

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO (RS 833068) DO GENE *VEGF* E SUA ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA DE ÚLCERA DE PERNA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Palavras-Chave: ANEMIA FALCIFORME; FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR; ÚLCERA DE PERNA

Autores(as):

MARIA EDUARDA COSME BONGIOVANI, FCM-UNICAMP

BRUNA FACANALI PIELLUSCH (co-orientadora), FCM-UNICAMP

Prof. Dr. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS (orientador), FCM-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética causada por uma mutação de ponto com a substituição de uma base nitrogenada no sexto códon, resultando na substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia da globina β . Em homozigose, o gene responsável pela produção da cadeia β^s (*HBB**S) resulta na formação da hemoglobina S (HbS), a qual caracteriza a AF (Kato *et al.*, 2018). Em sua forma desoxigenada, a HbS polimeriza e promove a falcização das hemácias. Essa alteração morfológica é a base da fisiopatologia da AF, caracterizada por vaso-occlusão e anemia hemolítica. A partir desses dois mecanismos, diversas manifestações clínicas são observadas nos pacientes, dentre elas acidente vascular cerebral, priapismo, hipertensão pulmonar, retinopatia, falência renal, danos hepáticos, síndrome torácica aguda e úlcera de perna (Piel *et al.*, 2017; Sonati & Costa, 2008).

A úlcera de perna é uma importante complicação da AF, com grande impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, além de ser fator de risco para mortalidade precoce. Os pacientes apresentam crises de dor intensas, podendo desenvolver osteomielite crônica e, em alguns casos, evoluir para amputação do membro afetado. A causa dessa comorbidade em pacientes com AF é multifatorial, tendo como fatores agravantes a vaso-occlusão, processos inflamatórios, redução de fluxo sanguíneo e maior viscosidade sanguínea (Antwi-Boasiako *et al.*, 2020).

Diferentes moduladores genéticos e não genéticos são associados às diferentes formas e graus de manifestações clínicas entre os pacientes com AF (Zanette *et al.*, 2019). Níveis mais elevados de hemoglobina fetal (HbF) em indivíduos adultos e a herança concomitante de talassemia α são exemplos de moduladores genéticos associados a quadros mais leves das complicações clínicas da AF. Além desses, diversos polimorfismos genéticos já foram associados com subfenótipos da AF (Piel *et al.*, 2017).

Nesse sentido, em estudo realizado por Li e colaboradores, foi encontrada associação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em pacientes com úlcera do pé diabético. O VEGF é uma glicoproteína relacionada à angiogênese e, por isso, foi estudada sua relação com a formação de úlceras (Li *et al.*, 2018). Dessa forma, assim como em pacientes úlceras diabéticas, polimorfismos do gene *VEGF* também podem ser candidatos

em potencial para a modulação da manifestação clínica de úlcera de perna em pacientes com AF. No entanto, os estudos relacionados aos potenciais moduladores genéticos na presença de úlcera de perna em pacientes com AF ainda são escassos e, portanto, a investigação de novos polimorfismos e sua influência é necessária. Dentre esses, destaca-se o polimorfismo rs833068 do gene *VEGF*, que já foi relacionado com a presença de crises vasculares e esplenomegalia em indivíduos com AF, e, por isso, pode contribuir para um melhor entendimento dessa complicação clínica frequente e prejudicial que é a úlcera de perna, possibilitando a identificação precoce de pacientes com maior risco de seu desenvolvimento (Da Silva, 2020; Al-Habboubi *et al.*, 2012). Portanto, esse estudo teve como objetivo investigar a prevalência do polimorfismo rs833068 do gene *VEGF* em pacientes com AF que apresentem ou não úlcera de perna.

METODOLOGIA:

O presente estudo avaliou uma população de 211 participantes acompanhados no Ambulatório de Hemoglobinopatias do Hemocentro de Pernambuco – HEMOPE, de ambos os sexos, de idade igual ou superior aos 18 anos e com diagnóstico de AF. Esses indivíduos foram divididos em dois grupos: um grupo composto por participantes que já apresentaram pelo menos um evento de úlcera de perna ($n = 102$) e outro grupo (controle) com aqueles que nunca apresentaram essa manifestação clínica ($n = 109$). As amostras utilizadas pertencem ao biorrepositório do HEMOPE. Em relação aos aspectos éticos, foi obtida a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP, sob o número CAAE: 67207323.5.0000.5404, parecer 6.008.392, permitindo o início da execução das atividades práticas do trabalho.

As amostras foram recebidas no Laboratório de Hemoglobinopatias/FCM/UNICAMP e armazenadas em freezer -80°C . Em seguida, a quantificação e a avaliação do grau de pureza dos DNAs foram realizadas com utilização do espectrofotômetro NanoDrop®1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, EUA). Como protocolo para obtenção de melhores resultados com a análise do material, foi estabelecida a concentração de $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ como referência para as amostras, com a diluição daquelas com concentrações mais elevadas. Assim, as alíquotas de trabalho foram preparadas.

Em seguida, foi preparada a solução de trabalho de acordo com o protocolo da tabela 1. Dessa forma, as amostras foram testadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR) utilizando o equipamento *Step One Plus Real Time PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação consiste em uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguida por 50 ciclos com três etapas cada: desnaturação de fragmentos (95°C por 15 segundos), hibridização do primer/sonda (60°C por 1 minuto) e extensão de novos fragmentos (60°C por 1 minuto).

Tabela 1: Protocolo do Ensaio de qPCR.

Reagentes	Volume (μL)
MasterMix® [2x]	12,5
H ₂ O	6,5
Ensaio TaqMan® (rs833068 /Assay ID C_11400864_10) [5x]	5
DNA	1
Total	25

O ensaio utilizado nos testes apresenta sondas marcadas com dois fluoróforos diferentes (VIC e FAM) que correspondem, respectivamente, aos alelos A e G na sequência do gene VEGF. No contexto do polimorfismo rs833068 analisado, há uma substituição de guanina (G) por uma adenina (A), formando o alelo mutante. Quando esses alelos estão presentes na amostra, ocorre a hibridização da sonda correspondente e, após sua clivagem, há emissão de fluorescência que é captada pelo equipamento. Com isso, foram obtidos gráficos de discriminação alélica com auxílio do *software* do sistema de detecção de sequência versão 2.3 (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA).

Os gráficos obtidos por qPCR podem indicar os genótipos homocigoto selvagem (ausência do polimorfismo), homocigoto mutante (ausência do alelo selvagem) ou heterocigoto (presença do alelo selvagem e do alelo mutante), representados, respectivamente, na figura 1.

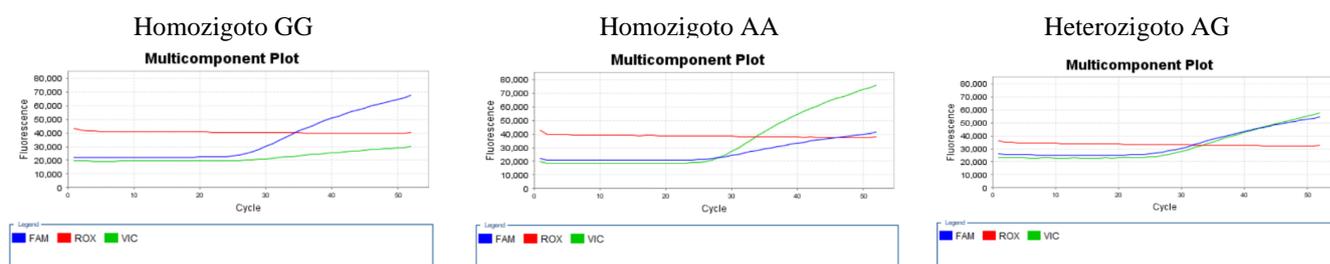


Figura 1: Exemplos de discriminação alélica encontradas nos testes realizados com as amostras do estudo.

Além disso, foi realizado o procedimento de sequenciamento do DNA de 32 amostras que obtiveram resultados inconclusivos utilizando o método de qPCR. O primer para o polimorfismo rs833068 foi desenhado e utilizado na reação de amplificação de acordo com o protocolo que consta na tabela 2.

Tabela 2: Protocolo da reação de amplificação.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O	19,0 µL
Forward primer (10 µM)	2,0 µL
Reverse primer (10 µM)	2,0 µL
2x PCR BIO Ultra Mix	25,0 µL
DNA	2,0 µL
Total	50 µL

Em seguida, a eletroforese em gel de agarose foi utilizada para confirmar a amplificação dos fragmentos de DNA pelo PCR e, em sequência, a purificação do DNA foi realizada utilizando o *PCR Purification Kit* (Cellco Biotec do Brasil Ltda). Uma nova reação foi feita e o resultado foi encaminhado para uma nova purificação e preparação para a realização do sequenciamento. Os resultados do sequenciamento foram analisados no sistema *Unipro UGENE v50.0 64-bit version*. Todos os dados foram tabelados e enviados para a análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A partir dos resultados obtidos pelos métodos previamente descritos, a discriminação alélica das amostras foi realizada e os dados estão apresentados na tabela 3. As análises estatísticas finais estão em andamento para a conclusão dos resultados do estudo.

Dentre as 211 amostras utilizadas no estudo, foi possível obter o resultado de discriminação alélica de 191 amostras, enquanto 20 amostras não obtiveram resultado conclusivo em nenhum dos testes e, portanto, não foram incluídas nas análises finais. O grupo com indivíduos que apresentaram pelo menos um episódio de úlcera de perna apresentou 91 pacientes, sendo que 39 são homocigotos selvagem (GG), ou seja, não apresentam o polimorfismo rs833068 do gene *VEGF*, 47 são heterocigotos (AG) e 5 são homocigotos mutantes (AA), isto é, apresentam os dois alelos com o polimorfismo. O grupo controle, por sua vez, apresentou 100 pacientes, dentre eles 37 são homocigotos selvagens, 54 heterocigotos (AG) e 9 homocigotos mutantes (AA). Dessa forma, observa-se que em ambos os grupos há maior frequência de indivíduos heterocigotos para o polimorfismo. No entanto, em relação à frequência de homocigotos mutantes, observa-se maior diferença entre os grupos, visto que essa corresponde a 5,5% dos pacientes do grupo com úlcera de perna, enquanto no grupo controle são 9% dos pacientes.

Tabela 3: Frequência de genótipos por grupo analisado.

Genótipos	Grupo com Úlcera de Perna	%	Grupo Controle	%
Homocigoto selvagem (GG)	39	42,9	37	37,0
Heterocigoto (AG)	47	51,6	54	54,0
Homocigoto mutante (AA)	5	5,5	9	9,0
Total	91	100%	100	100%

Na tabela 4 constam os dados referentes às variáveis idade, sexo e uso de hidroxiúria. Observa-se que a idade da população amostral variou no intervalo entre 18 e 67 anos, com média de 35 anos. No grupo com úlcera de perna, a idade média foi de 39 anos, enquanto no grupo controle foi de 31 anos. Dessa forma, nota-se que a média etária no grupo controle é menor do que do grupo com úlcera de perna. Em relação ao sexo, a população amostral consiste em 96 pacientes do sexo masculino e 95 pacientes do sexo feminino, com distribuição homogênea entre os grupos. Entre os pacientes analisados, em ambos os grupos, a maioria faz uso de hidroxiúria. No entanto, observa-se que esse uso é maior no grupo controle, visto que 64,0% utilizam hidroxiúria, em comparação com 51,6% do grupo com úlcera de perna.

Tabela 4: Dados das variáveis idade, sexo e uso de hidroxiúria para cada grupo analisado.

	Grupo com Úlcera de Perna n (%)	Grupo Controle n (%)
Idade		
<20	-	2 (2,0)
20-29	18 (19,8)	50 (50,0)
30-39	31 (34,0)	32 (32,0)
40-49	28 (30,8)	12 (12,0)
50-59	10 (11,0)	4 (4,0)
60-69	4 (4,4)	-
Sexo		
Feminino	41 (45,1)	54 (54,0)
Masculino	50 (54,9)	46 (46,0)
Uso de Hidroxiúria		
Sim	47 (51,6)	64 (64,0)
Não	44 (48,4)	36 (36,0)

CONCLUSÕES:

Embora a análise estatística dos dados obtidos pelo estudo ainda esteja em andamento, é possível encontrar possíveis diferenças na frequência dos genótipos entre os dois grupos avaliados. Espera-se que, com a conclusão das análises, os resultados possibilitem uma melhor avaliação do polimorfismo rs833068 do gene *VEGF* em pacientes com AF, especificamente em relação à úlcera de perna, e, assim, contribuir para identificação precoce e entendimento fisiopatológico dessa complicação clínica.

BIBLIOGRAFIA:

AL-HABBOUBI, Hebah H. et al. The relation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms on VEGF levels and the risk of vasoocclusive crisis in sickle cell disease. **European Journal of Haematology**, v. 89, n. 5, p. 403-409, 2012.

ANTWI-BOASIAKO, Charles *et al.* A study of the geographic distribution and associated risk factors of leg ulcers within an international cohort of sickle cell disease patients: the CASiRe group analysis. **Annals of Hematology**, v. 99, n. 9, p. 2073-2079, 2020.

DA SILVA, Aylla Núbia Lima Martins. Determinantes genéticos associados à evolução clínica da anemia falciforme em pacientes do Estado do Pará. 2020. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

KATO, Gregory J. *et al.* Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n.18010, p. 1-22, 2018.

Li, Xiaolei *et al.* Association between VEGF genetic variants and diabetic foot ulcer in Chinese Han population: A case-control study. **Medicine**, Baltimore, v. 97, n. 20, p. 1-4, 2018.

PIEL, Frédéric B. *et al.* Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561-1573, 2017.

SONATI, Maria de F. & COSTA, Fernando F.. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4 Suppl, p. S40-51, 2008.

ZANETTE, Dalila L. *et al.* Differential gene expression analysis of sickle cell anemia in steady and crisis state. **Annals of Human Genetics**, v. 83, n. 5, p. 310-317, 2019.