



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Estudo Imunohistoquímico das metaloproteinases e do fator transformador de crescimento β na insuficiência venosa crónica dos membros inferiores

António José Grilo Novais

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Dr. Pedro Serralheiro

Coorientador: Professora Doutora Maria Elisa Cairrão

Covilhã, maio de 2015

Dedicatória

Aos meus pais, às minhas irmãs e família.

Agradecimentos

Um especial agradecimento ao meu orientador e coorientadora, Dr. Pedro Serralheiro e Professora Doutora Maria Elisa Cairrão, respetivamente, pela oportunidade única de trabalhar numa área tão interessante, pela motivação, pelos conhecimentos partilhados, pelos momentos de paciência, amizade e dedicação na realização da presente dissertação, sem a qual a realização do trabalho não teria sido possível.

À Dr.^a Catarina Ferreira, pela ajuda, amizade, disponibilidade e apoio prestado nas ocasiões em que tudo parecia uma ilusão. Os dias no laboratório foram sem dúvida melhores na sua companhia. Obrigado por acreditar em mim. Obrigado em partilhar o seu conhecimento comigo.

Ao Professor Jorge Gama, pela ajuda no tratamento estatístico de dados. À Dra. Andreia Soares, pela revisão cuidada deste trabalho e pelas suas sugestões que o ajudaram a tornar-se num todo coerente.

À Leonor Leão, por toda a orientação, amizade e que apesar de longe, está sempre presente e nunca me deixou desistir.

Um muito obrigado pelo companheirismo e amizade dentro das “focas”. Um especial agradecimento ao Tiago, à Sónia, à Sarinha e à Aninhas. Agradecer à Andreia pelos momentos de motivação e inspiração. À Inês Carvalho por esta melhor amizade no final do curso e pelos “ingredientes” secretos para a felicidade e o sucesso!

À Teresa Alves, Cátia Carvalho, Isabel Tadeu e Mariline Ribeiro pelos breves mas eficazes momentos de encorajamento.

Aos meus pais por todo o amor, paciência e apoio demonstrado ao longo de toda a minha vida.

Às minhas irmãs por estarem sempre presentes e por me fazerem ver que a vida não é só estudar.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

Prefácio

“Recomeça...
Se puderes,
Sem angústia e sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro,
Dá-os em liberdade”
In Sísifo, Miguel Torga, Diário XIII

“*Veni, Vidi, Vici*”
Júlio César

Resumo

Introdução: A doença venosa crónica é uma patologia que origina a remodelação estrutural anormal da parede venosa, o desenvolvimento de veias varicosas e alterações dermatológicas veno-específicas. É uma doença caracterizada por uma mantida hipertensão venosa ambulatoria que contribui para a síntese e libertação de várias citocinas, incluindo o fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), pelas células endoteliais e musculares lisas. Este processo inflamatório origina a proliferação de fibroblastos que sintetizam metaloproteinasas (MMPs) e seus inibidores (TIMPs), cujo desequilíbrio resulta na degradação e deposição desregulada de colagénio e elastina na parede venosa. Este processo fisiopatológico ainda não é totalmente compreendido.

Objetivo: Demonstrar a alteração estrutural da parede das veias com insuficiência venosa crónica, bem como as diferenças na marcação imunohistoquímica de MMP-2, de TIMP-2 e de TGF- $\beta 2$ entre veias doentes e saudáveis e entre veias doentes em diferentes estádios.

Métodos: Foi realizado um estudo observacional, transversal, experimental de caso-controlo, com 6 doentes com insuficiência venosa crónica e 3 controlos submetidos a bypass coronário, tendo em consideração o estágio da doença e o género dos indivíduos. Foram colhidas amostras de veia grande safena de três locais anatómicos distintos (inguinal, colateral e maleolar) e foi realizado o estudo imunohistoquímico das amostras com os anticorpos Anti-MMP2, Anti-TIMP2 e o Anti-TGF $\beta 2$.

Resultados: De um modo geral, os resultados obtidos comprovaram a superioridade da espessura das túnicas média e adventícia das veias doentes, quando comparadas com as veias saudáveis, e apontaram a túnica adventícia como a mais afetada pelo processo patológico. Os dados indicaram ainda uma hipotética diminuição de MMP-2, TIMP-2 e TGF- $\beta 2$ em todas as túnicas das veias doentes, quando comparadas com veias saudáveis, e uma possível diminuição de MMP-2 nas veias doentes em estágio avançado, quando comparadas com veias doentes em estágio inicial.

Conclusão: Não obstante as evidentes limitações, este estudo assume alguma relevância na medida em que foi pioneiro na apresentação de resultados imunohistoquímicos em função dos estádios da insuficiência venosa crónica. Seria importante replicá-lo num conjunto significativamente maior de amostras, uma vez que com o conhecimento mais aprofundado da fisiopatologia inerente, poderia ser possível contrariar localmente a desregulação MMP/TIMP, cessando a evolução crónica e inevitável da doença.

Palavras-chave

Insuficiência venosa crônica, imunohistoquímica, MMP-2, TIMP-2, TGF- β 1.

Abstract

Introduction: Chronic venous disease is a pathology that causes abnormal structural remodelling of the vein wall, development of varicose veins and venous-specific skin changes. It is a disease characterized by a maintained ambulatory venous hypertension which contributes to the synthesis and release of several cytokines, including transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), by endothelial and smooth muscle cells. This inflammation causes the proliferation of fibroblasts that synthesize metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). MMPs/TIMPs imbalance results in unregulated degradation and deposition of collagen and elastin in the venous wall. This pathophysiological process is still not fully understood.

Aim: To demonstrate the structural change in vein wall with chronic venous insufficiency, as well as differences in immunohistochemical staining of MMP-2, TIMP-2 and TGF- β 2 between insufficient and healthy veins and between different stages of venous insufficiency.

Methods: An observational, cross-sectional, case-control study was conducted using vein samples of 6 patients (with chronic venous insufficiency) and 3 controls (undergoing coronary bypass), who were selected taking into account the stage of the disease and gender. Great saphenous vein samples, from three different anatomical regions (inguinal, collateral and malleolar), were harvested and the immunohistochemical study of the samples, using Anti-MMP2, Anti-TIMP2 and Anti-TGF β 2 antibodies, was performed.

Results: In general terms, the results showed that tunicae media and adventitia were thicker on insufficient veins, when compared with healthy veins, and identified the tunica adventitia as the most affected by the pathological process. Data also indicated a hypothetical decrease of MMP-2, TIMP-2 and TGF- β 2 in all tunicae of insufficient veins, when compared with healthy veins, and a possible decrease of MMP-2 in insufficient veins in advanced-stage, when compared with their counterparts in early-stage.

Conclusion: Despite obvious limitations, this study assumes relevance because it pioneered the presentation of immunohistochemical results according to chronic venous insufficiency stages. It would be important to replicate it in a significantly larger sample set, in order to achieve a deeper understanding of the inherent pathophysiology and eventually control the MMP/TIMP deregulation, stopping the inevitable evolution of the disease.

Keywords

Chronic venous insufficiency, immunohistochemistry, MMP-2, TIMP-2, TGF- β 1.

Índice

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xix
1. Introdução	1
1.1 Anatomia do sistema venoso dos membros inferiores	2
1.2 Insuficiência venosa crónica.....	3
1.2.1 Conceitos e definições	3
1.2.2 Etiologia	5
1.2.3 Epidemiologia.....	6
1.3 Alterações primárias da parede vascular na insuficiência venosa crónica	6
1.3.1 Degradação da matriz extracelular.....	8
1.3.2 Metaloproteinases e seus inibidores tecidulares	9
1.3.3 Intervenção do fator transformador de crescimento β	9
2. Metodologia de investigação.....	11
2.1 Objetivos e hipóteses de investigação.....	11
2.2 Tipo de estudo	12
2.3 Local e procedimentos de recolha da amostra.....	12
2.4 Procedimentos laboratoriais na preparação e análise das amostras	14
2.4.1 Preparação das secções de veias.....	14
2.4.2 Imunodeteção de MMPs, TIMPs e TGFBR	14
2.4.3 Análise das lâminas.....	19
2.5 Análise estatística dos dados	19
2.6 Considerações éticas e legais	20
3. Resultados	21
3.1 Características demográficas, clínicas e do estilo de vida dos indivíduos	21
3.2 Resultados da análise histológica.....	23
3.2.1 Características morfológicas da parede venosa: Espessura das túnica.....	24
3.3 Resultados da análise imunohistoquímica.....	26
3.3.1 Frequência da marcação dos anticorpos na parede venosa	27
3.3.2 Intensidade da marcação dos Anti-MMP2, Anti-TIMP2 e Anti-TGFBR2 nas camadas da parede venosa.....	31

4. Discussão dos resultados	37
4.1 Morfologia da parede venosa	37
4.2 Imunohistoquímica da parede venosa: consequências da IVC	38
4.3 Imunohistoquímica da parede venosa: variações entre estádios da IVC.....	40
4.4 Limitações do estudo	44
5. Conclusão	45
6. Bibliografia	47
7. Anexos	51

Lista de Figuras

Figura 1 Mecanismos da formação de veias varicosas.	7
Figura 2 Teste controlo positivo - carcinoma ductal invasivo da mama - Anti-MMP2 (400x). .	16
Figura 3 Teste controlo negativo - carcinoma ductal invasivo da mama - Anti-MMP2 (400x).	16
Figura 4 Teste controlo positivo - adenocarcinoma do cólon - Anti-TIMP2 (400x).....	17
Figura 5 Teste controlo negativo - adenocarcinoma do cólon - Anti-TIMP2 (400x).....	17
Figura 6 Teste controlo positivo - córtex cerebral - Anti-TGFBR2 (400x).	18
Figura 7 Teste controlo negativo - córtex cerebral - Anti-TGFBR2 (400x).	18
Figura 8 Estrutura histológica da parede venosa corada com H&E (controlo).....	23
Figura 9 Estrutura histológica da parede venosa, corada com H&E.	24
Figura 10 Imunodeteção de MMP-2.....	48
Figura 11 Imunodeteção de TIMP-2.	48
Figura 12 Imunodeteção de TGFBR2.	26
Figura 13 Imunodeteção de MMP-2.....	48
Figura 14 Imunodeteção de TIMP-2.	48
Figura 15 Imunodeteção de TGFBR2.	26
Figura 16 Imunodeteção de MMP-2.....	49
Figura 17 Imunodeteção de TIMP-2.	49
Figura 18 Imunodeteção de TGFBR2.....	27
Figura 19 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região maleolar em doentes com IVC e controlos.	28
Figura 20 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região maleolar de doentes com IVC em estágio inicial (EI) e estágio avançado (EA).....	29
Figura 21 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região inguinal de doentes com IVC em estágio inicial (EI) e estágio avançado (EA).	30
Figura 22 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região colateral de doentes com IVC em estágio inicial (EI) e estágio avançado (EA).....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Escala de classificação CEAP	4
Tabela 2 - Anticorpos primários - controlos positivos e amostras de veias - diluição para cada anticorpo e respetivo tempo de aplicação	15
Tabela 3 Características demográficas, clínicas e do estilo de vida dos doentes com IVC e dos controlos [média \pm erro padrão e frequências absolutas (frequências relativas)].	21
Tabela 4 Dados descritivos (média \pm erro) da espessura das várias camadas da parede venosa, em função da região (colateral, inguinal e maleolar) e dos grupos de participantes (doentes com IVC e controlos).	24
Tabela 5 Espessura média (média \pm erro) das várias camadas da parede venosa em doentes com IVC e controlos.	25
Tabela 6 Espessura média (média \pm erro) das várias camadas da parede venosa dos diferentes grupos de participantes (estádio inicial, estágio avançado e controlo).	25
Tabela 7 Espessura média (média \pm erro) das várias camadas da parede venosa da região inguinal dos diferentes subgrupos de doentes (estádio inicial e estágio avançado).	25
Tabela 8 Espessura média (média \pm erro) das várias camadas da parede venosa da região colateral dos diferentes subgrupos de doentes (estádio inicial e estágio final).	26
Tabela 9 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes anticorpos nas veias com IVC e controlos.	31
Tabela 10 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes anticorpos nas veias com IVC (no estágio inicial e no estágio avançado) da região maleolar.	32
Tabela 11 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes nas veias com IVC (no estágio inicial e no estágio avançado) da região inguinal.	33
Tabela 12 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes nas veias com IVC (no estágio inicial e no estágio avançado) da região colateral.	34

Lista de Acrónimos

DVC	Doença Venosa Crónica
MMPs	Metaloproteinases
TIMPs	Inibidores Tecidulares das Metaloproteinases
MEC	Matriz Extracelular
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento - beta
CEAP	Clínica, Etiologia, Anatomia, Fisiopatologia
IVC	Insuficiência Venosa Crónica
VGS	Veia Grande Safena
ICAM-1	Molécula-1 de Adesão Intercelular
CICS	Centro de Investigação de Ciências da Saúde
H&E	Hematoxilina & Eosina
TBS-T	Solução de lavagem
DAB	Diaminobenzidina

1. Introdução

A doença venosa crônica definida como disfunção do sistema venoso causada por incompetência valvular, associada ou não à obstrução do fluxo venoso é, hoje em dia, considerada uma patologia crônica e evolutiva que afeta uma grande parte da população mundial. Portugal, pela sua localização e clima, não é exceção, estimando-se que cerca de um terço da nossa população sofra de alterações da macro e microcirculação dos membros inferiores (1). Dada a sua elevada prevalência, os sinais e sintomas da DVC associam-se a elevados custos socioeconómicos, relacionados com o diagnóstico, tratamento e o absentismo laboral significativo (2).

Por ser um fenómeno generalizado na população do mundo ocidental, as estimativas de prevalência de varizes variam consideravelmente em função da população de estudo, idade, género, etnia, métodos de medida e da própria definição da doença. Estima-se que a prevalência seja ligeiramente superior no sexo feminino (3). *Nicolaidis et al.* (4), num estudo realizado na Europa, verificaram que um em cada dois adultos apresentam queixas relativas a sintomas e/ou sinais de doença venosa crônica.

Esta doença pode afetar o sistema venoso superficial, o sistema venoso profundo ou ambos. As varizes, veias dilatadas no tecido subcutâneo, podem ser classificadas segundo a sua etiologia, como primárias, secundárias e congénitas que resultam num processo de disfunção valvular e disfunção parietal das veias. A grande maioria das varizes dos membros inferiores não têm etiologia definida, sendo por isso classificadas como varizes primárias, essenciais ou idiopáticas, também designadas por familiares dada a elevada incidência de antecedentes de varizes na família (predisposição hereditária) (1,4).

A matriz extracelular é uma estrutura complexa e dinâmica que mantém a integridade e homeostase da veia através de várias interações com componentes celulares como o endotélio e as células musculares lisas. A sua degradação parece ser um dos possíveis fatores etiológicos para a dilatação e enfraquecimento das veias. Alteração das fibras elásticas, incluindo fragmentação das lâminas elásticas e espessamento das fibras de colagénio foram observados em veias varicosas. O seu conteúdo de elastina, quando comparado com veias normais, encontra-se diminuído (5). Em geral a deterioração de veias periféricas resulta na dilatação do lúmen e no encerramento insuficiente das válvulas venosas, permitindo o retorno venoso do sistema profundo para o sistema superficial que, por sua vez, desencadeia a hipertensão ortostática no sistema venoso superficial e conseqüente cascata inflamatória (6).

A remodelação da parede venosa parece ser influenciada por vários fatores, dentre os quais um desequilíbrio entre o rácio de metaloproteinases e os seus inibidores tecidulares e um aumento dos níveis de citocinas e de fatores de crescimento na parede venosa, que favorecem alterações na matriz extracelular (7).

As metaloproteínas são homólogas das endopeptidases zinco-dependentes e têm a capacidade de clivar a maioria dos componentes da matriz extracelular (6). Tem-lhes sido atribuído um papel dominante na proteólise da matriz extracelular, na degradação das cúpides das válvulas e no enfraquecimento da estrutura da parede venosa. *Woodsite et al.* acrescentam que a localização das metaloproteínas em camadas específicas na parede das veias varicosas é consistente com o seu papel na degradação da matriz extracelular (8). O fator transformador de crescimento β desempenha um papel crucial na remodelação da parede vascular. Tem efeitos significativos na síntese e degradação de um vasto número de moléculas da matriz extracelular, incluindo diferentes tipos de colagénio e proteoglicanos. Também influencia a síntese de metaloproteínas e dos seus inibidores (9).

Sem tratamento, desenvolvem-se, a longo prazo, vias de recirculação com aumento da insuficiência do sistema venoso profundo e surgem sinais de insuficiência venosa crônica, uma forma avançada de DVC caracterizada por uma hipertensão venosa ortostática continuada e ainda alterações dermatológicas veno-específicas (edema, hiperpigmentação da derme, eczema, lipodermatoesclerose e por último ulceração) (10,11).

O trabalho de investigação que consubstancia esta tese versa sobre o estudo imunohistoquímico de metaloproteínas e do transformador de crescimento β na insuficiência venosa crônica dos membros inferiores. A estrutura da presente tese conta com uma breve revisão da literatura, a descrição da metodologia, a apresentação dos resultados e discussão dos resultados e, finalmente, a conclusão.

1.1 Anatomia do sistema venoso dos membros inferiores

O sistema venoso dos membros inferiores encontra-se dividido em três sistemas - superficial, profundo e perfurante - localizados em dois compartimentos principais: o compartimento superficial, limitado profundamente pela fásia muscular/aponevrose e superficialmente pelo plano cutâneo, e o compartimento profundo, que é limitado superficialmente pela fásia muscular e contém as veias profundas. As veias perfurantes unem o sistema superficial ao profundo (12,13).

As veias profundas dentro dos músculos gemelares convergem para formar a veia poplítea, que por sua vez se transforma na veia femoral, de seguida em veia femoral comum, veia ilíaca e, por fim, em veia cava inferior (14,15).

Existem duas veias principais no sistema superficial, a pequena e a grande safena. A veia pequena safena tem origem na porção lateral do arco venoso do pé, percorre a parte posterior da perna e junta-se à veia poplítea atrás do joelho. A veia grande safena, com origem na porção medial do arco venoso do pé, drena para a veia femoral comum (na região do triângulo de Scarpa) (14,15). O principal objetivo da circulação venosa é fazer regressar o sangue ao coração

para que ocorra reoxigenação no pulmão e o sangue seja novamente lançado no sistema arterial. Dependendo do nível de atividade e postura, 60-80% da totalidade do sangue reside no sistema venoso, sendo que 25-50% deste volume se encontra nas pequenas vénulas pós-capilares e respetivos sistemas coletores (1).

Existem várias estruturas necessárias para o retorno do sangue ao coração, tais como (i) o próprio coração, (ii) a bomba venosa periférica (músculos da região gemelar), (iii) o plexo venoso plantar (iv) e as válvulas venosas. Estas estruturas levam a um gradiente de pressão, que permite o retorno venoso, contrariando a gravidade. Consideram-se ainda fatores adjuvantes do retorno a força da aspiração respiratória durante a inspiração, a força de inércia do sangue arterial a entrar nos capilares venosos e vénulas e a força da compressão da sístole arterial sobre as veias circulantes (1).

O compartimento superficial é um compartimento de baixa pressão enquanto o compartimento profundo é de alta pressão devido principalmente à ação dos músculos da perna (1,8,14).

Normalmente, em cada contração muscular (“sístole muscular”), as válvulas das veias perfurantes encerram para manter a alta pressão das veias profundas evitando que esta pressão seja transferida para as veias superficiais. Quando os músculos relaxam (“diástole muscular”), a pressão nas veias profundas (e consequentemente no compartimento profundo) torna-se temporariamente inferior à pressão do sistema venoso superficial. O sangue flui então das veias superficiais, através das perfurantes, para as veias profundas. A próxima contração muscular resultará então, de novo, no encerramento das válvulas perfurantes e o sangue é de novo bombeado proximalmente nas veias profundas (16).

1.2 Insuficiência venosa crónica

1.2.1 Conceitos e definições

A classificação CEAP (Clínica, Etiologia, Anatomia, fisiopatologia) é um método internacionalmente aceite para classificar a doença venosa. Esta classificação (tabela 1) tem como objetivo servir de guia sistemático para um melhor diagnóstico clínico e caracterização dos doentes com patologia venosa, permitindo encontrar uma melhor racionalização de tratamento para cada perfil de doente (1,17).

Tabela 1 Escala de classificação CEAP.

CLINICA
C0: sem patologia venosa
C1: Telangiectasias ou varizes reticulares
C2: Varizes tronculares
C3: Edema
C4: Alterações tróficas
C5: Úlcera Cicatrizada
C6: Úlcera ativa
ETIOLOGIA
Ec: Congénita
Ep: Primária
Es: Secundária (pós-trombótica)
En: sem etiologia identificada
ANATOMIA
As: Sistema venoso superficial
Ad: Sistema venoso profundo
Ap: Sistema venoso perforante
Na: sem localização identificada
FISIOPATOLOGIA
Pr: Refluxo
Po: Obstrução
Pr,o: Refluxo e Obstrução
Pn: sem processo fisiopatológico identificado

O termo doença venosa crónica (DVC) inclui todas as anormalidades morfológicas e funcionais do sistema venoso dos membros inferiores. O termo Insuficiência Venosa Crónica (IVC) foi aplicado na literatura científica e médica para se referir a alterações funcionais (refluxo, obstrução ou uma combinação dos dois) do sistema venoso. Este último conceito é frequentemente reservado a doentes com edema (C3), alterações dermatológicas (C4) ou úlceras venosas (C5/6) (18).

De acordo com o documento *Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document*: (19)

Alterações Venosas Crónicas: este termo inclui todo o espectro de anormalidades morfológicas e funcionais do sistema venoso;

Doença Venosa Crônica (DVC): diz respeito às anormalidades morfológicas e funcionais de longa duração do sistema venoso, manifestada tanto pelos seus sintomas e/ou sinais que indicam a necessidade de investigação e/ou tratamento;

Insuficiência Venosa Crônica (IVC): é um termo reservado para doenças venosas crônicas avançadas, que é aplicada a anormalidades funcionais do sistema venoso e que resulta em edema, alterações dermatológicas ou úlceras venosas (de acordo com a escala CEAP, inclui as doenças venosas classificadas no intervalo de C3 a C6);

Veias Varicosas: são veias dilatadas no tecido subcutâneo, com 3mm ou mais de diâmetro na posição ortostática. Estas podem envolver veias safenas, tributárias das safenas, ou veias não-safenas. As veias varicosas são normalmente tortuosas. Sinónimos incluem variz, varizes, e varicosidades;

Refluxo Venoso: fluxo venoso retrógrado de duração anormal em qualquer segmento venoso. Este pode ser classificado de primário (causado por disfunção venosa valvular idiopática), secundário (causado por trombose, trauma, ou etiologias mecânicas, térmicas ou químicas), congênito (causado pela ausência ou desenvolvimento anormal das válvulas venosas).

1.2.2 Etiologia

De acordo com a escala CEAP, a etiologia de DVC pode ser classificada da seguinte forma: (17)

- (i) E_c : congénita
- (ii) E_p : primária
- (iii) E_s : secundária (pós-trombótica)
- (iv) E_n : sem causa venosa identificada

A etiologia e patogénese das veias varicosas primárias (E_p) continua por esclarecer. A incompetência valvular é frequentemente observada e, desde há muito tempo, considerada como causa primária da fraqueza e dilatação da parede venosa. Contudo, esta hipótese tem sido contraposta recentemente com evidências a sugerir que alterações primárias na parede venosa podem preceder a disfunção valvular (5).

Vários fatores predisponentes podem contribuir para a formação de veias varicosas. História familiar, idade, género e gravidez são os mais importantes (5).

A IVC ocorre quando o fluxo sanguíneo normal é perturbado. Esta perturbação pode ocorrer no sistema venoso superficial e/ou profundo, ou mesmo nas veias perfurantes (5).

O fluxo sanguíneo alterado nas veias varicosas resulta em estase sanguínea e em refluxo. A causa e sequência de tais eventos, que levam ao fluxo sanguíneo ineficiente, mantêm-se por esclarecer, ainda que a insuficiência valvular, a fraqueza da parede venosa e a dilatação venosa

sejam características associadas às veias varicosas. Pensa-se que estas características possam causar ou serem causadas pela estase sanguínea, que gera hipertensão venosa nos membros inferiores (5).

1.2.3 Epidemiologia

A DVC é uma condição debilitante com prevalência entre 60-70% na população mundial e entre 30-40% dos adultos na população Europeia (20).

De acordo com a última publicação da *Official Journal of International Union of Angiology* (18), os mais recentes estudos mostraram um impacto socioeconómico considerável nos países ocidentais, devido à sua prevalência, custo de investigação e tratamento, e perda de dias úteis de trabalho.

As veias varicosas estão presentes em 25-33% das mulheres e em 10-40% dos homens adultos. A incidência anual de varizes é de 2,6% nas mulheres e 1,9% nos homens (18).

De acordo com a Sociedade Portuguesa de Angiologia e Cirurgia Vasculiar (1), os dados epidemiológicos nacionais referem que: 2 milhões de mulheres com mais de 30 anos sofrem de DVC, 7 em cada 10 mulheres com mais de 30 anos sofrem de problemas de circulação venosa e metade ainda não está tratada, 1/3 da população portuguesa, no geral, sofre de DVC. Os dados socioeconómicos mostram ainda que 8% dos doentes se reformam antecipadamente devido à doença venosa. Quanto à qualidade de vida, 48% da população portuguesa sofre regularmente de dor nos tornozelos e/ou nas pernas; 58% e 64% da população feminina, com mais de 40 e 50 anos de idade, respetivamente, sente a sua qualidade de vida significativamente afetada pela DVC (1).

1.3 Alterações primárias da parede vascular na insuficiência venosa crónica

A parede venosa é constituída por três camadas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. Fibras musculares, colagénio, fibroblastos, células musculares lisas e vasa vasorum formam a túnica adventícia. A túnica média é composta por colagénio, elastina, proteoglicanos e três camadas de células musculares lisas, incluindo uma camada interna longitudinal (que é mais espessa em locais com válvulas), uma camada circular e uma camada externa longitudinal. A túnica íntima consiste em células endoteliais e é suportada por uma lâmina elástica interna. Existe um balanço dinâmico entre a produção e degradação de colagénio, elastina, células musculares lisas e proteoglicanos (21).

As veias varicosas primárias são funcionalmente caracterizadas pelo retorno venoso e aumento da estase sanguínea na posição supina. Dilatação e tortuosidade concedem evidência para uma

remodelação progressiva da parede venosa, com distúrbio da organização da matriz extracelular/células musculares lisas (22).

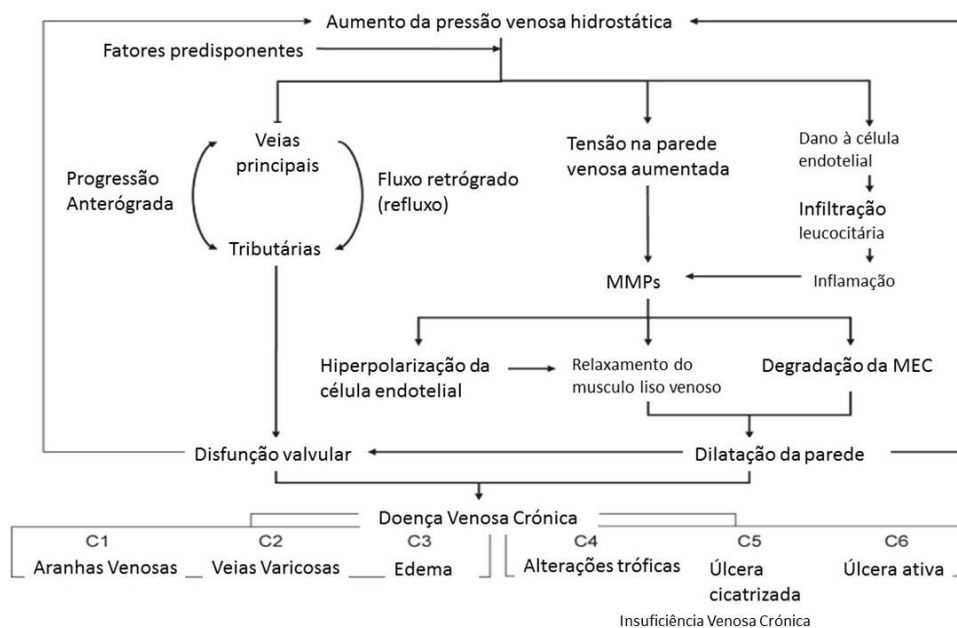


Figura 1 Mecanismos da formação de veias varicosas. Adaptado de Raffetto et al. Mechanisms of varicose vein formation, 2008.

As áreas afetadas não se encontram uniformemente distribuídas. Existem áreas hipertróficas assim como áreas de veia atróficas e áreas não alteradas. Área de hipertrofia e proliferação de células musculares lisas ocorrem na túnica média das veias varicosas. Células musculares lisas em veias varicosas aparecem desorganizadas e indiferenciadas (5,22).

Nas veias varicosas a organização das camadas encontra-se largamente destruída: os feixes de células musculares lisas perdem a orientação longitudinal ou circular e uma acumulação de tecido fibroso interpõe-se entre os feixes regulares de músculo liso. Observa-se ainda um aumento difuso da espessura da íntima (23).

Áreas de hiperplasia irregular da íntima com depósitos de colagénio associados, infiltrados de células musculares lisas, são alterações comumente vistas em veias varicosas (23).

Similarmente, a adventícia de veias varicosas demonstra áreas de aumento das células musculares lisas, fibroblastos e tecido conjuntivo, com regiões de atrofia onde se denota a ausência de *vasa vasorum* (5,23).

Nos segmentos hipertróficos, o número total de *vasa vasorum* encontra-se aumentado. Os *vasa vasorum* apresentam um diâmetro maior e mais irregular, e demonstram um aumento da espessura do vaso com acumulação de tenascina e células musculares lisas (23).

As alterações mais marcadas entre veias varicosas e não varicosas localizam-se na túnica média da parede venosa. Verifica-se perda da arquitetura desta camada devido à infiltração de tecido conjuntivo. A túnica íntima demonstra hipertrofia devido a semelhante infiltração e tecido conectivo. As alterações avaliadas contrastam com amostras de VGS obtidas de *bypass* cirúrgico, que evidenciam hipertrofia de predomínio de células musculares lisas da túnica média (24).

1.3.1 Degradação da matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é constituída por várias proteínas: colagénio, proteoglicanos, elastina, glicoproteínas e fibronectina. Esta estrutura dinâmica mantém a integridade e homeostase da veia através de várias interações com componentes celulares, como o endotélio e as células musculares lisas (5).

A MEC da parede vascular constitui um suporte essencial, uma base de trabalho necessária para as propriedades funcionais e estruturais das paredes dos vasos sanguíneos (elasticidade e resistência ao estiramento). As duas macromoléculas principais da MEC são o colagénio e a elastina. Estas macromoléculas são sintetizadas por três tipos de células, constituintes da parede vascular: endoteliais (íntima), musculares lisas (média) e fibroblastos (adventícia) (22,25).

A MEC é também constituída por colagénio. Dentro dos 19 tipos de colagénio descritos, o colagénio tipo I e o colagénio tipo III são os constituintes *major* detetados nos vasos (22).

A sua degradação parece ser um dos possíveis fatores etiológicos para a dilatação e enfraquecimento das veias. Alteração das fibras elásticas, incluindo fragmentação das lâminas elásticas e espessamento das fibras de colagénio foram observados em veias varicosas. O conteúdo de elastina em veias varicosas, quando comparado com veias normais, encontra-se diminuído. Relativamente ao colagénio examinado nas células de músculo liso de veias varicosas, observa-se que o colagénio tipo III, que contribui para a elasticidade, encontra-se diminuído, enquanto o colagénio tipo I, que é responsável pela força tensional, está aumentado nas veias varicosas (5,20).

Alteração no rácio colagénio tipo I/colagénio tipo III poderá contribuir para a fraqueza e diminuição da elasticidade das veias varicosas (20).

O *turnover* metabólico das fibras de elastina e colagénio é relativamente lento, contudo a sua degradação e fragmentação encontra-se aumentada em doenças vasculares. As enzimas colageniolíticas e elastinolíticas são encontradas em vários tecidos, nomeadamente em neutrófilos polimorfonucleares e em monócitos/macrófagos. As enzimas colageniolíticas são principalmente as metaloproteinases (22).

1.3.2 Metaloproteínases e seus inibidores tecidulares

As metaloproteínases (MMPs) são endopeptidases homólogas de zinco-dependentes que pertencem a um grupo de protéases designadas metzincinas e são capazes de clivar a maioria dos componentes da MEC (6).

A atividade proteolítica de cada MMP é regulada a três níveis: primeiro, expressão genética e níveis de secreção proteica; segundo, ativação de pró-enzimas (inativas); e terceiro, inibição através dos inibidores tecidulares das metaloproteínases (TIMPs) e outros inibidores (alfa-2-macroglobulina) (22).

Os TIMPs são basicamente quatro (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e inativam as pró-metaloproteínases assim como as MMPs diretamente. São promotores do crescimento celular (25,26).

O TIMP-2 inibe o crescimento de células endoteliais induzidas pelo fator de crescimento de fibroblastos e inibe preferencialmente a MMP-2. O TIMP-2 tem propriedades anti-apoptóticas (25,26).

Alguns estudos indicam que a hipertensão venosa secundária à estase sanguínea poderá levar a uma maior expressão de MMPs nos fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas. Este incremento de MMPs não só aumenta a degradação da MEC como aumenta também o relaxamento venoso. A hipertensão venosa também induz o início de uma cascata inflamatória (figura 1) (5,6,26).

Na DVC, a condição *sine qua non* é a pressão venosa ambulatoria persistente. O efeito da microcirculação começa com a alteração na tensão de cisalhamento (*shear stress*) nas células do endotélio, que potencia a libertação local de agentes vasoativos e a expressão de E-selectina, moléculas inflamatórias, quimiocinas e de precursores protrombóticos. Relativamente às forças mecânicas, como a baixa tensão de cisalhamento e o estiramento, estas são sentidas pelas células do endotélio através da molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1). É reconhecido que pacientes com DVC têm um aumento da expressão de ICAM-1, que é expresso nas células endoteliais e (I) ativa o recrutamento de leucócitos para a parede venosa e válvulas e (II) inicia a adesão endotelial, diapedese e transmigração, que despoleta então a cascata inflamatória, culminando com a libertação de várias citocinas, incluindo TGF- β 1, do qual se falará adiante (20).

1.3.3 Intervenção do fator transformador de crescimento β

O fator transformador de crescimento β (TGF- β) tem um papel preponderante na síntese e degradação de um grande número de moléculas da MEC, incluindo diferentes tipos de colagénio e proteoglicanos. Também influencia a síntese de MMPs e seus inibidores.

Dentro das suas três isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), o TGF- β 1 desempenha um papel crucial na remodelação da parede venosa. Vários estudos dentro da patogênese da IVC comprovaram que os níveis de mRNA, assim como os níveis de TGF- β 1, se encontravam aumentados nas paredes de veias varicosas quando comparados com os controlos. O TGF- β 1 é sintetizado como uma molécula inativa, participando na sua ativação numerosas proteínas. A forma ativa do TGF- β 1 atua através do seu recetor tipo 1 e tipo 2, sendo que o tipo 1 é recrutado depois da proteína se ligar ao recetor tipo 2. Como tal, a presença de TGF- β 2 é essencial para a responsividade do TGF- β 1 (9,27).

Na presença de IVC, os fibroblastos da derme são um importante alvo para leucócitos ativados por TGF- β 1. A progressão da IVC está ainda associada ao aumento dos níveis tecidulares de TGF- β 1 e da atividade de MMP-2, assim como a diminuição das respostas mitogénicas induzidas por TGF- β 1 ao nível dos fibroblastos (10,26).

Nas paredes das veias varicosas, observou-se um aumento significativo de TGF- β 1. Este é responsável pela estimulação da síntese de componentes da MEC, especialmente colagénio e elastina; para além disso também diminui a expressão/produção de MMPs e aumenta a expressão/produção de TIMPs (23). O efeito estimulante do TGF- β 1 na expressão de TIMP-1 é cumulativo à estimulação da síntese de colagénio e elastina (22).

O TGF- β 1 medeia ainda a remodelação tecidular através da regulação da síntese/degradação de colagénio. O papel do TGF- β 1 está ainda relacionado com a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos contrácteis, assim como com o estímulo da síntese de outras proteínas contracteis (26).

2. Metodologia de investigação

2.1 Objetivos e hipóteses de investigação

Os objetivos deste trabalho são: (I) demonstrar histologicamente que existe uma alteração estrutural da parede das veias com IVC, (II) demonstrar diferenças na marcação imunohistoquímica de MMP-2, de TIMP-2 e de TGF- β 2 em veias doentes e saudáveis e (III) relacionar o estágio da doença com a marcação obtida por imunohistoquímica.

Na sequência dos objetivos apresentados, enunciam-se as seguintes hipóteses de investigação para este estudo:

Hipótese 1 - existe uma diferença estatisticamente significativa entre a espessura das tunicas das veias (íntima, média e adventícia) da região maleolar dos controlos e dos doentes com IVC (em estágio inicial e avançado).

Hipótese 2 - existe uma diferença estatisticamente significativa entre a espessura de tunicas das veias (íntima, média e adventícia) da região inguinal dos doentes com IVC em estágio inicial e dos doentes com IVC em estágio avançado.

Hipótese 3 - existe uma diferença estatisticamente significativa entre a espessura de tunicas das veias (íntima, média e adventícia) da região colateral dos doentes com IVC em estágio inicial e dos doentes com IVC em estágio avançado.

Hipótese 4 - existe uma diferença estatisticamente significativa na proporção de indivíduos com marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas diferentes tunicas (íntima, média e adventícia) entre as veias sãs (controlos) e doentes da região maleolar.

Hipótese 5 - existe uma diferença estatisticamente significativa na proporção de indivíduos com marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF β 2 nas diferentes tunicas (íntima, média e adventícia) entre as veias da região maleolar de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado.

Hipótese 6 - existe uma diferença estatisticamente significativa na proporção de indivíduos com marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas diferentes tunicas (íntima, média e adventícia) entre as veias da região inguinal de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado.

Hipótese 7 - existe uma diferença estatisticamente significativa na proporção de indivíduos com marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas diferentes tunicas (íntima, média e adventícia)

entre as veias da região colateral de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado.

Hipótese 8 - existe uma diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação da MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 entre as veias sãs (controlos) e doentes da região maleolar.

Hipótese 9 - existe uma diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação da MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 entre as veias da região maleolar de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado.

Hipótese 10 - existe uma diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação da MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 entre as veias da região inguinal de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado.

Hipótese 11 - existe uma diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação da MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 entre as veias da região colateral de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado.

2.2 Tipo de Estudo

Para a consecução dos objetivos anteriores recorreu-se a um estudo observacional (i.e., no qual se observou a ocorrência de determinados eventos), transversal (i.e., as observações foram feitas num determinado momento), experimental (i.e., as unidades de estudo utilizadas foram veias de pacientes) de caso-controlo (i.e., foram constituídos dois grupos de estudo: o grupo experimental ou de veias doentes e o grupo controlo ou de veias sãs) (28).

Os critérios de seleção da amostra foram previamente definidos pelo investigador e a seleção da amostra foi realizada de modo não probabilístico (amostragem por conveniência). Da amostra total foi retirada uma subamostra representativa para que o presente trabalho de investigação fosse concretizado. A seleção da subamostra teve em consideração o estágio da doença e o género dos indivíduos.

2.3 Local e procedimentos de recolha da amostra

O estudo foi realizado no Centro de Investigação de Ciências da Saúde (CICS) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, ainda que as amostras de veia tenham sido colhidas em dois centros hospitalares diferentes, no decurso de cirurgias realizadas ou supervisionadas por um cirurgião familiarizado com a investigação.

Os indivíduos da população de onde foram colhidas as amostras de veias foram distribuídos por dois grupos: grupo de doentes com IVC (N=6) e grupo de controlos saudáveis (N=3), i.e., sem

patologia varicosa, ainda que fossem doentes com patologia coronária submetidos a *bypass* coronário com VGS.

Integraram o primeiro grupo doentes com o diagnóstico de IVC dos membros inferiores, internados no Centro Hospitalar da Cova da Beira para serem submetidos a Safenectomia da VGS.

Depois do consentimento informado, os doentes foram sujeitos a estudo imagiológico com eco-doppler venoso dos membros inferiores, com o objetivo de documentar a insuficiência venosa, e examinados pelo clínico para avaliar o grau de evolução da doença, aplicando a escala CEAP para classificação de DVCs [classificação que permitiu ao investigador a posterior distribuição da amostra pelos subgrupos estágio inicial (CEAP 2-3) e estágio avançado (CEAP 4-6)]. Foi ainda pedido aos doentes que preenchessem um questionário sucinto de escolha múltipla e resposta rápida com o objetivo de recolher a história familiar, antecedentes fisiológicos e patológicos, medicação habitual e sintomas da doença.

Para que os dados recolhidos não sofressem qualquer alteração originada por fatores extrínsecos à IVC, os critérios de exclusão dos doentes do grupo 1 foram: (i) doentes sujeitos a intervenção cirúrgica há menos de 6 semanas, (ii) medicados com corticoesteróides, (iii) com história de uso de drogas intravenosas, (iv) com história de trombose venosa profunda ou tromboflebite, (v) com infeção ativa, (vi) ou com co-morbilidades como: doenças que alterem a atividade normal leucocitária como a Diabetes Mellitus, Neoplasia, Artrite reumatóide, Vasculite ou Doenças do Colagénio.

Posteriormente, no intra-operatório, foram colhidas algumas amostras de VGS, nomeadamente 2 a 3 cm de veia proximal à junção safeno-femoral, 2 a 3 cm de veia distal, colhida junto ao maléolo interno e, eventualmente, 2 a 3 cm de veia colateral à VGS e que demonstrasse tortuosidade e aumento de diâmetro com o seu enchimento, sendo então sujeita a flebectomia. Deste modo, foram obtidas amostras de três locais anatómicos distintos e classificadas em função do local: inguinal, colateral e maleolar. As amostras colhidas foram imediatamente colocadas em formol.

Por seu lado, o grupo de controlo foi constituído por uma amostra de conveniência de doentes submetidos a *bypass* coronário com VGS no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

Novamente, após o consentimento informado, procedeu-se à avaliação pré-operatória no sentido de documentar a inexistência de insuficiência venosa através de Eco-Doppler. No intra-operatório, foram colhidas amostras de VGS, cerca de 2 a 3 cm de veia da região maleolar. Estas amostras foram também fixadas em formol.

2.4 Procedimentos laboratoriais na preparação e análise das amostras

2.4.1 Preparação das secções de veias

As amostras dos dois grupos anteriormente descritos foram, como já mencionado, imediatamente colocadas em formol, para serem fixadas e submetidas posteriormente a processamento segundo técnicas de histologia de rotina (análise imunohistoquímica).

Os fragmentos seccionados foram então colocados em cassetes nas quais foi efetuada uma identificação do fragmento para se iniciar o processamento tecidual. Procedeu-se então à fixação, desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina, microtomia, secagem. Todas as lâminas foram ainda coradas com H&E.

2.4.2 Imunodeteção de MMPs, TIMPs e TGF- β R

Os anticorpos utilizados foram o Anti-MMP2, Anti-TIMP2 e o Anti-TGF β R2 da *abcam*®. A escolha dos dois primeiros anticorpos foi baseada em resultados genéticos preliminares obtidos pelo grupo de investigação do CICS (ainda não publicados) que demonstraram um predomínio de MMP2 e TIMP2 na parede venosa. A escolha do anticorpo Anti-TGF β R2 foi também realizada com base nos resultados genéticos preliminares do mesmo grupo de investigação. Face ao conhecimento de que a forma ativa do TGF- β 1 atua através do seu recetor tipo 1 e tipo 2, sendo que o tipo 1 é recrutado depois da proteína se ligar ao recetor tipo 2 e portanto a presença de TGF- β R2 é essencial para a responsividade do TGF- β 1, foi decidido que deveria ser estudado este recetor em detrimento da utilização direta do TGF- β 1. Desta forma procurou-se obter informação do eventual processo patológico que influenciasse os recetores da citocina.

Cada anticorpo foi testado em diferentes amostras de tecido (ver tabela 2), que funcionaram como testes de controlo positivo. Esta amostra de tecido foi a indicada pela empresa do anticorpo - considerada como referência de certeza de marcação do anticorpo.

Cada anticorpo foi testado em todas as camadas de veias doentes e controlos. Realizou-se a técnica de IHQ em três dias distintos, um dia para cada anticorpo.

Tabela 2 Anticorpos primários - controlos positivos e amostras de veias - diluição para cada anticorpo e respetivo tempo de aplicação

Anticorpo	Teste Controlo Positivo	Diluição	Tempo de aplicação
Anti-MMP2	Carcinoma da Mama ductal invasivo	1:700	60 Minutos
Anti-TIMP2	Adenocarcinoma do Cólon	1:500	
Anti-TGFBR2	Córtex cerebral saudável	1:500	

O protocolo usado e otimizado para as diferentes amostras de tecido foi o seguinte:

1. Pré-tratamento com *Trilogy* (desparafinação, hidratação e pré-tratamento):
 - a. Colocar água no fundo da panela de pressão que cubra o suporte de plástico branco;
 - b. Colocar duas caixas de coloração com *Trilogy* (1:100 água destilada) dentro da panela, uma delas com as lâminas (casos + testes), bem fechadas;
 - c. Aquecer e após atingir a pressão, contar 15 minutos;
 - d. Retirar a panela e esperar 5 minutos;
 - e. Abrir a panela e colocar as lâminas na segunda caixa de *Trilogy*, deixar dentro da panela 5 minutos;
 - f. Lavagem em TBS-T (TBS + Tween 20): 5 minutos + 5 minutos, em tina;
2. Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% - 10 minutos;
3. Lavagem em TBS-T: 5 minutos + 5 minutos, em tina;
4. Aplicação do anticorpo primário pré-diluído - tempos de acordo com ajustes feitos em testes (ver Tabela 1);
5. Lavagem em TBS-T: 5 minutos + 5 minutos, em tina;
6. Amplificação - 10 minutos;
7. Lavagem em TBS-T: 5 minutos + 5 minutos, em tina;
8. Detecção - 10 minutos;
9. Lavagem em TBS-T: 5 minutos + 5 minutos, em tina;
10. Aplicação de DAB - 10 minutos:
 - a. 1 gota de DAB : 1 mL de tampão DAB;
11. Lavagem em TBS-T: 5 minutos + 5 minutos, em tina;
12. Contraste com Hematoxilina de Mayer - 3 minutos;
13. Lavagem em água corrente - 10 minutos;
14. Desidratação e montagem;
15. Visualização ao microscópio de todos os testes para controlo de qualidade para verificar: contraste, sensibilidade e especificidade da marcação.

Para o anti-MMP2 os testes positivos e negativos utilizados foram amostras de carcinoma da mama ductal invasivo.

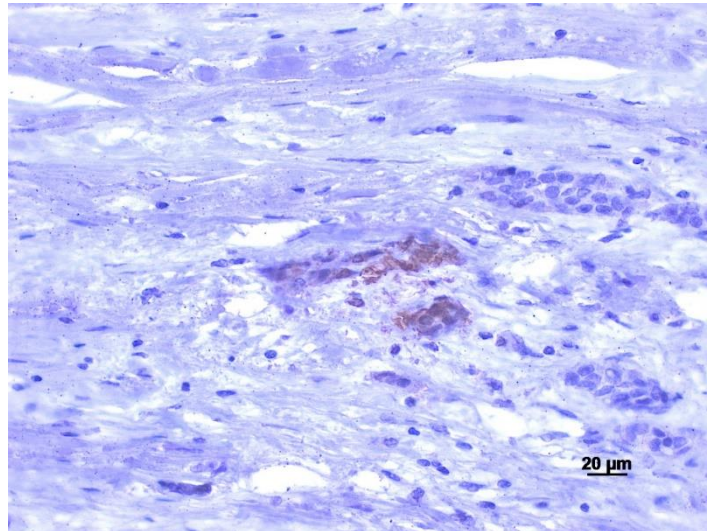


Figura 2 Teste controlo positivo - carcinoma ductal invasivo da mama - Anti-MMP2 (400x).

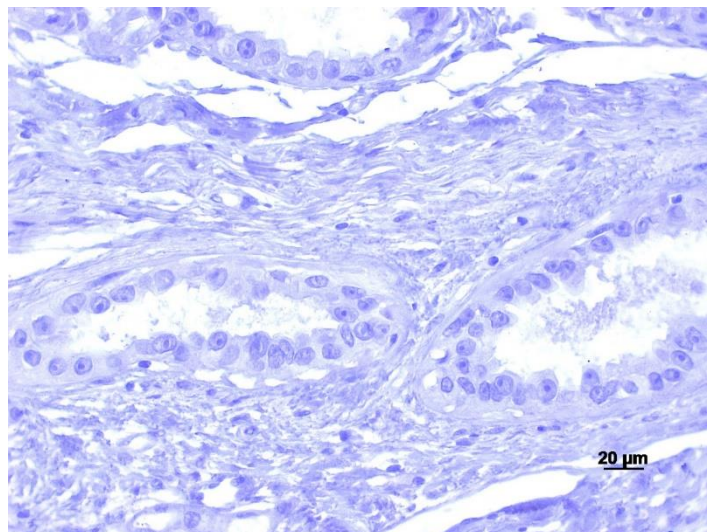


Figura 3 Teste controlo negativo - carcinoma ductal invasivo da mama - Anti-MMP2 (400x).

Para o anti-TIMP2 os testes positivos e negativos utilizados foram amostras de adenocarcinoma do cólon.

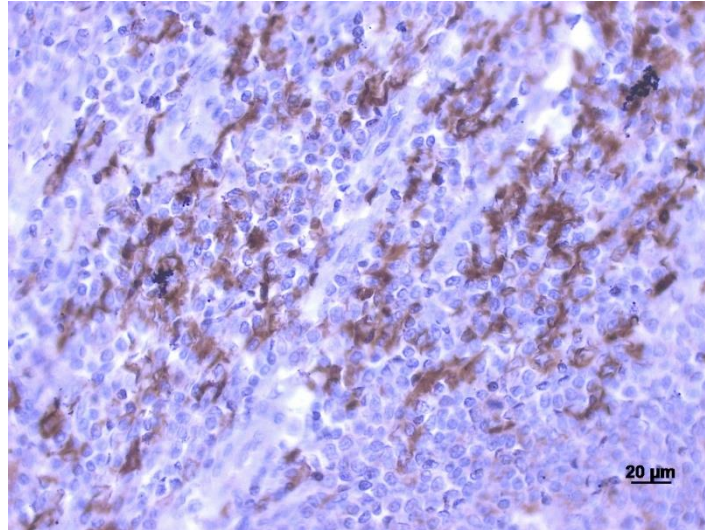


Figura 4 Teste controlo positivo - adenocarcinoma do cólon - Anti-TIMP2 (400x).

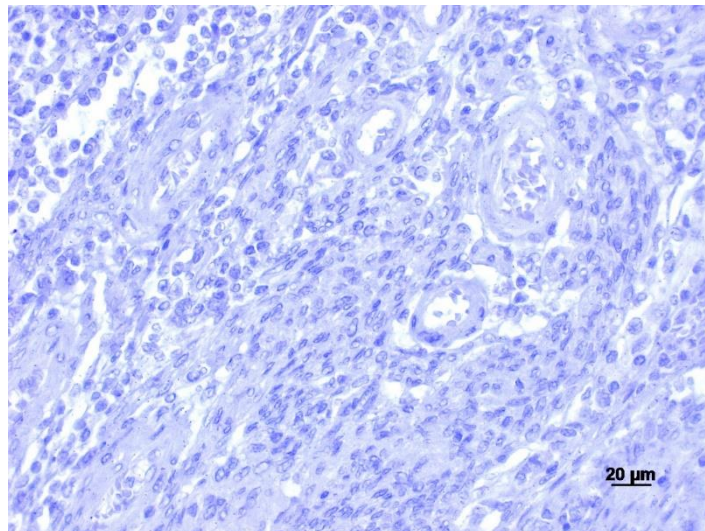


Figura 5 Teste controlo negativo - adenocarcinoma do cólon - Anti-TIMP2 (400x).

Para o anti-TGF β R2 os testes positivos e negativos utilizados foram amostras de córtex cerebral.

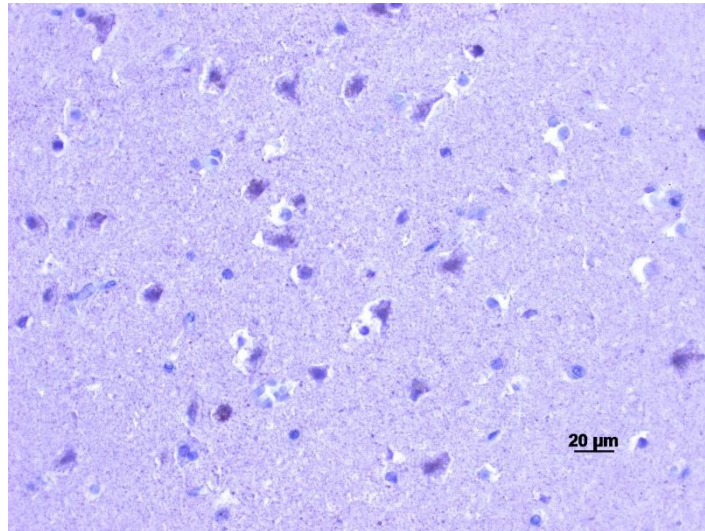


Figura 6 Teste controlo positivo - córtex cerebral - Anti-TGF β R2 (400x).

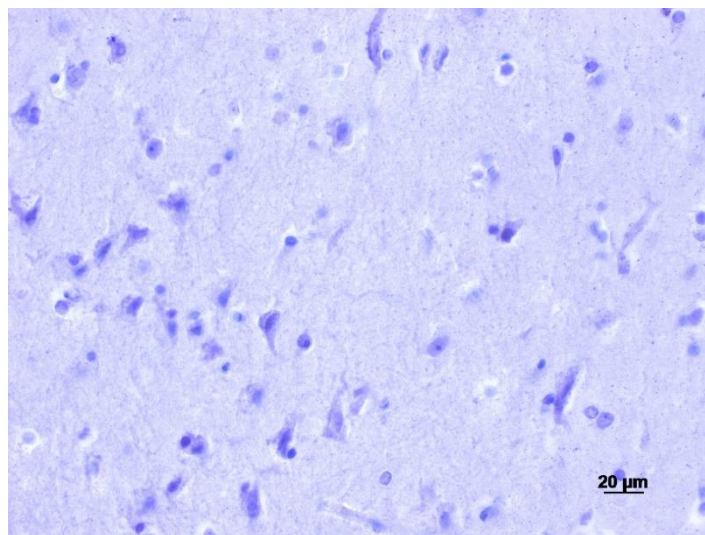


Figura 7 Teste controlo negativo - córtex cerebral - Anti-TGF β R2 (400x).

2.4.3 Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas no laboratório de semiótica do CICS.

A avaliação das lâminas foi feita de maneira cega por dois investigadores e em três dias diferentes. Procedeu-se à visualização das amostras de veia doente e de veia saudável para avaliar a frequência e intensidade de marcação dos anticorpos. A constatação de marcação dos anticorpos nas lâminas permitiu a contabilização da frequência. A intensidade de marcação do anticorpo foi avaliada segundo a seguinte classificação: – negativo; + marcação fraca/discreta; ++ marcação moderada; +++ marcação forte/intensa.

Mantendo sempre as mesmas propriedades de observação, com a ampliação de 400 vezes e com a mesma luminosidade, fotografaram-se as várias secções de veia. A espessura da parede venosa (intima, média e adventícia) foi avaliada utilizando um *software* informático equipado com o programa *Axio Vision rel. 4.8*®. A espessura foi avaliada em pelo menos cinco medições por secção.

2.5 Análise estatística dos dados

Os dados colhidos foram inseridos numa base de dados do programa SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 21.0. Entre outras, a base de dados incluiu as seguintes variáveis:

1. Grupo de pertença (variável qualitativa dicotómica: veias controlos e veias com IVC);
2. Subgrupo de pertença (variável qualitativa dicotómica: veias doentes em estágio inicial e avançado);
3. Espessura da parede da veia (variável quantitativa);
4. Intensidade de marcação imunohistoquímica de anti-MMP2, anti-TIMP2 e anti-TGFBR2 (variável ordinal de quatro categorias: 0-3);
5. Frequência de marcação imunohistoquímica de anti-MMP2, anti-TIMP2 e anti-TGFBR2 (variável quantitativa).

Para o tratamento estatístico dos dados utilizou-se, para além da versão 21.0 do SPSS®, a versão 3.5 de *SigmaStat*®.

Inicialmente foi efetuada uma análise estatística descritiva. Para as variáveis qualitativas, foram determinadas as frequências. Para as quantitativas foram determinadas as médias e o erro associado.

O pressuposto da normalidade foi verificado através do teste de Shapiro-Wilk. Garantido o cumprimento do pressuposto da normalidade usaram-se testes paramétricos, nomeadamente o teste t de Student e a Anova para amostras independentes.

Todos os testes de hipóteses foram considerados significativos sempre que o respetivo valor de prova (valor-p) não excedesse o nível de significância de 5% e os intervalos de confiança foram considerados a 95%.

2.6 Considerações éticas e legais

Os envolvidos neste trabalho de investigação regeram-se pelas boas práticas éticas e legais. O estudo foi submetido e autorizado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira (Anexo 1). Foi dada informação adequada sobre o estudo a todos os indivíduos participantes e obtido o seu consentimento informado por escrito (Anexo 2 e 3). O anonimato dos dados foi garantido através da atribuição de um código numérico aos participantes, não constando assim dos formulários ou da base de dados informática qualquer elemento identificativo dos mesmos. Neste estudo foram respeitadas as recomendações de Helsínquia e Tóquio, da Organização Mundial de Saúde e da Comunidade Europeia.

3. Resultados

3.1 Características demográficas, clínicas e do estilo de vida dos indivíduos

As amostras de veias utilizadas no estudo foram colhidas de 6 doentes com IVC e 3 controlos saudáveis. Como mencionado anteriormente, as amostras do grupo de doentes com IVC foram ainda subdivididas em dois subgrupos (estádio inicial e estágio avançado da doença) de acordo com o estadiamento feito através da escala CEAP (19). Assim, este grupo incluiu, no subgrupo estágio inicial, 2 doentes C3 e 1 doente C2, e no subgrupo estágio avançado, 2 doentes em C4 e 1 doente em C6.

Tabela 3 Características demográficas, clínicas e do estilo de vida dos doentes com IVC e dos controlos [média \pm erro padrão e frequências absolutas (frequências relativas)].

	DOENTES COM IVC			CONTROLOS
	Estádio inicial	Estádio avançado	Total doentes	
Sexo feminino	2 (66,67%)	2 (66,67%)	4 (66,67%)	2 (66,67%)
	n = 3	n = 3	n = 6	n = 3
Idade (anos)	51,67 \pm 3,480	60,33 \pm 9,262	56,00 \pm 4,830	69,67 \pm 7,0
	n = 3	n = 3	n = 6	n = 3
IMC (kg/m ²)	31,548 \pm 1,189	32,905 \pm 1,571	32,23 \pm 0,932	25,796 \pm 1,9
	n = 3	n = 3	n = 6	n = 3
Multiparidade (n ^o filhos)	2,50 \pm 1,5	2,50 \pm 0,5	2,50 \pm 0,645	3,50 \pm 2,5
	n = 2	n = 2	n = 4	n = 2
HTA	0 (0%)	3 (100%)	3 (50%)	2 (66,67%)
	n = 3	n = 3	n = 6	n = 3
Obstipação	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
	n = 6			-
Hemorroidas	2 (66,67%)	2 (66,67%)	4 (66,67%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	-
Doença articular MI	0 (0%)	1 (33,33%)	1 (16,67%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	-
Trauma MI	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	n = 6			n = 3
Pernas pesadas	3 (100%)	2 (66,67%)	5 (83,33%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	-

Pernas inquietas	2 (66,67%)	2 (66,67%)	4 (66,67%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Dor	2 (66,67%)	2 (66,67%)	4 (66,67%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Edema	1 (33,33%)	3 (100%)	4 (66,67%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Prurido	2 (66,67%)	2 (66,67%)	4 (66,67%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Cãibras	1 (33,33%)	2 (66,67%)	3 (50%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Antecedentes familiares	2 (66,67%)	3 (100%)	5 (83,33%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Toma de flavonoides (atual / prévia)	2 (66,67%)	3 (100%)	5 (83,33%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Uso frequente meia elástica	1 (33,33%)	1 (33,33%)	2 (33,33%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Longos períodos de pé no trabalho	3 (100%)	2 (66,67%)	5 (83,33%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Exercício	0 (0%)	1 (33,33%)	1 (16,67%)	-
	n = 3	n = 3	n = 6	
Consumo tabaco	1 (33,33%)	2 (66,67%)	3 (50%)	1 (33,33%)
	n = 3	n = 3	n = 6	n = 3

IVC = Insuficiência Venosa Crónica; IMC = Índice de Massa Corporal; HTA = Hipertensão Arterial; TVP = Trombose Venosa Profunda; MI = Membros Inferiores

Comparando os dados relativos ao grupo total de doentes e ao grupo de controlo, é possível perceber que existe algum grau de equivalência entre os dois (ver **tabela 3**). Verifica-se, quanto às características sociodemográficas, um predomínio do sexo feminino e da fase tardia da adultez (ainda que a idade média dos controlos fosse superior à dos doentes). Relativamente às características clínicas, constata-se que: (I) o índice de massa corporal (IMC) médio de ambos os grupos estava acima do intervalo considerado saudável (havendo uma superioridade do IMC dos doentes face ao IMC dos controlos); (II) as mulheres incluídas nos dois grupos eram múltiparas; (III) metade (ou mais) dos participantes dos dois grupos sofria de hipertensão arterial (HTA); e (IV) nenhum dos anteriores referiu trauma nos membros inferiores. Por fim, em relação às características do estilo de vida, o consumo de tabaco mostrou-se mais prevalente no grupo de doentes do que nos controlos.

Por seu lado, na comparação dos subgrupos de doentes (estádio inicial vs. estágio avançado) percebe-se, mais uma vez, algum grau de equivalência entre ambos (ver **tabela 3**), no que respeita às características sociodemográficas (havendo contudo uma ligeira diferença entre as idades médias dos

dois subgrupos: doentes no estágio avançado eram, em média, mais velhos que os do estágio inicial), clínicas (exceção para a HTA, observada pela totalidade de doentes do estágio avançado) e sintomatológicas (exceção para o sintoma edema, mencionado pela totalidade de doentes do estágio avançado), e do estilo de vida. Note-se que a grande maioria ($\geq 83\%$) destes doentes referiu antecedentes familiares de patologia venosa dos membros inferiores, pernas pesadas, toma (atual ou prévia) de flavonóides e longos períodos de pé no trabalho, e a maioria ($\geq 67\%$) relatou pernas inquietas, dor, edema, prurido e hemorróidas.

3.2 Resultados da análise histológica

Nas veias do grupo controlo, concretamente na parede do vaso sanguíneo, foi possível definir três camadas distintas: uma monocamada contínua de células endoteliais (íntima), a camada média composta pelas células musculares lisas e, finalmente, a adventícia (Figura 8).

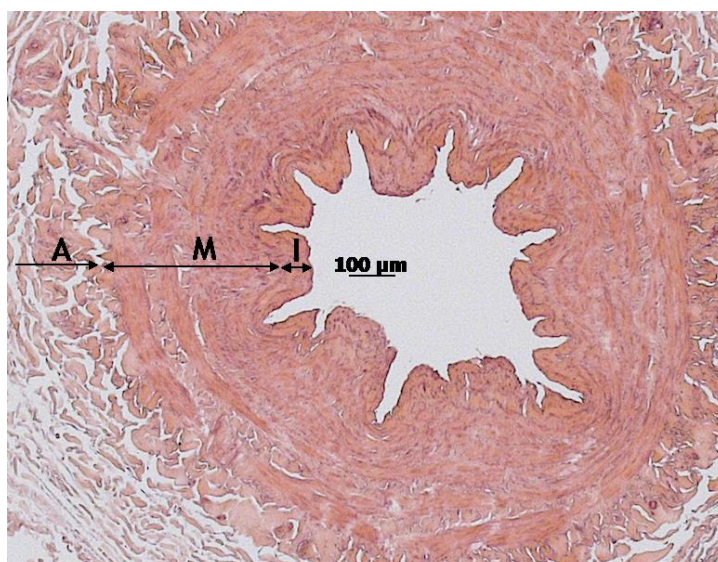


Figura 8 Estrutura histológica da parede venosa corada com H&E. Controlo de VGS com a representação das diferentes túnicas da parede venosa. Da esquerda para a direita representadas as camadas adventícia (A), média (M), íntima (I).

Nas veias varicosas, a parede venosa encontrava-se espessada e mal definida, sendo difícil distinguir as diferentes estruturas. Não havia um limite claro entre a íntima e a média nem entre a média e a adventícia.

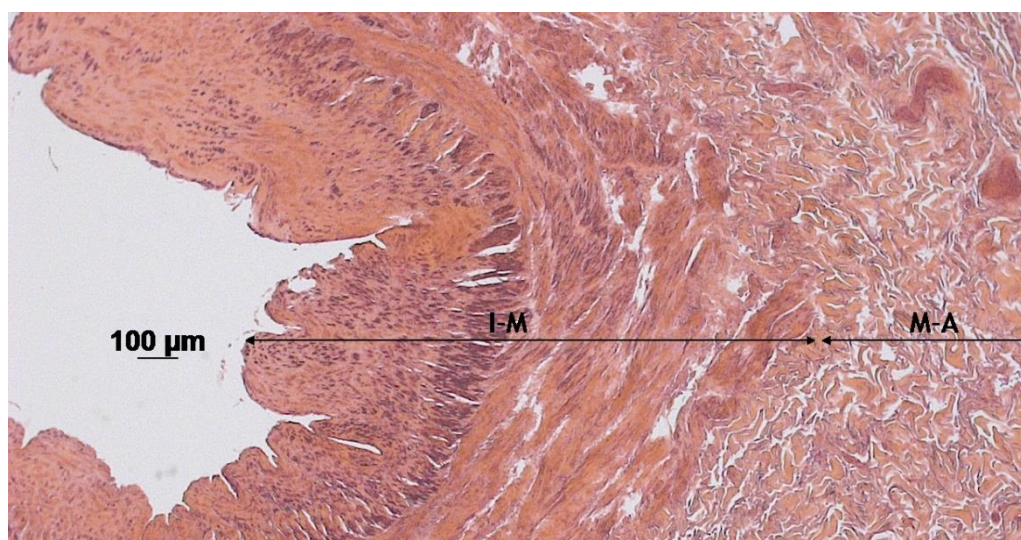


Figura 9 Estrutura histológica da parede venosa, corada com H&E. Veia varicosa, secção de VGS da região inguinal com a representação das diferentes túnicas da parede venosa. Grande heterogeneidade da parede venosa, sem perfeita distinção da camada íntima da média, assim como da média da adventícia. Da esquerda para a direita representadas as camadas íntima (I), média (M) e adventícia (A).

3.2.1 Características morfológicas da parede venosa: Espessura das túnicas

Numa primeira análise dos dados descritivos da tabela 4 é possível constatar que os doentes com IVC apresentavam valores médios de espessuras da íntima, média e adventícia superiores aos dos controlos.

Tabela 4 Dados descritivos (média ± erro) da espessura das várias camadas da parede venosa, em função da região (colateral, inguinal e maleolar) e dos grupos de participantes (doentes com IVC e controlos).

		IVC (n=6)	CONTROLOS (n=3)
Espessura Íntima (μm)	Colateral	206,61±29,16	-
	Inguinal	200,76±56,38	-
	Maleolar	172,18±23,81	122,44±18,11
Espessura Média (μm)	Colateral	361,10±47,09	-
	Inguinal	357,77±35,65	-
	Maleolar	519,85±54,00	200,87±118,72
Espessura Adventícia (μm)	Colateral	431,92±51,98	-
	Inguinal	303,42±30,59	-
	Maleolar	340,41±27,13	214,66±84,42

IVC = Insuficiência Venosa Crónica

Quando testadas (ver **tabela 5**) as diferenças entre a espessura (das diferentes camadas) das veias saudáveis e a espessura (das diferentes camadas) das veias doentes, da região maleolar, apenas se

verificou que as veias doentes apresentavam espessuras significativamente maiores a nível da média e da adventícia.

Tabela 5 Espessura média (média±erro) das várias camadas da parede venosa em doentes com IVC e controlos.

		IVC (n=6)	CONTROLOS (n=3)	T-Test p
Espessura das camadas (μm)	Íntima	172,18±23,81	122,90±10,46	0,204
	Média	512,19±54	200,87±68,54	0,011
	Adventícia	379,58±27,13	214,66±84,42	0,046

IVC = Insuficiência Venosa Crónica

Depois de feita a análise (ver **tabela 6**), mais uma vez, às diferenças entre a espessura (das diferentes camadas) das veias saudáveis e a espessura (das diferentes camadas) das veias doentes com IVC (separando, desta vez, os doentes por estádios: inicial e avançado), da região maleolar, constatou-se a não existência de diferenças estatisticamente significativas entre as três categorias de participantes (*p-value* > 0.05) com um erro tipo I de 0.05.

Tabela 6 Espessura média (média ± erro) das várias camadas da parede venosa dos diferentes grupos de participantes (estádio inicial, estágio avançado e controlo).

		IVC - MALEOLAR		CONTROLOS (n=3)	ONE-WAY ANOVA p
		Estádio inicial (n=3)	Estádio avançado (n=3)		
Espessura das camadas (μm)	Íntima	167,76±46,21	176,59±26,08	122,44±10,46	0,467
	Média	519,85±36,07	504,54±114,99	200,87±68,54	0,052
	Adventícia	340,41±27,79	418,75±37,07	214,66±84,42	0,102

IVC = Insuficiência Venosa Crónica

Quanto às diferenças entre os valores médios da espessura das diferentes camadas da veia da região inguinal dos dois subgrupos de doentes (estádio inicial e estágio avançado), pôde verificar-se que não existiam diferenças significativamente estatísticas (ver **tabela 7**).

Tabela 7 Espessura média (média ± erro) das várias camadas da parede venosa da região inguinal dos diferentes subgrupos de doentes (estádio inicial e estágio avançado).

		IVC - INGUINAL		T-test p
		Estádio inicial (n=3)	Estádio avançado (n=3)	
Espessura das camadas (μm)	Íntima	200,759±122,442	163,609±23,563	0,781
	Média	357,769±58,496	356,429±59,156	0,987
	Adventícia	431,916±113,635	459,736±20,158	0,821

IVC = Insuficiência Venosa Crónica

Em relação às espessuras das diferentes camadas da veia da região colateral, foi possível constatar diferenças estatisticamente significativas apenas entre a espessura média da camada íntima dos dois subgrupos de doentes (estádio inicial e estágio avançado).

Tabela 8 Espessura média (média ± erro) das várias camadas da parede venosa da região colateral dos diferentes subgrupos de doentes (estádio inicial e estágio final).

		IVC - COLATERAL		T-test p
		Estádio inicial (n=3)	Estádio avançado (n=3)	
Espessura das camadas (µm)	Íntima	206,61±34,78	99,189±12,56	0,044
	Média	361,101±73,163	295,927±68,364	0,551
	Adventícia	303,416±48,381	282,495±53,296	0,786

IVC = Insuficiência Venosa Crônica

3.3 Resultados da análise imunohistoquímica

Da análise imunohistoquímica dos tecidos em estudo (veias saudáveis, veias com IVC em estágio inicial e avançado), com recurso aos anticorpos Anti-MMP2, Anti-TIMP2 e Anti-TGFBR2, resultaram as imagens das lâminas abaixo apresentadas (conferir figuras 10-18).

Veias controlos

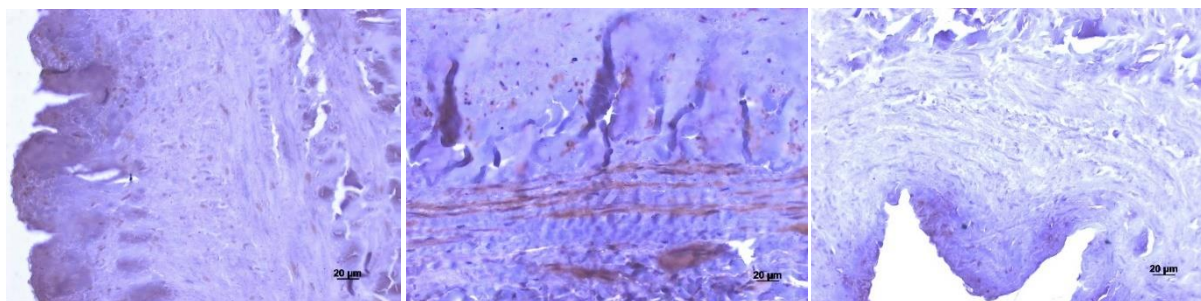


Figura 10 Imunodeteção de MMP-2. Figura 11 Imunodeteção de TIMP-2. Figura 12 Imunodeteção de TGF-βR2.

Veias com IVC (estádio inicial da doença)

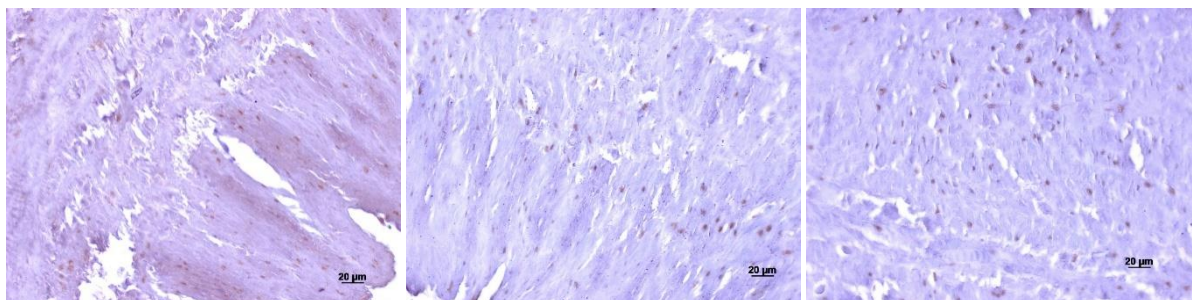


Figura 13 Imunodeteção de MMP-2. Figura 14 Imunodeteção de TIMP-2. Figura 15 Imunodeteção de TGF-βR2.

Veias com IVC (estádio avançado da doença)

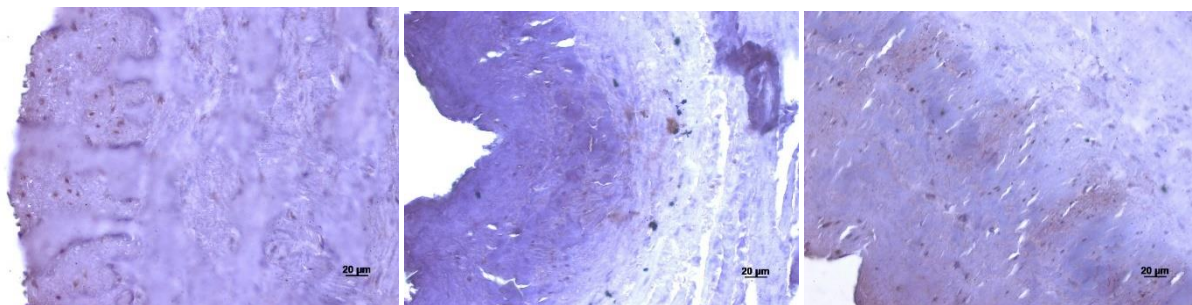


Figura 16 Imunodeteção de MMP-2. Figura 17 Imunodeteção de TIMP-2. Figura 18 Imunodeteção de TGF- β 2.

3.3.1 Frequência da marcação dos anticorpos na parede venosa

Região maleolar

Em relação à frequência de marcação do anticorpo Anti-MMP2 (figura 19) nas veias controlo, parece ter sido de 100% nas túnicas íntima e média e aproximadamente de 60% na túnica adventícia. Nas veias com IVC a frequência de marcação deste anticorpo revelou-se menor do que nas veias controlos. Na túnica adventícia das veias com IVC este anticorpo não marcou. De um modo geral, observou-se que a túnica média foi a que apresentou maior frequência de marcação para o anticorpo Anti-MMP2 nas veias controlos e com IVC.

Relativamente à frequência de marcação do anticorpo Anti-TIMP2 (figura 19), observou-se que estava diminuída nas túnicas íntima e média das veias com IVC, comparativamente às saudáveis. No entanto, em sentido contrário de variação, apenas a túnica adventícia das veias com IVC registou a marcação deste anticorpo (em aproximadamente 20% dos doentes). A túnica média das veias com IVC e controlos foi a túnica onde o anticorpo Anti-TIMP2 apresentou maior frequência de marcação.

No referente à frequência de marcação do anticorpo Anti-TGF β 2 (figura 19), verificou-se uma diminuição na frequência de marcação nas três túnicas das veias com IVC (tendo desaparecido na túnica adventícia nas veias com IVC), quando comparadas com as veias saudáveis.

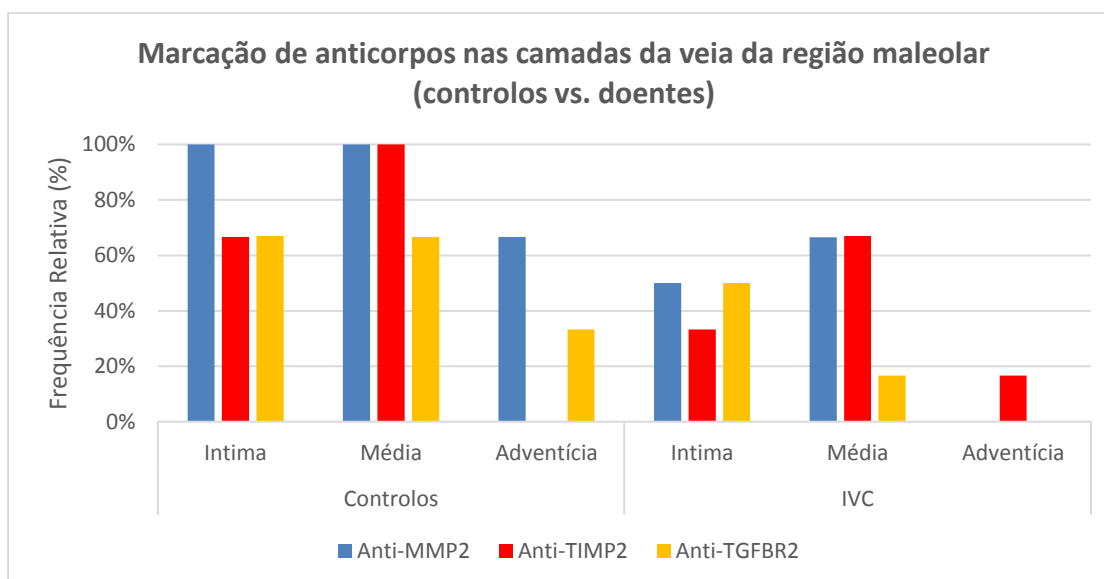


Figura 19 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região maleolar em doentes com IVC e controles.

Quando se considerou a existência de dois estádios, estágio inicial e estágio avançado, nas veias com IVC, observou-se que a frequência de marcação do anticorpo **Anti-MMP2** (figura 20) era similar na túnica média dos dois estádios e maior na túnica íntima das veias doentes em estágio avançado. A túnica adventícia, como referido anteriormente, não apresentou marcação deste anticorpo.

Relativamente à frequência de marcação do anticorpo **Anti-TIMP2** (figura 20), parece não ter havido variação entre as túnicas médias das veias dos diferentes estádios. Já na comparação entre as restantes túnicas homólogas, as tendências são opostas: se na íntima há um aumento de marcação deste anticorpo (não tendo sido detetada qualquer marcação nas veias doentes em estágio inicial), na adventícia há uma diminuição (tendo a marcação desaparecido nas veias doentes em estágio avançado), do estágio inicial para o avançado.

Em relação à frequência de marcação do anticorpo **Anti-TGFBR2** (figura 20), observou-se um aumento da marcação na túnica íntima das veias doentes e, em sentido oposto, uma diminuição na túnica média das veias doentes (tendo a marcação desaparecido nas veias doentes em estágio avançado), do estágio inicial para o avançado. A túnica adventícia, como já foi referido, não apresentou marcação deste anticorpo.

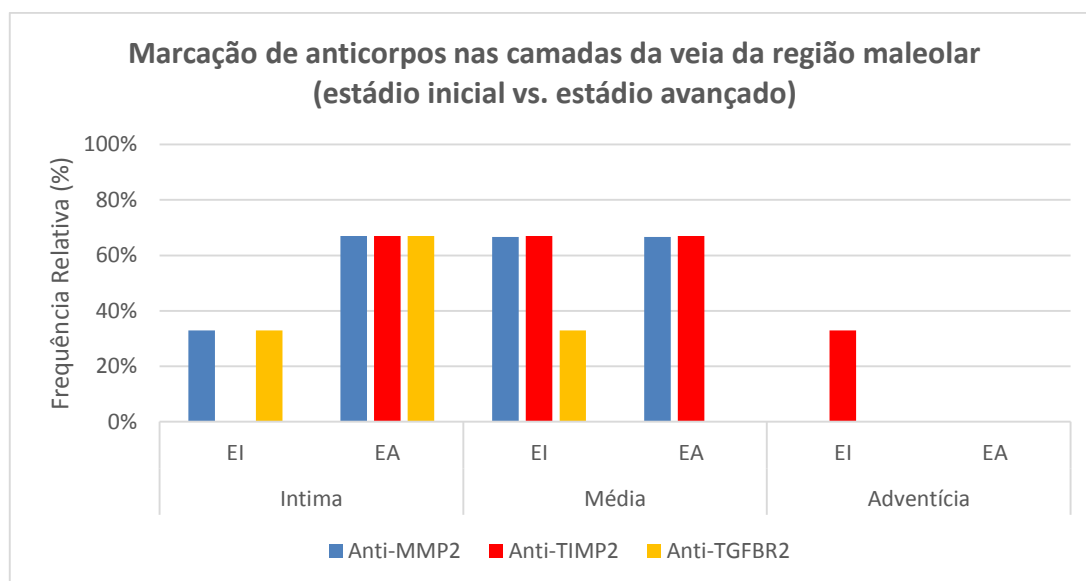


Figura 20 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região maleolar de doentes com IVC em estádio inicial (EI) e estádio avançado (EA).

Região Inguinal

No que diz respeito à frequência de marcação do anticorpo **Anti-MMP2** (figura 21), quando considerados novamente os dois estádios (inicial e avançado) das veias com IVC, pôde observar-se uma diminuição da frequência de marcação do anticorpo nas túnicas íntima e média, do estádio inicial para o estádio avançado. A túnica adventícia não apresentou qualquer marcação nos dois subgrupos.

Relativamente à frequência de marcação do anticorpo **Anti-TIMP2** (figura 21), parece ter existido um aumento dessa frequência nas túnicas íntima e média, do estádio inicial para o estádio avançado. Em sentido contrário, na túnica adventícia, do estádio inicial para o estádio avançado, observou-se uma diminuição da frequência de marcação deste anticorpo.

Em relação à frequência de marcação do anticorpo **Anti-TGFBR2** (figura 21) constatou-se, do estádio inicial de doença para o avançado, uma ausência de variação na frequência de marcação do anticorpo na túnica média e um aumento na frequência de marcação do anticorpo na túnica íntima. A túnica adventícia não registou qualquer marcação deste anticorpo em ambos os subgrupos.

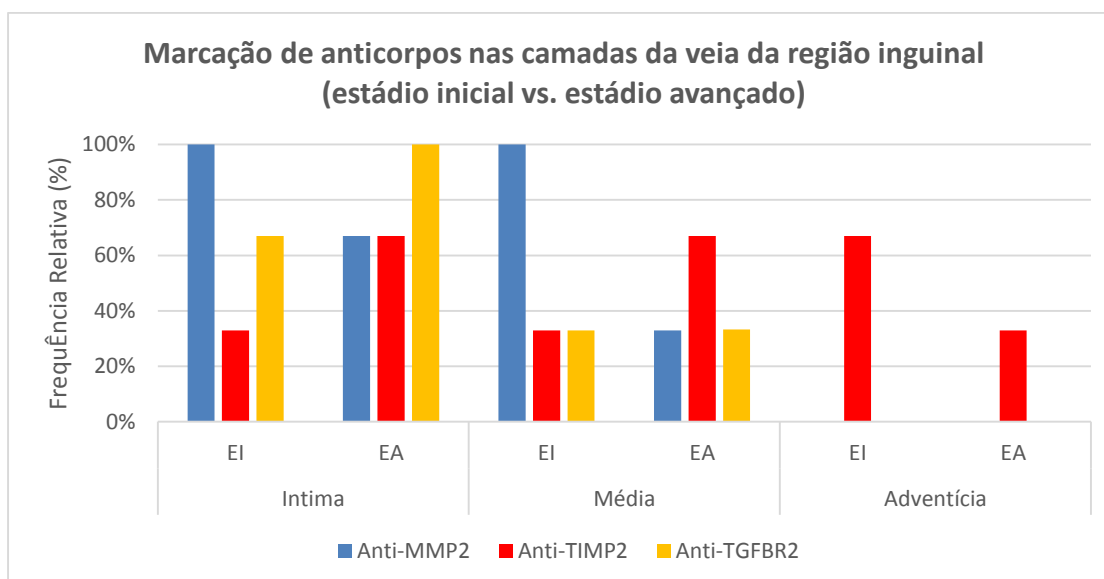


Figura 21 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região inguinal de doentes com IVC em estádio inicial (EI) e estádio avançado (EA).

Região colateral

Mantida a comparação entre os dois subgrupos de veias com IVC, estádio inicial e estádio avançado, observou-se que a frequência de marcação do anticorpo **Anti-MMP2** (figura 22) diminuiu, do estádio inicial para o avançado, nas túnicas íntima e média (não tendo sido detetada qualquer marcação nesta última túnica das veias doentes em estádio avançado). A túnica adventícia dos dois subgrupos em comparação não registou marcação deste anticorpo.

Relativamente à frequência de marcação do anticorpo **Anti-TIMP2** (figura 22), na túnica íntima verificou-se um aumento do estádio inicial (não tendo sido detetada qualquer marcação neste último) para o avançado. Nas túnicas médias e adventícia a tendência inverteu-se, tendo-se registado uma diminuição de frequência de marcação do estádio inicial para o estádio avançado da doença (a túnica adventícia apresentou apenas marcação no estádio inicial de doença).

Em relação à frequência de marcação do anticorpo **Anti-TGFBR2** (figura 22), constatou-se uma diminuição de frequência na camada íntima, do estádio inicial para o avançado (tendo desaparecido neste último). Na túnica média não se observou qualquer variação de frequência na marcação deste anticorpo entre os dois subgrupos. A túnica adventícia não apresentou, mais uma vez, marcação deste anticorpo nos dois subgrupos.

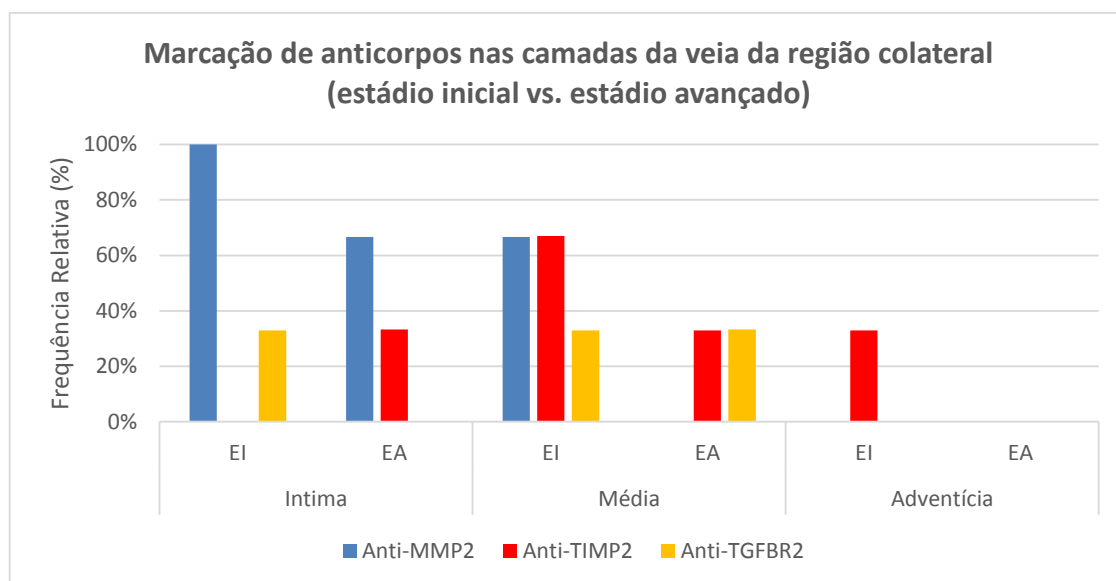


Figura 22 Frequência de marcação dos anticorpos nas diferentes camadas da veia da região colateral de doentes com IVC em estágio inicial (EI) e estágio avançado (EA).

3.3.2 Intensidade da marcação dos Anti-MMP2, Anti-TIMP2 e Anti-TGFBR2 nas camadas da parede venosa

Região maleolar

Em relação à intensidade de marcação do anticorpo **Anti-MMP2** (tabela 9 e figura 23), verificou-se que a intensidade da marcação deste anticorpo é mais forte nas camadas das veias saudáveis do que nas veias com IVC. A intensidade da marcação mais frequente nas veias doentes foi a fraca, ao passo que nas veias saudáveis foi a intensa.

Tabela 9 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes anticorpos nas veias com IVC e controlos.

	Intensidade da marcação (Mo Me)		
	Anti-MMP2	Anti-TIMP2	Anti-TGFBR2
Controlos (n=3)	3 3	X 2	1 1
IVC (n=6)	1 1	1 1	1 1

Mo = moda; Me = mediana; Categorias da intensidade: 0 = sem marcação, 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa; X = distribuição amodal

No respeitante à intensidade de marcação do anticorpo **Anti-TIMP2** (tabela 9 e figura 23), observou-se novamente uma intensidade de marcação superior nas camadas das veias controlos, comparativamente às veias doentes. A intensidade da marcação nas veias saudáveis variou de fraca a intensa, enquanto a intensidade fraca foi a mais frequente nas veias doentes (figura 23).

Sobre a intensidade de marcação do anticorpo **Anti-TGFBR2** (figura 23) verificou-se uma pequena variação de intensidade das camadas das veias controlos para as camadas de veias com IVC. As veias com IVC registaram uma marcação fraca ou inexistente deste anticorpo. Por seu lado, a intensidade

da marcação do anticorpo nas camadas de veias controlos variou de fraca e a moderada, sendo maioritariamente fraca (tabela 9).

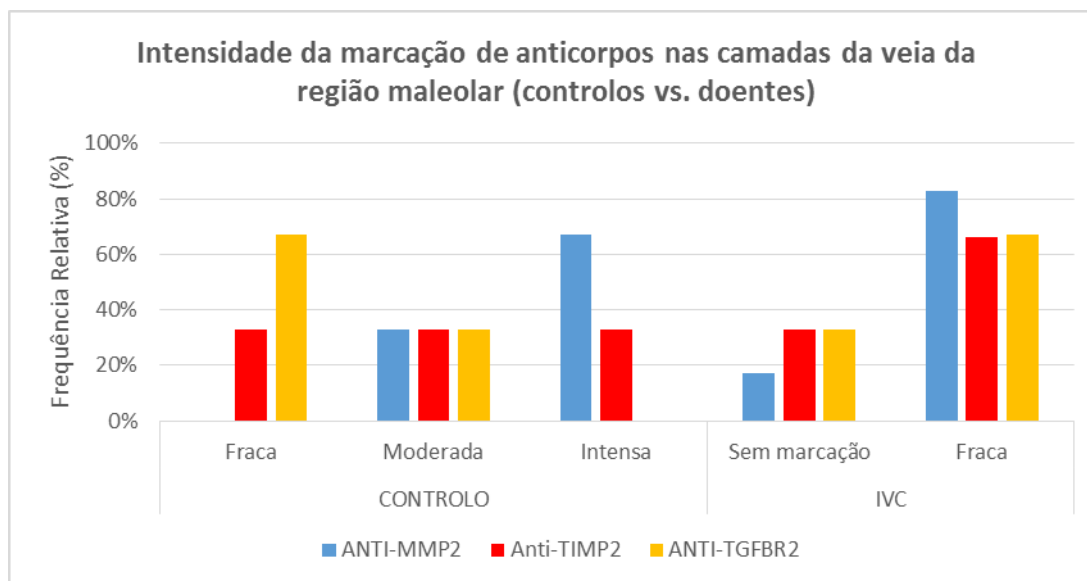


Figura 23 Intensidade de marcação dos anticorpos na veia da região maleolar em doentes com IVC e controlos.

Comparando entre si os subgrupos de veias com IVC, estágio inicial e estágio avançado, não se observaram grandes alterações na intensidade de marcação do anticorpo Anti-MMP2 (figura 24), mantendo-se a categoria de intensidade fraca como a mais frequente nos dois subgrupos em comparação (tabela 10).

Tabela 10 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes anticorpos nas veias com IVC (no estágio inicial e no estágio avançado) da região maleolar.

	Intensidade da marcação (Mo Me)		
	Anti-MMP2	Anti-TIMP2	Anti-TGFBR2
EI (n=3)	1 1	1 1	1 1
EA (n=3)	1 1	1 1	1 1

Mo = moda; Me = mediana; Categorias da intensidade: 0 = sem marcação, 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa

Relativamente à intensidade de marcação do anticorpo Anti-TIMP2, não se registaram mais uma vez, grandes diferenças entre os subgrupos relativamente à intensidade de marcação (figura 24), mantendo-se a intensidade fraca como a mais frequente entre as veias doentes do estágio inicial e avançado (tabela 10).

Em relação à intensidade de marcação do anticorpo Anti-TGFBR2, também não se verificou, do estágio inicial para o avançado, uma variação na intensidade de marcação, ou seja, se a maioria das tónicas das veias doentes em estágio inicial apresentava uma marcação fraca, as do estágio avançado, na sua maioria, também continuaram a marcar com intensidade fraca (figura 24 e tabela 10).

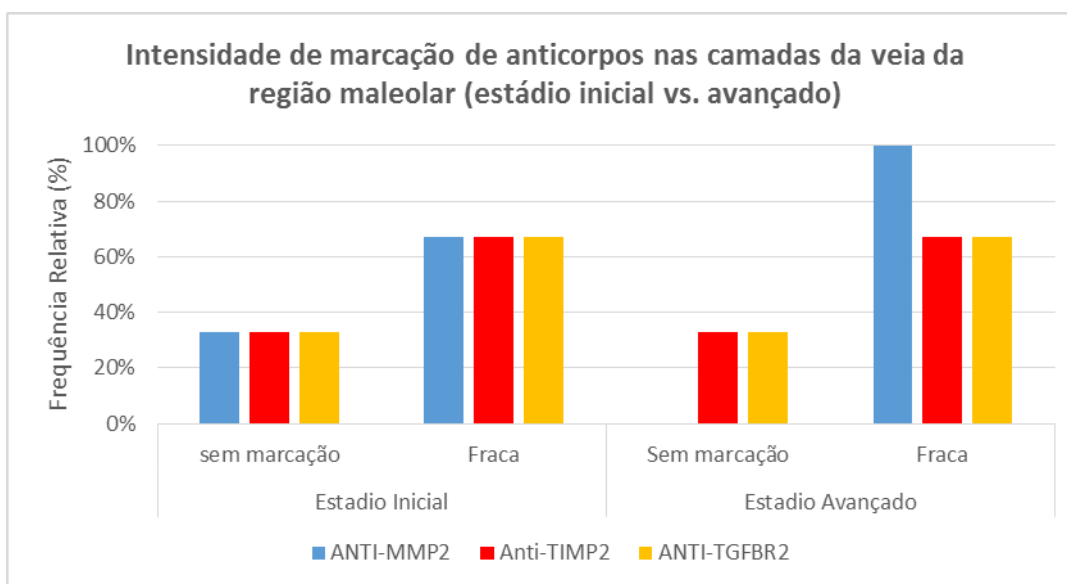


Figura 24 Intensidade de marcação dos anticorpos na veia da região maleolar em doentes com IVC em estágio inicial e estágio avançado.

Região inguinal

Mantendo a comparação entre os dois subgrupos de veias doentes quanto à intensidade de marcação do anticorpo **Anti-MMP2** (tabela 11 e figura 25), os dados parecem mostrar uma diminuição da intensidade de marcação (de moderada a fraca) do anticorpo, do estágio inicial para o avançado.

Tabela 11 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes nas veias com IVC (no estágio inicial e no estágio avançado) da região inguinal.

	Intensidade da marcação (Mo Me)		
	Anti-MMP2	Anti-TIMP2	Anti-TGFBR2
EI (n=3)	2 2	2 2	X 1
EA (n=3)	1 1	1 1	1 1

Mo = moda; Me = mediana; Categorias da intensidade: 0 = sem marcação, 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa

Relativamente ao anticorpo **Anti-TIMP2** (tabela 11 e figura 25), verificou-se uma diminuição da intensidade de marcação do anticorpo, do estágio inicial para o avançado. As veias com IVC em estágio inicial marcaram o anticorpo com uma intensidade de fraca a moderada (sendo esta última a categoria mais frequente), ao passo que a totalidade das veias da fase avançada da doença registou intensidade fraca.

Em relação ao anticorpo **Anti-TGFBR2**, a intensidade de marcação no subgrupo estágio inicial variou entre ausente e moderada (figura 25), não havendo uma categoria mais frequente (tabela 11), enquanto no subgrupo estágio avançado a categoria mais frequente (e única) foi a fraca.

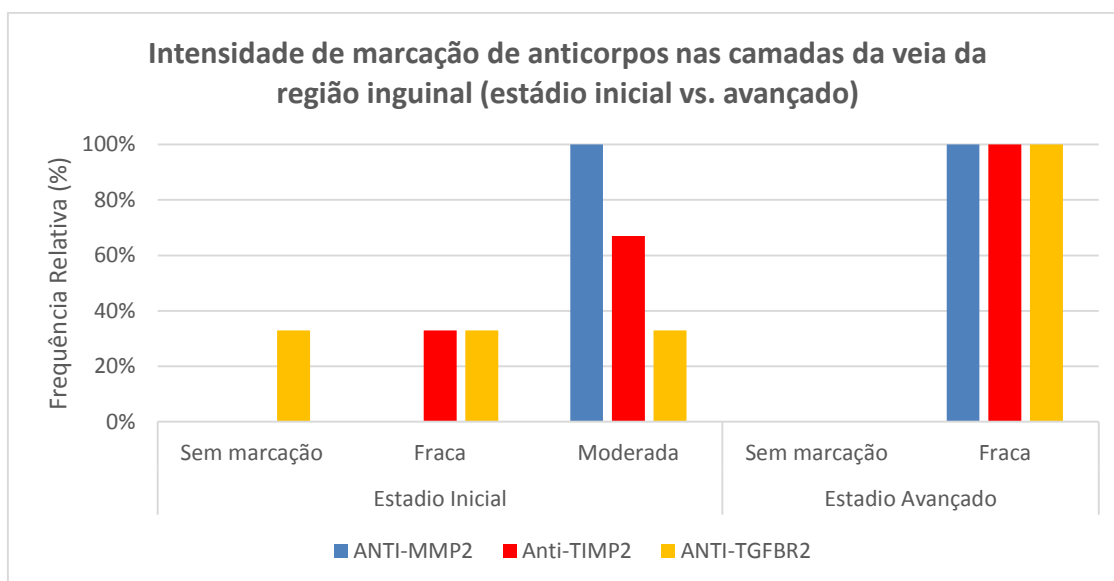


Figura 25 Intensidade de marcação dos anticorpos na veia da região inguinal em doentes com IVC em estágio inicial e estágio avançado.

Região colateral

Quanto à intensidade de marcação do anticorpo ANTI-MMP2 (tabela 12 e figura 26) e mantendo a comparação entre os dois subgrupos de veias com IVC, observou-se que todas as veias da fase inicial da doença registaram intensidade de marcação fraca, já as veias da fase avançada da doença não apresentaram uma categoria de intensidade de marcação do anticorpo mais frequente, tendo a intensidade variado entre ausente e moderada.

Tabela 12 Intensidade de marcação (moda e mediana) dos diferentes nas veias com IVC (no estágio inicial e no estágio avançado) da região colateral.

	Intensidade da marcação (Mo Me)		
	Anti-MMP2	Anti-TIMP2	Anti-TGFBR2
El (n=3)	1 1	1 1	0 0
EA (n=3)	X 1	1 1	0 0

Mo = moda; Me = mediana; Categorias da intensidade: 0 = sem marcação, 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa; X = distribuição amodal

No que se refere ao anticorpo Anti-TIMP2 (tabela 12) observaram-se ligeiras diferenças entre os dois estádios, no sentido da diminuição (do estágio inicial para o avançado). A totalidade das túnicas das veias doentes, em estágio inicial, apresentaram uma intensidade de marcação do anticorpo fraca, à semelhança da maioria das túnicas das veias da fase avançada da doença (figura 26).

Por fim, em relação à intensidade de marcação do anticorpo Anti-TGFBR2 (tabela 12 e figura 26), parece não ter havido grandes alterações entre os dois estádios da doença, tendo a maioria das túnicas

das veias dos dois subgrupos registado ausência de marcação do anticorpo, tal como as análises anteriores já tinham indicado.

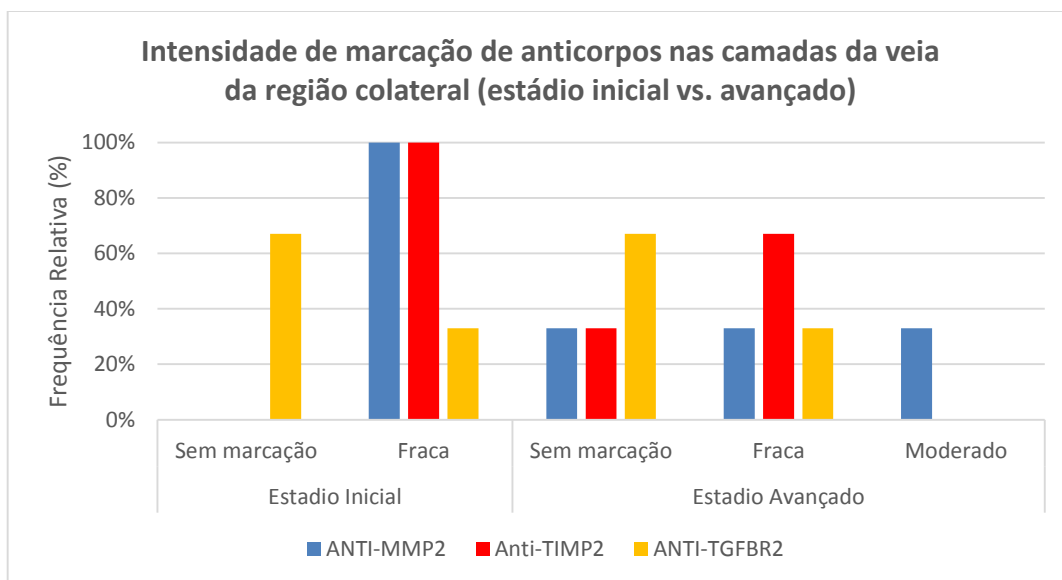


Figura 26 Intensidade de marcação dos anticorpos na veia da região colateral em doentes com IVC em estágio inicial e estágio avançado.

4. Discussão dos resultados

Até à data, há um número considerável de estudos que analisa a influência de vários fatores na patogênese da IVC. Contudo, poucos ou nenhuns estudos existem a relacionar a marcação imunohistoquímica de metaloproteinases (e seus inibidores tecidulares) e de TGF- β com o estágio da doença. Neste sentido, foi objetivo deste estudo, para além da demonstração histológica das alterações estruturais da parede das veias com IVC, a análise das diferenças na marcação imunohistoquímica de MMP-2, TIMP-2 e de TGF- β entre veias saudáveis e veias doentes e, dentro das veias doentes, entre estádios (inicial vs. avançado) da IVC.

Antes de se avançar na discussão dos resultados obtidos é necessário apontar as seguintes salvaguardas.

Por um lado, a inexistência ou escassez de estudos sobre o tema deste trabalho dificultou a comparação de resultados. Por outro, os estudos utilizados na comparação de resultados não só tinham objetivos de estudo diferentes, como também recorreram a amostras de populações temporal e geograficamente distintas, factos que obrigaram a alguma cautela e critério nas comparações feitas.

Por fim, apesar do número reduzido de indivíduos que integraram a amostra que serviu de base a este estudo, a sua constituição respeitou a necessidade de utilizar grupos de comparação (doentes vs. controlos; doentes em estágio inicial vs. doentes em estágio avançado) com alguma equivalência relativamente às características demográficas, clínicas ou do estilo de vida. Também a caracterização dos indivíduos doentes desta amostra não se afastou da caracterização observada noutros estudos: (I) o predomínio do sexo feminino e uma idade média avançada, (II) o predomínio de indivíduos com excesso de peso ou obesidade, com história familiar de veias varicosas ou com múltiplas gravidezes de termo (todos fatores de risco significativos para o desenvolvimento da IVC, de acordo com *Dindelli et al.*), e ainda (III) a presença de sintomas e sinais sugestivos de doença venosa (como pernas pesadas, pernas inquietas, dor, edema, prurido) e de períodos longos de ortostatismo (durante a atividade laboral) na maioria dos indivíduos doentes, foram igualmente encontrados nas amostras de outros estudos (29,14,30-33).

4.1 Morfologia da parede venosa

Atendendo aos resultados dos testes de hipóteses, foi possível verificar que apenas algumas das hipóteses inicialmente levantadas, nomeadamente as hipóteses H1 e H3, foram (parcialmente) confirmadas.

Assim, os resultados obtidos permitiram verificar que: (I) apesar da espessura das três túnicas ser superior nas veias doentes (quando comparadas com as veias saudáveis), apenas as diferenças na espessura das túnicas média e adventícia eram estatisticamente significativas; (II) as espessuras das túnicas das veias doentes no estágio inicial e no estágio avançado, da região maleolar, não

eram estatisticamente diferentes, ao contrário do que afirmava parte da hipótese H1. Alguns destes achados são consistentes com outros estudos acerca da morfologia da parede venosa, na qual se observaram aumentos da espessura da túnica média e da túnica adventícia em doentes com IVC (23,24). Os resultados alcançados por *Jacob et al.* demonstraram ainda um aumento estatisticamente significativo da espessura da íntima em doentes com IVC (23). O aumento de espessura de algumas túnicas da parede venosa doente poderá ser justificado pelo processo crônico inflamatório com ciclos de degradação e produção de colagênio, que ocorrem durante a tentativa de reconstrução de um tecido submetido a um stresse mecânico continuado.

Ao contrário do que afirmava a hipótese H2, os achados deste estudo não comprovaram a existência de diferenças estatisticamente significativas entre o valor médio da espessura (das várias túnicas) da parede venosa da região inguinal dos diferentes subgrupos de doentes (estádio inicial e estágio avançado). Não é possível comparar estes resultados com outros equivalentes (até à data, inexistentes na literatura empírica).

A hipótese H3 parece ter sido parcialmente confirmada pelos resultados obtidos, uma vez que só a espessura da túnica íntima das veias doentes em estágio avançado da região colateral se revelou estatisticamente inferior à das veias doentes em estágio inicial da mesma região. Mais uma vez não é possível estabelecer comparações, visto não existirem na literatura estudos que avaliem a espessura das túnicas da parede venosa nos diferentes estádios de classificação da doença.

4.2 Imunohistoquímica da parede venosa: consequências da IVC

Não tendo sido calculados testes de verificação de hipóteses para as hipóteses H4 e H8, fosse pelo reduzido tamanho da amostra, fosse pela natureza das variáveis em estudo, procurou-se responder às hipóteses de investigação levantadas pela análise dos dados descritivos (e das suas tendências).

Assim, relativamente à hipótese H4, que apontava para a existência de uma diferença estatisticamente significativa na frequência da marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas diferentes túnicas entre as veias sãs e doentes da região maleolar, os dados (para a frequência de marcação dos respetivos anticorpos) parecem sugerir que:

- No que à marcação de MMP-2 diz respeito, a hipótese poderia ter sido confirmada, uma vez que a presença desta enzima se encontrava menos frequentemente nas três túnicas das veias doentes. Mais ainda, se alguma diferença houver na frequência de marcação de MMP-2 entre os dois grupos, esta diferença poderá ser maior na túnica adventícia;
- Já em relação à marcação de TIMP-2, a hipótese poderia ter sido igualmente confirmada, dado que a presença desta enzima se encontrava menos frequentemente nas túnicas íntima e média das veias doentes e mais frequentemente na adventícia destas últimas. Por sua vez, se alguma

diferença houver na frequência de marcação de TIMP-2, esta diferença poderá ser maior nas túnicas íntima e média;

- Quanto à marcação de TGF- β R2, a hipótese também poderia ter sido confirmada, tendo em consideração que a presença deste recetor se encontrava com menor frequência nas três túnicas das veias doentes. Novamente, se alguma diferença houver na frequência de marcação de TGF- β R2 entre os dois grupos, esta diferença poderá ser maior na túnica média.

Estes achados parecem ser, de um modo geral, coerentes com os resultados obtidos para a intensidade da marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β R2. Tal como avançava a hipótese H8 (recorde-se: existência de uma diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β R2 entre as veias sãs e doentes da região maleolar), os dados (para a intensidade de marcação dos respetivos anticorpos) parecem indicar que poderão haver diferenças de intensidade de marcação de MMP-2 e de TIMP-2 entre os dois grupos considerados, uma vez que a intensidade de marcação destas enzimas se encontrava diminuída nas túnicas das veias doentes. Já em relação à marcação de TGF- β R2, a hipótese poderia ter sido rejeitada, tendo em consideração que a intensidade de marcação deste recetor não diferiu de modo relevante entre os grupos.

Outros estudos são concordantes com estes dados, na medida em que demonstraram uma diminuição da intensidade do anticorpo anti-MMP-2 e anti-TIMP-2 nas veias doentes. Para além disto, eles ainda comprovaram a diminuição da atividade de MMP-2 nas veias doentes. (34,35)

No entanto, contrariamente aos resultados obtidos, no estudo de *Parra et al.* (35), a MMP-2 foi localizada na região externa da túnica média e na adventícia das veias sãs e insuficientes, não tendo sido observada a marcação da enzima na túnica íntima. Também os resultados publicados por *Sansilvestri-Moreno et al.* (36), relativos à observação de uma intensidade de marcação fraca de MMP-2 em veias controlo e de uma marcação intensa em veias varicosas, são contrários aos achados do presente estudo.

Poderá ser sugerido que, sendo as MMPs e TIMPs responsáveis pela homeostasia e remodelação da MEC no caso de stresse vascular, qualquer processo patológico que altere o equilíbrio MMP/TIMP poderá originar uma remodelação estrutural anormal da MEC com fibrose e/ou atrofia da parede venosa. Apesar da MMP-2 e do TIMP-2 estarem diminuídos nas veias doentes, esta diminuição poderá não ser equitativa e, nesse sentido, predispor à desregulação da remodelação vascular normal no sentido da fibrose ou atrofia. Como consequência do processo inflamatório crónico mediado pelo TGF- β 1, a MMP-2 poderá ser diminuída. O TIMP-2 poderá ser aumentado inicialmente mas, numa fase mais avançada da doença, ser também diminuído, na medida em que a quantidade de MMPs presentes na parede venosa são diminutas.

- Quanto à marcação de TGF- β 2, não existe qualquer estudo cujos resultados possam ser comparados com os resultados aqui obtidos. No entanto, é possível sugerir que a diminuição de frequência de marcação de TGF- β 2 nas veias doentes poderá ser explicada pelo processo crônico inflamatório local que tenderá a diminuir a via de atuação do TGF- β 1, no sentido de controlar essa inflamação crônica. É também necessário ter em conta que o TGF- β 2 é um recetor de TGF- β e não demonstra necessariamente a quantidade de TGF- β no local. Outras possibilidades poderão ser: o TGF- β intervir independentemente dos seus recetores ou o TGF- β 2 estar diminuído nas veias varicosas como resultado de feedback negativo, pelo fato de existir maior quantidade de TGF- β no local.

4.3 Imunohistoquímica da parede venosa: variações entre estádios da IVC

Como também não foram calculados testes de verificação de hipóteses para as restantes hipóteses (H5-H7 e H9-H11), pelos motivos já apresentados, procurou-se responder às hipóteses de investigação levantadas pela análise dos dados descritivos (e das suas tendências).

Deste modo, no respeitante à **região maleolar** e à hipótese que mencionava a existência de uma diferença estatisticamente significativa na frequência de marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas diferentes túnicas entre as veias de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado (H5), os dados (para a frequência de marcação dos respetivos anticorpos) parecem sugerir que:

- Poderá haver uma diferença de frequência de marcação de MMP-2 entre os dois subgrupos apenas na túnica íntima, visto que a presença desta enzima era mais frequentemente encontrada na túnica íntima das veias com IVC em estágio avançado (logo a hipótese poderia ter sido apenas parcialmente confirmada);

- Relativamente à marcação de TIMP-2, a hipótese também poderia ter sido parcialmente confirmada, uma vez que a presença desta enzima se encontrava com maior frequência na túnica íntima das veias doentes em estágio avançado e com menor frequência (ou mesmo anulada) na túnica adventícia das mesmas veias. Mais ainda, se alguma diferença houver na frequência de marcação de TIMP-2 entre os dois subgrupos, esta diferença poderá ser maior na túnica íntima;

- A mesma hipótese poderia ter sido, mais uma vez, parcialmente confirmada quanto à marcação de TGF- β 2, dado que a presença deste recetor se mostrou mais frequente na túnica íntima das veias doentes em estágio avançado e menos frequente (mais concretamente, anulada) na média das mesmas veias.

Apesar dos dados alcançados para a intensidade da marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas veias doentes da região maleolar não acrescentarem informação relevante (note-se que, ao contrário do

que afirmava a hipótese H9, os dados parecem apontar, de um modo geral, para a ausência de diferenças de intensidade de marcação, já de si fraca, das enzimas e do recetor entre estádios diferentes de IVC) aos resultados obtidos para a frequência da marcação, é possível tecer as seguintes considerações.

Apenas as variações negativas na frequência de marcação das enzimas, do estágio inicial da doença para o estágio avançado, parecem ser congruentes com os resultados anteriores. A diminuição de frequência de TIMP-2 (na túnica adventícia) nas veias doentes em estágio avançado parece estar de acordo com o que foi referido antes (em relação à mesma diminuição na maioria das túnicas das veias doentes quando comparadas com as veias sãs).

O aumento verificado na frequência de marcação de MMP-2 e de TIMP-2 (na túnica íntima) do estágio inicial para o avançado é, à luz das considerações anteriores, difícil de explicar. Ainda assim, é possível sugerir que ao longo do processo evolutivo da doença, apesar da atrofia da parede venosa no estágio inicial da doença poder ser associada à diminuição geral da presença destas enzimas, a manutenção do processo inflamatório crónico em doentes em estágio avançado poderá ser responsável pela elevação, ainda que desregulada, da síntese local destas enzimas, promovendo o processo fibrótico da parede venosa destes doentes. Deste modo, é mais correto sugerir que esta elevação poderá ocorrer na íntima, visto ser a túnica mais próxima e, logo, a mais suscetível ao stresse traumático que ocorre com a coluna de sangue (cada vez maior, com a evolução da doença). A atrofia inicial poderá representar uma tentativa de acomodação da parede venosa ao incremento de pressão sanguínea e a fibrose venosa, nos estádios avançados, poderá significar uma tentativa desregulada de controlo dessa pressão sanguínea em expansão.

Por fim, relativamente à marcação de TGF- β 2 e às diferentes tendências que os dados mostraram para as túnicas íntima e média, e perante a inexistência de estudos publicados com este recetor, é difícil sugerir uma razão para esta discrepância. No entanto, tomando em consideração o que foi referido anteriormente, relativamente ao processo inflamatório crónico originado pela coluna de sangue em doentes no estágio avançado, poderá ser adiantado que o aumento do recetor na íntima é provavelmente a verdadeira mudança no decorrer da progressão da doença. Assim, à presença reduzida de TGF- β 2 no estágio inicial da doença (com o objetivo de diminuir o processo inflamatório e promover uma acomodação da parede venosa à coluna de sangue) poderá suceder um aumento desse recetor, face ao incremento exagerado de pressão na veia, facilitando a tendência de fibrose na parede venosa. É portanto mais correto sugerir que o aumento deste recetor ocorrerá maioritariamente na túnica mais exposta ao processo de stresse traumático (a túnica íntima).

No que à **região inguinal** e à hipótese H6 (que afirmava a existência de uma diferença estatisticamente significativa na frequência de marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas diferentes túnicas entre as veias da região inguinal de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado) diz respeito, os dados parecem indicar que:

- Poderá haver uma diferença de frequência de marcação de MMP-2 entre os dois subgrupos de doentes nas túnicas íntima e média, tendo em consideração que a presença desta enzima surgiu menos frequentemente nas veias com IVC em estágio avançado (logo a hipótese poderia ter sido parcialmente confirmada). E, se alguma diferença houver na frequência de marcação de MMP-2 entre os dois subgrupos, esta diferença poderá ser maior na túnica média;

- A hipótese H6 poderia ter sido confirmada quanto à marcação de TIMP-2, face à presença mais frequente desta enzima nas túnicas íntima e média das veias doentes em estágio avançado e menos frequente na túnica adventícia das mesmas veias;

- Relativamente à marcação do recetor de TGF- β , a mesma hipótese poderia ter sido parcialmente confirmada, uma vez que a presença de TGF- β R2 se revelou mais frequentemente apenas na túnica íntima das veias doentes em estágio avançado.

A diminuição de MMP-2 na íntima e média, o aumento de TIMP-2 na íntima e média e o aumento de TGF- β R2 na íntima, podem indicar o início do processo fibrótico nas túnicas mais sujeitas ao stresse traumático. Para este processo contribuirão o aumento dos recetores de TGF- β (intervenientes no processo inflamatório) e o aumento dos inibidores das enzimas que degradam o colagénio (dentro dos quais, o TIMP-2), com a consequente diminuição destas (dentro das quais, a MMP-2). Neste sentido, pode sugerir-se uma função protetora (do processo fibrótico) ao facto do segmento de veia da região inguinal apresentar maior diâmetro (logo, maior capacidade para acomodar um volume superior de sangue), o qual retarda o processo fibrótico neste segmento de veia. O facto anterior pode constituir também a razão pela qual se consegue objetivar primeiramente a insuficiência venosa neste segmento que, pela lei de Laplace, é sujeito a maior pressão mural, desencadeando a atrofia da parede e o afastamento das cúspides venosas.

Já a diminuição de TIMP-2 na túnica adventícia (note-se que esta variação se repete nas regiões maleolar e colateral) poderá ser entendida no âmbito do fenómeno de diminuição generalizada de TIMPs que decorre da redução profunda de colagenases nesta túnica das veias doentes em estágio avançado.

Da confrontação destes resultados com os obtidos para a intensidade da marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β R2 nas veias doentes da região inguinal surgem factos que importa destacar. Em primeiro lugar, tal como avançava parte da hipótese H10 (recorde-se: existência de uma diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β R2 entre as veias doentes em estágio inicial e avançado), os dados (para a intensidade de marcação dos respetivos anticorpos) parecem apontar para a existência de diferenças de intensidade de marcação das enzimas (facto que não se estende ao recetor) entre os dois subgrupos comparados, uma vez que a intensidade de marcação de MMP-2 e TIMP-2 se encontrava diminuída nas veias doentes em estágio avançado.

Em segundo lugar, apenas a diminuição de intensidade de MMP-2 é coerente com a diminuição de frequência dessa enzima nos doentes em estágio avançado. Relativamente ao TIMP-2, a diminuição global de intensidade de marcação não parece ser corroborada pelo aumento da frequência da enzima nas túnicas íntima e média, mas está de acordo com a diminuição da frequência constatada na adventícia. Sendo esta última túnica provavelmente responsável por estas discrepâncias.

No que concerne à **região colateral** e à hipótese H7, que afirmava a existência de uma diferença estatisticamente significativa na frequência de marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 nas diferentes túnicas entre as veias de doentes com IVC em estágio inicial e de doentes com IVC em estágio avançado, os dados (para a frequência de marcação dos respectivos anticorpos) parecem sugerir que:

- À semelhança do que aconteceu para a região inguinal, poderá haver uma diferença de frequência de marcação de MMP-2 entre os dois subgrupos de doentes nas túnicas íntima e média, uma vez que a presença desta enzima surgiu menos frequentemente nas veias com IVC em estágio avançado (logo a hipótese poderia ter sido parcialmente confirmada). E, se alguma diferença houver na frequência de marcação de MMP-2 entre os dois subgrupos, esta diferença poderá também ser maior na túnica média;

- A mesma hipótese poderia ter sido confirmada quanto à marcação de TIMP-2, considerando o facto da sua presença ser mais frequente na túnica íntima das veias doentes em estágio avançado e menos frequente nas restantes túnicas das mesmas veias;

- Quanto à marcação do recetor, a hipótese H7 poderia ter sido apenas parcialmente confirmada, dado que a presença de TGF- β 2 se revelou menos frequentemente na túnica íntima das veias em estágio avançado da doença.

Já os achados encontrados para a intensidade de marcação de MMP-2/TIMP-2/TGF- β 2 não acrescentaram informação relevante aos resultados da frequência da marcação, face à aparente ausência generalizada de diferenças na intensidade de marcação das enzimas e do recetor entre os dois subgrupos (contrariamente ao que afirmava a hipótese H11). Ainda assim, é possível afirmar que a diminuição de frequência de MMP-2 no estágio avançado é coerente com a discussão apresentada para a região inguinal. Relativamente ao TIMP-2, existe um aumento de frequência de marcação na túnica íntima das veias doentes em estágio avançado, que é coerente com a diminuição de MMP-2 na mesma túnica, e uma diminuição de frequência de marcação na túnica média das veias supracitadas, que pode ser explicada pelo facto de não existir qualquer marcação de MMP-2 nessa mesma túnica. Esta última explicação pode ser repetida para a diminuição de frequência de TIMP-2 na túnica adventícia.

Por último, e atendendo a todos os resultados discutidos até ao momento, é ainda pertinente salientar que a comprovação do aumento de espessura da adventícia e a verificação da diminuição de MMP-2 nesta túnica em veias doentes, quando comparadas com veias saudáveis, são concordantes. Sendo a MMP-2 uma gelatinase que degrada o colagénio, a sua diminuição na adventícia de veias doentes pode explicar o aumento de espessura da parede venosa (maioritariamente devido à deposição de fibras colagénicas). O facto do TIMP-2 estar diminuído em frequência nos doentes em estágio avançado, comparativamente aos doentes em estágio inicial, poderá ser explicado unicamente pela inexistência/diminuição de colagenases nessa túnica das veias doentes. De um modo geral, verificou-se uma diminuição de MMPs em todas as túnicas, com o avançar da doença. E, aparentemente, será a túnica adventícia a mais afetada pelo processo patológico.

4.4 Limitações do estudo

Este estudo não está isento de limitações. A mais evidente relaciona-se com o número reduzido de amostras de veias analisadas que, por sua vez, condicionou o tratamento estatístico dos dados e consequentemente a validade das conclusões. É importante salientar que esta limitação se prendeu com o facto de as amostras terem sido recolhidas por um só cirurgião, com a agravante de este ter de percorrer, num curto espaço de tempo, cerca de 300km para colher cada uma das amostras de veias saudáveis (controlos), na instituição de saúde que colaborou na investigação.

Para além da complexidade do processo de colheita de amostras, também a recolha de informação clínica e a execução do eco-doppler venoso pré-operatório se revelaram demoradas e laboriosas, tendo sido apenas realizadas pelo já mencionado cirurgião, facto que agravou a morosidade de todo o procedimento de recolha de dados.

Outras limitações possíveis podem ser apontadas no âmbito dos procedimentos laboratoriais. A técnica de IHQ aplicada deteta formas ativas e inativas das enzimas e do recetor. Para ultrapassar este problema poderia ser realizada a zimografia, que permitiria avaliar a atividade enzimática, com o objetivo de avaliar mais concretamente a influência das MMPs e dos seus inibidores no processo patológico da IVC.

Também o método utilizado de preservação dos tecidos pode ter alterado os resultados. Admite-se a possibilidade de ter ocorrido uma destruição parcial dos epítomos das proteínas, permitindo que apenas uma diminuta quantidade destas proteínas fossem marcadas. A afinidade dos anticorpos usados poderá também ter sido insuficiente para detetar as proteínas no tecido.

Em futuras investigações sobre o mesmo tema, seria pertinente (I) conseguir envolver uma equipa de cirurgiões na recolha de amostras, (II) obter uma amostra de dimensão razoável e que integrasse participantes em diferentes estádios CEAP, (III) repetir as técnicas laboratoriais e incluir a zimografia e (IV) renovar as análises estatísticas para testar as hipóteses levantadas.

5. Conclusão

A DVC deixou de ser considerada um problema do foro estético, estando associada a elevados custos socioeconómicos. Se não for tratada atempadamente, a evolução natural da doença poderá culminar em complicações sérias, como ulceração crónica do membro inferior. Os métodos terapêuticos atuais limitam-se ao alívio sintomático da doença e, em algumas situações, a terapias mais invasivas, como a cirurgia ou métodos térmicos de ablação venosa, com o objetivo de controlar a evolução da doença. A recorrência é frequente, provavelmente porque o tratamento atualmente realizado se centra na sintomatologia e nas complicações, em vez de ter em consideração a etiologia.

Não obstante a exaustiva investigação sobre a etiologia da DVC, a patogénese da doença continua por esclarecer. A identificação do papel das MMPs em várias doenças vasculares e degenerativas transformou-as num objeto proeminente no âmbito da investigação da DVC.

Ainda que com evidentes limitações, oportunamente referidas, este estudo apresentou dados relevantes e de elevado interesse científico. Parte da sua importância advém do simples facto de não existirem estudos publicados que apresentem os resultados imunohistoquímicos em função dos estádios da IVC. De um modo geral, os resultados obtidos comprovaram a superioridade da espessura das túnicas média e adventícia das veias doentes, quando comparadas com as veias saudáveis, e apontaram a túnica adventícia como a mais afetada pelo processo patológico. Os dados indicaram ainda uma hipotética diminuição de MMP-2, TIMP-2 e TGF- β 2 em todas as túnicas das veias doentes, quando comparadas com veias saudáveis, e uma possível diminuição de MMP-2 nas veias doentes em estágio avançado, quando comparadas com veias doentes em estágio inicial.

A replicação deste estudo num conjunto significativamente maior de amostras de veias reveste-se de elevada pertinência, uma vez que com o conhecimento mais aprofundado da fisiopatologia desta doença poderia ser possível contrariar localmente a desregulação MMP/TIMP de forma farmacológica ou mesmo genética, cessando a evolução crónica e inevitável desta doença.

6. Bibliografia

1. Albuquerque de Matos A, Mansilha A, Serra Brandão E, Cássio I, Barbosa J, França J, et al. Recomendações no diagnóstico e tratamento da doença venosa crónica [Internet]. Sociedade Portuguesa de Angiologia e Cirurgia Vasculár; 2011; 1-60.
2. Nicolaides a. N. Investigation of Chronic Venous Insufficiency : A Consensus Statement. *Circulation*. 2000; 102(20):e126-63.
3. Robertson L, Evans C, Fowkes FGR. Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology*. 2008; 23(3):103-11.
4. Porter JM, Moneta GL, Consensus AI. Reporting standards in venous disease: An update. 1995;635-45.
5. Lim CS, Davies a H. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg*. 2009; 96(11):1231-42.
6. Raffetto JD, Khalil R a. Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology*. 2008;23(2):85-98.
7. Nicolaides a. N. Chronic Venous Disease and the Leukocyte-Endothelium Interaction: From Symptoms to Ulceration. *Angiology*. 2005; 56(6 suppl):S11-9.
8. Raffetto JD, Khalil R a. Matrix metalloproteinases in venous tissue remodeling and varicose vein formation. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008;6(3):158-72.
9. Kowalewski R, Malkowski A, Sobolewski K, Gacko M. Evaluation of transforming growth factor-beta signaling pathway in the wall of normal and varicose veins. *Pathobiology*. 2010; 77(1):1-6.
10. Raffetto JD. Dermal pathology, cellular biology, and inflammation in chronic venous disease. *Thromb Res*. Elsevier Ltd; 2009; 123(SUPPL. 4):S66-71.
11. Mannello F, Raffetto J. Matrix metalloproteinase activity and glycosaminoglycans in chronic venous disease: the linkage among cell biology, pathology and translational research. *Am J Transl Res*. 2011;3(2):149-58.
12. Diniz L., Marques J., Coito A, Pinto G., Korn M. A doença venosa dos membros inferiores. Gráfico B. Porto Editora; 1979; 24-53
13. Bergan JJ. *The Vein Book*. Elsevier. 2006; 15-124; 499-548

14. Beebe-Dimmer J, Pfeifer J. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Annals of Epidemiology*. 2005; 15(3):175-84.
15. Williams NS, Bulstrode CJK. *Bailey and Love's Short Practice of Surgery*. 25th ed. 2008; 54:925-943
16. Browse N, Burnand K, Irvine A, Wilson N. *Diseases of Veins*. 1999; 49-65.
17. Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg*. 2004; 40(6):1248-52.
18. BALAS P, A. NICOLAIDES. *Official Journal of International Union of Angiology*. 2014;33: 87-208.
19. Eklof B, Perrin M, Delis KT, Rutherford RB, Gloviczki P. Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. *J Vasc Surg*. Elsevier Inc.; 2009;49(2):498-501.
20. Raffetto JD, Mannello F. Pathophysiology of chronic venous disease. *Int Angiol*. 2014;33:1-10.
21. Segiet OA, Brzozowa M, Piecuch A, Dudek D, Reichman-Warmusz E, Wojnicz R. Biomolecular mechanisms in varicose veins development. *Ann Vasc Surg*. Elsevier Ltd; 2014; 377-384
22. Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris)*. 2001;49(4):326-32.
23. Badier-Commander C. Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An in situ study. *J Pathol*. 2001;193(3):398-407.
24. Aravind B, Saunders B, Navin T. Inhibitory effect of TIMP influences the morphology of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Elsevier Ltd; 2010;40(6):754-65.
25. Raffetto JD, Qiao X, Koledova V V., Khalil R a. Prolonged increases in vein wall tension increase matrix metalloproteinases and decrease constriction in rat vena cava: Potential implications in varicose veins. *J Vasc Surg*. 2008; 48(2):447-56.
26. Pappas PJ, Lal BK, Ohara N, Saito S, Zapiach L, Durán WN. Regulation of Matrix Contraction in Chronic Venous Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;38(4):518-29.
27. Dabek J, Kułach A, Monastyrska-Cup B, Gasior Z. Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the "protective cytokine". *Pharmacol Rep*. 2006;58(6):799-805.

28. Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS De, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20: 1-18.
29. Dindelli M, Parazzini F, Basellini A. Risk factors for varicose disease before and during pregnancy. *Angiology.* 1993;44:361-7.
30. Lee AJ, Evans CJ, Allan PL, Ruckley CV, Fowkes FGR. Lifestyle factors and the risk of varicose veins: Edinburgh Vein Study. *J Clin Epidemiol.* 2003;56(2):171-9.
31. Jawien a. The Influence of Environmental Factors in Chronic Venous Insufficiency. *Angiology.* 2003;54(1 suppl):S19-31.
32. Eberhardt RT, Raffetto JD. Chronic venous insufficiency. *Circulation.* 2005;111(18):2398-409.
33. Pfisterer L, König G, Hecker M, Korff T. Pathogenesis of varicose veins - lessons from biomechanics. *Vasa [Internet].* 2014;43(2):88-99.
34. Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, Michel JB, Jacob MP. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol.* 2000;192(1):105-12.
35. Parra J, Cambria R, Hower C. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J Vasc Surg.* 1998;28(4):669-75.
36. Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau G, et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond).* 2007;112(4):229-39.

7. Anexos

Anexo 1 - Parecer da Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira

PARECER N.º 28/2009

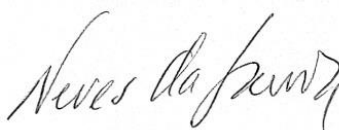
COMISSÃO DE ÉTICA DO CENTRO HOSPITALAR COVA DA BEIRA

Na sua reunião de 19 e 26 de Fevereiro de 2009, esta Comissão de Ética apreciou o pedido de autorização do Dr. Pedro Miguel Azevedo Serralheiro, médico interno da especialidade de cirurgia geral no CHCB e aluno do Doutoramento em Medicina na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, para a realização de um estudo subordinado ao tema “A clínica, as metaloproteinases, os inibidores tecidulares de metaloproteinases e o factor de crescimento transformador B1 na insuficiência venosa crónica dos membros inferiores”, a realizar no Serviço de Cirurgia deste Centro Hospitalar.

Apreciado o projecto, concluiu esta Comissão de Ética nada ter a opor à realização do mesmo.

Covilhã, 19 e 26 de Fevereiro de 2009

O Presidente da Comissão de Ética



(Dr. Neves da Gama)

Anexo 2 - Consentimento informado participantes no estudo do Centro Hospitalar da Cova da Beira



Consentimento Livre e Informado

O Serviço de Cirurgia Geral do Centro Hospitalar da Cova da Beira, com a colaboração do Serviço de Cirurgia Cardiotorácica do Hospital da Universidade de Coimbra, está correntemente a realizar um Estudo de Investigação com o objectivo de contribuir activamente para a comunidade científica no conhecimento mais aprofundado na área da fisiopatologia da Insuficiência venosa dos membros inferiores, dando a possibilidade de desenvolvimentos futuros de novas formas de tratamento desta patologia. Para isso serão necessários recolher dados clínicos e imagiológicos dos doentes com Insuficiência Venosa dos Membros Inferiores, ou com patologia coronária e colher amostras de Veia Safena Interna que irão ser excisadas no tratamento cirúrgico a que o doente irá ser sujeito.

O Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, vem solicitar a sua colaboração para que sejam utilizados os dados clínicos e imagiológicos, decorrentes da avaliação da patologia que apresenta e para que sejam utilizadas algumas amostras do tecido venoso, que irá ser sujeito a excisão durante a intervenção cirúrgica a que vai ser sujeito/a. Informa-se que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento, sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo C.H.C.B., E.P.E.; informa-se ainda que todos os dados recolhidos são confidenciais.

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- Entregou esta informação
- Explicou o propósito deste trabalho
- Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo doente.

Nome do investigador

Assinatura do investigador

Data

__/__/__

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- O Sr.(a) leu e compreendeu todas as informações desta informação e teve tempo para as ponderar
- Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente
- Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao investigador que lhe fosse explicado, tendo este explicado todas as dúvidas.
- O Sr.(a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Doente

Assinatura do Doente

Representante Legal

Data

__/__/__

Anexo 3 - Consentimento informado participantes no estudo do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Consentimento Livre e Informado

O Serviço de Cirurgia Geral do Centro Hospitalar da Cova da Beira, com a colaboração do Serviço de Cirurgia Cardiorácica do Hospital da Universidade de Coimbra, está correntemente a realizar um Estudo de Investigação com o objectivo de contribuir activamente para a comunidade científica no conhecimento mais aprofundado na área da fisiopatologia da Insuficiência venosa dos membros inferiores, dando a possibilidade de desenvolvimentos futuros de novas formas de tratamento desta patologia. Para isso serão necessários recolher dados clínicos e imagiológicos dos doentes com patologia coronária e colher amostras de Veia Grande Safena, que irão ser excisadas no tratamento cirúrgico a que o doente irá ser sujeito e servirão de grupo controlo no referido estudo.

O Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, vem solicitar a sua colaboração para que sejam utilizados os dados clínicos e imagiológicos, decorrentes da avaliação da patologia que apresenta e para que seja utilizada uma amostra de 2 cm do tecido venoso que irá ser necessariamente excisado durante a intervenção cirúrgica a que vai ser sujeito/a, para a realização do bypass coronário.

As amostras irão ser utilizadas para o estudo em laboratório de metaloproteínas, (enzimas da parede venosa) e TGF- β 1 (uma citocina também presente na parede venosa). As amostras serão acondicionadas na Faculdade de Medicina da Universidade da Beira Interior e irão ser incineradas posteriormente ao estudo. Não se acarretam quaisquer riscos ou benefícios directos para si na recolha das referidas amostras.

Informa-se que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento, sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo H.U.C., E.P.E.; informa-se ainda que todos os dados recolhidos são confidenciais, sujeitos a código identificador a que só o investigador responsável terá acesso.

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- Entregou esta informação
- Explicou o propósito deste trabalho
- Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo doente.

Nome do investigador

Pedro Serralheiro

Assinatura do investigador

Data

___/___/___

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- O Sr.(a) leu e compreendeu todas as informações desta informação e teve tempo para as ponderar
- Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente
- Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao investigador que lhe fosse explicado, tendo este explicado todas as dúvidas.
- O Sr.(a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Doente

Assinatura do Doente

Representante Legal

Data

___/___/___

Anexo 4 - Certificado de apresentação de póster em Congresso

Fundação AstraZeneca Innovate Competition

O Departamento de Ciência e Investigação da Associação de Estudantes da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa da Universidade NOVA de Lisboa declara que

António José Grilo Novais

concorreu ao Fundação AstraZeneca Innovate Award, apresentando o trabalho

Immunohistochemistry: Matrix metalloproteinases (MMPs) and transforming growth factor-beta1 in chronic venous disease in lower limbs

sob a forma de poster no congresso iMed 4.0 Conference - Innovating Medicine.

Ana Rita Alves

Ana Rita Alves

Coordenadora Fundação AstraZeneca
Innovate Competition



UNIVERSIDADE
NOVA DE LISBOA



Faculdade de Ciências Médicas/NOVA

Beatriz Lança

Beatriz Lança

Presidente da CO iMed 4.0
Conference - Innovating Medicine



António Jacinto

Prof. Doutor António Jacinto

Pelo Júri do Fundação AstraZeneca
Innovate Competition



Anexo 5 - Certificado de apresentação de póster em Congresso

iMed[®] Conference

Certificate of Participation
Fundação AstraZeneca Innovate Competition

It is hereby certified that

António José Grilo Novais

participated with a poster presentation in the Fundação AstraZeneca Innovate Competition, an initiative included in iMed 5.0 Conference, an event organised by Associação de Estudantes da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa which took place at the Rectorate of Universidade NOVA de Lisboa, on the 12th and 13th of October 2013.

The Fundação AstraZeneca Innovate Competition is an initiative that reinforces the commitment of iMed Conference to young students involved in scientific research projects, promoting the best ideas in the area of Life Sciences. This initiative is sponsored by Fundação AstraZeneca and has the institutional support of CEDOC.

Diogo Cabral
Diogo Cabral
President of iMed 5.0 Conference

Ana Rita Alves
Rita Alves
Fundação AstraZeneca Innovate Competition Coordinator

aefcL

Fundação AstraZeneca

CEDOC
Chronic Diseases FCM NOVA

Anexo 6 - Publicação em "Abstract book"

NOVAIS, António José Grilo*, SERRALHEIRO, Pedro**

A clínica, as Metaloproteínas, os Inibidores Tecidulares de Metaloproteínas e o Factor de Crescimento Transformador - β 1 na Insuficiência Venosa Crónica dos membros inferiores.

* Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade da Beira Interior

**Centro de Investigação de Ciências da Saúde(CICS) - Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade da Beira Interior

"Immunohistochemistry: Matrix metalloproteinases (MMPs) and transforming growth factor-beta1 in chronic venous disease in lower limbs"

Identificação do problema

Inexistência de estudos suficientes para correlacionar a síntese de Metaloproteínas (MMP) e Inibidores Tecidulares de Metaloproteínas (TIMP) na insuficiência venosa crónica dos membros inferiores, com o grau de evolução da doença e os seus sintomas, assim como inexistência de estudos suficientes que correlacionem

venosa crónica dos membros inferiores com a síntese de Metaloproteínas ou Inibidores Tecidulares de Metaloproteínas nas veias varicosas, poderá eventualmente, precipitar estudos subsequentes mais concretos com o objectivo de contrariar localmente a desregulação MMP / 2 TIMP de forma farmacológica ou genética, cessando a evolução crónica e inevitável da doença.

Referencial teórico fundamentador

É sobejamente conhecido pelos clínicos habituados a lidar diariamente com doentes com patologia venosa dos membros inferiores, nomeadamente com a Insuficiência venosa crónica e o surgimento de varizes, que a doença surge em variadíssimos estados de evolução, visto tratar-se de uma doença de carácter crónico. É também conhecida a discrepância dos sintomas apresentados pelos doentes relativamente à sua evolução patológica. Este é um facto que intrin-