

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 01/03/2020.



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: Marcione 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/m<sup>2</sup>: 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. <b>A</b> - veias varicosas; <b>B</b> - hipertrofia do membro acometido (MIE > MID) e <b>C</b> - 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 transcrito 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

|                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                | <b>20</b> |
| <b>2. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>                                                                                                     | <b>30</b> |
| 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 MI RNA'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        |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>                                                                                                                | <b>39</b> |
| 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 MI RNA'S .....                                                                                             | 49        |
| <b>4. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                | <b>65</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                 | <b>70</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                 | <b>71</b> |
| <b>APÊNDICES.....</b>                                                                                                                    | <b>74</b> |
| 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        |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                                                      | <b>79</b> |
| 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 ( $\geq 18$  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 ( $\geq 18$ 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

## 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. Berton 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