



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

THAIS HELENA CHAVES BATISTA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MICRORNAS MIR-21 E MIR-130A NO
DESENVOLVIMENTO DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

**Recife
2019**

THAIS HELENA CHAVES BATISTA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MICRORNAS MIR-21 E MIR-130A NO
DESENVOLVIMENTO DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Coorientador: Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Batista, Thais Helena Chaves

Avaliação da influência dos micrornas miR-21 e miR-130a no desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme / Thais Helena Chaves Batista - 2019.

57 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Anemia falciforme 2. Úlceras maleolares 3. Moduladores genéticos
I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Orientador) II. Araujo, Antonio
Roberto Lucena de (Coorientador) III. Vasconcelos, Luydson
Richardson Silva (Coorientador) IV. Título

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-65

THAIS HELENA CHAVES BATISTA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAS MIR-21 E MIR-130A NO
DESENVOLVIMENTO DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Aprovado em 28/08/2019

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Paula Sandrin Garcia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Igor de Farias Domingos (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dr. Bruno de Melo Carvalho (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Recife

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu maior guia, pois sem ele nada do que sou e conquistei até hoje seria possível. Aos meus pais, pela educação que me ofereceram, por sempre terem confiado em mim e me apoiado em todas as decisões tomadas. Cada conquista minha sempre dedicarei a vocês.

Ao meu orientador, Marcos André, agradeço imensamente por fazer parte de seu laboratório, por confiar em mim e no meu trabalho e por todas as oportunidades que me foram dadas. Não poderia deixar de agradecer pela nossa amizade e por todo conhecimento compartilhado ao longo desses quatro anos.

Aos meus coorientadores, Antonio Roberto e Luydson Vasconcelos, por me acompanharem durante esse período, por todos os ensinamentos e diretrizes transmitidos e por sempre estarem disponíveis no esclarecimento das minhas inúmeras dúvidas

A todos que fizeram e fazem parte do NHCL da UFPE, em especial a Rodrigo, Gabi Arcanjo, Aida, Peu, Igor e Diego Martins, e aos colegas de graduação, especialmente a Leandro, Sérgio e Lucas Estevão, pela amizade, experiências e sugestões compartilhadas e por todos os momentos de descontração que tivemos. A José Lucas, por todo incentivo e apoio que me foi dado na reta final.

À Fundação HEMOPE, especialmente à equipe de coleta do setor ambulatorial e cada paciente que participou voluntariamente na doação de amostras e permitiu que o projeto fosse realizado.

Ao Laboratório de Doenças Transmissíveis do Departamento de Parasitologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães e ao Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina da UNICAMP, por toda infraestrutura oferecida.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelo conhecimento e espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa. Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido durante o meu mestrado.

Por fim, agradeço a cada um que, mesmo não sendo aqui listado, teve alguma participação nessa conquista e contribuiu para que esse momento pudesse se concretizar.

RESUMO

Na busca de novos moduladores genéticos da úlcera maleolar (UM) na anemia falciforme (AF), a análise da expressão de miR-21 e miR-130a torna-se uma abordagem interessante, uma vez que ambos regulam mecanismos relacionados com a fisiopatologia das UMs, especialmente o processo de reparo tecidual. Esses microRNAs também foram relacionados com a regulação da leptina, um hormônio pleiotrópico, que atua na cicatrização de lesões cutâneas. Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar a influência de miR-21 e miR-130a no desenvolvimento de UMs em pacientes com AF. Foram selecionados 60 pacientes, 40 com histórico de UM (caso) e 20 que não desenvolveram UM (Controle-HbSS). O grupo caso foi subdividido em: UM aberta (UMA), n=19 e UM fechada (UMF), n=21. Também foi analisado um grupo de 10 doadores com perfil de hemoglobina normal (Controle-HbAA). As expressões dos microRNAs foram obtidas por RT-qPCR. Os níveis séricos de leptina foram avaliados por ELISA. Houve maior expressão de ambos microRNAs no grupo UMA frente aos grupos Controle-HbSS (miR-21: Fold Change [FC]=4,12, $p<0.0001$; miR-130a: FC=3,92, $p=0.0006$), UMF (miR-21: FC=3,48, $p<0.0001$; miR-130a: FC=4,52, $p=0.0004$) e Controle-HbAA (miR-21: FC=2,95, $p<0.0001$; miR-130a: FC=9,50, $p=0.0009$). Não houve diferença significativa entre os grupos UMF, Controle-HbSS e Controle-HbAA (miR-21: $p=0.1829$; miR-130a: $p=0.3537$). Além disso, o grupo UMA apresentou menores níveis de leptina quando comparados aos grupos Controle-HbSS ($p=0.0079$) e UMF ($p=0.0022$). Nossos resultados demonstraram uma relação inversa entre a expressão de miR-21 e miR-130a com os níveis séricos de leptina, sugerindo que a maior expressão desses microRNAs pode estar relacionada com a cronicidade e cicatrização das UMs em indivíduos com AF, pela diminuição dos níveis de leptina.

Palavras-Chave: Anemia falciforme. Úlceras maleolares. Moduladores genéticos.

ABSTRACT

In the search for new modulators of the leg ulcer (LU) in sickle cell anemia (SCA), the analysis of miR-21 and miR-130a expression becomes an interesting approach, since both regulate biological mechanisms related to the pathophysiology of LU, especially the tissue repair process. These microRNAs have also related to the regulation of leptin, a pleiotropic hormone, which acts in the healing process of skin lesions. Therefore, the aim of the study was to investigate the influence of miR-21 and miR-130a on the development of LUs in SCA patients. Were selected 60 SCA patients, 40 with a history of LU (case) and 20 who not develop LU (Control-HbSS). The case group was subdivided into: Active LU, n=19 and healed LU, n=21. In addition, it was analyzed a group of 10 donors with normal hemoglobin profile (Control-HbAA). MicroRNAs expression were evaluated by RT-qPCR. Serum leptin levels were evaluated by ELISA. There was higher expression of both microRNAs in the active LU group in contrast to Control-HbSS (miR-21: Fold Change [FC]=4,12, $p<0.0001$; miR-130a: FC=3,92, $p=0.0006$), healed LU (miR-21: FC=3,48, $p<0.0001$; miR-130a: FC=4,52, $p=0.0004$) and Control-HbAA groups (miR-21: FC=2,95, $p<0.0001$; miR-130a: FC=9,50, $p=0.0009$). There was no significant difference between the healed LU, HbSS-Control and HbAA-Control groups (miR-21: $p=0.1829$; miR-130a: $p=0.3537$). Furthermore, the active LU group had lower leptin levels when compared to the Control-HbSS ($p=0.0079$) and healed LU groups ($p=0.0022$). Our results demonstrated an inverse relation between miR-21 and miR-130a expression with serum leptin levels, suggesting that the higher expression of these microRNAs may be related to the chronicity and healing of LUs in individuals with SCA by decreased of serum leptin levels.

Key words: Sickle cell anemia. Leg ulcers. Genetic modulators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número de recém-nascidos com anemia falciforme em cada país no ano de 2015.....	16
Figura 2 –	Fisiopatologia da anemia falciforme.....	17
Figura 3 –	Imagens de úlceras nos maléolos medial e lateral, respectivamente, em pacientes com AF acompanhados na Fundação HEMOPE em 2013.....	19
Figura 4 –	Biogênese do miRNA.....	24
Figura 5 –	Localização cromossômica do gene codificante do miR-21.....	28
Figura 6 –	Localização cromossômica do gene codificante do miR-130a.....	29
Figura 7 –	Perfil de expressão do miR-21 e do miR-130a em pacientes com AF.....	39
Figura 8 –	Perfil de expressão do miR-21 e do miR-130a em pacientes com AF e indivíduos com hemoglobina normal.....	40
Figura 9 –	Níveis séricos de leptina em pacientes com AF.....	41
Figura 10 –	Níveis séricos de leptina em pacientes com AF.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Co-SMAD	SMAD estimulatória
Ct	Ciclo de threshold
DF	Doença Falciforme
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region in gene 8</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Nucleoside triphosphate
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ET-1	Endotelina-1
FC	Fold Change
G	Guanina
Glu	Ácido Glutâmico
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
<i>HBB</i>	Gene da Hemoglobina Subunidade Beta
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HU	Hidroxiuréia
kDa	Kilodalton
LABCEN-UFPE	Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco
miRNA/miR	MicroRNA
miR-21	MicroRNA 21
miR-130a	MicroRNA 130a
mL	Mililitro(s)
mRNA	RNA mensageiro

NO	<i>Nitric oxide</i>
<i>p</i>	Significância
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pre-miRNA	microRNA precursor
pri-miRNA	microRNA primário
qPCR	PCR em tempo real (PCR quantitativa)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
Rpm	Rotações por minuto
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA Pol	RNA polimerase
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STA	Síndrome torácica aguda
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TMEM49	Proteína Transmembranar 49
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UM	Úlcera maleolar
UMA	Úlcera maleolar aberta
UMF	Úlcera maleolar fechada
UTR	<i>Untranslated region</i>
Val	Valina
ng	Nanograma
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivos Específicos	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	ANEMIA FALCIFORME.....	15
2.1.1	Etiologia e Epidemiologia	15
2.1.2	Fisiopatologia e Manifestações clínicas	16
2.2	ÚLCERAS MALEOLARES	19
2.2.1	Tratamento e Prevenção	20
2.2.2	Fatores Genéticos	21
2.3	MIRNAS	23
2.3.1	Biogênese	23
2.3.2	Regulação da expressão gênica por miRNAs	24
2.3.3	miR-21	27
2.3.4	miR-130a	28
2.4	INFLUÊNCIA DO MIR-21 E DO MIR-130A NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS VENOSAS	29
2.5	PAPEL DA LEPTINA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS..	31
3	METODOLOGIA	33
3.1	DESENHO DE ESTUDO	33
3.2	DEFINIÇÃO DE GRUPOS	33
3.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	34
3.4	COLETA DE MATERIAL	34
3.5	EXTRAÇÃO DOS MIRNAS	35
3.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DO MIR-21 E DO MIR-130A ...	35
3.7	DOSAGEM DA LEPTINA	36
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	38
4.2	ENSAIOS DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS MIR-21 E MIR-130A.....	38
4.3	ANÁLISES DA DOSAGEM DE LEPTINA.....	40

5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANO CCS - UFPE	54
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS (resolução 466/12)	55
	ANEXO C – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS	57

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia de prevalência mundial, que acomete predominantemente afro-descendentes, e decorre de uma mutação pontual no gene da globina β , que resulta na formação de uma hemoglobina anormal (HbS). Em condições especiais, como baixas concentrações de oxigênio e diminuição do pH, a HbS sofre polimerização intraeritrocitária, formando estruturas filamentosas que se depositam nas hemácias, tornando-as falcizadas.

Os eventos hemolíticos e vaso-oclusivos, provenientes do processo de falcização das hemácias, têm um papel determinante na origem das manifestações clínicas da AF. Algumas dessas manifestações comprometem consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes, como a úlcera maleolar (UM) ou úlcera de perna, que ocorre principalmente a região dos maléolos medial e lateral e a região frontal da perna de indivíduos com AF. A recorrência das UMs é frequente e o processo cicatrização é lento, podendo evoluir por meses ou anos.

A etiologia das UMs ainda não está completamente esclarecida, no entanto, há um consenso que seu surgimento está relacionado com eventos hemolíticos, vaso-oclusivos e trombóticos, além de fatores externos. Além disso, acredita-se que há uma heterogeneidade molecular que distingue os pacientes quanto a ocorrência das UMs, uma vez que o processo de reparo de lesões é regulado por uma complexa rede de células, proteínas, citocinas e outras moléculas, incluindo os microRNAs (miRNAs).

Os miRNAs são moléculas endógenas de RNAs não-codificantes, que regulam a expressão gênica através da degradação de RNA mensageiro ou inibindo a tradução. Essas moléculas estão envolvidas no controle de uma ampla variedade de mecanismos biológicos e há evidências que a expressão anormal desses reguladores gênicos está relacionada com o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo doenças cutâneas.

Estudos apontam que a superexpressão dos miRNAs miR-21 e miR-130a está associada a cronicidade de úlceras venosas em pacientes diabéticos devido à desregulação dos processos de reepitelização, formação de tecido de granulação e cicatrização. Além disso, esses miRNAs estão envolvidos na regulação da leptina, um hormônio multifuncional, que atua em diversos processos biológicos, incluindo a angiogênese, proliferação celular e migração de queratinócitos para recuperação de uma lesão cutânea.

Diante do papel do miR-21 e miR-130a no processo de reparo e cicatrização de lesões, é evidente a necessidade de compreensão da influência dessas moléculas no desenvolvimento de UMs na AF. Portanto, a análise dos níveis de expressão desses miRNAs em indivíduos com AF torna-se uma importante estratégia para descoberta de moduladores genéticos envolvidos com a cronicidade e cicatrização das UMs, contribuindo para elucidação de mecanismos fisiopatológicos até então desconhecidos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão de miR-21 e miR-130a e sua relação com a ocorrência de UMs em indivíduos com AF.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterização clínica de indivíduos com AF a partir da análise de prontuários;
- Avaliar a expressão dos miRNAs miR-21 e miR-130a em amostras de sangue periférico de pacientes com AF, selecionados de acordo com o histórico de UM, e em indivíduos com perfil de hemoglobina normal (HbAA);
- Verificar se há diferença entre os perfis de expressão desses miRNAs entre os grupos estudados;
- Verificar se há diferença entre os níveis de leptina sérica entre os grupos de pacientes selecionados e avaliar a sua relação com o desenvolvimento de UMs.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Etiologia e Epidemiologia

O termo doença falciforme (DF) se aplica a um grupo de desordens genéticas, denominadas hemoglobinopatias, caracterizadas pela presença da hemoglobina S (HbS). A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva, decorrente de uma mutação pontual no gene da β -globina (*HBB*), localizado no locus 11p15.15 (HO; THEIN, 2000; DRISS et al., 2009). A alteração molecular da AF consiste na substituição da base nitrogenada adenina por timina no sexto códon do gene *HBB*. Por conseguinte, ocorre a troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina na 6ª posição da cadeia polipeptídica (*HBB*; β^S GAG→GTG; glu6val) levando à formação de uma hemoglobina anormal, a HbS, ao invés da hemoglobina normal, a HbA (INGRAM, 1957; THEIN, 2017).

A primeira descrição de uma doença caracterizada por episódios dolorosos foi feita por James Herrick, um médico e pesquisador, que identificou células falciformes em um estudante de origem africana (HERRICK, 1910). Nos 12 anos seguintes, foram relatados mais três casos com características semelhantes, sendo todos pacientes de origem africana. Isso levou ao equívoco de que a doença estava restrita a pessoas de origem africana (MASON, 1922). De fato, a prevalência da AF é alta em regiões da África, do Oriente Médio, do Mediterrâneo e da Índia, devido à vantagem seletiva que a heterozigose para a HbS proporciona contra a malária (PIEL et al., 2010; SERJEANT; VICHINSKY, 2017). Entretanto, o comércio de escravos e os movimentos migratórios populacionais favoreceram a distribuição da mutação muito além das suas regiões de origem (Figura 1) (PIEL et al., 2014).

Estimativas sugerem que, por ano, aproximadamente 300 mil indivíduos nasçam com AF no mundo e esse número pode chegar a 400 mil nascimentos no ano de 2050 (PIEL et al., 2017). Anualmente, cerca de 3.500 indivíduos nascem com DF no Brasil e devido ao seu processo histórico de colonização, há uma distribuição heterogênea do alelo β^S no país, sendo mais prevalente em indivíduos afrodescendentes (CANÇADO; JESUS, 2007; SOARES et al., 2014).

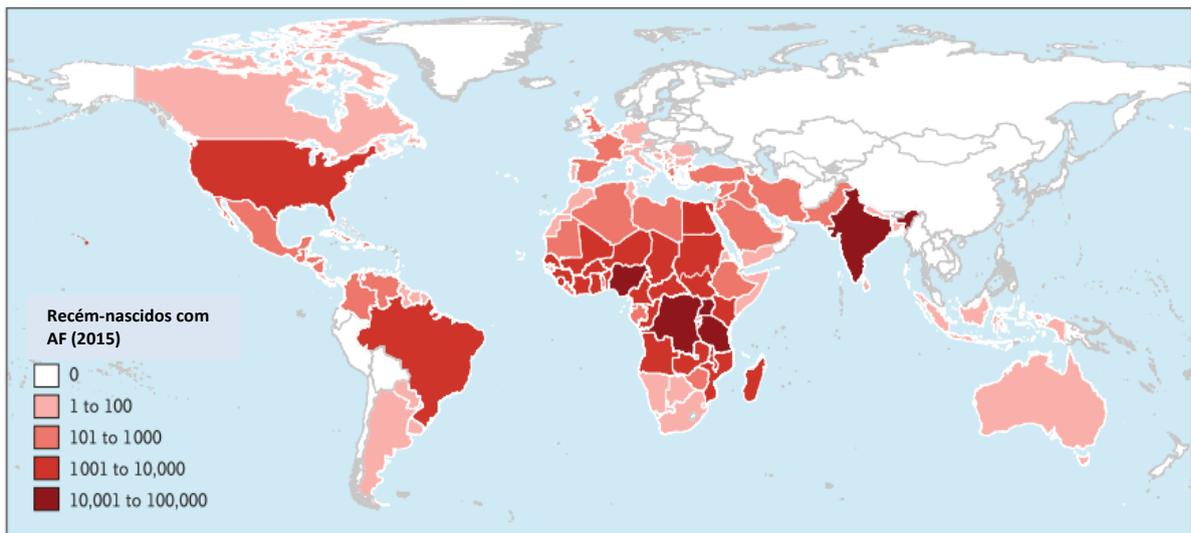


Figura 1. Número de recém-nascidos com anemia falciforme em cada país no ano de 2015. Adaptado de (PIEL et al., 2017).

No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 4.000 nasce com a DF (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2012; SOARES et al., 2014). Devido à alta prevalência da doença, o seu diagnóstico tornou-se obrigatório em todo país, desde 2001, através do Programa Nacional de Triagem Neonatal, o que proporcionou um tratamento mais precoce e, conseqüente, aumento na sobrevivência dos pacientes (FERRAZ; MURAO, 2007; JESUS, 2010).

2.1.2 Fisiopatologia e Manifestações clínicas

As manifestações clínicas nas DFs derivam primariamente da anormalidade estrutural da HbS (ZAGO; PINTO, 2007). Em condições normais, as hemácias têm a capacidade de deformabilidade que lhes permite circular através de vasos estreitos, carregando oxigênio para todos os tecidos do corpo. Entretanto, quando a HbS sofre desoxigenação, a valina hidrofóbica (presente no lugar do ácido glutâmico polar) é exposta na superfície da cadeia β^S , levando à polimerização dessa hemoglobina por meio de interações hidrofóbicas, o que resulta em uma série de alterações morfológicas e funcionais das hemácias. A deformação mais conhecida é provocada por feixes de polímeros se organizando paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada”. Essas modificações tornam as hemácias menos flexíveis e mais aderentes ao endotélio, desencadeando

fenômenos inflamatórios (STUART; NAGEL, 2004; BETAL; SETTY, 2008; SONATI; COSTA, 2008).

Estudos de cinética da polimerização da HbS demonstraram que a formação do polímero é de ordem exponencial em função da quantidade dessa hemoglobina, ressaltando o papel crucial da sua concentração no fenômeno da falcização (EATON; HOFRICHTER, 1990; STEINBERG, 1999; DE FRANCESCHI et al., 2011). Entretanto, fatores como grau de desoxigenação da célula, pH, temperatura e concentração de Hb fetal (HbF) também estão relacionados com esse fenômeno (LONERGAN et al., 2001; VEKILOV, 2007).

O acúmulo de polímeros no interior das hemácias falcizadas culmina em lesão nessas células. Em larga escala, as hemácias danificadas promovem eventos hemolíticos e vaso-oclusivos, caracterizando os fenótipos da AF. Esses eventos resultam de um cenário complexo, que envolve interações entre as hemácias falciformes e outros componentes do sistema circulatório (Figura 2).

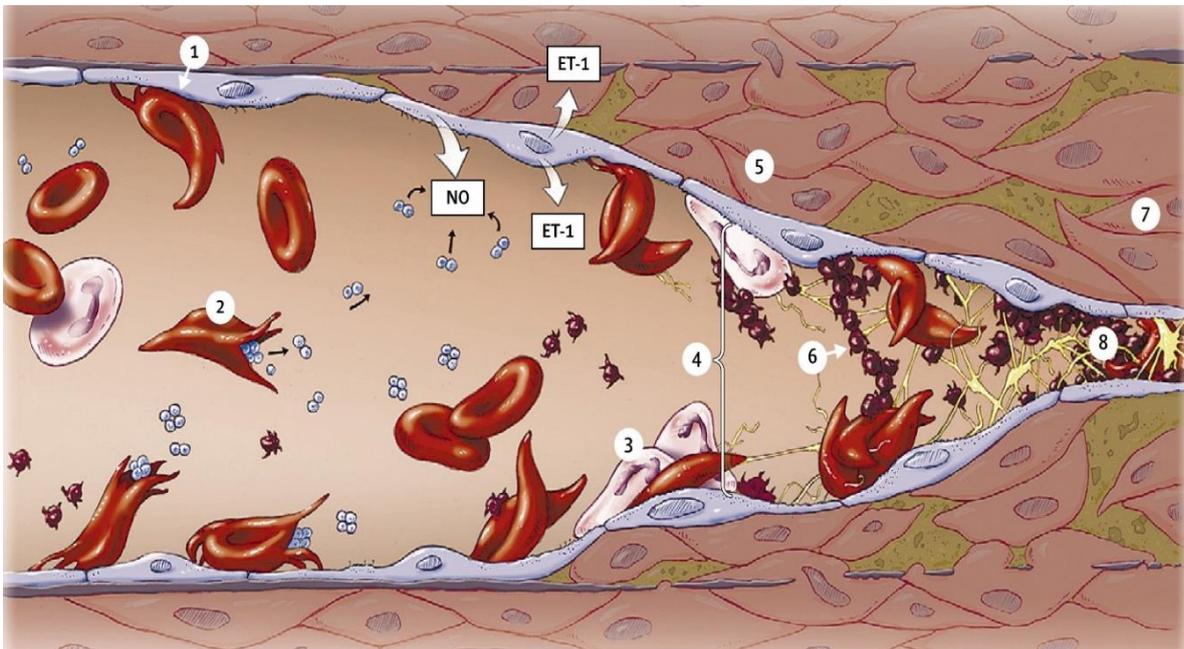


Figura 2. Fisiopatologia da anemia falciforme. Adaptado de (SWITZER et al., 2006).

A forma alterada e rígida da hemácia é mais propensa à aderência anormal ao endotélio vascular (1) e hemólise (2). Esses fatores resultam em um estado pró-inflamatório manifestado pela adesão de leucócitos (3) e pela agregação plaquetária (6). O aumento da secreção de endotelina-1 (ET-1) e a diminuição da concentração do óxido nítrico (NO), pela ação da hemoglobina livre, resultam na exacerbação da

vasoconstrição (4). O estreitamento vascular ocorre secundário à proliferação de células musculares lisas e fibroblastos dentro da camada íntima (5). O resultado final é a vasculopatia (7) e vaso-oclusão (8) (STEINBERG, 1999; SWITZER et al., 2006; PLATT, 2008; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013).

As hemácias falcizadas apresentam um tempo de circulação mais curto, devido ao elevado grau de hemólise, que pode ocorrer de forma extravascular, pelo reconhecimento das hemácias danificadas por células do sistema retículoendotelial ou dentro dos vasos, com os níveis podendo atingir até 30% da hemólise total de um indivíduo com AF (KATO et al., 2017). Assim, os indivíduos com AF apresentam altos níveis de hemoglobina plasmática circulantes que, por sua vez, sequestram o óxido nítrico (NO), diminuindo sua disponibilidade (REES; GIBSON, 2012; NGO; STEINBERG, 2014).

O NO é um gás produzido pelo endotélio vascular e possui efeito vasodilatador, sendo um potente regulador do tônus da musculatura lisa dos vasos. A depleção desse gás exacerba o fenômeno de vasoconstrição e prejudica suas funções vasculares: ocorre diminuição do relaxamento do músculo liso vascular, diminuição da inibição da ativação e agregação plaquetária, além de aumento da expressão de moléculas de adesão celular, como VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), P-selectina e E-selectina (WOOD et al., 2008; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017). Como consequência da diminuição da biodisponibilidade de NO, os pacientes com AF que possuem um quadro de hemólise intravascular significativo são mais propensos a desenvolver diversas complicações clínicas (MACK; KATO, 2006; MORRIS, 2011).

Além de produzir NO, as células endoteliais liberam endotelina-1 (ET-1), um peptídeo pró-inflamatório e vasoconstritor. A regulação do tônus vascular normal depende de um equilíbrio entre esses mediadores produzidos pelo endotélio. Além da ação vasoconstritora, a ET-1 aumenta as concentrações de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias, que estimulam a ativação de leucócitos e plaquetas e a interação desses com o endotélio (KATO et al., 2005; LANARO et al., 2009; ODIÈVRE et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

As interações entre diferentes tipos celulares, incluindo hemácias falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, leucócitos e células endoteliais anormalmente ativadas, plaquetas e proteínas plasmáticas, aumentam a probabilidade de bloqueio da microcirculação, que por sua vez causam vaso-oclusão. A vaso-oclusão

tipicamente resulta em complicações agudas, incluindo danos isquêmicos aos tecidos, levando a dores intensas e insuficiência de órgãos. Esse ambiente inflamatório é exacerbado por episódios agudos que se interligam e se retroalimentam com a hemólise, formando um ciclo inflamatório permanente, o que caracteriza a AF como uma doença inflamatória crônica (DE FRANCESCHI et al., 2011; MANWANI; FRENETTE, 2013; KATO et al., 2017).

Ao longo dos anos, a hemólise e a isquemia em pacientes com AF promovem danos em órgãos como pulmão, coração, cérebro e rim, que podem ser sintomáticos ou silenciosos. Hipertensão pulmonar, retinopatia, insuficiência renal crônica, osteonecrose, síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC), priapismo e úlceras maleolares, são exemplos de algumas das manifestações clínicas da AF (REES et al., 2010; BALLAS et al., 2010).

2.2 ÚLCERAS MALEOLARES

A úlcera maleolar (UM), também denominada úlcera de membros inferiores ou úlcera de perna, é uma manifestação cutânea bastante frequente e dolorosa em pacientes com AF (PALADINO, 2007; ALAVI; KIRSNER, 2015). Ocorre em áreas com redução do tecido subcutâneo e com menor fluxo sanguíneo, como a região dos maléolos medial e lateral (Figura 3), podendo ainda acometer, em menor frequência, a região anterior da tibia, tendão de Aquiles e o dorso do pé (SERJEANT et al., 2005; MINNITI et al., 2010).



Figura 3. Imagens de úlceras nos maléolos medial e lateral, respectivamente, em pacientes com AF acompanhados na Fundação HEMOPE em 2013. Fotos cedidas por Carolina Sanuzi.

Eventos hemolíticos, vaso-oclusivos e trombóticos estão relacionados com o surgimento das UMs. Ademais, traumas, fatores socioeconômicos, ambientais e

genéticos também podem contribuir para a ocorrência dessa manifestação (SERJEANT et al., 2005; NOLAN et al., 2006; PALADINO, 2007; MINNITI et al., 2010; MADU et al., 2013; ALAVI; KIRSNER, 2015).

Estudos mostram que a UM é mais frequente em pacientes adultos, por volta dos 21 anos de idade. A hipótese para a raridade dessa manifestação em pacientes pediátricos é de que a princípio a rede vascular tem capacidade de tolerar oclusões sem que o tecido epitelial sofra hipóxia. Com o passar dos anos, devido às sucessivas oclusões e danos recorrentes ao endotélio, o organismo passa a não mais tolerar essas injúrias, culminando nos danos teciduais (MINNITI et al., 2010; MADU et al., 2013).

Alguns pacientes apresentam história prévia de traumas com infecção bacteriana secundária, que culminam na abertura da úlcera; em outros, espontaneamente, surge uma área dolorosa em pele ainda íntegra, seguida de edema e vermelhidão, evoluindo rapidamente para uma lesão cutânea. As úlceras espontâneas surgem em áreas da derme que sofrem sucessivos quadros de hipóxia tecidual e danos ao endotélio, como os membros inferiores (PALADINO, 2007).

De acordo com sua duração, a UM pode ser classificada em aguda ou crônica. Contudo, não há um consenso que defina um período específico para a cronicidade, aceitando-se, de modo geral, aguda quando há cicatrização em menos de um mês, e crônica com duração acima de 6 meses. A recorrência dessa manifestação é frequente, e o processo cicatrização, em geral, é lento, o que compromete consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes, trazendo danos psicológicos e sociais (SERJEANT et al., 2005; MINNITI et al., 2010; UMEH et al., 2017).

2.2.1 Tratamento e Prevenção

Devido à fisiopatologia multifatorial das UMs, ainda não há um tratamento específico para essa manifestação. Entretanto, como forma de amenizar o risco de infecções deve-se manter os devidos cuidados com as feridas abertas, através de curativos e higiene adequada na área da lesão. Dependendo da extensão e do tempo de abertura da úlcera, pode haver necessidade de terapias auxiliares, tais como, enxerto de pele, uso de botas (conhecidas como botas de Unna), aplicação tópica de Burtirato de Arginina e administração oral de Sulfato de Zinco (DELANEY et al., 2013; ALTMAN et al., 2015).

Como medida preventiva recomenda-se o uso de meias de compressão com o objetivo de minimizar a estase venosa. Além disso, observações clínicas e estudos epidemiológicos documentaram o papel central do trauma no surgimento das UMs. Esse fato proporciona uma série de intervenções simples que permitem reduzir a prevalência dessa manifestação, como, por exemplo, a utilização de artefatos protetores para a região comumente afetada (MINNITI et al., 2010; ALAVI; KIRSNER, 2015; MINNITI; KATO, 2016).

A utilização de hidroxiuréia (HU) é considerada favorável ao quadro geral do paciente com AF por reduzir a incidência de eventos vaso-oclusivos e hemolíticos (GLADWIN et al., 2002; PLATT, 2008; KOVACIC, 2011). Contudo, uma vez que outros fatores também têm influência no surgimento e cicatrização das UMs, apenas a administração da HU não colabora diretamente na prevenção ou aceleração de sua cicatrização.

2.2.2 Fatores Genéticos

Inúmeras são as variações no fenótipo dos indivíduos com AF. Alguns pacientes seguem com curso clínico mais grave, com os primeiros sinais e sintomas ocorrendo logo após o nascimento, enquanto outros se tornarão sintomáticos mais tarde ou raramente apresentarão intercorrências clínicas que necessitem de hospitalização. Diante disso, acredita-se que, subjacente à mutação pontual no gene *HBB*, existam moduladores genéticos que proporcionam quadros clínicos distintos e variabilidade na ocorrência das manifestações clínicas (STEINBERG, 2009; FERTRIN; COSTA, 2010; DOMINGOS et al., 2014; THEIN, 2017).

Dentre os moduladores conhecidos, alguns têm seu efeito e influência sobre as complicações da AF bem estabelecidos. Um deles é a coexistência com alfa talassemia (α -talassemia), a qual tem sido associada com uma menor taxa hemolítica, redução da HbS e diminuição da polimerização, amenizando os eventos vaso-oclusivos e levando a um efeito protetor contra complicações clínicas, como a UM (FERTRIN; COSTA, 2010).

Em 2006, Nolan e colaboradores analisaram 215 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) em mais de 100 genes candidatos e verificaram a associação de alguns SNPs com a ocorrência de UMs em pacientes com AF. Foram genotipados 759 pacientes com AF oriundos de

centros de referência para hemoglobinopatias dos Estados Unidos. Desses, 243 pacientes apresentaram histórico de UMs e 516 pacientes não haviam desenvolvido UMs até a data de coleta. Os SNPs rs685417 e rs516306 no gene *KLOTHO* foram associados à ocorrência de UMs, sendo justificado pela atuação desse gene no metabolismo do NO, importante fator envolvido na hemólise intravascular (NOLAN et al., 2006). Posteriormente, esses SNPs foram relacionados com a diminuição da biodisponibilidade de NO, em consequência, os pacientes com AF que possuem um quadro de hemólise intravascular significativo são mais propensos a desenvolverem algumas complicações clínicas, chamadas coletivamente de síndrome da disfunção hemolítica-endotelial. Essas complicações incluem hipertensão pulmonar, priapismo e as UMs (MACK; KATO, 2006; KATO et al., 2007; MORRIS, 2011).

O estudo de Nolan e colaboradores também demonstrou que disfunções nas vias de ativação de genes envolvidos nos mecanismos de angiogênese e reparo tecidual, como a via de sinalização TGF- β / BMP e no receptor de tirosina quinase TEK, podem influenciar no surgimento das UMs em indivíduos com AF. Os membros da superfamília TGF- β atuam na proliferação celular, reepitelização, inflamação local, formação de tecido de granulação e cicatrização. Os SNPs que aumentam o risco de UMs foram descritos em vários genes, como os que codificam os receptores TGFBR2, TGFBR3 e BMPR1B, BMP6, proteínas sinalizadoras SMAD7 e SMAD9, SMURF1 e enzimas, como MAP2K1 e MAP3K7. No gene *TEK*, foram verificadas associações dos SNPs rs603085 e rs671084 com a ocorrência das UMs (NOLAN et al., 2006).

Estudos relatam que a cicatrização de úlceras venosas é um processo complexo, que envolve interações coordenadas entre a matriz de reparo tecidual, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais e leucócitos (RAMIREZ et al., 2013; MAQUART; MONBOISSE, 2014). Além desses fatores, evidências apontam que uma rede de moléculas, incluindo microRNAs (miRNAs), atuam na regulação da proliferação e diferenciação celular e síntese de matriz extracelular no local da ferida (PASTAR et al., 2012; WANG et al., 2012; BANERJEE; SEN, 2015).

Alguns miRNAs, como o miR-16, -20, -21, -106, -130a, -203, já foram relacionados com o desenvolvimento de úlceras venosas crônicas em pacientes diabéticos e com o processo de cicatrização de feridas cutâneas (PASTAR et al., 2012, MADHYASTHA et al., 2012; PASTAR et al., 2014).

2.3 MIRNAS

Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de RNAs não codificantes, de fita simples (com aproximadamente 22 nucleotídeos), que regulam a expressão dos seus genes alvo de maneira pós-transcricional (BARTEL, 2009; HAMMOND, 2015). Até o momento, 1917 miRNAs foram descritos no genoma humano de acordo com o banco de dados mirBase (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa, acesso em 08/07/2019).

Os genes codificantes dessas moléculas são evolutivamente conservados e podem estar localizados em íntrons, éxons ou em regiões intergênicas. Estima-se que mais de um terço dos genes humanos são preditos como alvos dos miRNAs e aproximadamente 40% dos *loci* que os codificam estão localizados em íntrons (FRIEDMAN et al., 2009; CORTEZ et al., 2011; DI LEVA et al., 2014). Um único miRNA é capaz de regular simultaneamente centenas de genes que podem atuar em diversas vias na célula, constituindo uma potente classe de reguladores genéticos (KIM, 2005; BHATTACHARYYA et al., 2011).

2.3.1 Biogênese

A síntese dos miRNAs tem início no núcleo da célula (Figura 4), onde eles são transcritos pela RNA polimerase II (RNA Pol II) em um longo miRNA primário (pri-miRNA), que possui de centenas a milhares de bases de comprimento e pode conter um ou mais miRNAs. Esses transcritos primários exibem uma molécula de 7-metilguanossina associada à extremidade 5' e uma cauda poli A na extremidade 3'. Subseqüentemente, os pri-miRNAs são clivados pela enzima RNase III Drosha, dando origem a um transcrito curto, conhecido como micro-RNA precursor (pre-miRNA), com cerca de 70 pares de bases, contendo um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples, formando uma estrutura denominada *hairpin loop* (estrutura em grampo). A Drosha atua como parte integrante de um complexo nuclear que inclui o seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), o qual estabiliza a associação da Drosha com o pri-miRNA e determina a localização precisa do processamento (BARTEL, 2004; KIM et al., 2009; BLAHNA; HATA 2012; HAMMOND, 2015).

O pre-miRNA é transportado para o citoplasma, através da atividade da enzima de exportação nuclear, a Exportina 5. No citoplasma, esse precursor associa-se à enzima Dicer, que cliva a estrutura em grampo e origina um miRNA fita dupla

(duplex) com 18 a 22 nucleotídeos em cada fita. O duplex é então incorporado a um complexo proteico chamado Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC – *RNA Induced Silencing Complex*), o qual é composto pela Dicer, helicases, proteína TRBP (*trans-activation response RNA-binding protein*) de ligação ao RNA dupla-fita e Argonata 2. Essa última seleciona a fita guia (miRNA maduro) que permanecerá estável no RISC, enquanto a outra, denominada fita passageira, será rapidamente degradada e removida (GREGORY; SHIEKHATTAR, 2005; KIM et al., 2009; BLAHNA; HATA, 2012; HAMMOND, 2015).

Os miRNAs maduros selecionados podem ser gerados a partir de ambas as fitas do duplex de miRNA. Acredita-se que a instabilidade termodinâmica da região 5' seja a responsável por definir qual será a fita guia. Além disso, a posição na formação do grampo e a fragilidade do pareamento de bases em relação à outra cadeia também pode influenciar na seleção da fita guia (RANA, 2007; KIM et al., 2009; KAWAMATA; TOMARI, 2010).

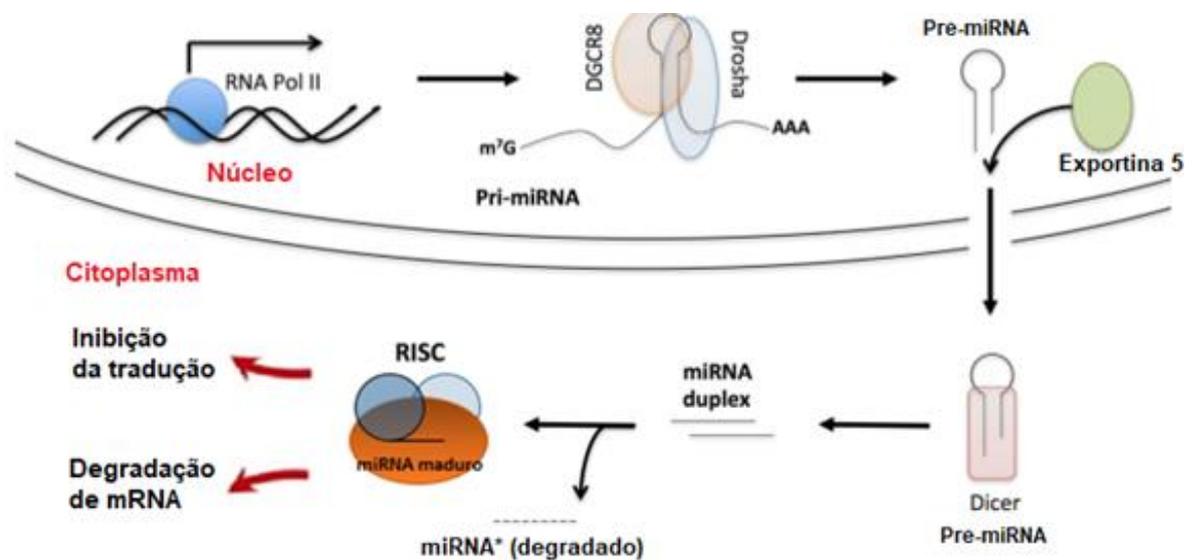


Figura 4. Biogênese do miRNA. Adaptado de (BLAHNA; HATA, 2012).

2.3.2 Regulação da expressão gênica por miRNAs

O miRNA maduro direciona o complexo RISC para as regiões não-traduzidas (UTR) 3' ou 5', *open reading frames* e regiões promotoras dos seus respectivos mRNAs alvo. Por sua vez, a regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs

incorporados ao RISC depende do grau de complementariedade da sequência localizada entre a posição 2 e 8 da região 5' do miRNA (chamada de *seed*), com o mRNA alvo e pode ocorrer através de dois mecanismos: degradação do mRNA ou repressão da tradução. Quando há complementariedade às regiões codificadoras de proteínas do mRNA, o mRNA é clivado por ribonucleases, o que resulta na degradação do mRNA alvo. A maioria dos miRNAs presentes em humanos utiliza um mecanismo de regulação gênica que não envolve a clivagem dos mRNAs alvo. Esses miRNAs ligam-se por complementariedade parcial a regiões UTRs de seus mRNAs alvo, inibindo a tradução do mRNA, sem que haja degradação (BARTEL 2009; CORTEZ et al., 2011; MOTT; MOHR, 2015).

A repressão da tradução pode ocorrer tanto no início desse processo como em etapas mais tardias. Quando no início da tradução, o RISC pode bloquear o recrutamento da subunidade ribossômica 60S ou a função 5' Cap (CHENDRIMADA et al., 2006; MATHONNET et al., 2007, KIRIAKIDOU et al., 2007; WAKIYAMA et al., 2007), ou ainda induzir a deadenilação, que afeta a circularização do RNA alvo (interação do 5' CAP com cauda poli-A). Em um processo normal de tradução, a cauda poli-A interage com a proteína PABPC1 (*poli-A binding protein C1*), ao passo que o 5' CAP interage com eIF4E/eIF4G (*eukaryotic translation initiation factor 4E/4G*). Por sua vez, a interação entre PAPBC1 e eIF4G leva à circularização do mRNA. No processo de deadenilação, alguns miRNAs atuam impedindo a interação entre a PAPBC1 e a eIF4G, o que impede que o processo de tradução se inicie (WU et al., 2006; MISHIMA et al., 2006; WAKIYAMA et al., 2007).

Os mecanismos posteriores ao início da tradução incluem: dissociação prematura dos ribossomos (PETERSEN et al., 2006), redução da velocidade de alongação (MARONEY et al., 2006) ou proteólise durante a fase de alongação (NOTTROTT et al., 2006).

Além dos mecanismos de regulação pós-transcricional, há relatos da ligação de miRNAs a proteínas (EIRING et al., 2010) e também da regulação da expressão gênica em um nível transcricional por meio da ligação direta do miRNA ao DNA (BARTEL 2004; GARZON et al., 2010, WU et al., 2010).

Devido à complementariedade parcial entre o miRNA e seu transcrito alvo, um único miRNA pode ter como alvo cerca de 200 transcritos diferentes. Em contrapartida, diferentes miRNAs também podem ligar-se de forma cooperativa para controlar um mRNA alvo, o que resulta em uma complexa rede de regulação (KIM

2005; MISKA et al., 2008; BHATTACHARYYA et al., 2011).

Vários estudos têm demonstrado que expressão desregulada de miRNAs pode estar relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças. De fato, essas moléculas estão envolvidas em uma ampla variedade de processos biológicos, como proliferação, diferenciação celular e apoptose (ERSON; PETTY, 2008; MEOLA et al., 2009; IORIO; CROCE, 2012; DI LEVA et al., 2014; MOTT; MOHR, 2015). Diante disso, os miRNAs vêm ganhando destaque na busca de novos candidatos a moduladores dos eventos clínicos das doenças falciformes.

Utilizando as técnicas de MicroArray, RT-qPCR e Northern Blot, Chen e colaboradores analisaram a expressão de diversos miRNAs em indivíduos com perfil de hemoglobina normal e em pacientes com AF e verificaram que os padrões de expressão dos miRNAs foram distintos entre os grupos. No grupo de indivíduos com perfil de hemoglobina normal os miRNAs miR-320, -181, -141 foram mais expressos, em contrapartida, os miRNAs miR-29a, -144, -451, -140 tiveram destaque no grupo de indivíduos com AF. Posteriormente, foi identificado que o miR-320 tem como alvo o CD71, que está envolvido com a maturação eritróide. A baixa expressão do miR-320 em células de pacientes com AF foi associada à regulação negativa de CD71 durante a diferenciação eritróide terminal e ao maior número de reticulócitos que esses indivíduos apresentam, em relação aos indivíduos com hemoglobina normal (CHEN et al., 2008).

O mir-144 foi relacionado com a capacidade antioxidante atenuada em hemácias HbSS, redução da tolerância ao estresse oxidativo e aumento da gravidade da anemia em pacientes com AF (SANGOKOYA et al., 2010). Um estudo realizado por Khalyfa e colaboradores analisou a expressão de miRNAs em 32 pacientes pediátricos com AF. Foi relatado que a expressão anormal de alguns miRNAs estava relacionada com a clínica desses pacientes, onde 3 miRNAs foram exclusivamente identificados no grupo com clínica “grave” e 141 miRNAs foram identificados apenas no grupo com clínica “leve” (KHALYFA et al., 2016).

Em 2018, um estudo realizado por Biassi e colaboradores verificou a expressão de 667 miRNAs em amostras de plasma de pacientes com AF classificados de acordo com o índice de gravidade da doença. Observou-se que 17 miRNAs foram diferencialmente expressos entre os grupos, e, posteriormente, 5 (miR15b, miR502, miR510, miR544, miR629) desses miRNAs foram selecionados para validação em 56 amostras de pacientes com AF. Os miRNAs miR510 e miR629 foram

significativamente diminuídos em pacientes mais graves. O miR510 foi relacionado com a regulação da Peroxirredoxina-1, uma proteína envolvida no estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo apresentado na AF sugere que o miR510 tem um papel nesse mecanismo. Já o miR629 foi relacionado com a ET-1. Como é sabido, esse peptídeo vasoconstritor está aumentado na AF e é importante na hipertensão pulmonar (BIASSI et al., 2018).

Esses estudos sugerem que os miRNAs podem atuar como moduladores epigenéticos da AF, contribuindo para o entendimento da heterogeneidade clínica observada nessa doença.

2.3.3 miR-21

O miRNA-21 (miR-21), também conhecido como hsa-mir-21, foi um dos primeiros miRNAs de mamíferos identificados e desempenha um papel crucial em diversas funções fisiológicas e patológicas. Em vários tipos de câncer, a expressão desse miRNA apresentou-se positivamente regulada, característica que o classifica como um “oncomiR” (miRNA associado ao desenvolvimento de câncer) (RIBAS; LUPOLD, 2010; FENG; TSAO, 2016). Nos últimos anos, foram descritos papéis adicionais do miR-21 em doenças cardiovasculares, hematológicas e pulmonares (KUMARSWAMY et al., 2011; BHAGAT et al., 2016).

Uma vez que o miR-21 atua no controle de diversas funções biológicas, com destaque para a regulação da proliferação e migração celular, angiogênese e remodelação da matriz extracelular, a expressão desregulada desse miRNA frequentemente é relacionada com doenças cutâneas, como psoríase, eczema atópico e úlceras venosas crônicas (SONKOLY et al., 2007; MADHYASTHA et al., 2012; WANG et al., 2012; PASTAR et al., 2012; BANERJEE; SEM, 2015).

Em humanos, o gene *MIR21* codifica o transcrito primário do miR-21 (pri-miR-21) e está localizado no cromossomo 17 (q23.2), sobrepondo-se à extremidade 3' UTR do gene *TMEM49* [codificante da Proteína Transmembranar 49, também conhecida como Proteína da Membrana do Vacúolo Humano 1 (VMP-1)] (Figura 5).

Apesar de *MIR21* e *TMEM49* estarem sobrepostos na mesma direção da transcrição, são genes regulados de forma independente e possuem suas próprias regiões promotoras. No entanto, todos os transcritos do *MIR21* contêm o último éxon do *TMEM49* (FUJITA et al., 2008; FENG; TSAO, 2016).

No núcleo, esse transcrito é clivado, gerando o precursor do miR-21 (pre-miR-21), que possui 72 pares de bases. Por fim, o pre-miR-21 é processado no citoplasma até chegar em sua forma madura (miR-21), com 22 nucleotídeos de comprimento (http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR21.html, acesso em 20/08/2019).

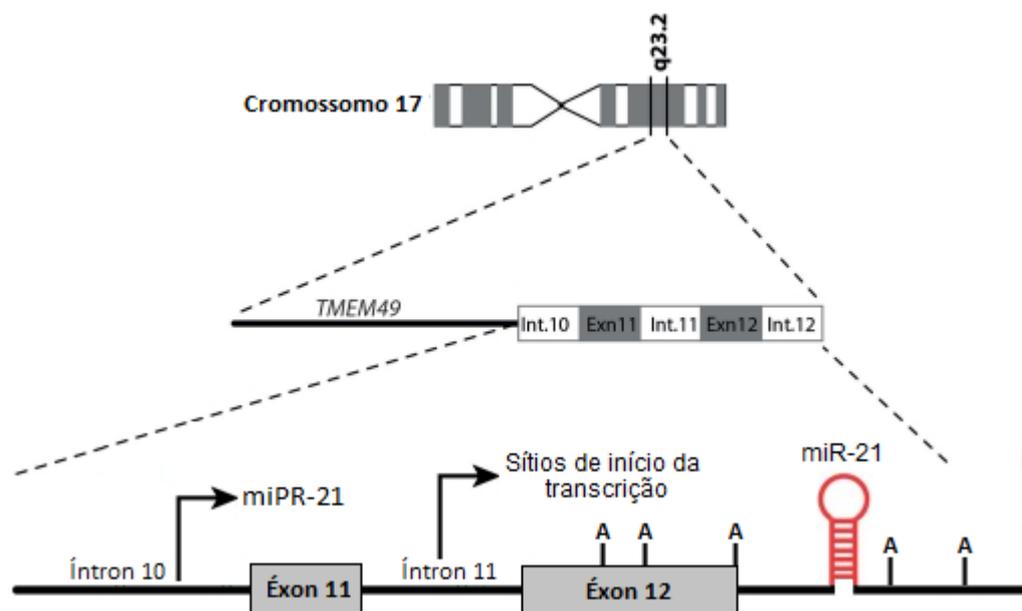


Figura 5. Localização cromossômica do gene codificante do miR-21. Em humanos, o *MIR21* está localizado no locus 17q23.1, sobrepondo-se à extremidade 3' UTR do *TMEM49* (gene codificante da Proteína Transmembranar 49). Apesar dessa sobreposição, esses genes são regulados independentemente e possuem seus próprios promotores. Os éxons 11 e 12 são os éxons terminais de *TMEM49*. A região promotora do *MIR21* está indicada como miPR-21 e seus sítios de início da transcrição estão localizados na região equivalente ao íntron 11 do gene *TMEM49*. A estrutura vermelha representa o *hairpin* (estrutura em grampo) do pre-miR-21, que está localizado imediatamente à jusante do *TMEM49*. Os sinais de poliadenilação estão indicados por A. Elaborado pela autora, 2018.

2.3.4 miR-130a

O miRNA-130a (miR-130a), também conhecido como hsa-mir-130a, faz parte da Família miR130/301, que é composta por 129 miRNAs (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?fam=MIPF0000034, acesso em 20/08/2019). Foi identificado pela primeira vez por estudos de clonagem em modelos murinos (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). Posteriormente, sua expressão foi também verificada em células-tronco embrionárias humanas (SUH et al., 2004).

Estudos demonstraram que esse miRNA desempenha um papel importante em diversos processos fisiológicos, incluindo a regulação do crescimento celular e apoptose. Devido às suas funções biológicas, o miR-130a possui vários alvos e atua em diferentes tipos de câncer, incluindo carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão,

câncer de ovário, glioblastoma, carcinoma de próstata e leucemia (ZHANG et al., 2016; CHEN et al., 2017). Ademais, em amostras de feridas cutâneas e úlceras venosas crônicas, esse miRNA apresentou expressão aumentada, destacando seu papel no processo de cicatrização de lesões (BANERJEE et al., 2010; PASTAR et al., 2012; BANERJEE; SEN, 2015).

Em humanos, o transcrito primário do miR-130a (pri-miR-130a) é codificado pelo gene *MIR130A*, que está localizado no locus 11q12.1 e assim como o *MIR21*, contém apenas um éxon em sua sequência (Figura 6) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406919>, acesso em 08/07/2019). O pri-miR-130a é clivado no núcleo para gerar o precursor miR-130a (pre-miR-130a), que possui 88 pares de bases. Por fim, o pre-miR-130a é processado no citoplasma até chegar em sua forma madura (miR-130a), com 22 nucleotídeos de comprimento (http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR130A.html, acesso em 08/07/2019).

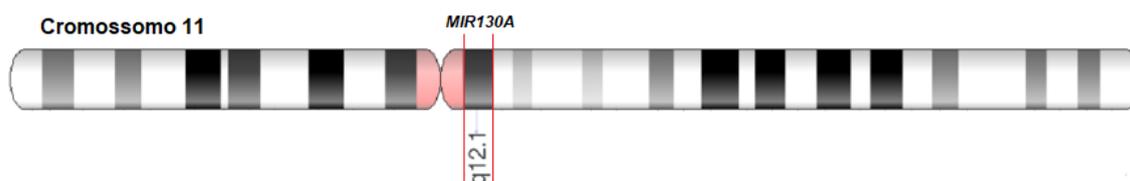


Figura 6. Localização cromossômica do gene codificante do miR-130a. (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR130A>, acesso em 08/07/2019).

2.4 INFLUÊNCIA DO MIR-21 E DO MIR-130A NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS VENOSAS

As úlceras venosas são feridas cutâneas que apresentam alta morbidade e os fatores genéticos envolvidos na sua patologia ainda são pouco estudados, impedindo o desenvolvimento de estratégias de tratamento eficazes (AGALE, 2013; PASTAR et al., 2014).

Entretanto, evidências apontam a importância dos miRNAs na homeostase do tecido cutâneo (ANDL et al., 2006; YI et al., 2009; BANERJEE et al., 2010). Um estudo realizado por Wang e colaboradores identificou 54 miRNAs, incluindo miR-21, alterados no estágio de formação do tecido de granulação durante a cicatrização de feridas. Esses miRNAs estavam intimamente relacionados aos principais eventos do reparo de lesões cutâneas, incluindo migração e proliferação celular, angiogênese e remodelamento de matriz (WANG et al., 2012).

Em uma análise realizada em amostras de úlceras venosas, em 2012, Pastar e colaboradores identificaram um conjunto miRNAs com expressão aumentada, entre eles o miR-21 e o miR-130a, em relação às amostras de pele íntegra. O estudo utilizou uma coorte de 10 pacientes diabéticos com úlceras venosas. Através das técnicas de PCR em tempo real, hibridização *in situ* e análises computacionais, foi possível observar que a superexpressão dos miRNAs 21 e 130a contribuiu para a perda da homeostase do tecido e a incapacidade de migração dos queratinócitos nas lesões cutâneas e, conseqüentemente, para a cronicidade das úlceras (PASTAR et al., 2012).

Os queratinócitos, principais componentes celulares da epiderme, são responsáveis por restaurar a epiderme após lesão, através de um processo denominado epitelização. Esse processo é essencial para a cicatrização de lesões cutâneas e é usado como parâmetro de definição de um fechamento bem-sucedido de uma ferida. Uma lesão não pode ser determinada cicatrizada, independentemente da totalidade das estruturas dérmicas subjacentes, se não possuir epitelização completa (RAMIREZ et al., 2013; PASTAR et al., 2014).

O estudo de Pastar e colaboradores identificou que a superexpressão dos miRNAs 21 e 130a suprimiam o processo de epitelização e formação do tecido de granulação, retardando o processo de cicatrização, e, conseqüentemente, contribuindo para que as lesões agudas se tornassem crônicas. A expressão aumentada do miR-21 foi detectada não apenas na epiderme das úlceras venosas, mas também na derme e nos vasos sanguíneos, onde o miR-130a também se apresentou induzido. A superexpressão desses miRNAs também foi relacionada com a diminuição dos níveis de transcritos do receptor de leptina (PASTAR et al., 2012).

2.5 PAPEL DA LEPTINA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

A leptina é um produto proteico do gene *ob*, constituído por 146 aminoácidos, que circula como um monômero de 16 kDa. É um hormônio que possui várias propriedades fisiológicas, tais como homeostase do peso corporal, metabolismo lipídico, formação óssea e angiogênese (TADOKORO et al., 2015). Há evidências de que a leptina desempenha um papel importante na hematopoiese, uma vez que contribui para a produção de eritropoietina pelo rim (MIKHAIL et al., 1997), e potencializa a ativação plaquetária (GIANDOMENICO et al., 2005). Também foi demonstrado que esse hormônio atua na fisiopatologia da AF. Verificou-se que

durante períodos instáveis da doença (estado não estacionário), como crises de dor, os pacientes apresentavam redução significativa dos níveis plasmáticos de leptina, quando comparados àqueles em estado estacionário e aos indivíduos sem AF. No entanto, ainda não está bem compreendido como a leptina atua na modulação clínica da doença (IWALOKUN et al., 2011).

Os receptores de leptina são expressos principalmente no hipotálamo, nas células endoteliais, células mononucleares do sangue periférico e nos queratinócitos (TARTAGLIA et al., 1995). Na pele normal, a leptina e seu receptor (Ob-R) foram amplamente observados na camada basal celular, nos fibroblastos, células glandulares sebáceas, células glandulares sudoríparas e células endoteliais vasculares, sugerindo que esse hormônio participa da fisiologia normal dos tecidos cutâneos maduros (STALLMEYER et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que a leptina é um potente fator angiogênico e atua no reparo e regeneração de lesões cutâneas, tornando-se um alvo importante na elucidação dos distúrbios no processo de cicatrização de feridas cutâneas, queimaduras e úlceras (BOULOUMIÉ et al., 1998; LIAPAKIS et al., 2008; TOKUYAMA-TODA; SATOMURA, 2016).

O efeito angiogênico da leptina foi investigado através de um estudo no qual esse hormônio foi administrado por via exógena e foi avaliado o processo de cicatrização em queimaduras cutâneas provocadas em ratos. A análise qualitativa de angiogênese, nas amostras obtidas a partir de biópsias, foi realizada utilizando-se a coloração de hematoxilina e eosina. Cada fragmento de tecido, de cada grupo experimental, foi submetido à avaliação imuno-histoquímica da densidade dos microvasos pela coloração da célula endotelial utilizando anticorpo monoclonal. Verificou-se que a administração exógena de leptina aumentou a angiogênese tecidual em queimaduras no modelo experimental (LIAPAKIS et al., 2008).

Frank e colaboradores verificaram que a administração sistêmica e tópica da leptina melhorou significativamente o processo de epitelização de feridas cutâneas em ratos com deficiência desse hormônio. Além disso, a leptina topicamente aplicada acelerou as condições normais de cicatrização de feridas em ratos sem deficiência de leptina. Análises de imuno-histoquímica mostraram que os queratinócitos em proliferação localizados nas margens da ferida expressaram especificamente o subtipo de receptor de leptina Ob-R durante o reparo. Ademais, foi verificado que a leptina mediava um estímulo mitogênico para queratinócitos humanos *in vitro* (FRANK

et al., 2000).

Estudos mais recentes demonstraram, de maneira semelhante ao estudo de Frank e colaboradores, o efeito estimulante da leptina na proliferação, diferenciação e migração de queratinócitos humanos *in vitro* e na aceleração da cicatrização de úlceras venosas em ratos. No entanto, nesses estudos, a leptina foi administrada apenas por via tópica, e no estudo de Tokuyama-Toda e Satomura esse hormônio foi administrado em dose única, com o objetivo de evitar possíveis efeitos adversos, como distúrbios metabólicos, devido à atuação sistêmica e multifuncional da leptina (TADOKORO et al., 2015; TOKUYAMA-TODA; SATOMURA, 2016).

Os efeitos do miR-21 e do miR-130a na regulação da expressão da leptina foram examinados através da avaliação dos níveis de mRNA desse hormônio proteico nos queratinócitos humanos primários transfectados com os precursores desses miRNAs. A análise de qPCR mostrou níveis significativamente reduzidos do mRNA do receptor de leptina em células que expressavam miR-21 e miR-130a em comparação com o controle, indicando uma regulação negativa desses miRNAs na via da leptina (PASTAR et al., 2012).

Contudo, até o presente momento, não há na literatura um estudo que tenha analisado o perfil de expressão desses miRNAs em pacientes com AF e sua relação com os níveis de leptina sérica e o desenvolvimento de UMs. Diante disso, torna-se evidente a importância de analisar a influência dessas moléculas nesses indivíduos, na busca de novas perspectivas sobre os mecanismos moleculares que podem contribuir para o retardo da cicatrização e, conseqüentemente, com a cronicidade das UMs na AF.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo analítico observacional do tipo caso-controle, que foi realizado no período de março de 2017 a julho de 2019. O projeto foi desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN-UFPE) e no Laboratório de Doenças Transmissíveis do Departamento de Parasitologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz-PE, que ofereceram toda a infraestrutura requerida para a pesquisa. A Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) – Recife foi incluída no projeto como instituição co-participante, onde foram coletadas as amostras e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

3.2 DEFINIÇÃO DE GRUPOS

Após a análise de prontuários médicos, dos quais foram obtidas informações sobre os respectivos cursos clínicos, foram selecionados 60 pacientes, que obrigatoriamente correspondiam aos critérios de inclusão do estudo, sendo eles (1) ter acima de 18 anos, (2) não ter realizado regime profilático de hipertransfusão sanguínea e/ou hidroxiuréia por pelo menos três meses até o momento da coleta e (3) apresentar acompanhamento regular pelo ambulatório do HEMOPE.

Não foram incluídos no estudo pacientes que apresentaram algumas das principais manifestações clínicas que possam ter etiologia decorrente da doença de base (a saber: osteonecrose, AVC, priapismo e STA), como proposto por Ballas e colaboradores (BALLAS et al., 2010).

Os pacientes com histórico de UM foram considerados casos, e aqueles que, até a data da coleta não apresentaram essa manifestação, foram considerados controle (n=20). Para melhor compreensão da análise, esse grupo foi denominado de “Controle-HbSS” e o grupo caso foi dividido em dois subgrupos como se segue:

- a) Grupo Úlcera Maleolar Aberta (UMA): 19 pacientes com AF com UM ativa no momento da coleta,
- b) Grupo Úlcera Maleolar Fechada (UMF): 21 pacientes com AF com UM cicatrizada no momento da coleta.

Além dos pacientes com AF, também foi analisado um grupo de 10 doadores com perfil de hemoglobina normal, identificado como “Controle-HbAA”. Esse grupo foi composto por indivíduos adultos, que não apresentavam doenças dermatológicas (úlceras ou feridas cutâneas, psoríase e eczema atópico) no momento da coleta. A avaliação do perfil de hemoglobina foi realizada por eletroforese alcalina (pH 8,6) em suporte sólido.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CCS/UFPE) (Nº do parecer: 2.469.384) (Anexo A). Após a aprovação, o projeto foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 196/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os indivíduos envolvidos foram orientados sobre a proposta da pesquisa e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B), concedendo autorização para a coleta da amostra de sangue periférico para a realização de procedimentos descritos adiante.

3.4 COLETA DE MATERIAL

De todos os indivíduos que se dispuseram a participar da pesquisa, após assinatura do TCLE, foram realizadas coletas de amostras de sangue periférico para realização das análises moleculares. A cada convocação feita por telefone ou durante as consultas ambulatoriais de rotina, 4,0 mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para realização dos experimentos de expressão gênica. Para as dosagens de leptina sérica, foram coletados 4,0 mL de sangue periférico em tubos com ativador de coágulo e gel separador para obtenção do soro. Os pacientes foram orientados a realizar 12 horas de jejum e não praticar qualquer tipo de exercício físico no dia antecedente à coleta. As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do LABCEN-UFPE, onde foram processadas para que as análises moleculares pudessem ser realizadas.

3.5 EXTRAÇÃO DOS MIRNAS

A extração dos miRNAs foi realizada a partir de alíquotas de 500 µL de sangue total dos pacientes, através do kit *mirVana™ PARIS Kit* (Invitrogen™), seguindo o protocolo do fabricante. Inicialmente, o RNA total da amostra foi isolado através de extração orgânica, utilizando-se uma solução desnaturante e ácido fenol-clorofórmio. Em seguida, ocorreu o enriquecimento da amostra com miRNAs através da imobilização dos RNA maiores em filtros e de duas filtrações consecutivas com quantidades diferentes de etanol 100%. Por fim, algumas etapas de lavagens foram necessárias para remoção de impurezas e resquícios de reagentes. Ao final das lavagens, os miRNAs foram ressuspensos em uma solução de eluição e armazenado à -80°C para posterior uso.

Posteriormente, as amostras extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, DE) e a integridade foi avaliada no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, EUA), disponibilizado no Laboratório de Hematologia da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DO MIR-21 E DO MIR-130A

A quantificação da expressão dos miRNAs de interesse foi realizada através de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR). Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Código de catálogo: 4366597; Applied Biosystems™, CA, EUA). Cada reação continha 15 µL de volume final, sendo 7 µL do MIX [0,15 µL de dNTPs 100 mM, 1 µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50 U/µL), 1,5 µL de 10X Reverse Transcription Buffer, 0,19 µL de *RNase Inhibitor* (20 U/µL) e 4,16 µL de água livre de nuclease], 3 µL de oligonucleotídeo e 5 µL da amostra de miRNA (2 ng/µL). As condições da reação compreenderam as etapas de 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C e 4°C até refriar a amostra.

Após a síntese do cDNA, as reações de PCR em tempo real quantitativas (qPCR) foram realizadas em triplicata em placas ópticas MicroAmp de 96 poços, no equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems™, CA, EUA), utilizando o *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems™, CA, EUA), seguindo

estritamente as instruções do fabricante. Cada reação tinha 20 µL de volume final, contendo, 2X Master Mix Universal TaqMan, amostra de cDNA, sondas específicas (miR-21 – ID do ensaio: 002438 e miR-130a – ID do ensaio: 000454; Applied Biosystems™, EUA) e água livre de nuclease. A ciclagem para os ensaios foi inicialmente 95°C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

O RNU6B (ID do ensaio: 001093; Applied Biosystems™, EUA) foi utilizado como referência para normalização dos resultados. A seleção desse pequeno RNA baseou-se em dados da literatura, nos quais foram relatados que em estudos com AF esse normalizador apresentou uma boa estabilidade (Sangokoya et al 2010; Pule et al 2016; Khalyfa et al 2016). O método comparativo dos *Ct*'s foi usado para determinar a expressão relativa dos miRNAs de interesse (miR-21 e miR-130a). Esse método se baseia na comparação dos valores de *Ct* (Ciclo de Threshold) entre dois grupos de amostras, no momento em que a PCR atinge a fase exponencial de amplificação (Schmittgen and Livak 2008). Os valores foram calculados para replicata com base na normalização dos genes de interesse subtraído do gene normalizador ($\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA alvo}} - Ct_{\text{RNU6B}}$). Posteriormente, foi obtida a diferença desse valor pelo *Ct* da amostra referência ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{referência}}$). A amostra referência é um cDNA composto por um pool de amostras de indivíduos com perfil de hemoglobina normal. É importante salientar essa amostra de referência foi usada como um controle interno e seus resultados foram comparados em todos os experimentos. Por fim, foi aplicada a seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.7 DOSAGEM DA LEPTINA

Para obtenção do soro, o sangue coletado dos pacientes com AF foi centrifugado a 1600 rpm por 10 minutos a 4°C e congelado a -80°C até o momento da dosagem. A dosagem da leptina foi realizada através do método imunoenzimático, utilizando o *Human Leptin* ELISA Kit (Catálogo: EZHL-80SK; Millipore®, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina – LICRI da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation) e GraphPad Prism (versão 5.0). O Teste de Kolmogorov–Smirnov e o Teste de Shapiro-Wilk foram utilizados para avaliar se a amostra em questão apresentava distribuição normal. Uma vez que não apresentaram distribuição normal, as análises foram realizadas através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, que são testes não paramétricos aplicados para comparar variáveis contínuas. O Teste de Mann-Whitney foi utilizado na comparação entre dois grupos de pacientes e o Kruskal-Wallis foi aplicado quando houve comparação entre mais de dois grupos. Para todos os testes o nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Dos 60 pacientes incluídos no estudo, 40 pacientes foram considerados casos (Grupo UMA e grupo UMF) e 20 foram considerados controles. A mediana de idade do grupo controle foi de 26 anos de idade (variação: 19 a 61 anos), sendo 10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino. O grupo UMA foi composto por 19 pacientes, sendo 13 do sexo masculino (68%) e 6 do sexo feminino (32%), com mediana de idade de 35 anos (variação: 24 a 56 anos). Já o grupo UMF foi composto por 21 pacientes, sendo 9 do sexo masculino (43%) e 12 do sexo feminino (57%), com mediana de idade de 34 anos (variação: 22 a 52 anos).

Alguns indivíduos do grupo caso apresentaram histórico de UM recorrente, abrindo e cicatrizando ao longo dos anos, sendo 20 anos (variação: 10 a 38 anos) a mediana de idade do surgimento da primeira UM nesses pacientes. Os indivíduos do grupo “UMA” apresentavam úlceras crônicas, ativas por no mínimo 1 ano antes da data de coleta da amostra sanguínea, chegando a 15 anos o tempo de evolução mais longo da UM. Em relação ao tempo de cicatrização das UMs dos pacientes analisados no grupo “UMF”, foi relatado que o fechamento mais recente havia ocorrido 1 mês antes do momento da coleta (variação: 0,08 a 20 anos).

O grupo de doadores com perfil de hemoglobina normal, foi composto por 5 indivíduos do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com mediana de idade de 25 anos (variação: 20 a 30 anos).

4.2 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS MIR-21 E MIR-130A

Inicialmente, foi realizada uma análise quantitativa da expressão relativa de miR-21 e miR-130a dos grupos de pacientes com UMA, com UMF e o grupo Controle-HbSS. Houve diferença significativa dos perfis de expressão desses miRNAs entre os três grupos analisados (miR-21: $p < 0.0001$, Figura 7A; miR-130a: $p = 0.0003$, Figura 7B). O miR-21 mostrou-se 4,12 vezes mais expresso no grupo de pacientes com UMA em comparação ao grupo Controle-HbSS ($p < 0.0001$, Fold Change [FC]=4,12) e 3,48 vezes mais expresso nos pacientes com UMA em relação aos pacientes com UMF ($p < 0.0001$, FC=3,48) (Figura 7A). O miR-130a apresentou-se 3,92 vezes mais expresso nos pacientes com UMA quando comparados aos pacientes do grupo

Controle-HbSS ($p=0.0006$, FC=3,92) e 4,53 vezes quando comparados àqueles com UMF ($p=0.0004$, FC=4,53) (Figura 7B).

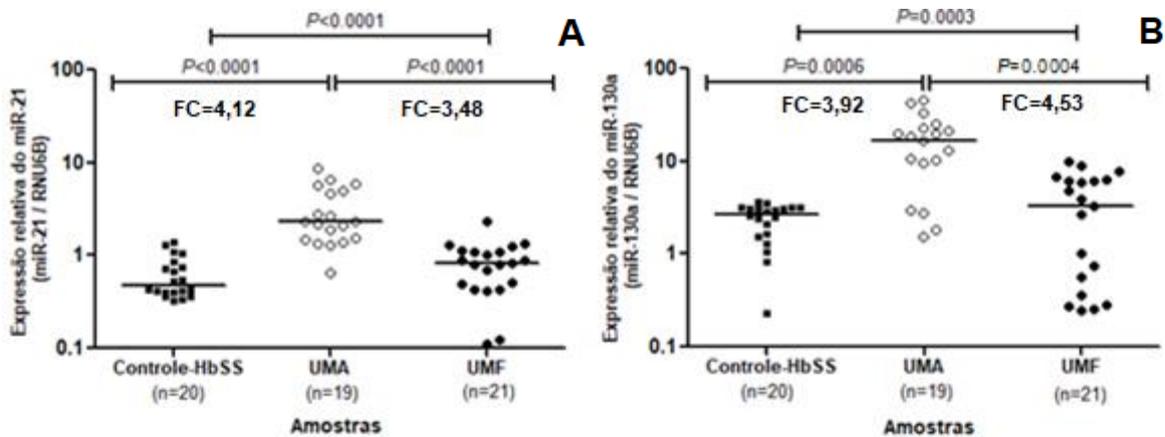


Figura 7. Perfil de expressão do miR-21 e do miR-130a em pacientes com AF. A) Perfil de expressão relativa de miR-21/RNU6B dos grupos UMA, UMF e Controle-HbSS; B) Perfil de expressão relativa de miR-130a/RNU6B dos grupos UMA, UMF e Controle-HbSS. As barras horizontais representam o valor mediano da expressão de miR-21 e miR-130a relativa ao RNU6B. Foram considerados significativos os valores de $p<0.05$. *Controle-HbSS: pacientes com AF sem histórico de UM; UMA: pacientes com AF e UM aberta; UMF: pacientes com AF e UM fechada; FC: Fold Change.

Posteriormente, foram comparados os valores da expressão relativa de miR-21/RNU6B e de miR-130a/RNU6B das amostras do grupo Controle-HbAA, composto por indivíduos com perfil de hemoglobina normal, frente às amostras de pacientes do grupo Controle-HbSS e de pacientes do grupo UMF. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos analisados (miR-21: $p=0.1829$, Figura 8A; miR-130a: $p=0.3537$, Figura 8B). No entanto, foi observada uma maior expressão de miR-21 e miR-130a no grupo de pacientes com UMA em relação ao grupo Controle-HbAA (miR-21: $p=0<0.0001$, FC=2,95, Figura 8C; miR-130a: $p=0.0009$, FC=9,50, Figura 8D).

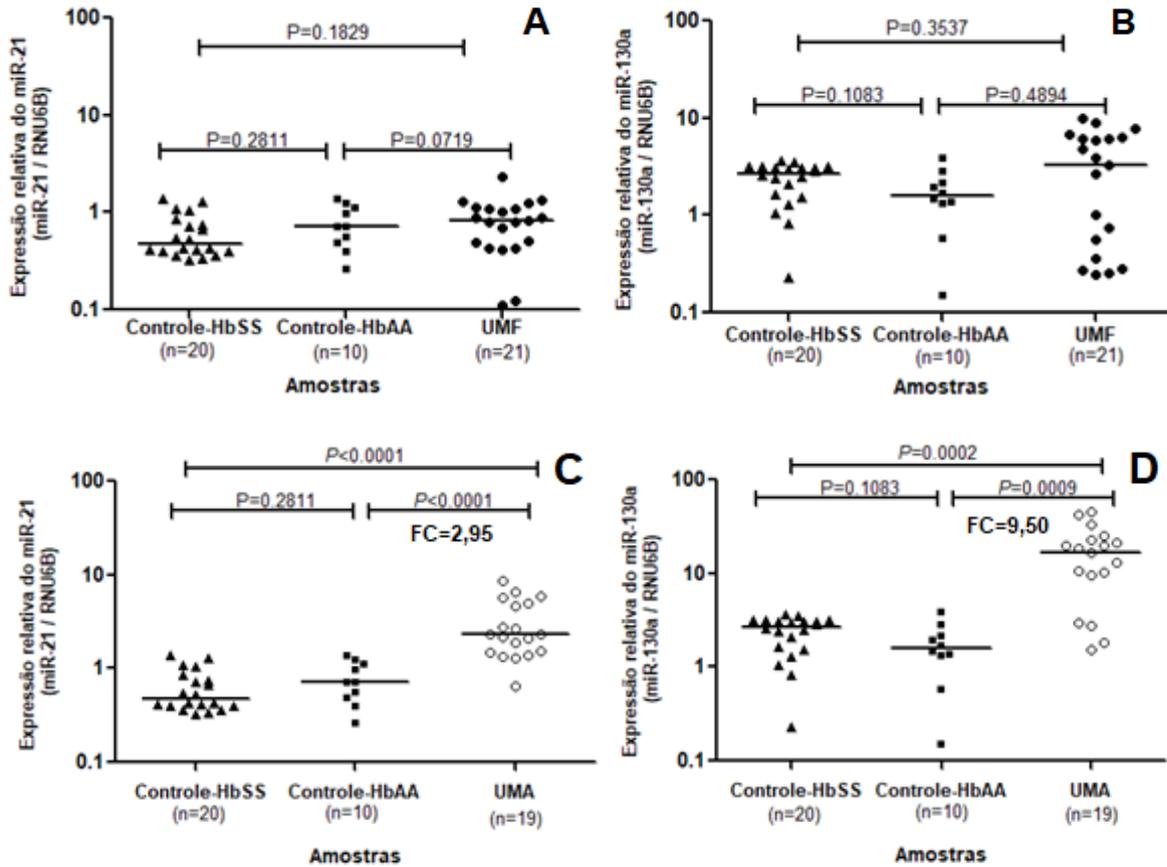


Figura 8. Perfil de expressão do miR-21 e do miR-130a em pacientes com AF e indivíduos com hemoglobina normal. A) Perfil de expressão relativa de miR-21/RNU6B dos grupos Controle-HbSS, Controle-HbAA e UMF; B) Perfil de expressão relativa de miR-130a/RNU6B dos grupos Controle-HbSS, Controle-HbAA e UMF; C) Perfil de expressão relativa de miR-21/RNU6B dos grupos Controle-HbSS, Controle-HbAA e UMA; D) Perfil de expressão relativa de miR-130a/RNU6B dos grupos Controle-HbSS, Controle-HbAA e UMA. As barras horizontais representam o valor mediano da expressão de miR-21 e miR-130a relativa ao RNU6B. Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$. *Controle-HbAA: indivíduos com perfil de hemoglobina normal; Controle-HbSS: pacientes com AF sem histórico de UM; UMA: pacientes com AF e UM aberta; UMF: pacientes com AF e UM fechada; FC: Fold Change.

4.3 ANÁLISES DA DOSAGEM DE LEPTINA

Todas as análises relacionadas aos níveis de leptina foram realizadas levando em consideração apenas os pacientes AF, classificados de acordo com o histórico de UM. Foram analisados 54 pacientes, sendo 19 com UMA, 15 com UMF e 20 sem histórico de UM até a data da coleta. Inicialmente, foram comparados os valores dos níveis de leptina do grupo UMA, frente aos grupos Controle-HbSS e UMF. Os resultados mostraram uma diferença significativa entre os três grupos analisados ($p=0.0058$; Figura 9A). Os níveis mostraram-se significativamente maiores no grupo de pacientes com UMA, quando comparado ao grupo com UMF e ao grupo Controle-HbSS ($p=0.0022$ e $p=0.0179$, respectivamente; Figura 9A). Em contrapartida, não

houve diferença significativa nos níveis de leptina quando comparados os grupos Controle-HbSS e o UMF ($p=0.5929$; Figura 9B).

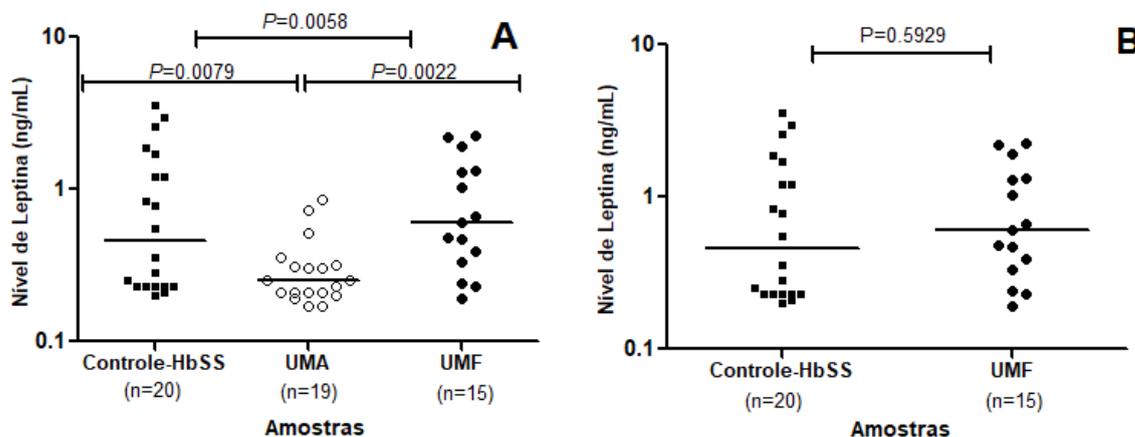


Figura 9. Níveis séricos de leptina em pacientes com AF. A) Níveis séricos de leptina dos grupos de pacientes Controle-HbSS, UMA e UMF; B) Níveis séricos de leptina dos grupos de pacientes Controle-HbSS e UMF. As barras horizontais representam o valor mediano dos níveis séricos de leptina de cada grupo. Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$. *Controle-HbSS: pacientes com AF sem histórico de UM; UMA: pacientes com AF e UM aberta; UMF: pacientes com AF e UM fechada; FC: Fold Change.

Uma análise posterior foi realizada levando em consideração apenas pacientes do sexo feminino. Foram comparados os grupos de pacientes UMA (n=6), Controle-HbSS (n=10) e UMF (n=8). Houve diferença significativa entre os três grupos analisados ($p=0.0102$; Figura 10A). Foi observado que os níveis séricos de leptina foram significativamente maiores no grupo de pacientes do UMA, quando comparado aos demais grupos ($p=0.0127$ e $p=0.0056$, respectivamente; Figura 10A). Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos Controle-HbSS e o grupo UMF ($p=0.6891$; Figura 10B).

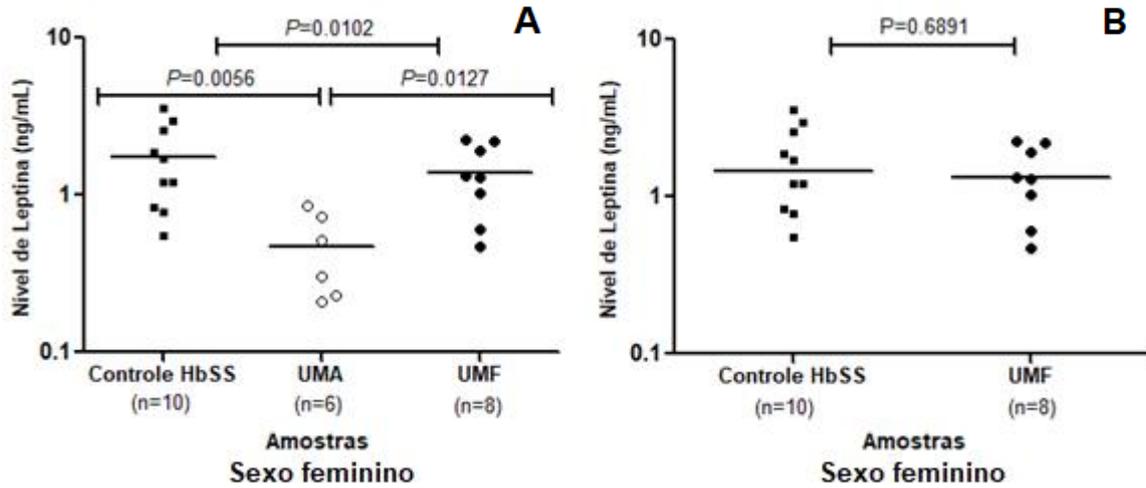


Figura 10. Níveis séricos de leptina em pacientes com AF do sexo feminino. A) Níveis séricos de leptina dos grupos de pacientes Controle-HbSS, UMA e UMF; B) Níveis séricos de leptina dos grupos de pacientes Controle-HbSS e UMF. As barras horizontais representam o valor mediano dos níveis de leptina de cada grupo. Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$. *Controle-HbSS: pacientes com AF sem histórico de UM; UMA: pacientes com AF e UM aberta; UMF: pacientes com AF e UM fechada. ** Para essa análise foram incluídos apenas os pacientes do sexo feminino.

5 DISCUSSÃO

A princípio, os estudos voltados para compreensão da variedade fenotípica observada nos pacientes com AF eram direcionados apenas para a análise da expressão gênica, a nível transcricional. Contudo, na busca de novos candidatos a moduladores dos eventos clínicos da doença, pesquisas mais recentes estão focadas em mecanismos de regulação pós-transcricional, com destaque para os miRNAs (CHEN et al., 2008; SANGOKOYA et al., 2010; KHALYFA et al., 2016; BIASSI et al., 2018).

Diante disso, o presente estudo foi o primeiro a avaliar a influência de miRNAs no desenvolvimento das UMs em pacientes com AF. Nossos resultados demonstraram que pacientes com UMA apresentaram maior expressão dos miRNAs miR-21 e miR-130a em relação àqueles com UMF e aos pacientes que não haviam desenvolvido UM até a data da coleta. De fato, evidências apontam que o miR-21 e o miR-130a atuam como moduladores genéticos no processo de epitelização e reparo tecidual e que estão relacionados com o desenvolvimento de feridas cutâneas, incluindo úlceras venosas (GOREN et al., 2003; PASTAR et al., 2012; WANG et al., 2012; BANERJEE; SEM, 2015).

Pastar e colaboradores verificaram que em amostras de lesões ulcerativas crônicas de pacientes diabéticos, obtidas por biópsia, esses miRNAs apresentavam uma maior expressão, quando comparadas àquelas de pele íntegra. Em nosso estudo, para avaliar a influência de miRNAs em feridas cutâneas e úlceras venosas, essas moléculas foram obtidas a partir de amostras do sangue periférico. Além disso, nossa amostra populacional foi constituída por pacientes com AF, em contrapartida, Pastar e colaboradores analisaram pacientes diabéticos (PASTAR et al., 2012). Apesar da diferença de metodologia, em nosso trabalho também foi possível identificar a associação da expressão aumentada dos miRNAs miR-21 e miR-130a com o desenvolvimento de úlceras maleolares.

No presente estudo, também analisamos um grupo de indivíduos que não apresentavam AF frente à pacientes com AF, com o intuito de verificar se a expressão aumentada dos miRNAs-alvo estava de fato relacionada apenas com a presença de UMs ou estaria sendo influenciada pela AF. Nossos resultados demonstraram que não houve nenhuma diferença significativa nos perfis de expressão do miR-21 e do miR-

130a entre os pacientes com AF sem histórico de UM e os indivíduos com perfil de hemoglobina normal (indivíduos sem AF). Também não houve diferença significativa entre os níveis de expressão desses miRNAs quando comparamos os grupos com UMF e os indivíduos que não apresentavam AF. Em contrapartida, os pacientes com UMA apresentaram maior expressão dos miRNAs analisados quando comparados aos indivíduos sem AF.

Esses achados corroboram com a hipótese que o miR-21 e o miR-130a contribuem para o desenvolvimento de úlceras venosas, independentemente da doença de base dos pacientes, sendo notável que a expressão elevada dessas moléculas está associada com o retardo do processo de reparo e cicatrização tecidual em lesões ulcerativas, e consequente cronicidade das UMs.

Na busca de possíveis alvos dos miRNAs 21 e 130a, para melhor compreensão de como essas moléculas influenciam na ocorrência das úlceras, Pastar e colaboradores verificaram que a expressão aumentada desses miRNAs estava relacionada com a regulação negativa dos receptores de leptina na epiderme das úlceras venosas crônicas analisadas em pacientes diabéticos. Em contraste, houve aumento dos receptores em toda a epiderme em amostras de pele íntegra (PASTAR et al., 2012).

Diversos estudos, a partir de análises *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que a leptina estimula a angiogênese, a proliferação celular, diferenciação e migração de queratinócitos para a área de uma lesão, o que faz desse hormônio um importante alvo na elucidação dos distúrbios no processo de cicatrização de feridas cutâneas (BOULOUMIÉ et al., 1998; STALLMEYER et al., 2001; LIAPAKIS et al., 2008; TADOKORO et al., 2015; TOKUYAMA-TODA; SATOMURA, 2016).

Em 2011, Iwalokun e colaboradores verificaram a relação da leptina com a fisiopatologia da AF, demonstrando que durante períodos instáveis da doença, os pacientes apresentavam redução significativa dos níveis plasmáticos de leptina, quando comparados àqueles em estado estacionário e aos indivíduos sem AF (IWALOKUN et al., 2011). Contudo, até o presente momento, não há na literatura estudos que buscaram avaliar a associação da leptina com a presença de UMs em pacientes com AF.

No presente estudo, foram analisados os níveis de leptina séricos em pacientes com AF, estratificados de acordo com o histórico de UM. Em trabalhos prévios, foi relatado que a leptina é um hormônio cujos níveis podem variar de acordo

com a dieta e a prática de exercícios do indivíduo (AGGEL-LEIJSEN, 1998; HULVER; HOUWARD, 2003; RIBEIRO et al., 2007).

Dessa forma, os pacientes foram orientados a realizar 12 horas de jejum e não praticar qualquer tipo de exercício físico no dia antecedente à coleta, para evitar a possível interferência dos fatores mencionados nos nossos resultados. Verificamos que houve diferença significativa entre os níveis de leptina do grupo pacientes com UMA quando comparados àqueles com UMF e com o grupo Controle-HbSS, constituído por pacientes que não desenvolveram essa manifestação. Foi observado que os pacientes com UMA apresentaram menores níveis de leptina em relação aos demais grupos e que não houve diferença entre os níveis desse hormônio entre o grupo com UMF e o grupo Controle-HbSS. Esse fato pode ser justificado pelo fato de a leptina ser um potente fator angiogênico e atuar no processo de reepitelização e cicatrização de lesões. Nos indivíduos com UMA há deficiência desses processos e dessa forma os níveis de leptina são menores em relação aos demais pacientes.

Também foi relatado que a dosagem da leptina possivelmente sofre influência dos hormônios sexuais, de forma que a sua concentração pode ser de duas a três vezes maior em mulheres que em homens, quando se considera o mesmo índice de massa corporal (AHIMA; FLIER, 2000).

Diante disso, realizamos uma segunda análise, levando em consideração apenas pacientes do sexo feminino, a fim de avaliar a associação entre os níveis de leptina com a cicatrização e cronicidade das UMs. Comparamos o grupo de pacientes com AF, classificados de acordo com o histórico de UM. Houve diferença estatística nos níveis de leptina sérica entre os grupos de pacientes com UMA, UMF e o grupo Controle-HbSS, sendo possível verificar que o grupo com UMA apresentou menores níveis de leptina sérica em relação aos demais grupos, ressaltando o papel estimulante desse hormônio no processo de reparo e cicatrização de feridas cutâneas. A leptina pode ser considerada um possível alvo dos miRNAs miR-21 e miR-130a (PASTAR et al., 2012; PASTAR et al., 2014). De fato, nós verificamos que pacientes com AF e UMA apresentam maior expressão desses miRNAs e níveis de leptina diminuídos em relação aos pacientes com UMF e com aqueles que não apresentaram essa manifestação.

Assim, o presente estudo demonstrou que a expressão aumentada dos miRNAs miR-21 e miR-130a influenciam no desenvolvimento das UMs em pacientes com AF, contribuindo para a cronicidade dessas lesões, devido ao retardo dos

processos reparo tecidual e cicatrização.

Por ser um possível alvo desses miRNAs, a leptina pode representar um novo fator terapêutico para melhorar as condições de cicatrização das UMs. No entanto, seriam necessários estudos mais detalhados e análises com modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* para confirmar ou refutar nossos resultados e melhor verificar o impacto desses miRNAs no desenvolvimento e manutenção das UMs.

6 CONCLUSÃO

1. Pacientes com AF e UMA apresentaram maiores níveis de expressão de miR-21 e miR-130a quando comparados àqueles com UMF, aos sem histórico de UM e aos indivíduos sem AF (HbAA);
2. Não houve diferença significativa no perfil de expressão de miR-21 e miR-130a entre os pacientes com AF e UMF, os sem histórico de UM e com indivíduos com perfil de hemoglobina normal;
3. Há uma relação inversa entre a expressão de miR-21 e miR-130a com os níveis séricos de leptina em pacientes com AF;
4. O aumento da expressão de miR-21 e miR-130a pode estar relacionado com a cronicidade das UMs em indivíduos com AF, por meio da diminuição dos níveis de leptina.

REFERÊNCIAS

- AGALE, S. V. Chronic Leg Ulcers: Epidemiology, Aetiopathogenesis, and Management. **Hindawi**, v. 2013: p. 1–9, 2013.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11: p. 327–331, 2000.
- ALAVI, A.; KIRSNER, R. S. Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 14: p. 213–216, 2015.
- ALTMAN, I. A. et al. A treatment algorithm to identify therapeutic approaches for leg ulcers in patients with sickle cell disease. **Int Wound J**, v. 13: p. 1315–1324, 2015.
- ANDL, T. et al. The miRNA processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. **Curr Biol**, v. 16: p. 1041–1049, 2006.
- AGGEL-LEIJSEN, D. P. C. Regulation of average 24h human plasma leptin level: influence of exercise and physiological changes in energy balance. **Int J Obes**, v. 23: p. 1–8, 1998.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of the Phenotypic Manifestations of Sickle Cell Disease. **Am J Hematol**, v. 85: p. 6–13, 2010.
- BANERJEE, J.; CHAN, Y. C.; SEM, C. K. MicroRNAs in skin and wound healing. **Physiol Genomics**, v. 43: p. 543–556, 2010.
- BANERJEE, J.; SEM, C. K. MicroRNAs and wound healing. **Adv Exp Med Biol**, v. 888: p. 291–305, 2015.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116: p. 281–297, 2004.
- BARTEL, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136: p. 215–233, 2009.
- BETAL, S. G.; SETTY, B. N. Y. Phosphatidylserine positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin1 via its heparin binding domain. **Transl Res**, v. 152: p. 165–177, 2008.
- BHAGAT, T. D. et al. miR-21 mediates hematopoietic suppression in MDS by activating TGF- β signaling. **Blood**, v. 121: p. 2875–2881, 2016.
- BHATTACHARYYA, S. et al. Elevated miR-155 Promotes Inflammation in Cystic Fibrosis by Driving Hyperexpression of Interleukin-8. **The Journal of biological chemistry**, v. 286: p. 11604–11615, 2011.
- BIASSI, T. P. et al. microRNA and Severity of Sickle Cell Anemia. **Blood**, v. 132: p. 3647, 2018.
- BLAHNA, M. T.; HATA, A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. **FEBS Lett**, v. 586: p. 1906–1912, 2012.
- BOULOUMIÉ, A. et al. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. **Circ Res**, v. 83: p. 1059–1066, 1998.
- BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.048, de 3 de setembro de 2009, artigos 187 e 188. **Conduitas Básicas para o Tratamento – Doença Falciforme**, p. 9, 2012.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. Sickle cell disease in Brazil. **Rev bras hematol hemoter**, v. 29: p. 203–206, 2007.
- CHENDRIMADA, T. P. et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. **Nature**, v. 447: p. 823–828, 2007.
- CHEN, S. Y. et al. The Genomic Analysis of Erythrocyte microRNA Expression in

- Sickle Cell Diseases. **PLoS ONE**, v. 3: p. e2360, 2008.
- CHEN, X. et al. MiR-130a-3p inhibits the viability, proliferation, invasion, and cell cycle, and promotes apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing BACH2 expression. **Bioscience Reports**, v. 37: p. 1–12, 2017.
- CORTEZ, M. A. et al. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8: p. 467–477, 2011.
- DE FRANCESCHI, L.; CAPPELLINI, M. D.; OLIVIERI, O. Thrombosis and Sickle Cell Disease. **Semin Thromb Hemost**, v. 37: p. 226–236, 2011.
- DELANEY, K. M. et al. Leg ulcers in sickle cell disease: current patterns and practices. **Hemoglobin**, v. 37: p. 325–332, 2013.
- DI LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. microRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 9: p. 287–314, 2014.
- DOMINGOS, I. F. et al. Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Ann Hematol**, v. 93: p. 1123–1129, 2014.
- DRISS, A. et al. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**, v. 2: p. 23–48, 2009.
- EATON, W. A.; HOFRIKHTER, J. Sickle cell hemoglobin polymerization. **Adv Protein Chem**, v. 40: p. 63–279, 1990.
- EIRING, A. M. et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. **Cell** 140: 652-665, 2010.
- ERSON, A. E.; PETTY, E. M. MicroRNAs in development and disease. **Clin Genet**, v. 74: p. 296–306, 2008.
- FENG, Y. H.; TSAO, C. J. Emerging role of microRNA-21 in cancer. **Biomed Rep**, v. 5: p. 395–402, 2016.
- FERRAZ, M. H. C.; MURAO, M. Laboratorial diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life. **Rev bras hematol hemoter**, v. 29: p. 218–222, 2007.
- FERTRIN, K. Y.; COSTA, F. F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Rev Hematol**, v. 3: p. 443–458, 2010.
- FRANK, S. et al. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. **J Clin Invest**, v. 106: p. 501–509, 2000.
- FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, v. 19: p. 92–105, 2009.
- FUJITA, S. et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. **J Mol Biol**, v. 378: p. 492–504, 2008.
- GARZON, R.; MARCUCCI, G.; CROCE, C. M. Targeting MicroRNAs in Cancer: Rationale, Strategies and Challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9: p. 775–789, 2010.
- GIANDOMENICO, G. et al. The leptin receptor system of human platelets. **J Thromb Haemost**, v. 3: p. 1042–1049, 2005.
- GLADWIN, M. T. et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 116: p. 436–444, 2002.
- GOREN, I. et al. Leptin and Wound Inflammation in Diabetic *ob/ob* Mice. **Diabetes**, v. 52: p. 2821–2832, 2003.
- GREGORY, R. I. et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v. 123: p. 631–640, 2005.
- HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Adv Drug Deliv Rev** 87: 3–14, 2015.

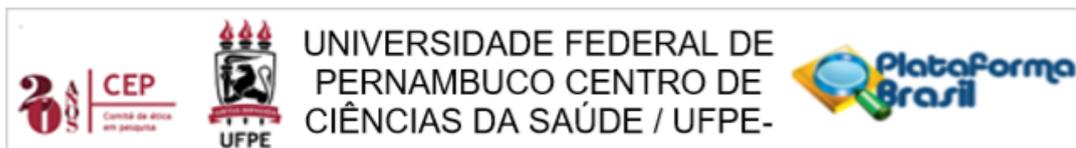
- HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch Intern Med (Chic)**, v. 5: p. 517–521, 1910.
- HO, P. J.; THEIN, S. L. Gene regulation and deregulation: a β globin perspective. **Blood Rev**, v. 14: p. 78–93, 2000.
- HULVER, M. W.; HOUWARD, J. A. Plasma leptin and exercise. **Sports Med**, v. 33: p. 473–482, 2003.
- IWALOKUN, B. A. et al. Serum levels of leptin in Nigerian patients with sickle cell anaemia. **BMC Blood Disord**, v. 11: p. 1–11, 2011.
- INGRAM, V. M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 180: 326-328, 1957.
- IORIO, M. V.; CROCE, C. M. Causes and Consequences of microRNA Dysregulation. **Cancer Journal**, v. 18: p. 215–222, 2012.
- JESUS, J. A. Sickle cell disease in Brazil. **Gaz méd Bahia**, v. 80: p. 8–9, 2010.
- KATO, G. J. et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. **Br J Haematol**, v. 130: p. 943–953, 2005.
- KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**, v. 21: p. 37–47, 2007.
- KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127: p. 750–760, 2017.
- KAWAMATA, T.; TOMARI, Y. Making RISC. **Trends Biochem Sci**, v. 35: p. 368–376, 2010.
- KHALYFA, A. et al. Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes. **British Journal of Haematology**, v. 174: p. 786–798, 2016.
- KIM, N. V. MicroRNA Biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews**, v. 6: p. 376–385, 2005.
- KIM, N. V.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews**, v. 10: p. 126-139, 2009.
- KIRIAKIDOU, M. et al. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. **Cell**, v. 121: p. 141–51, 2007.
- KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Med Hypotheses**, v. 76: p. 24–31, 2011.
- KUMARSWAMY, R.; VOLKMANN, I.; THUM, T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. **RNA Biol**, v. 8: p. 706–713, 2011.
- LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85: p. 235–242, 2009.
- LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Curr Biol**, v. 12: p. 735–739, 2002.
- LIAPAKIS, I. et al. Burn wound angiogenesis is increased by exogenously administered recombinant leptin in rats. **Acta Cir Bras**, v. 23: p. 118-124, 2008.
- LONERGAN, G. F.; CLINE, D. B.; ABBONDANZO, S. L. Sickle cell anemia. **RadioGraphics**, v. 21: p. 971–994, 2001.
- Mack, A. K.; Kato, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38: p. 1237–1243, 2006.
- MADHYASTHA, R. et al. MicroRNA signature in diabetic wound healing: promotive

- role of miR-21 in fibroblast migration. **Int Wound J**, v. 9: p. 355–361, 2012.
- MADU, A. J. et al. Evaluation of clinical and laboratory correlates of sickle leg ulcers. **Wound Repair Regen**, v. 21: p. 808–812, 2013.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2013: p. 362–369, 2013.
- MAQUART, F. X.; MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathol Biol (Paris)**, v. 62: p. 91–95, 2014.
- MARONEY, P. A. et al. Evidence That microRNAs Are Associated with Translating Messenger RNAs in Human Cells. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 13: p. 1102–1107, 2006.
- MASON, V. R. Sickle cell anemia. **JAMA**, v. 79: p. 1318–1320, 1922.
- MATHONNET, G. et al. MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the CAP-binding Complex eIF4F. **Science**, v. 317: p. 1764–1767, 2007.
- MEOLA, N.; GENNARINO, V. A.; BANFI, S. microRNAs and genetic diseases. **Pathogenetics**, v. 2: p. 1–14, 2009.
- MIKHAIL, A. A. et al. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. **Blood**, v. 89: p. 1507–1512, 1997.
- MINNITI, C. P. et al. Leg Ulcers in Sickle Cell Disease. **Am J Hematol**, v. 85: p. 831–833, 2010.
- MISHIMA, Y. et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. **Curr Biol**, v. 16: p. 2135–2142, 2006.
- MORRIS, C. R. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. **Haematologica** 96: 1–5, 2011.
- MOTT, J. L.; MOHR, A. M. Overview of MicroRNA Biology. **Semin Liver Dis**, v. 35: p. 3–11, 2015.
- NGO, D.; STEINBERG, M. Sickle cell disease. **Hematology**, v. 19: p. 244–245, 2014.
- NOLAN, V. G. et al. Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. **Br J Haematol**, v. 133: p. 570–578, 2006.
- NOTTROTT, S.; SIMARD, M. J.; RICHTER, J. D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. **Nat Struct Mol Biol**, v. 13: p. 1108–1114, 2006.
- ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res**, v. 134: p. 532–537, 2011.
- PALADINO, S. F. Leg ulcers in sickle cell disease. **Rev bras hematol hemoter**, v. 29: p. 288–290, 2007.
- PASTAR, I. et al. Induction of Specific MicroRNAs Inhibits Cutaneous Wound Healing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287: p. 29324–29335, 2012.
- PASTAR, I. et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in wound care**, v. 3: p. 445–463, 2014.
- PETERSEN, C. P. et al. Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. **Molecular Cell**, v. 21: p. 533–542, 2006.
- PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1: p. 1–7, 2010.
- PIEL, F. B. et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: A quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. **Lancet Glob Heal**, v. 2: p. e80–89, 2014.

- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **N Engl J Med**, v. 376: p. 1561–1573, 2017.
- PLATT, O. S. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med**, v. 358: p. 1362–1369, 2008.
- PULE, G. D. et al. Hydroxyurea down-regulates *BCL11A*, *KLF-1* and *MYB* through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5: p. 1–15, 2016.
- RAMIREZ, H.; PATEL, S. B.; PASTAR I. The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization. **Advances in Wound Care**, v. 3: p. 482–491, 2013.
- RANA, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RN. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8: p. 23–36, 2007.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376: p. 2018–2031, 2010.
- REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 156: p. 433–445, 2012.
- RIBAS, J.; LUPOLD, S. E. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. **Cell Cycle**, v. 5: p. 923–929, 2010.
- RIBEIRO, L. M. S. et al. Leptina: Aspectos Sobre o Balanço Energético, Exercício Físico e Amenorréia do Esforço. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51: p. 11-24, 2007.
- SANGOKOYA, C.; TELEN, M. J.; CHI, J. T. microRNA miR 144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. **Blood**, v. 116: p. 4338–4348, 2010.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3: p. 1101–1108, 2008.
- SERJEANT, G. R. et al. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 19: p. 943–956, 2005.
- SERJEANT, G. R.; VICHINSKY, E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells Mol Dis**, v. 70: p. 66–77, 2017.
- SOARES, C. A. N. et al. Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36: p. 250–255, 2014.
- SONATI, M. F.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de pediatria (RJ)**, v. 84: p. 40–51, 2008.
- SONKOLY, E. et al. MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? **PlosOne**, v. 2: p. e610, 2007.
- SPARKENBAUGH, E.; PAWLINSKI, R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 162: p. 1–22, 2013.
- SPARKENBAUGH, E.; PAWLINSKI, R. Prothrombotic aspects of sickle cell disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15: p. 1307–1316, 2017.
- STALLMEYER, B. et al. A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair. **J Invest Dermatol**, v. 117: p. 98–105, 2001.
- STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 340: p. 1021–1030, 1999.
- STEINBERG, M. H. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **Sci World J**, v. 9: p. 46–67, 2009.
- STEINBERG, M. H. Nitric oxide-based treatment for sickle cell leg ulcers? **Lancet**

- Haematol**, v. p. 1: e86–87, 2014.
- STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364: p. 1343–1360, 2004.
- SUH, M. R. et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. **Dev Biol**, v. 270: p. 488–498, 2004.
- SWITZER, J. A. et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **Lancet Neurol**, v. 5: p. 501–512, 2006.
- TADOKORO, S. et al. Leptin promotes wound healing in the skin. **PLoS One**, v. 10: p. e0121242, 2015.
- TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83: p. 1263–1271, 1995.
- THEIN, S. L. Genetic Basis and Genetic Modifiers of β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 1013: p. 27–57, 2017.
- TOKUYAMA-TODA, R.; SATOMURA, K. The Physiological Roles of Leptin in Skin Wound Healing. **IntechOpen**, v. 2: p. 25–35, 2016.
- UMEH, N. I. et al. The psychosocial impact of leg ulcers in patients with sickle cell disease: I don' t want them to know my little secret. **PLoS One**, v. 12: p. e0186270, 2017.
- VEKILOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **British Journal of Haematology**, v. 139: p. 173–184, 2007.
- WAKIYAMA, M. et al. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. **Genes Dev**, v. 21: p. 1857–1862, 2007.
- WANG, T. et al. miR-21 Regulates Skin Wound Healing by Targeting Multiple Aspects of the Healing Process. **AJP December**, v. 181: p. 1911–1920, 2012.
- WOOD, K. C.; HSU, L. L.; GLADWIN, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. **Free Radic Biol Med**, v. 44: p. 1506–1528, 2008.
- WU, L.; FAN, J.; BELASCO, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. **PNAS**, v. 103: p. 4034–4039, 2006.
- WU, L. et al. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. **Mol Cell**, v. 38: p. 465–475, 2010.
- YI, R. et al. DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106: p. 498–502, 2009.
- ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 29: p. 207–214, 2007.
- ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127: p. 801–809, 2016.
- ZHANG, H. D. et al. The role of miR-130a in cancer. **Breast Cancer**, v. 24: p. 521–527, 2016.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANO CCS - UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise da expressão do miR-21 e miR-130a na ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme

Pesquisador: THAIS HELENA CHAVES BATISTA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 74775717.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.469.384

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as exigências para a submissão da pesquisa no CEP foram cumpridas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos encontram-se adequados.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 18 de Janeiro de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS (resolução 466/12)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa “Impacto da expressão dos microRNAs miR-21 e miR-130a no desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Thais Helena Chaves Batista (Endereço: Rua Dois, bloco 17, apto. 106, Curado IV, Jaboatão dos Guararapes, PE, CEP: 54270-010 – Fone: (81) 99698-7262 – E-mail: tha.helena.batista@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105 - macbezerraufpe@gmail.com). Também participa também desta pesquisa: Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99908-9382 - araujoarl@hotmail.com).

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o(a) Sr.(a) não será penalizado(a) de forma alguma. O(a) Sr.(a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

A anemia falciforme é uma doença que altera a forma das hemácias e pode provocar, dentre as várias complicações clínicas, a úlcera maleolar (úlcera de perna), comprometendo a qualidade de vida dos portadores. Esta pesquisa pretende avaliar se o desenvolvimento das úlceras de perna em pacientes com anemia falciforme está relacionado com fatores genéticos. Nós acreditamos que o aumento dos microRNAs 21 e 130a no sangue dos pacientes seria uma possível causa destas úlceras. As amostras de sangue serão coletadas entre novembro de 2017 e setembro de 2018, durante as visitas de rotina dos pacientes ao ambulatório do HEMOPE. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 8 mL de sangue periférico, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco para o paciente é a ocorrência de uma dor leve resultante da picada da agulha. Além disso, a área da coleta pode ficar roxa, o que pode ser amenizado colocando compressas de gelo nas primeiras horas após a coleta, em seguida, podem ser colocadas compressas mornas. Também gostaríamos que o(a) senhor(a) permitisse o acesso aos dados do seu prontuário. Como benefícios ao paciente, acreditamos que a identificação de alterações genéticas permitirá a detecção precoce da úlcera de perna, sendo assim, medidas preventivas podem ser tomadas, evitando abertura dessas úlceras e promovendo ao aumento da qualidade de vida dos pacientes.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, sendo divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo garantido o sigilo sobre a sua participação. Todos dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

Impacto da expressão dos microRNAs miR-21 e miR-130a no desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Impacto da expressão dos microRNAs miR-21 e miR-130a no desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme” como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do participante

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

