



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA

ÉVELIN MOTA CASSEMIRO

**ANÁLISE POLIMÓRFICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO FATOR DE  
CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL – VEGF (-2549 I/D 18 pb) EM  
INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Brasília

2017

ÉVELIN MOTA CASSEMIRO

**ANÁLISE POLIMÓRFICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO FATOR DE  
CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL – VEGF (-2549 I/D 18 pb) EM  
INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à Faculdade de Ceilândia, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Dr. Rodrigo Haddad

Brasília

2017

Cassemiro, Évelin Mota  
CC344a Análise polimórfica da região promotora do gene do  
Fator de Crescimento Vascular Endotelial - VEGF ( 2549 I/D 18 pb) em indivíduos diagnosticados com  
Lúpus Eritematoso Sistêmico / Évelin Mota Cassemiro;  
orientador Rodrigo Haddad. -- Brasília, 2017.  
40 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade  
de Brasília, 2017.

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2. VEGF. 3.  
Polimorfismo. I. Haddad, Rodrigo, orient. II. Título.

ÉVELIN MOTA CASSEMIRO

**ANÁLISE POLIMÓRFICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO FATOR DE  
CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL – VEGF (-2549 I/D 18 pb) EM  
INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

BANCA EXAMINADORA

---

Orientador: Dr. Rodrigo Haddad  
(Universidade de Brasília – UnB/FCE)

---

Dra Daiani Cristina Cilião Alves Haddad  
(Unieuro)

---

Dr. Eduardo Antônio Ferreira  
(Universidade de Brasília – UnB/FCE)

Brasília  
2017

“ Tenho para mim que os sofrimentos da presente vida não têm proporção alguma com a glória futura que nos deve ser manifestada”

Romanos 8, 18

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à Deus pela oportunidade de viver essa experiência maravilhosa que foi estudar na Universidade de Brasília.

Agradeço aos meus pais por serem meus pilares e espelhos de vida. Pelo amor incondicional, paciência e apoio em todos os momentos, principalmente durante a graduação.

Ao meu namorado Lucas, que acompanhou toda minha evolução de perto, pelo companheirismo, amor, carinho e apoio nos momentos críticos. Se tornando um dos maiores incentivadores para eu sempre perseverar e concluir o curso.

Aos meus amigos e colegas de turma, que se tornaram minha família UnB, por sempre estarem presentes me auxiliando no curso e me dando conselhos valiosos, tornando essa experiência única. E, especialmente, à amiga Ana Carolina Bruno Pereira, que se tornou minha parceira de vida, sempre estando presente nos momentos de glória e de tristeza nesses 5 anos de convivência.

Ao professor Rodrigo Haddad por aceitar o desafio de me orientar, pelo empenho em me apoiar nos momentos de desespero, por sempre me motivar a continuar, pela paciência e pela confiança depositada em mim para desenvolver seus projetos.

Às professoras Daiani Cristina Cilião Alves Haddad e Izabel Cristina Rodrigues da Silva pelo auxílio no desenvolvimento e compreensão dos resultados apresentados nesse trabalho.

Aos professores Eduardo Antônio Ferreira e Daiani Cristina Cilião Alves Haddad, por aceitarem o convite de participar dessa banca avaliadora e pela atenção durante a graduação.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios de classificação revisados e modificados pelo American College of Rheumatology (ACR), em 1982 (TAN et al., 1982) e 1997(HOCHBERG, 1997). .....	13
<b>Tabela 2.</b> Elementos utilizados para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas concentrações e quantidades .....	24
<b>Tabela 3.</b> Condições de amplificação .....	24
<b>Tabela 4.</b> Frequência alélica dos pacientes portadores de LES e controle saudável. ....	28
<b>Tabela 5.</b> Frequência genotípica dos pacientes portadores de LES e controle saudável. ....	28
<b>Tabela 6.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene VEGF (-2549 I/D 18 pb) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) conforme os critérios ACR. ....	29
<b>Tabela 7.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene VEGF (-2549 I/D 18 pb) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) conforme o critério ACR alterações imunológicas. ....	31
<b>Tabela 8.</b> Relação genótipos VEGF e alterações diversas. ....	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espiral da evolução do LES. ....	15
<b>Figura 2:</b> Sequência de eventos para ocorrência da aterosclerose.....	16
<b>Figura 3:</b> Localização dos receptores VEGF e seus respectivos ligantes (VEGF-A; VEGF-B; VEGF-C; VEGF-D).....	18
<b>Figura 4:</b> Gel de poliacrilamida amostras distintas de pacientes acometidos com LES. ....	25
<b>Figura 5:</b> Gel de poliacrilamida amostras distintas de pacientes acometidos com LES. ....	25



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR – American College of Rheumatology  
D – Deleção  
DD – Deleção/Deleção  
FAN – Fatores Antinucleares  
FGF - Fator de Crescimento Fibroblástico  
g - Gramas  
HGF - Fator de Crescimento de Hepatócitos  
I – Inserção  
IC – Intervalo de Confiança  
I/D ou ID – Inserção/Deleção  
II – Inserção/Inserção  
LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico  
LN – Nefrite Lúpica  
 $\mu\text{L}$  - Microlitro  
mL – Mililitro  
mV - Milivolt  
nm - Nanomol  
OR – Odds Ratio  
pb – Pares de Base  
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase  
PIGF - Fator de Crescimento Placentário  
 $\text{Pmol}/\mu\text{L}$  – picomol/microlitro  
mRNA – RNA mensageiro  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SNPs – Polimorfismo de Único Nucleotídeo  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
 $\text{U}/\mu\text{L}$  – Unidades/microlitro  
VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial  
VPF – Fator de Permeabilidade Tumoral

## RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença considerada auto-imune devido a atuação de auto-anticorpos, que ocasionam inflamações crônicas em diversos tecidos corporais. Em sua patogênese, indutores angiogênicos, como o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), pode participar do desenvolvimento da inflamação, apresentando níveis séricos de VEGF maiores em pacientes com LES quando comparados a pacientes saudáveis. O gene do VEGF possui um polimorfismo na sua região promotora na posição -2549 (I/D 18pb, rs35569394) que pode influenciar nos níveis de VEGF no soro (alelo D aumenta a expressão do VEGF). Assim, este trabalho objetivou analisar a frequência desse polimorfismo em pacientes com LES e compará-los com indivíduos saudáveis. Além disso, a frequência do polimorfismo foi observada em diferentes grupos, classificados de acordo com os critérios de diagnóstico do LES. Para tal análise, foram utilizadas 61 amostras de pacientes com LES e 33 amostras controle (indivíduos saudáveis). Não foram encontradas diferenças estatísticas ao comparar as frequências alélicas e genotípicas entre pacientes e controles, mostrando que não há relação entre o LES e o polimorfismo pesquisado. Por outro lado, observou-se uma relação do polimorfismo com as alterações imunológicas sofridas pelos pacientes. Portanto, conclui-se que pacientes que possuem o alelo para inserção (I) tem o risco aumentado de sofrer com esses distúrbios e suas consequências.

**Palavras chave:** Lúpus Eritematoso Sistêmico; VEGF; polimorfismo

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a disease considered autoimmune due to the action of autoantibodies, which cause chronic inflammation in various body tissues. The pathogenesis of SLE is also characterized by action of angiogenic inducers, such as the augment of Endothelial Vascular Growth Factor (VEGF) that, in turn, participates in the development of inflammation. The VEGF gene has a polymorphic site in the promoter region at -2549 position (I / D 18pb, rs35569394), that may influence in VEGF levels (D allele enhances VEGF expression). Thus, this study aimed to analyze the frequency of this polymorphism in patients with SLE and in healthy individuals. In addition, the frequency of polymorphism was observed in different groups, classified according to the SLE diagnosis criteria. For this analysis, 61 samples of patients with SLE and 33 control samples (healthy individuals) were observed. No statistical differences were found when comparing allele and genotype frequencies between patients and controls. On the other hand, we observed the relation of the polymorphism with the immunological alterations. Therefore, we concluded that patients who have the insertion allele (I) are at increased risk of suffering from these disorders and their consequences.

**Keywords:** Systemic Lupus Erythematosus; VEGF; polymorphism

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico .....	13
1.2 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 Objetivo geral .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
4.1. Revisão de literatura .....	22
4.2. Critérios de inclusão e exclusão.....	22
4.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	23
4.4 Obtenção de amostras de sangue .....	23
4.5. Extração de DNA .....	23
4.6. Reação em cadeia da polimerase.....	23
4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	24
4.8. Análise dos dados .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	34
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35
<b>8 ANEXO</b> .....	40

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune, de patogenicidade complexa e sintomatologia heterogênea, que atinge a população mundial, prevalecendo no sexo feminino. A proporção pode chegar a 10 vezes maior quando há comparação de gênero, ou seja, a cada dez mulheres que portam a doença, um homem é diagnosticado com o LES (HUANG et al., 2016) (LIU; DAVIDSON, 2012).

O diagnóstico é realizado baseando-se em critérios desenvolvidos pela American College of Rheumatology (ACR) e é necessário a presença de, pelo menos, 4 deles para confirmar o quadro clínico do paciente (Tabela 1).

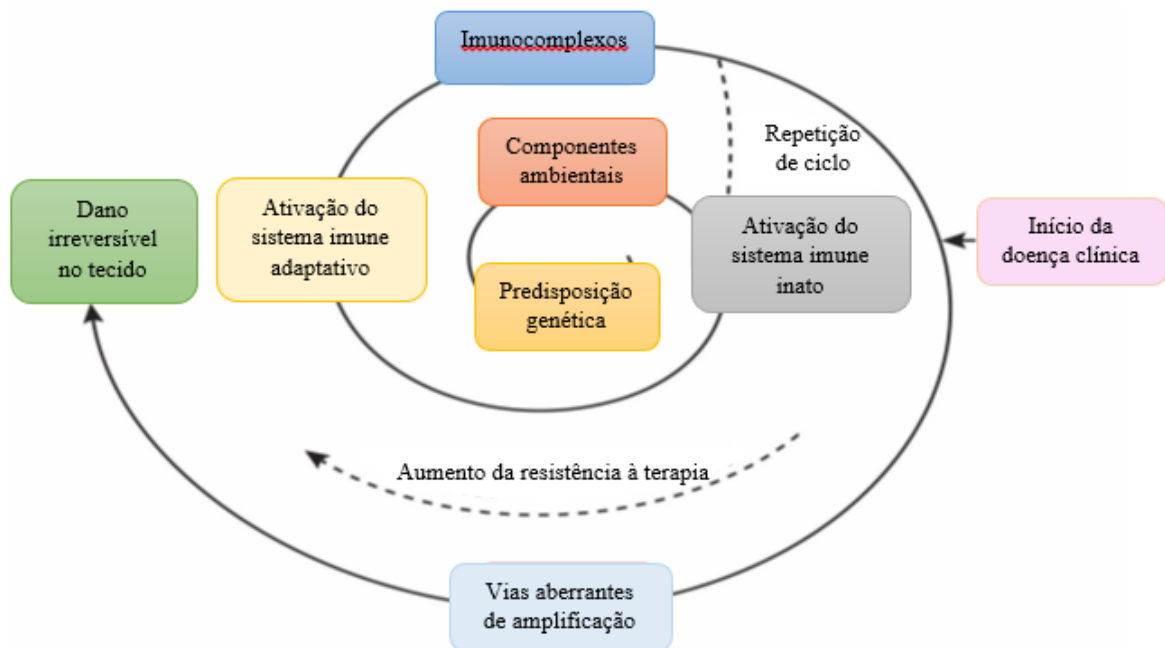
**Tabela 1.** Critérios de classificação revisados e modificados pelo American College of Rheumatology (ACR), em 1982 (TAN et al., 1982) e 1997(HOCHBERG, 1997).

<b>Critério</b>	<b>Definição</b>
<b>1. Rash Malar</b>	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre a eminências malares, tendendo a poupar as dobras nasolabiais
<b>2. Rash Discóide</b>	Manchas eritematosas elevadas com placa ceratótica aderente e encaixe folicular; cicatriz atrófica pode ocorrer em lesões mais antigas
<b>3. Fotossensibilidade</b>	Rash cutâneo resultante de reação incomum em decorrência da exposição à luz solar, pela história do paciente ou pela observação médica
<b>4. Úlceras orais</b>	Úlcerações orais ou nasofaríngeais, normalmente indolores, observadas pelo médico
<b>5. Artrite não erosiva</b>	Envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizadas por sensibilidade, inchaço ou efusão
<b>6. Pleurite ou Pericardite*</b>	Pleurite – história convincente de dor pleurítica ou evidência de efusão pleural Ou Pericardite – documentado por eletrocardiograma ou evidência de efusão pericárdia
<b>7. Disordem renal</b>	Proteinúria persistente > 0,5 gramas por dia ou > que 3+ quantificação if não realizada Ou Modelos celulares – podendo ser hemácias, hemoglobina, granulares, tubulares ou misturadas
<b>8. Disordem neurológica</b>	Convulsões - na ausência de medicamentos ou desordens metabólicas conhecidas; e.g. uremia, cetoacidose ou desequilíbrio eletrolítico Ou Psicose – na ausência de medicamentos ou desordens metabólicas conhecidas; e.g. uremia, cetoacidose ou desequilíbrio eletrolítico
<b>9. Disordem hematológica</b>	Anemia hemolítica com reticulócitos Ou

	Leucopenia - < 4000/mm <sup>3</sup> por ≥ 2 ocasiões OU Linfopenia - <1500/mm <sup>3</sup> por ≥ 2 ocasiões OU Trombocitopenia - <100000/ mm <sup>3</sup> na ausência de oferta de medicamentos
<b>10. Disordem imunológica</b>	Anti-DNA: anticorpo nativo do DNA em títulos anormais OU Anti-Sm: presença de anticorpos para o antígeno nuclear Sm OU Achados positivos para anticorpos antifosfolípídeos em: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Níveis séricos anormais de anticorpos anticardiolipina IgG e IgM</li> <li>2. Resultado de teste anticoagulante para Lúpus positivo usando método standart*</li> <li>3. Resultado falso-positivo por, pelo menos, 6 meses confirmado por imobilização de <i>Treponema pallidum</i> ou teste de absorção de fluorescência de anticorpo treponêmico</li> </ol>
<b>11. Anticorpo antinuclear positivo</b>	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou ensaio equivalente em qualquer período e na ausência de medicamentos

Fonte: Tabela adaptada de "1997 Update of the 1982 American College of Rheumatology Revised Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus"

O LES pode não possuir uma etiologia totalmente conhecida. A doença pode se iniciar a partir das alterações genéticas que, juntamente com componentes ambientais, desencadeiam uma cascata de eventos, levando às manifestações clínicas da doença, ou seja, danos aos tecidos. Esses eventos são desencadeados devido à ativação do sistema imune inato pela apresentação dos antígenos às células T. Estas, por sua vez, liberam citocinas como o interferon tipo I (pró-inflamatória) auxiliando na atividade do sistema imune adaptativo e na posterior agregação dos autoanticorpos aos componentes celulares e ácidos nucléicos, formando complexos que estimulam os receptores do tipo Toll-like nas células do sistema imune inato. Já as células B autorreativas atuam no recrutamento de mais células T por serem consideradas células apresentadoras de antígenos, formando um *feedback* positivo que aumentará o número de linfócitos reativos (fase pré-clínica) e levará a inflamação tecidual e posterior dano (Fig 1) (LIU; DAVIDSON, 2012).



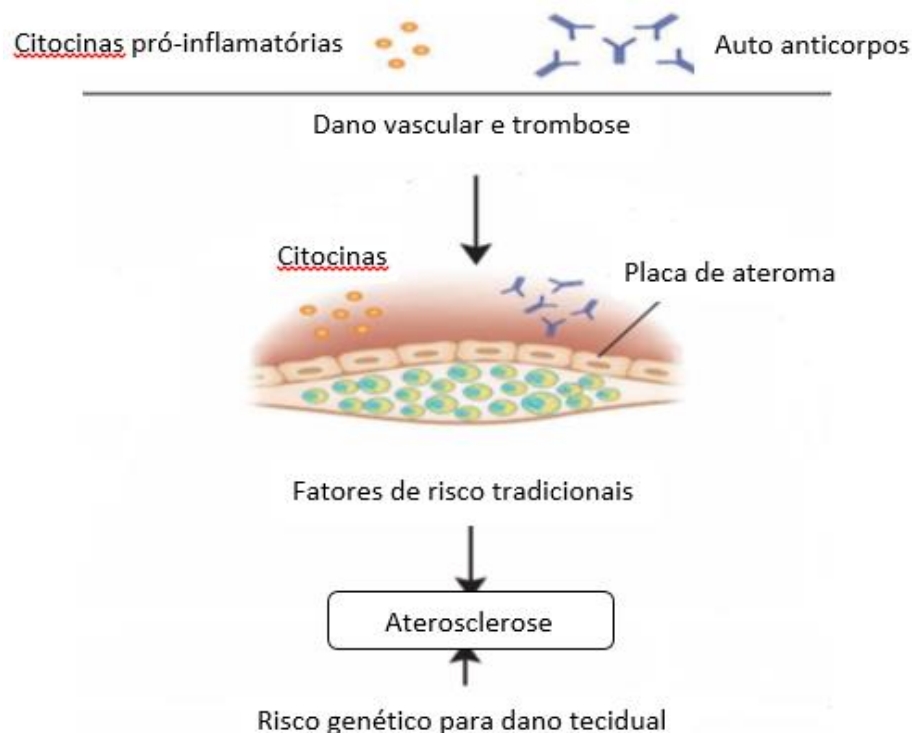
**Figura 1:** Espiral da evolução do LES. Indivíduos de uma população que contém a predisposição genética são mais afetados que os indivíduos normais. Somado a isso, temos os componentes ambientais que variam de acordo com a vida de cada pessoa e eles podem aumentar as chances da doença ser iniciada e desenvolvida. Com a instalação da doença, tem-se a ativação do sistema imune inato que ativará o sistema imune adaptativo, liberando citocinas. Por conseguinte, ocorrerá a formação de imunocomplexos que terão duas funções: 1-fazes o feedback positivo na exacerbação da atividade do sistema imune inato e, 2- iniciar a fase clínica da doença, que estará associada a inflamação em determinados órgãos, ampliando a atividade imunológica até causar danos irreversíveis nos tecidos. (LIU; DAVIDSON, 2012. Adaptado)

De acordo com o dano sistêmico, diferentes consequências podem acometer os pacientes, dentre elas o rash, a anemia hemolítica, a glomerulonefrite, a artrite, a trombocitopenia e os problemas no Sistema Nervoso Central (SNC) (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015). Dentre os alvos teciduais, vale ressaltar àqueles de grande importância devido à sua funcionalidade, como os danos renais, neurológicos e/ou cardiovasculares.

No âmbito renal, os pacientes com LES podem desenvolver nefrite em múltiplos locais do rim, sendo desencadeada por uma exacerbação de várias quimiocinas e citocinas em diversos estágios da nefrite, podendo afetar as células glomerulares até os túbulos renais alterando a funcionalidade e massa do rim (VIELHAUER; ANDERS; SCHLONDORFF, 2007; SCHLONDORFF, 2008).

Quando o dano é cerebral, situação denominada de síndrome neuropsiquiátrica, o dano cognitivo pode ocorrer afetando tanto o SNC quanto o periférico. Ressalta-se que nesse tecido, em especial, a perda da função pode ser diretamente causada pelos autoanticorpos que trazem um prejuízo parenquimal e vascular (LAUVSNES; OMDAL, 2012; DE LAAT; MERTENS; DE GROOT, 2008).

Já no sistema cardiovascular, foi relatado que portadores do LES apresentam uma maior atividade angiogênica (formação de novos vasos) quando comparados à população normal (LIU et al, 2015). Além disso, o risco maior de mortalidade envolve doenças como a aterosclerose, que é considerada a maior causa de morte dos pacientes portadores de LES (ESDAILE, 2001; SYMMONS; GABRIEL, 2011). Logo, para o desenvolvimento da aterosclerose deve ocorrer, inicialmente, o dano no endotélio vascular por motivo de aumento da apoptose celular mediada por citocinas, ou ativação de células endoteliais que aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias que regulam as moléculas adesivas facilitando o recrutamento de monócitos a fim de formar a placa de ateroma no vaso sanguíneo (Fig 2) (NARSHI et al, 2011).



**Figura 2:** Sequência de eventos para ocorrência da aterosclerose. As citocinas pró-inflamatórias e os autoanticorpos irão induzir o dano vascular por interferir na ativação ou apoptose celular. Isso induzirá um recrutamento de monócitos que se encaminharão ao local afetado e poderá causar uma oxidação



de lipídios e lipoproteínas pró-inflamatórias de baixa densidade lipídica, formando a placa de ateroma e desencadeando a aterosclerose juntamente com os fatores de risco tradicionais para ocorrer tal evento. (LIU; DAVIDSON, 2012, Adaptado)

Devido ao alto risco de desenvolvimento de problemas cardiovasculares, principalmente aterosclerose, relatou-se a existência de fatores que regulam a formação do endotélio vascular participando da mitose de células endoteliais, e são eles: Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), Fator de Crescimento Placentário (PIGF), Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) (LIU et al., 2015).

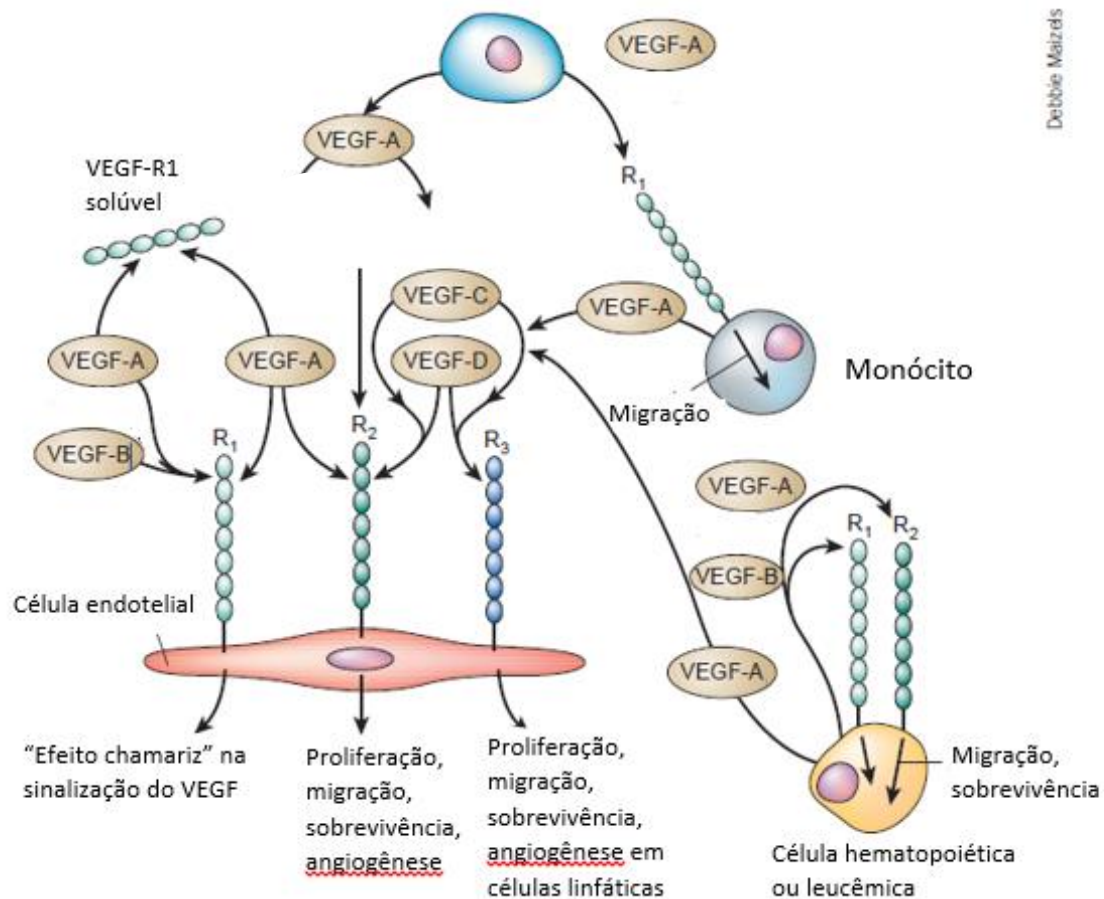
## **1.2 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)**

Historicamente, o mérito pela descoberta do VEGF é conflitante. Isso ocorre pois apenas em 1989, Ferrara e Henzel relataram a existência desse fator de crescimento. Porém, no mesmo ano descobriu-se que já existia relatos dessa molécula por Senger et al em 1983, molécula esta denominada de Fator de Permeabilidade Tumoral (VPF) e identificada durante um processo tumoral.

O gene do VEGF está localizado no cromossomo 6p 21.3, e é considerado um importante participante do processo de angiogênese (formação de vasos) do corpo humano (VINCENTI et al., 1998; SHEN; TSAO, 2004; LIU et al., 2015). Ele apresenta atividades distintas, a depender do receptor de tirosina quinase que é ativado. Quando há estimulação no receptor VEGF-R1 inicia-se uma ativação ou inibição da atividade do VEGF em células neuronais, monócitos, macrófagos e células musculares lisas, sendo que esta atividade está ligada diretamente à angiogênese no curso de processos patológicos. Por outro lado, quando o estímulo é no receptor VEGF-R2 tem-se a participação na mediação da proliferação celular e permeabilidade vascular em locais como tecido arterial, junções endoteliais e células sanguíneas endoteliais. Por fim, quando o receptor é o VEGF-R3 (presente no sistema linfático) diz-se que não há participação na angiogênese, apesar de outros estudos demonstrarem a sua participação na angiogênese em determinadas situações como, por exemplo, na retina. (FERRARA et al., 2004; SIMONS; GORDON; CLAESSEON-WELSH, 2016).

Contribuindo para a variação nas funções do VEGF, existem alguns subtipos de VEGF descritos como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. O VEGF-A é o mais

relatado e mais utilizado nos estudos. Ele se liga tanto no receptor R1 quanto no R2; o VEGF-B se liga, exclusivamente, ao receptor R1. Quanto aos VEGF-C e VEGF-D, há afinidade tanto para o receptor R2 quanto para o receptor R3 (Fig 3) (FERRARA et al., 2004).



**Figura 3:** Localização dos receptores VEGF e seus respectivos ligantes (VEGF-A; VEGF-B; VEGF-C; VEGF-D). Os receptores VEGF-R1 e VEGF-R2 se encontram em células epiteliais, hematopoiéticas ou leucêmicas. O VEGF-R1 ainda pode ser encontrado em monócitos, e o VEGF-R3 está presente em células linfáticas. O ligante VEGF-A pode ter afinidade pelo receptor R1 e R2, já o VEGF-B se liga apenas ao R1. Os VEGF-C e VEGF-D se ligam tanto no receptor R2 quanto no R3, portanto, pode-se dizer que os VEGFs C e D são os responsáveis pela atuação do VEGF no sistema linfático. (Ferrara et al., 2004. Adaptado).

Deste modo, afirma-se que o VEGF exerce diferentes funções em situações normais, inflamatórias e patológicas. E dentre essas funções estão: embriogênese, formação ovariana e crescimento esquelético (durante a normalidade). Já em situações patológicas há uma ligação com desenvolvimento de tumores, edema

cerebral, problemas intraoculares e problemas no sistema reprodutor feminino. Esse amplo espectro de funções se deve às suas diferentes variações e ao fato de que podem se ligar à diferentes receptores (FERRARA et al., 2004). Além da variabilidade de receptores e subtipos de VEGF, as mutações genéticas que podem ocorrer no gene do VEGF também podem influenciar na sua ação; mais de 30 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) já foram descritos para o gene do VEGF (WEI et al., 2013).

Dentre os polimorfismos descritos destaca-se um da região promotora do gene do VEGF. O polimorfismo na posição -2549 I/D de 18pb (rs35569394) é um dos responsáveis por aumentar a expressão do gene em determinadas situações, sendo a presença do alelo de deleção (D) responsável por um aumento de duas vezes mais na atividade de transcrição quando comparada ao alelo de inserção (I) (UNGERBÄCK et al., 2009; YANG et al., 2003). Portanto, pode-se hipotetizar que o polimorfismo -2549 I/D de 18 pb pode estar relacionado ao controle da atividade do VEGF, e dessa forma influenciar em pacientes com LES.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo foi verificar a frequência do polimorfismo da posição -2549 (I/D 18pb) do VEGF em uma amostra populacional de indivíduos brasileiros com LES, comparando-a com a frequência em pacientes saudáveis.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar levantamento bibliográfico sobre polimorfismo na posição -2549 (I/D18pb) do VEGF;
- Padronizar e executar as estratégias de biologia molecular (PCR convencional e eletroforese em gel de poliacrilamida) para estudo da frequência do polimorfismo na posição -2549 (I/D 18pb) do VEGF em indivíduos com LES e indivíduos saudáveis;
- Investigar a possível associação entre o polimorfismo na posição -2549 (I/D 18pb) do VEGF com diferentes manifestações clínicas e prognóstico de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando o conhecimento parcial da etiologia do LES e a relevância de estudos para esclarecer fatores genéticos relacionados no desenvolvimento dessa doença, torna-se primordial a busca pela elucidação dos genes envolvidos. Em especial, o gene do VEGF possui grande importância no processo de angiogênese e pode ter relação com o processo de desenvolvimento do LES. Tal possibilidade é reforçada pela observação de que pacientes com LES possuem alto risco de desenvolvimento de problemas cardiovasculares, principalmente aterosclerose. Dentre os fatores que regulam a formação do endotélio vascular estão o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), Fator de Crescimento Placentário (PIGF), Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF). Ainda, foi demonstrado que pacientes com LES apresentam níveis de VEGF mais altos quando comparados a um grupo controle (PETERS, 1998; LIU et al, 2015). Assim, o estudo dos polimorfismos genéticos que podem influenciar na produção do VEGF, como o polimorfismo na posição -2549 (del/ins 18pb) torna-se importante a fim de comprovar, juntamente com a literatura já estabelecida, as relações entre este polimorfismo e o desenvolvimento da patologia.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Revisão de literatura**

Os instrumentos de pesquisa utilizados foram: Pubmed, Periódicos Capes, MedLine e Biblioteca Virtual em Saúde.

### **4.2. Critérios de inclusão e exclusão**

O estudo foi conduzido com indivíduos saudáveis (31 pessoas, com idades entre 18 e 74 anos) e pacientes diagnosticados como portadores de LES (61 mulheres, com idades entre 19 e 73 anos). Estas pacientes portadoras de LES foram recrutadas em uma unidade hospitalar do Distrito Federal. As participantes selecionadas preencheram os critérios de classificação revisados e modificados pelo *American College of Rheumatology* (ACR), em 1982 (TAN et al., 1982) e 1997 (HOCHBERG, 1997).

As características clínicas de cada paciente com LES foram avaliadas cuidadosamente a partir dos respectivos prontuários. Comprometimento renal, perfil de auto-anticorpos, e ademais características clínicas também foram registradas. O comprometimento renal foi definido como proteinúria considerada maior que 0,5g/24 horas ou comprovada por biópsia de nefrite lúpica. Foram utilizados os altos índices para o título de anti-dsDNA e reduzidos para o nível C3. Para cada paciente foram determinados o número de critérios do ACR, o índice de *SLE Disease Activity* (SLEDAI) e o Lúpus Internacional de Colaboração Clínicas (SLICC) / Índice de Danos ACR.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da FEPECS (ANEXO 1).

Foram excluídos os indivíduos menores de 18 anos; Pacientes sem diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico; Pacientes externos ao Hospital de Base

### **4.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes do presente trabalho caso tenham condições de compreender e assinar o TCLE.

### **4.4 Obtenção de amostras de sangue**

Foram colhidos aproximadamente 10 mL de sangue venoso com tubo VacuTainer contendo EDTA a 5%. Após a coleta, o material foi processado no laboratório de Genética Molecular das Faculdades LS, e parte do material foi levado ao laboratório de Análises Clínicas da FCE/UnB. O sangue foi submetido à centrifugação, sendo o sobrenadante (plasma) estocado em frascos a -20 °C. Os *buffy coats* (leucócitos já separados por centrifugação) foram congelados a -20 °C.

### **4.5. Extração de DNA**

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit Invisorb Spin Blood Mini Kit (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/μL.

### **4.6. Reação em cadeia da polimerase**

A reação de amplificação para região (posição -2549) onde está localizada a deleção/inserção no gene do VEGF foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se 200 ng de DNA de cada amostra e utilizando iniciadores contendo uma sequência específica para o gene.

Para cada teste de amplificação foram adicionados todos os elementos demonstrados na tabela, e a amplificação respeitou as condições apresentadas na tabela 3.

**Tabela 2.** Elementos utilizados para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas concentrações e quantidades

	<b>Concentrações</b>	<b>Quantidade para um microtubo</b>
<b>DNA</b>		7,0 µL
<b>Tampão</b>	10 x	1,0 µL
<b>Cloreto de Magnésio</b>	50 nm	0,5 µL
<b>Taq polimerase</b>	5U/µL	0,2 µL
<b>Dntp</b>	2,5 nm	0,1 µL
<b>Primer R</b>	10 pmol/µL	0,5 µL
<b>Primer F</b>	10 pmol/µL	0,5 µL
<b>Total</b>		10 µL

**Tabela 3.** Condições de amplificação

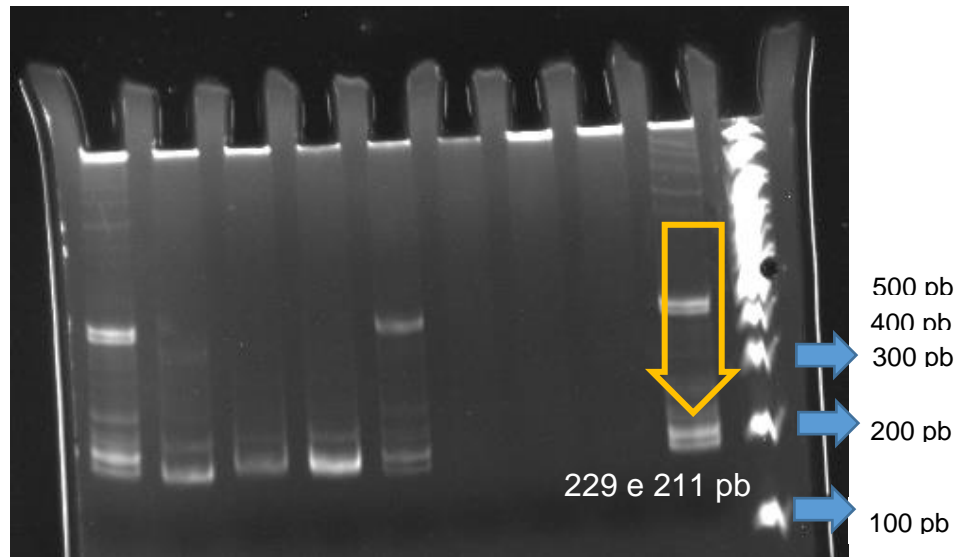
	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>35 ciclos</b>	95 °C	5 minutos
	94 °C	1 minuto
	59 °C	1 minuto
	72 °C	1 minuto e 30 segundos
<b>Extensão final (final dos 35 ciclos)</b>	72 °C	10 minutos

#### 4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

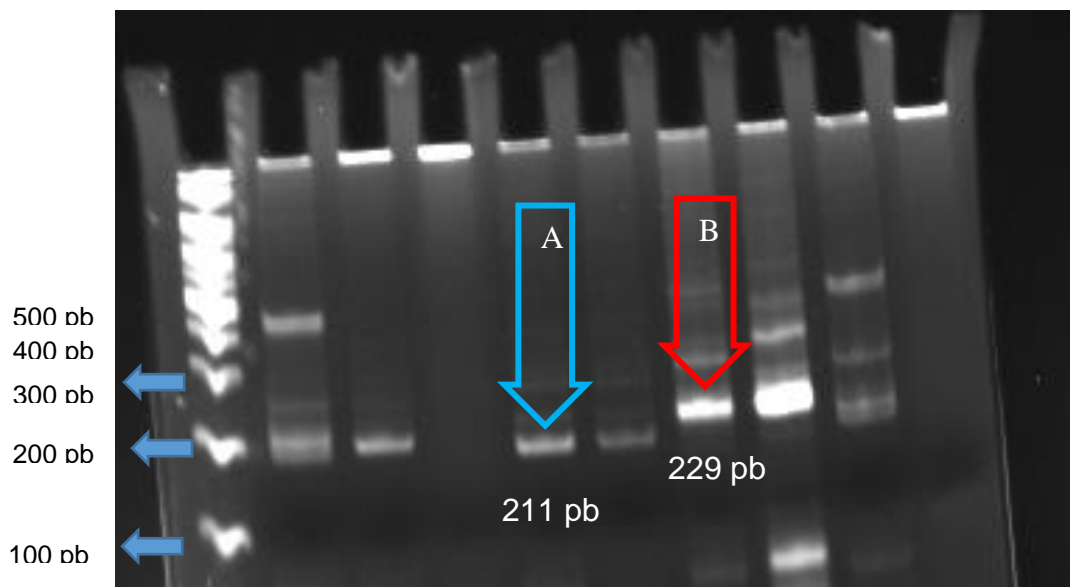
A análise da reação de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, observando-se o padrão de bandas. As amostras receberam 5 µL de azul de bromofenol e 1 µL de *GelRed* para possibilitar sua visualização no gel de poliacrilamida 10%. Além disso, no primeiro poço do gel foi depositado 5 µL do marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder RTU (Ready-to-Use)* com 1 µL de *GelRed*. Em seguida, o gel de poliacrilamida foi submetido a uma voltagem de 100 mV durante 10 minutos e 120 mV por 110 minutos e a leitura do gel foi realizada utilizando um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia). Essa leitura baseou-se na



formação de bandas de 229 pb e 211 pb, sendo que a presença somente da primeira demonstra uma inserção de 18 pb no homozigoto e a presença somente da segunda mostra uma deleção de 18 pb no homozigoto. Para a determinação do heterozigoto foi observado a presença das duas bandas descritas (Fig 5 e 6).



**Figura 4:** Gel de poliacrilamida amostras distintas de pacientes acometidos com LES. seta indica uma amostra de heterozigoto VEGF 18 pb ID. Com marcador de peso molecular de 100 pb ao lado



**Figura 5:** Gel de poliacrilamida amostras distintas de pacientes acometidos com LES. A) homozigoto VEGF 18 pb DD; B) homozigoto VEGF 18 pb II; com marcador de peso molecular de 100 pb ao lado

#### 4.8. Análise dos dados

Dados clínicos dos pacientes foram obtidos por meio da revisão de prontuários médicos. Esses dados clínicos descrevem o tempo do diagnóstico da doença, sistema inicialmente envolvido, história atual da doença, antecedentes patológicos, antecedentes epidemiológicos e sociais, antecedentes familiares, exames complementares e critérios ACR. Com estes dados, estudos de associação entre a presença do polimorfismo genético e o determinado dado clínico foram obtidos, com o uso da estatística qui-quadrado.

Para associação das características clínicas para cada genótipo foi aplicado o teste qui-quadrado e o nível de significância adotado foi de 5%. Foram obtidas as frequências alélicas e genotípicas, o *Odds ratio* (OR) e utilizado intervalo de confiança (IC) de 95%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos demonstram que fatores angiogênicos circulantes no soro, como o VEGF, podem ser considerados marcadores circulantes da atividade de LES, por ser encontrado em concentrações mais elevadas em indivíduos com LES que na população saudável (LIU et al., 2015). Em linha, foi demonstrado que no LES o VEGF apresenta um papel importante no processo da neovascularização e nefrite. Também já foi relatado que os níveis de VEGF são mais elevados em pacientes com LES ativa, ao compará-los com pacientes saudáveis demonstrando a relação entre esse fator genético e a evolução da doença (BARBULESCU et al., 2015).

Diversos estudos apontam para a associação de polimorfismos no gene do VEGF e o desenvolvimento e desfecho de doenças autoimunes, como por exemplo, o LES (WONGPIYABOVORN et al., 2010). Tal relação poderia estar relacionada aos níveis de VEGF circulante, uma vez que tais polimorfismos podem estar relacionados à maior ou menor expressão do gene do VEGF, como por exemplo, o polimorfismo na posição -2549 (I/D 18 pb), em que a presença de -2549 D/D e I/D estão associados a maior produção de VEGF que o I/I (YANG et al., 2003; TAHA et al., 2016).

No presente estudo, a frequência alélica e genotípica dos pacientes com LES e a dos pacientes saudáveis pode ser observada (tabelas 4 e 5). Dentre os pacientes com LES, 50,82% apresentam alelo de deleção (D) e 49,18% tem alelo de inserção (I), quando comparado com o controle saudável os valores são similares (alelo deleção apresentou 48,48% e alelo inserção apresentou 51,52%). Em relação aos genótipos, os resultados também são similares quando comparados os pacientes com LES e controle saudável, sendo que a presença do genótipo deleção/deleção (DD) foi observado em 22,95% dos pacientes com LES e em 24,24% dos indivíduos saudáveis; a presença do genótipo inserção/deleção (ID) foi observada em 55,74% dos pacientes com LES e em 48,48% dos indivíduos saudáveis; por fim, a presença do genótipo inserção/inserção (II) foi observada em 21,31% dos pacientes com LES e em 27,27% dos indivíduos saudáveis.

**Tabela 4.** Frequência alélica dos pacientes portadores de LES e controle saudável.

Grupos de pacientes	ALELOS		Valor de P
	Deleção (D)	Inserção (I)	
<b>LES</b>	50,82 %	49,18 %	
<b>Controle</b>	48,48 %	51,52 %	
<b>LES X Controle</b>			0,8786

**Tabela 5.** Frequência genotípica dos pacientes portadores de LES e controle saudável.

Grupos dos pacientes	Deleção/Deleção	Inserção/Deleção	Inserção/Inserção (II)
	(DD)	(ID)	
<b>LES</b>	0,2295	0,5574	0,2131
<b>Controle</b>	0,2424	0,4848	0,2727
<b>LES X Controle</b>	1,0000*	0,5237*	0,6114*

\*Valor de p.

Não houve diferenças significantes ( $p > 0,05$ ) entre as frequências alélicas e genotípicas de pacientes acometidos de LES e indivíduos saudáveis. Diversos estudos apontam para a associação de polimorfismos no gene do VEGF e o desenvolvimento e desfecho de doenças autoimunes, como por exemplo, o LES. Nessa linha, um estudo recente demonstrou que O SNP G1612A (rs10434) do gene VEGF pode representar um aumento na susceptibilidade ao envolvimento neuropsiquiátrico em pacientes com LES (TAHA et al., 2017). Outro estudo mostrou que não houve diferença na frequência de alelos e genótipos de polimorfismos do gene VEGF (-460 (C/T) e +405 (C/G)) entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e controles saudáveis. No entanto, este mesmo estudo mostrou que o polimorfismo +405 GG foi significativamente associado a pacientes com nefrite lúpica (LN) com baixa expressão de mRNA de VEGF (WONGPIYABOVORN et al., 2010).

A análise do polimorfismo na posição -2549 (I/D 18 pb) se justificava na hipótese de que os níveis de VEGF circulante poderia influenciar no desenvolvimento do LES, uma vez que a presença de -2549 D/D e I/D estão associados a maior produção de VEGF (YANG et al., 2003). Porém, não foram encontradas diferenças, para esse polimorfismo, entre as frequências alélicas e genótípicas em pacientes acometidos por lúpus e indivíduos saudáveis.

Por outro lado, ao se relacionar os genótipos avaliados (DD; ID; II) dos pacientes com LES com os critérios de classificação ACR (Tabela 7), associando os dois genótipos que contém o alelo I em apenas um grupo, observou-se uma relação estatisticamente significativa ( $p = 0,034$ ) entre os genótipos e as alterações imunológicas que podem ocorrer com o paciente, sendo que a maior parte dos casos (81,6%) que apresentaram esses sintomas apresentavam o alelo I presente no genótipo. Com isso, pode-se dizer que o genótipo DD confere a proteção contra essas alterações nos pacientes. O genótipo DD está relacionado com a expressão aumentada de VEGF (YANG et al., 2003), já a ação desta molécula na proteção contra o aparecimento dessas alterações imunológicas (produção de anticorpos autorreativos) ainda é um campo a ser estudado.

**Tabela 6.** Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene VEGF (-2549 I/D 18 pb) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistemico (LES) conforme os critérios ACR.

	<b>VEGF -2549I/D (rs35569394)</b>							
	DD		ID / II		P	OR	IC (OR)	
	N	%	N	%				
<b>ARTRITE NÃO EROSIVA – ACR</b>	15	26,3	42	73,7	0,308	0,35	0,04-2,77	
<b>RASH MALAR - ACR</b>	9	27,3	24	72,7	0,920	0,93	0,31-2,88	
<b>LESÕES DISCOIDES – ACR</b>	1	11,1	8	88,9	0,215	0,28	0,03-2,44	
<b>FOTOSENSIBILIDADE – ACR</b>	12	34,3	23	65,7	0,194	2,19	0,66-7,27	

<b>SEROSITES – ACR</b>	3	17,6	14	82,4	0,218	0,46	0,11-1,86
<b>NEFRITES – ACR</b>	7	23,3	23	76,7	0,439	0,64	0,21-1,98
<b>HEMATOLÓGICO – ACR</b>	14	27,5	37	72,5	0,572	0,88	0,20-3,90
<b>ÚLCERAS ORAIS/NASAIS - ACR</b>	2	18,2	9	81,8	0,350	0,52	0,10-2,69
<b>FAN – ACR</b>	17	27,9	44	72,1	0,999	NA	NA
<b>ALTERAÇÃO IMUNOLÓGICA – ACR</b>	7	18,4	31	81,6	0,034	0,29	0,09-0,94
<b>PSICOSE CONVULSÕES - ACR</b>	2	33,3	4	66,7	0,540	1,33	0,22-8,05

Um estudo realizado com a população indiana, analisando o mesmo polimorfismo, também mostrou que pacientes com o alelo D tinham uma menor predisposição a desenvolver câncer de mama (KAPAH I et al., 2013). E de acordo com Keshavarzi et al. (2017) a presença do alelo D também exerce influência sobre a predisposição de se desenvolver leiomioma (mioma uterino), pois as pacientes que apresentavam o genótipo II tinham um risco 1,5 maior quando comparadas aos grupos com genótipos DD ou DI.

Em contrapartida, Bruyère et al. (2010) observou que pacientes que apresentavam o alelo D tinham um aumento do risco de desenvolver carcinoma de células renais; e também foi observado por Buraczynska et al. (2006) e Amle et al. (2015), que o alelo D está envolvido no aumento da susceptibilidade da retinopatia diabética e nefropatia diabética em indivíduos com diabetes mellitus tipo II.

Ao avaliar as características de alterações imunológicas indicadas pelo critério ACR tem-se os anticorpos decisivos no diagnóstico, de acordo com o descrito por SATO (2008):

- FAN: Fatores Antinucleares. É encontrado na maior parte dos pacientes com LES (95%), sendo que durante o curso da doença pode-se apresentar mais de um anticorpo (60% dos casos).

- Anticorpo anti-Sm: É considerado específico para diagnóstico de LES, com sensibilidade de 30%;
- Anticorpo anti-RNP: É inespecífico, estando presente em 40% dos casos;
- Anticorpo anti-Ssa/anti-Ro: Não é específico (presente em 40% dos casos), podendo ser encontrado também na lesão cutânea fotossensível, lúpus neonatal, lúpus cutâneo subagudo e síndrome de Sjögren;
- Anticorpo anti-Ssb/anti-La: Também não é específico, estando presente em 15% dos casos e em pacientes com síndrome de Sjögren;
- Anticorpo anti-DNA/Ds: É específico para o diagnóstico sendo considerado um marcador da atividade de LES, porém apresenta baixa sensibilidade.
- Complemento: a queda dos valores representa um dos indicadores de atividade da doença;
- Anticardiolipinas: estão associados com o desenvolvimento de trombos e fenômenos gestacionais como, eclampsia, óbito intra-uterino, pré-eclampsia e abortamentos;
- Inibidor Lúpico: Conhecido também por anticoagulante lúpico. Sua positividade é dependente do teste utilizado para avaliação e são necessários, no mínimo, 2 testes com metodologias diferentes para validar seu resultado.

Olhando detalhadamente quais são as alterações imunológicas descritas dentro dos critérios de classificação ACR não foi possível identificar qual foi o anticorpo mais prevalente (Tabela 8), e isso ocorreu pela falta da identificação desses anticorpos em todas as amostras.

**Tabela 7.** Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene VEGF (-2549 I/D 18 pb) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) conforme o critério ACR alterações imunológicas.

	<b>VEGF -2549I/D (rs35569394)</b>						
	DD		ID / II		P	OR	IC(OR)
	N	%	N	%			
<b>FAN – ALTERADO</b>	17	27,9	44	72,1	0,999	NA	NA
<b>Sm – ALTERADO</b>	2	12,5	14	87,5	0,200	0,36	0,07-1,94

<b>RNP – ALTERADO</b>	3	21,4	11	78,6	0,542	1,26	0,25-6,22
<b>Ssa/Ro – ALTERADO</b>	3	13,6	19	86,4	0,181	0,37	0,08-1,73
<b>Ssb/La – ALTERADO</b>	1	11,1	8	88,9	0,383	0,41	0,04-3,76
<b>ANTI Ds DNA – ALTERADO</b>	5	18,5	22	81,5	0,108	0,39	0,10-1,27
<b>COMPLEMENTO – ALTERADO</b>	10	24,4	31	75,6	0,386	0,60	0,19-1,92
<b>ANTICARDIOLIPINA – ALTERADO</b>	3	37,5	5	62,5	0,335	2,7	0,33-21,98
<b>INIBIDOR LÚPICO – ALTERADO</b>	0	0,0	0	0,0	0,999	NA	NA

Com relação às alterações diversas no LES, não foram encontradas nenhuma diferença significativa entre os genótipos, mostrando que esse polimorfismo não exerce uma influência na susceptibilidade em adquirir tais distúrbios ou eventos (Tabela 9). Em um estudo realizado por Bleda et al. (2012) com pacientes diabéticos também não foi encontrada nenhuma relação entre o polimorfismo na região -2549 I/D e a frequência de doença arterial periférica que pode levar a aterosclerose. Aggarwal et al. (2011) também mostrou que a frequência genotípica do polimorfismo em questão não tem relação com abortos espontâneos recorrentes em mulheres que vivem ao norte da Índia.

**Tabela 8.** Relação genótipos VEGF e alterações diversas.

	<b>VEGF -2549I/D (rs35569394)</b>						
	<b>DD</b>		<b>ID / II</b>		<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC (OR)</b>
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>			
<b>DISLIPIDEMIA</b>	1	16,7	5	83,3	0,460	0,49	0,05-4,51
<b>HIPERTENSÃO ARTERIAL</b>	6	27,3	16	72,7	0,823	0,95	0,30-3,07



<b>TROMBOSE VENOSA</b>	0	0,0	4	100,0	0,260	NA	NA
<b>TROMBOSE ARTERIAL</b>	0	0,0	0	0,0	0,999	NA	NA
<b>IAM</b>	0	0,0	1	100,0	0,721	NA	NA
<b>AVC</b>	0	0,0	0	0,0	0,999	NA	NA
<b>LEUCOPENIA</b>	6	18,8	26	81,3	0,090	0,97	0,10- 1,20
<b>LINFOPENIA</b>	9	20,9	34	79,1	0,060	0,33	0,10- 1,08
<b>PLAQUETOPENIA</b>	4	28,6	10	71,4	0,599	1,04	0,27- 3,93
<b>ARTRITE</b>	14	25,0	42	75,0	0,126	0,22	0,03- 1,47
<b>ABORTAMENTOS</b>	5	33,3	10	66,7	0,407	1,42	0,40- 4,99

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu para o entendimento da influência do polimorfismo -2549 na região promotora do VEGF em pacientes com LES, visando entender sua etiologia complexa e sua relação com a genética de cada indivíduo.

Com os resultados pôde-se elucidar uma relação significativa entre o polimorfismo e as alterações imunológicas sofridas pelos portadores do LES, que podem influenciar, por exemplo, na sua contribuição durante a formação da placa de ateroma na aterosclerose. Foi possível obter dados significativos para comprovar a influência do genótipo no risco de ser adquirir ou não esses distúrbios, podendo ainda inferir que o risco é aumentado quando o paciente porta o alelo inserção (I) independentemente de ser homocigoto para inserção (II) ou heterocigoto (ID). Embora, não tenha sido possível analisar qual anticorpo antinuclear tem sua expressão aumentada com a atividade do gene em questão.

Apesar dos resultados obtidos no estudo, ainda é necessário um maior número amostral para que possamos obter conclusões mais concretas. Ainda, mais estudos envolvendo o LES e VEGF devem ser realizados no intuito de buscar a real participação desse fator na patogenia da doença, dentre eles mais estudos que possam avaliar níveis de VEGF circulante e outros polimorfismos relacionados a esse gene.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K; LICHTMENS, Andrew H.; PILLAI, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AGGARWAL, Shagun et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in North Indian patients with recurrent miscarriages. *Reproductive biomedicine online*, v. 22, n. 1, p. 59-64, 2011.

AMLE, Dnyanesh et al. Association of 18bp insertion/deletion polymorphism, at- 2549 position of VEGF gene, with diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus patients of North Indian population. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, v. 14, n. 1, p. 19, 2015.

BĂRBULESCU, ANDREEA-LILI et al. Vascular endothelial growth factor in systemic lupus erythematosus—correlations with disease activity and nailfold capillaroscopy changes. *Romanian journal of morphology and embryology= Revue roumaine de morphologie et embryologie*, v. 56, n. 3, p. 1011, 2015.

BLEDA, Silvia et al. Impact of VEGF polymorphisms on the severity of peripheral artery disease in diabetic patients. *Growth Factors*, v. 30, n. 5, p. 277-282, 2012.

BURACZYNSKA, Monika et al. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 22, n. 3, p. 827-832, 2006.

BRUYÈRE, Franck et al. VEGF polymorphisms are associated with an increasing risk of developing renal cell carcinoma. *The Journal of urology*, v. 184, n. 4, p. 1273-1278, 2010.

DE LAAT, Bas; MERTENS, Koen; DE GROOT, Philip G. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies—from clinical association to pathologic mechanism. *Nature clinical practice Rheumatology*, v. 4, n. 4, p. 192-199, 2008.

ESDAILE, John M. et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, v. 44, n. 10, p. 2331-2337, 2001.

FERRARA, Napoleone. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FERRARA, Napoleone; HENZEL, William J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 161, n. 2, p. 851-858, 1989.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology Revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, v. 40, n. 9, p. 1997, 1997.

HUANG, Liuye et al. The Impact of T Cell Vaccination in Alleviating and Regulating Systemic Lupus Erythematosus Manifestation. *Journal of Immunology Research*, v. 2016, 2016.

KAPAHI, Ruhi et al. Association of -2549 Insertion/Deletion Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor with Breast Cancer in North Indian Patients. *Genetic testing and molecular biomarkers*, v. 17, n. 3, p. 242-248, 2013.

KESHAVARZI, Farshid et al. The -2549 insertion/deletion polymorphism of VEGF gene associated with uterine leiomyoma susceptibility in women from Southeastern Iran. *Ginekologia Polska*, v. 88, n. 3, p. 115-119, 2017.

LAUVSNES, Maria B.; OMDAL, Roald. Systemic lupus erythematosus, the brain, and anti-NR2 antibodies. *Journal of neurology*, v. 259, n. 4, p. 622-629, 2012.

LIU, J. et al. Investigating the role of angiogenesis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 24, n. 6, p. 621-627, 2015.

LIU, Zheng; DAVIDSON, Anne. Taming lupus [mdash] a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nature medicine*, v. 18, n. 6, p. 871-882, 2012.

MANNU, Claudia et al. Comparison of different DNA extraction methods from peripheral blood cells: advice from the Fondazione Italiana Linfomi Minimal Residual Disease Network. *Leukemia & lymphoma*, v. 57, n. 2, p. 400-410, 2016.

NARSHI, C. B.; GILES, I. P.; RAHMAN, A. The endothelium: an interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus?. *Lupus*, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2011.

PETERS, Kevin G. *Vascular endothelial growth factor and the angiopoietins*. 1998.

SATO, Emilia I. *Lúpus Eritematoso Sistêmico*. Voltarelli 29. Indd 651, 2008. Capítulo 29.

SCHLONDORFF, Detlef O. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney international*, v. 74, n. 7, p. 860-866, 2008.

SENGER, Donald R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, v. 219, n. 4587, p. 983-985, 1983.

SHEN, Nan; TSAO, Betty P. Current advances in the human lupus genetics. *Current rheumatology reports*, v. 6, n. 5, p. 391-398, 2004.

SIMONS, Michael; GORDON, Emma; CLAESSION-WELSH, Lena. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 17, n. 10, p. 611-625, 2016.

SYMMONS, Deborah PM; GABRIEL, Sherine E. Epidemiology of CVD in rheumatic disease, with a focus on RA and SLE. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 7, n. 7, p. 399-408, 2011.

TAHA, Sherif et al. Polimorfismo genético do fator de crescimento vascular endotelial G1612A (rs10434) e manifestações neuropsiquiátricas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2017

TAN, E. M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, v. 25, n. 11, p. 1271–1277, 1982.

UNGERBÄCK, Jonas et al. Analysis of VEGF polymorphisms, tumor expression of VEGF mRNA and colorectal cancer susceptibility in a Swedish population. *Mol Med Report*, v. 2, p. 435-439, 2009.

VIELHAUER, Volker; ANDERS, Hans-Joachim; SCHLÖNDORFF, Detlef. Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in lupus nephritis. In: *Seminars in nephrology*. WB Saunders, 2007. p. 81-97.

VINCENTI, V.; CASSANO, C.; ROCCHI, M.; PERSICO, G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* v. 93, p. 1493–1495, 1996

WEI, Ni et al. Polymorphism of VEGF gene in susceptibility to chronic immune-mediated inflammatory diseases: a meta-analysis. *Rheumatology international*, v. 35, n. 8, p. 1351-1360, 2015.

WONGPIYABOVORN, J. et al. The association of single nucleotide polymorphism within vascular endothelial growth factor gene with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *International journal of immunogenetics*, v. 38, n. 1, p. 63-67, 2011.

YANG, Bingmei et al. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications*, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2003.

## 8 ANEXO

## Aprovação do projeto pelo comitê de ética



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



## PARECER Nº 309/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 353/09 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS  
ASSOCIADOS AO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial),  
Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 03/11/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 03 de novembro de 2009.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes  
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF  
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br  
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE