM, et al. Escanometria dos membros inferiores: revisitando Dr. Juan Farill. *Radiologia Brasileira* 2007;40:137-141.
23. Mainine S, Ribeiro LL, Nascimento TF, et al. Complicações ortopédicas na síndrome de Klippel-Trenaunay. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde* 2010;35.
24. Pawel B, Spencer K, Dormans J. Klippel-trenaunay syndrome. *Archives of disease in childhood* 2005;90:1127-1127.
25. Wang QK. Update on the molecular genetics of vascular anomalies. *Lymphatic research and biology* 2005;3:226-233.
26. Timur A, Driscoll D, Wang Q. Biomedicine and diseases: the Klippel-Trenaunay syndrome, vascular anomalies and vascular morphogenesis. *Cellular and molecular life sciences* 2005;62:1434-1447.
27. Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *The Journal of pediatrics* 2015;166:1048-1054. e5.
28. Tian X-L, Kadaba R, You S-A, et al. Identification of an angiogenic factor that when mutated causes susceptibility to Klippel-Trenaunay syndrome. *Nature* 2004;427:640.
29. Baskerville PA, Ackroyd JS, Browse N. The etiology of the Klippel-Trenaunay syndrome. *Annals of surgery* 1985;202:624.
30. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932.
31. Jain RK, Carmeliet PF. Vessels of death or life. *Scientific American* 2001;285:38-45.
32. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249.
33. Buysschaert I, Schmidt T, Roncal C, et al. Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi) genomics in angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2008;12:2533-2551.
34. Boyd SD. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory investigation* 2008;88:569.
35. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell* 2009;136:215-233.
36. Stather P, Wild J, Sylvius N, et al. MicroRNAs associated with the pathways involved in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Artery Research* 2013;7:28-35.
37. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:17897-17901.
38. Roush SF, Slack FJ. Micromanagement: a role for microRNAs in mRNA stability: ACS Publications, 2006.

39. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:10513-10518.
40. Bertonni N, Pereira LM, Severino FE, et al. Integrative meta-analysis identifies microRNA-regulated networks in infantile hemangioma. *BMC medical genetics* 2016;17:4.
41. Manchester-University. miRBase, 2013.
42. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research* 2013;42:D68-D73.
43. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics* 2004;5:631.
44. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, et al. Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of physiology and biochemistry* 2011;67:129-139.
45. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* 2008;18:997.
46. Li W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. *Journal of bioinformatics and computational biology* 2012;10:1231003.
47. hospital Bcs. Clinical Practice Guidelines for Klippel Trenaunay Syndrome (KTS). Boston, 2016.
48. Wittens C, Davies A, Bækgaard N, et al. Editor's choice-management of chronic venous disease: clinical practice guidelines of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2015;49:678-737.
49. Goldberg TB, Colli AS, Curi PR. Relação entre área do braço, área do músculo, área de gordura do braço e a menarca em adolescentes do município de Botucatu. *J Pediatr (Rio de J)* 1996;72:85-92.
50. Clinic M. Klippel-Trenaunay Syndrome. Volume 2018. Rochester, 2017.
51. Dimopoulos A, Sicko RJ, Kay DM et al. Copy number variants in a population-based investigation of Klippel-Trenaunay syndrome. *Am J Med Genet A* 2016;30(11):172-8

APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados demográficos e epidemiológicos: Grupo “Pacientes com SKT”

Paciente	Naturalidade	Raça	Gênero	Idade
1	Botucatu/ SP	Branca	F	28
2	Várzea Grande/ MT	Branca	F	18
3	Botucatu/ SP	Branca	F	40
4	Agudos/ SP	Branca	F	47
5	Avaré/ SP	Branca	F	32
6	Botucatu/ SP	Branca	F	61
7	Penápolis/ SP	Parda	M	22
8	Ferraz de Vasconcelos/ SP	Branca	F	29
9	Itatinga/ SP	Branca	F	26
10	São Manuel/ SP	Parda	M	19
Agudos= 1 (10%) Avaré= 1 (10%) Botucatu= 3 (30%) Ferraz de Vasconcelos= 1 (10%) Itatinga= 1 (10%) Penápolis= 1 (10%) São Manuel= 1 (10%) Várzea Grande= 1 (10%) Branca= 8 (80%) Parda= 2 (20%) F= 8 (80%) M= 2 (20%) Média= 32 anos				

Legenda: F= gênero feminino; M = gênero masculino

APÊNDICE B - Dados epidemiológicos: Grupo “Pacientes com SKT”

Paciente	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Comorbidades	Medicações em uso	Etilismo	Tabagismo	Passado Obstétrico	Antecedente familiar de neoplasias
1	59	1,64	21,94	Líquen plano	-	-	-	G0P0C0A0	Sim – Avô paterno Neoplasia pulmão
2	81	1,70	28,03	-	Diosmin	-	-	G0P0C0A0	Não
3	75	1,68	26,57	-	-	-	-	G4P4C0A0	Não
4	49	1,57	19,88	-	-	-	-	G3P1A2C0	Não
5	69	1,73	23,05	-	-	-	-	G0P0C0A0	Não
6	83	1,62	31,63	HAS, DM, DLP, Depressão, Angina estável, Hipotireoidismo	Metoprolol, Enalapril, Atorvastatina, Citalopram, Metformina, Diosmin, Puran T4	-	-	G0P0C0A0	Não
7	96	1,72	32,45	-	Diosmin	-	-	-	Não
8	82	1,53	35,03	Hipotireoidismo	Puran T4	-	-	G3P3C3A0	Não
9	50	1,55	20,81	-	-	-	-	G0P0C0A0	Não
10	76	1,70	26,30	-	-	-	-	-	Não
Média= 72kg Média= 1,64m Média= 26,57kg/m ²						0	0	Nulíparas= 5 (62,50%) Múltíparas= 3 (37,50%)	1 (10%)

Legenda: HAS = hipertensão arterial sistêmica; DM = diabetes mellitus; DLP = dislipidemia; IMC = índice de massa corpórea; GnPnCnAn = referente ao número do evento: G – gestações; P – partos; C – cesáreas; A – abortos

APÊNDICE C – Dados demográficos e epidemiológicos: Grupo “Referência”

Paciente	Naturalidade	Raça	Gênero	Idade
1	Botucatu/ SP	Parda	M	32
2	Cariacica/ ES	Branca	M	38
3	São Manuel/ SP	Branca	M	38
4	São Manuel/ SP	Negra	F	19
5	Botucatu/SP	Parda	M	42
6	São Manuel/ SP	Branca	F	31
7	Souto Soares/ BA	Branca	M	27
8	Areia/ PB	Branca	M	36
9	Botucatu/SP	Branca	M	39
10	São Manuel/ SP	Branca	M	41
11	Conchas/ SP	Branca	M	30
12	Botucatu/ SP	Branca	M	36
13	São Manuel/ SP	Negra	F	36
14	Avaré/ SP	Branca	M	52
15	Botucatu/ SP	Branca	F	58
16	Iracemápolis/ SP	Branca	M	39
17	Taquarituba/ SP	Branca	F	43
18	Pardinho/ SP	Branca	M	50
19	Avaré/ SP	Branca	F	35
20	Barra Bonita/ SP	Parda	M	28
21	Corumbá/ MS	Branca	M	27
22	São Manuel/ SP	Branca	F	39
		Parda= 3 (13, 64%)	F= 7 (31,81%) M= 15 (68,19%)	Média= 37,09 anos
		Negra= 2 (9,09%)		
		Branca= 17		
		(77,27%)		

Legenda: F= gênero feminino; M = gênero masculino

APÊNDICE D – Dados epidemiológicos: Grupo “Referência”

Paciente	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m²)	Comorbidades	Medicações	Etilismo	Tabagismo	Passado obstétrico	Antecedente familiar de neoplasias
1	88,00	1,68	31,18	-	-	-	-	-	-
2	107,00	1,80	33,02	-	-	-	-	-	-
3	110,00	1,85	32,14	-	-	-	-	-	-
4	82,00	1,63	30,86	-	-	-	-	G0P0C0A0	-
5	75,00	1,63	28,23	-	-	-	Sim	-	-
6	63,00	1,59	24,92	-	-	-	-	G0P0C0A0	-
7	80,00	1,71	27,36	Rinite	Sorine	-	-	-	-
8	69,00	1,81	21,06	-	-	-	-	-	-
9	66,00	1,71	22,57	-	-	-	-	-	-
10	77,00	1,75	25,14	Enxaqueca	Dorflex	-	-	-	-
11	98,00	1,89	27,43	-	-	-	-	-	-
12	80,00	1,80	24,69	-	-	-	-	-	-
13	95,00	1,61	36,65	-	-	-	-	G4P4C3A0	-
14	84,00	1,65	30,85	-	-	-	Sim	-	-
15	83,00	1,57	33,67	-	-	-	-	G0P0C0A0	-
16	85,00	1,80	26,23	-	-	-	-	-	Sim – pai Neoplasia gástrica
17	79,00	1,62	30,10	-	-	-	-	G0P0C0A0	-
18	82,00	1,78	25,88	-	-	-	-	-	-
19	95,00	1,65	34,89	Hipotireoidismo	Puran T4	-	Sim	G0P0C0A0	-
20	67,00	1,66	24,31	-	-	-	-	-	-
21	83,00	1,75	27,10	-	-	-	-	-	-
22	87,00	1,60	33,98	-	-	-	-	G2P0C0A2	-
Média= 83,41kg Média= 1,71m Média= 28,74kg/m²						0	Sim= 3 (13,64%)	Nulíparas= 6 (85,71%) Multíparas= 1 (14,29%)	1 (4,55%)

Legenda: IMC = índice de massa corpórea; GnPnCnAn = referente ao número do evento: G – gestações; P – partos; C – cesáreas; A – abortos

APÊNDICE E – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

Eu, _____ RG _____ RG Hospitalar _____, estou sendo convidado a participar de um estudo denominado **“Perfil global de expressão de micro-RNA’s em adultos com Síndrome de Klippel-Trenaunay”** cujo objetivo é pesquisar características genéticas que possam direcionar os métodos de tratamento de pacientes adultos com esta síndrome

Para a realização do estudo, uma pequena quantidade de sangue de veia periférica será coletada de pacientes que tenham diagnóstico de Síndrome de Klippel-Trenaunay e que são acompanhados no Ambulatório de Malformações Vasculares da Disciplina de Cirurgia Vascular da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, e de adultos saudáveis doadores de sangue, cuja as amostras serão provenientes do Hemocentro de Botucatu. Posteriormente, o sangue coletado será analisado para verificar se há fatores genéticos presentes, especificamente em pacientes com a Síndrome de Klippel-Trenaunay, que possam determinar a forma mais eficaz para o seu tratamento. Nos pacientes portadores de síndrome, será feita uma fotografia das alterações corpóreas presentes para possíveis correlações com os resultados futuros das análises. Para todos os pacientes envolvidos na pesquisa será realizada, se pertinente, consulta e análise de dados contidos no prontuário médico.

A coleta do sangue é uma prática rotineira e praticamente não implica em riscos. No entanto, algumas complicações podem ocorrer como dor, sangramento ou hematomas no lugar da punção e, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente acompanhado neste hospital visando a minha recuperação, estando a pesquisa dentro do que determina a lei.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Paula Angeleli B. Camargo, Marcone Lima Sobreira, Regina Moura, Patrícia Pintor dos Reis e Matheus Bertanha todos profissionais ligados à disciplina de Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, e com eles poderei manter contato pelo telefone (14) 3811-6269.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Botucatu, ____/____/20____.

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

Dra. Paula Angeleli B. Camargo – CRM 129.373
Médica responsável pelo estudo

ANEXOS

ANEXO A – Classificação de Hamburgo para Malformações Vasculares Congênicas

Tipos

- Defeito predominantemente arterial
- Defeito predominantemente venoso
- Defeito predominantemente shunt arteriovenoso
- Defeito predominantemente linfático
- Defeitos combinados
- Defeitos predominantemente capilar

Subtipos embriológicos**Formas extratronculares**

- Infiltrativa, difusa
- Limitada, localizada

Formas tronculares

- Estenose ou obstrução
- Hipoplasia, aplasia, hiperplasia
- Dilatação, ectasia, aneurisma localizado

Fonte: Cronenwett JL, Johnston KW. Rutherford's Vascular Surgery: Elsevier Health Sciences, 2014 – adaptado pelo autor

ANEXO B – Classificação da International Society for Studies of Vascular Anomalies (ISSVA) para Malformações Vasculares Congênitas

Anomalias vasculares				
Tumores vasculares	Malformações Vasculares			
Benigno	Simplex	Combinada (2 ou + malformações vasculares encontradas na mesma lesão)	Vasos de grande calibre	Associada com outras anomalias *
Localmente agressivo ou borderline	Malformações capilares linfáticas venosas arteriovenosas	Malformação capilar-venosa capilar-linfática capilar-veno- linfática capilar-arteriovenosa	Tronculares	Ver quadro abaixo
Maligno	Fístulas arteriovenosas	Outras		

* Malformações vasculares associadas a outras anomalias	
Síndrome de Klippel-Trenaunay	MC + MV +/- ML + crescimento excessivo membro
Síndrome de Parkes-Weber	MC + FAV + crescimento excessivo membro
Síndrome Servelle-Martorel	MV + crescimento ósseo restrito
Síndrome Sturge-Weber	MC leptomeníngea e facial + anomalia ocular +/- crescimento excessivo partes moles e/ou ósseo
Limb CM + hipertrofia congênita não-progressiva do membro	
Síndrome Maffucci	MV +/- hemangioma + encondromas
Macrocefalia + MC	
Microcefalia + MC	
Síndrome CLOVES	ML + MV + MC +/- MAV + crescimento lipomatoso excessivo
Síndrome Proteus	MC, MV e/ou ML + crescimento somático assimétrico
Sd. Bannayan-Riley-Ruvalcaba	MAV + MV + macrocefalia, crescimento lipomatoso
MC: malformação capilar; MV: malformação venosa; ML: malformação linfática; FAV: fístula arteriovenosa; MAV: malformação arteriovenosa	

Fonte: <http://www.issva.org/UserFiles/file/Classifications-2014-Final.pdf> - adaptado pelo autor