



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# As metaloproteinases, seus inibidores e os recetores do fator transformador de crescimento $\beta$ na insuficiência venosa crónica dos membros inferiores: estudo genético exploratório

**Marina Adelina Delgado João**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Dr. Pedro Miguel Azevedo Serralheiro

Covilhã, maio de 2016

# Dedicatória

Aos meus pais, obrigada por tudo.

## Agradecimentos

Especialmente ao Dr. Pedro Serralheiro pela oportunidade de participar no estudo que desenhou, pela orientação, partilha de conhecimento e por todo o tempo despendido na realização desta dissertação.

À Faculdade de Ciências da Saúde e Universidade da Beira Interior pela formação académica e pessoal ao longo dos últimos 6 anos.

Ao Centro de Investigação de Ciências da Saúde, pelo material cedido para a realização dos diferentes procedimentos laboratoriais deste estudo.

Ao Professor Jorge Gama, pelos bons conselhos e ajuda no tratamento estatístico dos dados, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Dra. Andreia Soares pela sua contribuição na revisão desta dissertação.

Aos meus pais, por me formarem e darem tudo o que sou, sem qualquer condicionalismo durante os meus 23 anos de formação como pessoa.

Às minhas colegas de casa pelo apoio, amizade e alegria nos momentos de maior aflição.

Aos meus amigos que são sempre uma fonte inesgotável de energia positiva.

Por tudo e nada mais que tudo, ao meu namorado.

# Prefácio

*“Vocês não estão aqui para ganhar a vida...  
Estão aqui para enriquecer o mundo, e empobrecerão  
a si mesmos se esquecerem essa tarefa”*

Woodrow Wilson

*“Festina Lente”  
(Apressa-te lentamente)*

Provérbio latino

## Resumo

**Introdução:** A doença venosa crónica é uma patologia que desencadeia a remodelação estrutural anormal da parede venosa, o desenvolvimento de veias varicosas e alterações dermatológicas veno-específicas. Caracteriza-se por uma hipertensão venosa ambulatória contínua que parece contribuir para a síntese e libertação de várias citocinas, incluindo o fator transformador de crescimento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), intervenientes no processo inflamatório. Este processo inflamatório origina a proliferação de fibroblastos que sintetizam metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) e seus inibidores (TIMPs). O desequilíbrio entre MMPs/TIMPs aparenta ser determinante na degradação e deposição desregulada de colagénio e elastina na parede venosa. Este processo fisiopatológico ainda não é totalmente compreendido.

**Objetivo:** Comprovar uma variação na expressão genética de MMPs, TIMPs e recetores do fator transformador  $\beta$  (TGFBRs) entre veias insuficientes de três regiões anatómicas distintas (inguinal, maleolar e colateral) dos membros inferiores, bem como entre veias insuficientes e saudáveis da região maleolar dos membros inferiores.

**Métodos:** Foi realizado um estudo observacional, transversal, experimental de caso-controlo, com sete doentes com insuficiência venosa crónica (IVC) e 13 controlos (sem IVC) submetidos a *bypass* coronário. Foram colhidas amostras de veia grande safena das regiões inguinal, colateral e maleolar, no grupo com IVC, e amostras de veia grande safena da região maleolar no grupo de controlo. A expressão genética de MMP2, MMP9, MMP12, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGFBR2 e TGFBR3 foi determinada pela técnica *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qPCR).

**Resultados:** Os dados obtidos não permitiram comprovar a variação na expressão genética de MMPs, TIMPs e TGFBRs de veias insuficientes em função da região anatómica. No entanto, foi possível verificar a existência de expressões genéticas diminuídas de MMP2, TIMP3, TIMP4 e TGFBR2 nas veias do grupo com IVC comparativamente ao grupo controlo.

**Conclusão:** Não obstante as evidentes limitações, os resultados verificados são de elevado interesse científico e sublinham a importância de replicar o estudo num conjunto significativamente maior de amostras. O conhecimento mais aprofundado da fisiopatologia inerente à IVC permitiria contrariar localmente a desregulação MMP/TIMP, cessando a evolução crónica e inevitável da doença.

## Palavras-chave

Insuficiência venosa crónica, qPCR, MMP, TIMP, TGFBR, matriz extracelular.

## 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 characterized by a continuous ambulatory venous hypertension that seems to contribute to the synthesis and release of several cytokines, including transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). The resulting inflammatory process leads to the proliferation of fibroblasts that synthesize metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). MMPs/TIMPs imbalance appears to result in unregulated degradation and deposition of collagen and elastin in the venous wall. This pathophysiological process is still not fully understood. **Aim:** To demonstrate variation on gene expression of MMPs, TIMPs and transforming growth factor-beta receptors (TGFBR) among insufficient veins from three different anatomical regions (inguinal, malleolar and collateral) of the lower limbs, as well as between insufficient and healthy veins of the lower limbs from malleolar region.

**Methods:** An observational, cross-sectional, case-control study was conducted using vein samples of seven patients with chronic venous insufficiency (CVI) and 13 controls (without CVI) undergoing coronary bypass. Great saphenous vein samples from inguinal, collateral and malleolar regions were harvested from the CVI group, while great saphenous vein samples, from malleolar region only, were collected from the control group. Gene expression of MMP2, MMP9, MMP12, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGFBR2 e TGFBR3 was analyzed through the use of quantitative real time-polymerase chain reaction (qPCR).

**Results:** The results did not give enough evidence of variation on gene expression of MMPs, TIMPs and TGFBR among insufficient veins from different anatomical regions. However, data showed that the gene expression of MMP2, TIMP3, TIMP4 and TGFBR2 were decreased on insufficient veins, when compared to control veins.

**Conclusion:** Despite obvious limitations, the achieved results have a high scientific value and emphasize the importance of replicate the study in a significantly larger sample set. A deeper understanding of the CVI pathophysiology could facilitate the local control of MMP/TIMP deregulation, stopping the inevitable evolution of the disease.

## Keywords

Chronic venous insufficiency, qPCR, MMPs, TIMPs, TGFBRs, extracellular matrix.

# Índice

Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Lista de Tabelas .....	iv
Lista de Acrónimos .....	x
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomia e fisiologia do sistema venoso dos membros inferiores .....	1
1.2 Insuficiência venosa crónica .....	2
1.2.1 Definição e classificação CEAP .....	2
1.2.2 Etiologia .....	3
1.2.3 Epidemiologia.....	4
1.3 Alterações primárias da parede vascular na insuficiência venosa crónica .....	5
1.3.1 Degradação da MEC.....	6
1.3.2 Metaloproteinases e seus inibidores tecidulares .....	6
1.3.3 Intervenção do fator transformador de crescimento $\beta$ .....	7
1.4 Objetivos e hipóteses de investigação.....	8
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>10</b>
2.1 Tipo de estudo .....	10
2.2 Local e procedimentos de recolha da amostra.....	10
2.3 Características demográficas e clínicas dos participantes .....	11
2.4 Procedimentos laboratoriais na análise da expressão genética.....	12
2.4.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).....	12
2.4.2 Quantitative real time-polymerase chain reaction (qPCR) .....	12
2.5 Variáveis e análise estatística dos dados .....	14
2.6 Considerações éticas e legais .....	14
<b>3. Resultados .....</b>	<b>16</b>
3.1 Expressão genética de MMPs, TIMPs e TGFBRs em veias insuficientes da região maleolar, inguinal e colateral .....	16
3.2 Expressão genética das MMPs, TIMPs e TGFBRs em veias saudáveis e insuficientes	17
<b>4. Discussão dos resultados.....</b>	<b>19</b>
4.1 Expressão genética de MMPs, TIMPs e TGFBRs em veias insuficientes da região maleolar, inguinal e colateral .....	19
4.2 Expressão genética das MMPs, TIMPs e TGFBRs em veias saudáveis e insuficientes	20

4.3	Limitações do estudo .....	21
5.	<b>Conclusão .....</b>	<b>22</b>
6.	<b>Bibliografia.....</b>	<b>23</b>
7.	<b>Anexos .....</b>	<b>25</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Escala de classificação CEAP.....	3
<b>Tabela 2</b> Características demográficas e clínicas do grupo com IVC e dos controlos [média $\pm$ erro padrão e frequências absolutas (frequências relativas)]. .....	11
<b>Tabela 3</b> Primers utilizados no estudo.....	13
<b>Tabela 4</b> Expressão genética (média $\pm$ erro padrão) de MMPs em função do local de colheita das veias.....	16
<b>Tabela 5</b> Expressão genética (média $\pm$ erro padrão) de TIMPs em função do local de colheita das veias.....	17
<b>Tabela 6</b> Expressão genética (média $\pm$ erro padrão) de TGFBRs em função do local de colheita das veias.....	17
<b>Tabela 7</b> Expressão genética (média $\pm$ erro padrão) de MMPs em função do grupo de pertença. ....	18
<b>Tabela 8</b> Expressão genética (média $\pm$ erro padrão) de TIMPs em função do grupo de pertença.....	18
<b>Tabela 9</b> Expressão genética (média $\pm$ erro padrão) de TGFBRs em função do grupo de pertença.....	18

## Lista de Acrónimos

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEAP	Clínica, Etiologia, Anatomia, Fisiopatologia
CICS	Centro de Investigação de Ciências da Saúde
DVC	Doença Venosa Crónica
IVC	Insuficiência Venosa Crónica
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases da matriz extracelular
qPCR	Quantitative real time-polymerase chain reaction
RNA	Ácido ribonucleico
TGFB	Fator Transformador de Crescimento - beta
TGFBRs	Recetores do Fator Transformador de Crescimento - beta
TIMPs	Inibidores Tecidulares das Metaloproteinases
VGS	Veia Grande Safena

# 1 Introdução

## 1.1 Anatomia e fisiologia do sistema venoso dos membros inferiores

A divisão anatómica do sistema venoso dos membros inferiores é habitualmente feita em três sistemas: superficial, profundo e perfurante[1, 2].

As veias do sistema venoso superficial, localizadas acima da fáscia profunda da perna e da coxa e no interior do tecido celular subcutâneo, iniciam-se no pé e, no seu trajeto ascendente ao longo do membro inferior, formam as duas principais veias do sistema superficial: a grande e a pequena safena. A veia grande safena (VGS) é formada pela união da veia dorsal do hálux e o arco venoso dorsal do pé, ascende anteriormente até o maléolo medial e segue posteriormente ao côndilo medial do fémur, atravessa o hiato safeno da fáscia lata e drena na veia femoral comum. A veia pequena safena origina-se na face lateral do pé, a partir da união da veia dorsal do quinto dedo com o arco venoso dorsal, percorre posteriormente ao maléolo lateral e ascende para, na fossa poplítea, drenar para a veia poplítea[1-4].

As veias do sistema venoso profundo situam-se abaixo da fáscia profunda da perna e da coxa e acompanham o trajeto de todas as principais artérias dos membros inferiores[1-4].

Por fim, o sistema perfurante contém pequenas veias que atravessam a fáscia profunda da perna e da coxa e unem os dois sistemas anteriores, drenando o sangue do sistema venoso superficial para o profundo[1-4].

A circulação venosa tem como principal objetivo fazer regressar o sangue da periferia ao coração, para que ocorra a sua reoxigenação no pulmão e posterior recirculação no sistema arterial[1]. O sistema venoso tem um papel *major* na determinação do retorno venoso e pré-carga em condições fisiológicas e patológicas[5]. Devido ao diâmetro e à capacidade de expansão das veias, e dependendo do nível de atividade e postura corporal, 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].

Para que o sangue retorne ao coração são necessárias várias estruturas, das quais se destacam o coração (bomba central), os músculos da região gemelar (bomba periférica), o plexo venoso plantar e as válvulas venosas. Para o retorno venoso contribuem ainda os seguintes fatores adjuvantes: 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 sucção vascular na

diástole cardíaca. Todos os anteriores contribuem para a criação de um gradiente de pressão que permite ao sangue chegar ao coração contrariando a força da gravidade[1].

## 1.2 Insuficiência venosa crónica

### 1.2.1 Definição e classificação CEAP

Em 2009 foi publicado um documento[6], desenvolvido por um grupo internacional de peritos, no qual constavam importantes recomendações quanto à terminologia a utilizar na investigação, diagnóstico, tratamento e seguimento de doentes com patologia venosa. No âmbito desta dissertação é importante apresentar as seguintes[6, 7]:

**Doença venosa crónica (DVC)** - Qualquer alteração morfológica e funcional do sistema venoso, de longa duração, e cujos sintomas e/ou sinais indicam a necessidade de investigação e/ou tratamento.

**Insuficiência venosa crónica (IVC)** - Conceito reservado para os estádios avançados de DVC; aplica-se perante a existência de alterações funcionais no sistema venoso que originam edema, alterações tróficas ou úlceras venosas.

**Incompetência valvular venosa** - Disfunção das válvulas venosas, da qual resulta um fluxo venoso retrógrado de duração anormal.

**Refluxo venoso** - Fluxo venoso retrógrado de duração anormal em qualquer segmento venoso. Primário: provocado por disfunção valvular venosa idiopática. Secundário: provocado por trombose ou trauma de etiologia mecânica, térmica ou química. Congénito: provocado pela ausência ou desenvolvimento anormal das válvulas venosas.

**Varizes reticulares** - Veias subcutâneas azuladas e dilatadas, geralmente tortuosas e com 1-3mm de diâmetro. São excluídas as veias normais visíveis em pessoas com pele fina e clara.

**Varizes Tronculares** - Veias dilatadas com 3mm ou mais de diâmetro, medido em posição vertical. Pode envolver veias safenas, afluentes das safenas ou outras veias superficiais. As varizes são geralmente tortuosas.

**Úlcera venosa** - Disrupção de toda a espessura da pele, mais frequentemente na região do tornozelo, habitualmente com falha na cicatrização.

Para uniformizar o diagnóstico e controlo da doença foi criada, em 1994, a classificação CEAP que se baseia nos sinais clínicos (C), etiologia (E), distribuição anatómica (A) e condições fisiopatológicas (P). Além de servir como guia sistemático de diagnóstico clínico e

caracterização dos pacientes com patologia venosa, permite uma melhor racionalização do tratamento para cada perfil de doente[7].

Tabela 1 Escala de classificação CEAP.

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

### 1.2.2 Etiologia

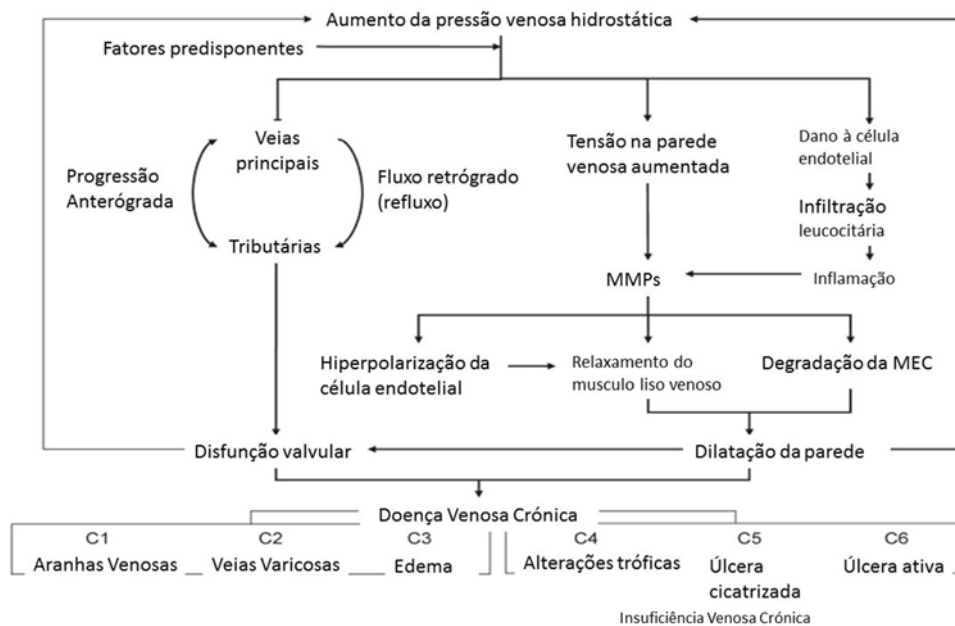
De acordo com a escala CEAP, a etiologia de DVC pode ser classificada da seguinte forma:

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

Na maioria dos casos a DVC é classificada como primária ( $E_p$ ) relativamente à etiologia, no entanto a patogénese continua por esclarecer. Uma das hipóteses com maior aceitação afirma que a disfunção valvular e posterior refluxo sanguíneo estão na origem da lesão da parede

venosa. De acordo com esta hipótese, o refluxo venoso causa estase sanguínea e hipertensão venosa que, por sua vez, desencadeiam a fraqueza e dilatação da parede venosa. A dilatação, ao separar as cúspides das válvulas, aumenta a incompetência valvular, dando início a um novo ciclo dos acontecimentos anteriormente descritos[8]. Esta hipótese plausível foi, entretanto, posta em causa por evidências que sugerem que alterações na parede venosa precedem a incompetência valvular[8]. Neste novo cenário, o aparecimento de veias varicosas seria secundário a alterações ao nível celular e dos componentes da matriz extracelular, que causariam fraqueza e alteração do tónus venoso. A etiologia destas alterações permanece desconhecida, no entanto fatores como a hipoxia, estiramento e diminuição das forças de cisalhamento podem estar envolvidos[8].

Vários fatores foram identificados como potenciadores de risco para DVC, entre eles: a idade, o género, a história familiar e a gravidez[8-13].



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

### 1.2.3 Epidemiologia

A DVC é uma patologia comum e, embora exista uma grande variabilidade entre os diferentes estudos epidemiológicos, a prevalência nos países ocidentais situa-se entre os 30% e 50%[8, 12, 14]. Surge habitualmente descrita como uma patologia dos países ocidentais uma vez que ocorre com maior frequência em países desenvolvidos. A recorrência da patologia (mais propriamente das veias varicosas) foi documentada em 7% a 65% dos pacientes após tratamento e permanece um problema comum, debilitante, complexo e de custos acrescidos[15].

A maioria dos estudos afirma que esta patologia é mais comum em mulheres, no entanto alguns demonstram o contrário[16, 17]. Foi sugerido que as mulheres estariam mais atentas à existência de veias varicosas e por isso reportavam mais o fenómeno[8].

Em Portugal e segundo os dados da Sociedade Portuguesa de Angiologia e Cirurgia Vasculiar 1/3 da população portuguesa sofre de DVC; 2 milhões de mulheres com mais de 30 anos sofrem de DVC ou 7 em cada 10 mulheres com mais de 30 anos sofrem de problemas de circulação venosa e metade ainda não está tratada[1].

Relativamente ao impacto socioeconómico da patologia em Portugal: 8% dos doentes reformam-se antecipadamente devido à patologia e a 55.4% dos doentes com úlcera venosa recorre à suspensão temporária da atividade profissional (tendência que se agrava com a idade)[1].

Quanto à qualidade de vida, 48% da população portuguesa sofre regularmente de dor nos tornozelos e/ou pernas; 58% da população feminina, com mais de 40 anos de idade, sente a sua qualidade de vida significativamente afetada pela DVC; e 64% da população feminina, com mais de 50 anos de idade, 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. A túnica adventícia é composta por fibras musculares, colagénio, fibroblastos, células musculares lisas e *vasa vasorum*. A túnica média compõe-se de 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. Por fim, a túnica íntima consiste em células endoteliais e é suportada por uma lâmina elástica interna. Existe um balanço dinâmico entre a produção e a degradação de colagénio, elastina, células musculares lisas e proteoglicanos[13].

As veias varicosas primárias são funcionalmente caracterizadas pelo refluxo venoso e aumento da estase sanguínea na posição supina. A dilatação e tortuosidade resultam da remodelação progressiva da parede venosa, com distúrbio da organização da matriz extracelular/células musculares lisas. As áreas afetadas não se encontram uniformemente distribuídas: existem áreas hipertróficas, assim como áreas de veia atroficas e áreas não alteradas[18].

Nas zonas hipertróficas das veias varicosas a organização das três camadas musculares concêntricas encontra-se evidentemente alterada. Devido à acumulação de matriz extracelular (MEC) os feixes de células musculares lisas perdem a orientação habitual e verifica-se uma acumulação de tecido fibroso que se interpõe entre os feixes regulares de músculo liso. Em contraste, nas zonas atroficas, tanto os componentes celulares como a MEC encontram-se reduzidos. A desorganização e fragmentação da rede elástica da média é evidente nas zonas hipertróficas e atroficas[18].

### 1.3.1 Degradação da MEC

A MEC da parede venosa providencia a base estrutural essencial ao suporte dos vasos sanguíneos, diferenciação, sinalização e migração celular assim como epitelização e cicatrização de feridas. Tem uma estrutura tridimensional dinâmica e é constituída não só por elastina e colagénio (as duas principais macromoléculas), como também por proteoglicanos e glicoproteínas estruturais [5, 8, 18]. As propriedades biomecânicas dos vasos dependem maioritariamente das quantidades absolutas e relativas da elastina e do colagénio [18]. Dentro dos 26 tipos de colagénio conhecidos, o tipo I e o tipo III são os constituintes *major* das fibrilas detetadas nos vasos sanguíneos, representando 60% e 30% do colagénio vascular[18]. O *turnover* metabólico das fibras de elastina e do colagénio da MEC é relativamente baixo nos adultos verificando-se o seu aumento em doenças vasculares [18].

Muito provavelmente a degradação da MEC contribui para o enfraquecimento e dilatação das veias. Em alguns estudos foi possível observar a disrupção das fibras elásticas e o espessamento das fibras de colagénio em veias varicosas, assim como uma quantidade total de elastina diminuída nas veias varicosas, quando comparadas com veias não varicosas[18]. Também o colagénio se mostrou alterado nesta comparação: o colagénio tipo III, que contribui para a elasticidade dos vasos, encontrava-se diminuído enquanto o colagénio tipo I, responsável pela força de tensão, se encontrava aumentado nas veias varicosas.

### 1.3.2 Metaloproteinases e seus inibidores tecidulares

A homeostase da MEC é regulada por um grupo de enzimas denominadas metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores teciduais endógenos (TIMPs)[8].

As MMPs são endopeptidases dependentes do zinco que pertencem a uma família de protéases designadas metzincinas. Até à data foram identificadas 23 MMPs na espécie humana, das quais 14 são expressas em tecidos vasculares[8].

A atividade destas enzimas é controlada em diferentes patamares. A primeira linha de controlo situa-se na expressão genética e nos níveis de secreção proteica, a segunda na ativação dos zimogénios (enzimas não ativas), a última linha na inibição das enzimas através dos TIMPs e outros inibidores como a alfa-2-macroglobulina[18, 19].

São conhecidos apenas quatro TIMPs (TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4). Estas enzimas são capazes de inativar as MMPs, reduzindo a sua atividade proteolítica. A TIMP2 é também reconhecida por promover a apoptose e o crescimento de fibroblastos e, por seu , a TIMP3 possui atividade anti-apoptótica[20].

Há estudos a documentar níveis diminuídos de expressão genética de MMPs em veias insuficientes[10, 12, 21] e outros a provar o seu oposto, isto é, um aumento das MMPs em veias varicosas[22-25]. Experiências em veias safenas *ex vivo* demonstraram um aumento da expressão genética da MMP2 e MMP9 em veias expostas a um aumento de pressão venosa e uma diminuição superior a 50% dessa expressão genética quando expostas a pressões arteriais por mais de 3 dias[5]. Outros estudos mostraram ainda diferenças regionais na presença de MMPs[10, 25].

Para alguns autores, a hipertensão venosa secundária à estase sanguínea poderá levar a uma maior expressão de MMPs sintetizadas por fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas. Este aumento de MMPs (especialmente de MMP2) poderá ser responsável pela degradação da MEC e consequente relaxamento da parede da veia[8], que permitirá acomodar o volume em excesso. Este aumento de pressão dá início à cascata inflamatória[8].

Foi sugerido que o aumento da atividade proteolítica poderá não só estar envolvida na patogénese das veias varicosas, mas também a inibição da mesma, que posteriormente poderá levar à acumulação de MEC[5].

A presença de MMPs não implica causalidade, no entanto, e atendendo às diferentes expressões genéticas e localizações das MMPs no tecido venoso, é provável que as MMPs tenham diferentes funções nos vários estádios da doença venosa crónica [5].

### 1.3.3 Intervenção do fator transformador de crescimento $\beta$

O fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tem um papel preponderante na síntese e degradação de um grande número de moléculas da MEC, incluindo diferentes tipos de colagénio e proteoglicanos[26]. Também influencia a síntese de MMPs e seus inibidores[26].

O TGF- $\beta$  ocorre em três isoformas diferentes em mamíferos (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3). O TGF- $\beta$ 1 desempenha um papel crucial na remodelação da parede venosa[26]. Vários estudos comprovaram que os níveis de mRNA, assim como os níveis totais de TGF- $\beta$ 1, se encontravam aumentados nas paredes de veias varicosas quando comparados com os controlos[26, 27]. O TGF- $\beta$ 1 poderá ser responsável pela estimulação da síntese de componentes da MEC (especialmente colagénio e elastina), assim como pela diminuição da expressão/produção de

MMPs e aumento da expressão/produção de TIMPs[18]. O efeito estimulante do TGF- $\beta$ 1 na expressão de TIMPs é cumulativo à estimulação da síntese de colagénio e elastina[18].

Na presença de IVC, os fibroblastos da derme são um importante alvo para leucócitos ativados por TGF- $\beta$ 1[28]. A progressão da IVC parece ainda estar associada ao aumento dos níveis tecidulares de TGF- $\beta$ 1 e da atividade de MMPs, assim como à diminuição das respostas mitogénicas induzidas por TGF- $\beta$ 1 ao nível dos fibroblastos[29]. O papel do TGF- $\beta$ 1 está ainda relacionado com a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos contrácteis, assim como com o estímulo da síntese de outras proteínas contrácteis[29]. A forma ativa do TGF- $\beta$ 1 atua através do seu recetor tipo um (TGFBR1) e tipo dois (TGFBR2), sendo que o TGFBR1 é recrutado após a citocina se ligar ao TGFBR2. Como tal, a presença de TGF- $\beta$ 2 é essencial para a responsividade do TGF- $\beta$ 1[26]. A função primordial do recetor tipo três (TGFBR3) é a apresentação do TGF- $\beta$ 1 ao TGFBR2. Há estudos a relatar níveis de TGFBR2 significativamente aumentados em veias varicosas quando comparadas com controlos[26]. Estudos que abordaram outras patologias, como o cancro do ovário, documentaram uma diminuição nestes recetores como possível mecanismo de dessensibilização aos efeitos do TGF- $\beta$ 1[30].

## 1.4 Objetivos e hipóteses de investigação

Os objetivos deste trabalho são demonstrar: (I) que a expressão genética das MMPs, TIMPs e TGFBRs das veias insuficientes dos membros inferiores varia em função da região de colheita (inguinal, maleolar e colateral) das amostras e (II) que a expressão genética das MMPs, TIMPs e TGFBRs é diferente entre veias insuficientes e saudáveis.

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

**Hipótese 1** - As diferenças observadas na expressão genética das MMPs (MMP2, MMP9 ou MMP12) entre as três regiões de colheita de veia insuficiente são estatisticamente significativas.

**Hipótese 2** - As diferenças observadas na expressão genética dos TIMPs (TIMP1, TIMP2, TIMP3 ou TIMP4) entre as três regiões de colheita de veia insuficiente são estatisticamente significativas.

**Hipótese 3** - As diferenças observadas na expressão genética dos TGFBRs (TGFBR2 ou TGFBR3) entre as três regiões de colheita de veia insuficiente são estatisticamente significativas.

**Hipótese 4** - Existe uma diferença estatisticamente significativa na expressão genética das MMPs (MMP2, MMP9 ou MMP12) entre veias insuficientes e veias saudáveis da região maleolar.

**Hipótese 5** - Existe uma diferença estatisticamente significativa na expressão genética dos TIMPs (TIMP1, TIMP2, TIMP3 ou TIMP4) entre veias insuficientes e veias saudáveis da região maleolar.

**Hipótese 6** - Existe uma diferença estatisticamente significativa na expressão genética dos TGFBRs (TGFBR2 ou TGFBR3) entre veias insuficientes e veias saudáveis da região maleolar.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Tipo de Estudo

Para a concretização dos objetivos propostos, 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) e de caso-controlo (i.e., foram constituídos dois grupos de estudo: o grupo experimental ou de veias insuficientes e o grupo controlo ou de veias sãs)[31].

Os critérios de seleção da amostra foram previamente definidos pelo investigador e na seleção da amostra não foi utilizado qualquer método probabilístico (amostragem por conveniência). Por ser um estudo exploratório, não se recorreu ao cálculo prévio do tamanho da amostra.

### 2.2 Local e procedimentos de recolha da amostra

O estudo decorreu no Centro de Investigação de Ciências da Saúde (CICS) inserido na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior. Devido à natureza do mesmo, a colheita das amostras foi realizada durante intervenções cirúrgicas realizadas ou supervisionadas por um cirurgião familiarizado com a investigação, em meio hospitalar: no Centro Hospitalar da Cova da Beira e no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

As amostras foram colhidas em indivíduos da população com características diferentes, relativamente ao diagnóstico de IVC: as amostras de veia insuficiente resultaram de um grupo de doentes diagnosticado com IVC dos membros inferiores e as amostras de veia saudável resultaram de um grupo sem IVC dos membros inferiores (ainda que com patologia coronária).

Os indivíduos com IVC encontravam-se internados no Centro Hospitalar Cova da Beira para serem submetidos a safenectomia da VGS. No seguimento da obtenção do consentimento informado destes doentes, realizou-se o estudo imagiológico dos membros inferiores com recurso ao eco-doppler venoso (de modo a documentar a existência de IVC) e a recolha de dados demográficos e clínicos através de um questionário de escolha múltipla e respostas breves. Com o objetivo de controlar os efeitos de alguns dos fatores extrínsecos à IVC, foram excluídos do estudo os doentes com IVC que apresentavam os seguintes critérios: (i) doentes sujeitos a intervenção cirúrgica há menos de seis 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 comorbilidades como: doenças que alterem a atividade normal leucocitária como a diabetes mellitus, neoplasia, artrite reumatóide, vasculite ou doenças do colagénio. Durante o

procedimento cirúrgico foram obtidas amostras da VGS em três locais distintos: 2 a 3 cm de veia próxima à junção safeno-femoral (amostra inguinal), 2 a 3 cm de veia colhida junto ao maléolo interno (amostra maleolar) e 2 a 3 cm de veia colateral à VGS quando sujeita a flebectomia (amostra colateral).

Os indivíduos sem IVC ou controlos encontravam-se internados no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra para serem submetidos a cirurgia de *bypass* coronário com VGS. Mais uma vez, após a obtenção do consentimento informado, realizou-se o estudo imagiológico dos membros inferiores com recurso ao eco-doppler venoso (desta vez para documentar a ausência de IVC) e a recolha de dados demográficos e clínicos através de um questionário de escolha múltipla e respostas breves. Durante o procedimento cirúrgico foram colhidas amostras de 2 a 3 cm de VGS, apenas da região maleolar.

Todas as amostras de veia (insuficientes e saudáveis) foram tratadas de acordo com o seguinte protocolo: lavagem com soro fisiológico, imersão em RNA-Later (Ambion®), refrigeração a 4°C por 24h e armazenamento em nitrogénio líquido, a -80°C, até utilização posterior.

## 2.3 Características demográficas e clínicas dos participantes

As características dos indivíduos que cederam as amostras de VGS necessárias ao estudo encontram-se resumidas na tabela seguinte.

**Tabela 2** Características demográficas e clínicas do grupo com IVC e dos controlos [média  $\pm$  erro padrão e frequências absolutas (frequências relativas)].

	GRUPO COM IVC	CONTROLOS
<b>Género</b>	N= 7	N=13
Feminino	6 (85.7%)	3 (23.1%)
Masculino	1 (14.3%)	10 (76.9%)
<b>Idade (anos)</b>	N=7	N=13
	56.29 $\pm$ 2.417	67.85 $\pm$ 2.679
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	N=7	N=13
	27.68 $\pm$ 2.031	25.28 $\pm$ 0.936
<b>Multiparidade (nº de gravidezes)</b>	N=6	N=3
	1.50 $\pm$ 0.563	2.33 $\pm$ 1.856
<b>Categoria CEAP</b>	N=7	N=13
C0	-	13 (100%)
C2	1 (14.3%)	-
C3	5 (71.4%)	-
C5	1 (14.3%)	-

Quando comparados os grupos de participantes (experimental vs. controlo) é possível perceber que, relativamente às variáveis demográficas, existe um predomínio do sexo feminino no grupo com IVC e uma idade média inferior à do grupo controlo, no qual predomina o sexo masculino. Quanto às características clínicas, ambos os grupos têm um IMC médio acima do intervalo considerado saudável e a multiparidade é ligeiramente superior no grupo controlo. A maioria dos doentes com IVC pertence à categoria CEAP C3.

## 2.4 Procedimentos laboratoriais na análise da expressão genética

### 2.4.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)

O RNA total foi isolado de 50-100 mg de amostra de veia usando o reagente TRI (Ambion®), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas e lavadas com etanol a 75%. A quantidade e qualidade do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria a 260nm e 280nm (Pharmacia Biotech, Ultrospec-3000) e eletroforese em gel de agarose a 1%, respetivamente.

Para a síntese de cDNA, 500 ng de RNA total foram inversamente transcritos usando o *Kit M-MuLV Reverse Transcriptase (NZYTech®)* num volume final de 20  $\mu$ L. De modo sucinto, a reação de síntese de cDNA foi iniciada por uma incubação a 25°C durante 10 minutos, seguida de um ciclo de 60 minutos a 37°C e uma fase de inativação a 70°C durante 15 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C até uso posterior.

### 2.4.2 Quantitative real time-polymerase chain reaction (qPCR)

A expressão genética da MMP2, MMP9, MMP12, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGFBR2 e TGFBR3 nas amostras de veia insuficiente e saudável foi determinada através da técnica qPCR, utilizando *primers* específicos para cada gene (Tabela 2) e o kit SYBR-Green/Fluorescein qPCR-Master-Mix (Fermentas-Life-Sciences®). O gene *housekeeping*  $\beta$ -actina foi utilizado para normalização dos níveis de expressão genética. A concentração e a temperatura de *annealing* para cada conjunto de *primers* foram previamente otimizadas e a especificidade dos amplicões foi determinada por análise da curva de dissociação.

As reações realizaram-se num volume final de 20 $\mu$ L, contendo 1 $\mu$ L de cDNA sintetizado, 10 $\mu$ L SYBR-Green/Fluorescein, 1.2 $\mu$ L de *sense* e *antisense primers* (5pmol/ $\mu$ L) para cada gene e 6.6  $\mu$ L de água esterilizada.

Tabela 3 *Primers* utilizados no estudo.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Tamanho dos amplicões (pb)
B-actina	Sense: CAT CCT CAC CCT GAA GTA CCC	202
	Antisense: AGC CTG GAT AGC AAC GTA CAT G	
TIMP1	Sense: GAC GGC CTT CTG CAA TTC C	79
	Antisense: GTA TAA GGT GGT CTG GTT GAC TTC TG	
TIMP2	Sense: GAG CCT GAA CCA CAG GTA CCA	77
	Antisense: AGG AGA TGT AGC ACG GGA TCA	
TIMP3	Sense: CCA GGA CGC CTT CTG CAA	73
	Antisense: CCC CTC CTT TAC CAG CTT CTT C	
TIMP4	Sense: CAG CCT CAG CAG CAC ATC TG	75
	Antisense: GGC CGG AAC TAC CTT CTC ACT	
MMP2	Sense: AAC TAC GAT GAC GAC CGC AAG T	142
	Antisense: AGG TGT AAA TGG GTG CCA TCA	
MMP9	Sense: AGG CGC TCA TGT ACC CTA TGT AC	111
	Antisense: GCC GTG GCT CAG GTT CA	
MMP12	Sense: CGC CTC TCT GCT GAT GAC ATA C	136
	Antisense: GGT AGT GAC AGC ATC AAA ACT CAA A	
TGFB $\beta$ 2	Sense: GCA GGT GGG AAC TGC AAG AT	76
	Antisense: GAA GGA CTC AAC ATT CTC CAA ATT C	
TGFB $\beta$ 3	Sense: CTG TTC ACC CGA CCT GAA AT	502
	Antisense: CGT CAG GAG GCA CAC ACT TA	

pb - pares de bases

As amostras foram amplificadas com um sistema IQ5 (Bio-Rad) programado para realizar 3min de desnaturação inicial a 95°C, seguido de 30-35 ciclos (dependendo do *primer* utilizado) de 10s a 95°C, 30s de *annealing* a 60°C e 10s de extensão a 72°C. Os fragmentos amplificados de qPCR foram analisados por curvas de dissociação, tendo sido submetidos ao aquecimento gradual entre 55 e 95°C, com períodos de espera de 10s entre cada valor da temperatura (0.05°C/s).

As expressões genéticas foram calculados com base no modelo matemático proposto por Pfaffl [32] utilizando a fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 2.5 Variáveis e análise estatística dos dados

As observações registadas foram inseridas numa base de dados do programa IBM-SPSS-Statistics, v.23.0. A base de dados incluiu as seguintes variáveis:

- Grupo de pertença (variável qualitativa dicotómica: veias controlos e veias insuficientes);
- Variáveis demográficas como o sexo (variável qualitativa dicotómica: feminino e masculino) e a idade (variável quantitativa);
- Variáveis clínicas como o Índice de Massa Corporal ou IMC (variável quantitativa), multiparidade nas mulheres (variável quantitativa) e categoria CEAP (variável ordinal com sete categorias: C0-C6);
- Região de colheita da VGS (variável nominal com três categorias: inguinal, maleolar e colateral);
- Expressão genética<sup>1</sup> de MMPs, TIMPs e TGF $\beta$ Rs (variáveis quantitativas).

No âmbito da estatística descritiva, determinaram-se frequências (absolutas e relativas) e medidas de tendência central (médias ou  $M$ ) e de dispersão (erro padrão ou EP).

No âmbito da estatística inferencial, foram aplicados testes paramétricos como a ANOVA para amostras emparelhadas e o teste  $t$  de Student para amostras independentes ou as suas alternativas não paramétricas (neste caso, só o teste de Friedman foi necessário) quando os pressupostos foram violados. O pressuposto da normalidade foi verificado através do teste de Shapiro-Wilk e o da esfericidade foi verificado através do teste de Mauchly. Para garantir o cumprimento do pressuposto da normalidade recorreu-se, quando necessário, à transformação dos dados (usando  $\log_{10}(x)$ ).

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

---

<sup>1</sup> Note-se que a unidade de medida destas variáveis é, de acordo com a literatura [32], irrelevante, uma vez que se recorreu à estratégia de quantificação relativa (que se baseia nos níveis de expressão do gene-alvo vs. do gene *housekeeping*).

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 Expressão genética de MMPs, TIMPs e TGFBRs em veias insuficientes da região maleolar, inguinal e colateral

Observando os dados descritivos da tabela 4 constata-se que, no geral, o valor médio da expressão genética de cada uma das MMPs estudadas não variou consideravelmente em função do local de colheita das amostras de veia com IVC (maleolar, inguinal e colateral). Apenas a média da expressão genética de MMP9 das amostras da região maleolar parecia ser superior aos valores das outras duas regiões. No entanto, os resultados da ANOVA (para medidas repetidas) não confirmaram a existência de diferenças estatisticamente significativas nas expressões genéticas das MMPs entre as diferentes regiões.

**Tabela 4** Expressão genética (média  $\pm$  erro padrão) de MMPs em função do local de colheita das veias.

	Local de Colheita	M $\pm$ EP	N	ANOVA P
MMP2	Maleolar	0.117 $\pm$ 0.201	6	0.828
	Inguinal	0.106 $\pm$ 0.255	7	
	Colateral	0.137 $\pm$ 0.032	4	
MMP9	Maleolar	4.753 $\pm$ 2.070	6	0.914
	Inguinal	1.950 $\pm$ 0.667	7	
	Colateral	1.868 $\pm$ 0.738	5	
MMP12	Maleolar	0.486 $\pm$ 0.092	5	0.927
	Inguinal	1.081 $\pm$ 0.421	7	
	Colateral	0.683 $\pm$ 0.449	6	

Relativamente à expressão genética dos TIMPs nos três locais de colheita (tabela 5), a tendência manteve-se: ainda que não tivesse havido grandes variações nos valores médios entre as três regiões, é possível observar que quase todos os TIMPs (exceção para o TIMP4) registaram expressões superiores na região maleolar. Contudo, mais uma vez, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 5 Expressão genética (média  $\pm$  erro padrão) de TIMPs em função do local de colheita das veias.

	Local de Colheita	M $\pm$ EP	N	ANOVA P
TIMP1	Maleolar	1.366 $\pm$ 0.521	7	0.124
	Inguinal	0.407 $\pm$ 0.074	7	
	Colateral	1.030 $\pm$ 0.247	5	
TIMP2	Maleolar	0.807 $\pm$ 0.334	6	0.961
	Inguinal	0.407 $\pm$ 0.074	7	
	Colateral	0.430 $\pm$ 0.120	5	
TIMP3	Maleolar	0.240 $\pm$ 0.115	6	0.218
	Inguinal	0.056 $\pm$ 0.009	7	
	Colateral	0.048 $\pm$ 0.012	5	
TIMP4	Maleolar	0.248 $\pm$ 0.126	6	0.368 <sup>a</sup>
	Inguinal	0.316 $\pm$ 0.262	7	
	Colateral	0.230 $\pm$ 0.173	5	

a) Probabilidade de significância associada ao teste de Friedman

Finalmente, como mostra a tabela 6, os recetores de TGF- $\beta$  não se comportaram de maneira diferente, estando os valores médios da expressão genética muito próximos entre as três regiões.

Tabela 6 Expressão genética (média  $\pm$  erro padrão) de TGFBRs em função do local de colheita das veias.

	Local de Colheita	M $\pm$ EP	N	ANOVA P
TGFBR2	Maleolar	0.074 $\pm$ 0.028	7	0.499
	Inguinal	0.067 $\pm$ 0.011	7	
	Colateral	0.062 $\pm$ 0.019	6	
TGFBR3	Maleolar	0.318 $\pm$ 0.048	5	0.207
	Inguinal	0.359 $\pm$ 0.092	7	
	Colateral	0.516 $\pm$ 0.170	5	

### 3.2 Expressão genética das MMPs, TIMPs e TGFBRs em veias saudáveis e insuficientes

Quanto às diferenças nos valores médios da expressão genética das MMPs entre o grupo com IVC e o grupo controlo (tabela 7) observou-se uma diferença estatisticamente significativa: a expressão genética de MMP2 revelou-se inferior nas veias insuficientes quando comparadas com as veias saudáveis.

Tabela 7 Expressão genética (média  $\pm$  erro padrão) de MMPs em função do grupo de pertença.

	Grupo com IVC		Grupo Controlo		t de Student p
	N	M $\pm$ EP	N	M $\pm$ EP	
MMP2	6	0.117 $\pm$ 0.20	12	0.852 $\pm$ 0.181	<0.001
MMP9	6	4.753 $\pm$ 2.070	11	0.958 $\pm$ 0.245	0.062
MMP12	5	0.486 $\pm$ 0.091	10	0.844 $\pm$ 0.180	0.363

Para a MMP9 verificou-se que a expressão genética média se mostrou superior no grupo com IVC, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Já no caso da MMP12, a tendência inverteu-se novamente, dado que a expressão média se mostrou inferior no grupo com IVC, ainda que de modo não estatisticamente significativo.

Tabela 8 Expressão genética (média  $\pm$  erro padrão) de TIMPs em função do grupo de pertença.

	Grupo com IVC		Grupo Controlo		t de Student p
	N	M $\pm$ EP	N	M $\pm$ EP	
TIMP1	7	1.366 $\pm$ 0.521	13	1.095 $\pm$ 0.146	0.872
TIMP2	6	0.807 $\pm$ 0.334	13	1.427 $\pm$ 0.259	0.212
TIMP3	6	0.240 $\pm$ 0.115	13	1.567 $\pm$ 0.319	0.003
TIMP4	6	0.248 $\pm$ 0.126	12	0.829 $\pm$ 0.173	0.001

Na comparação entre grupos dos valores médios da expressão genética dos TIMPs (tabela 8) constatou-se que quase todos (excluindo o TIMP1) estavam diminuídos no grupo das veias insuficientes, ainda que essa diferença fosse estatisticamente significativa apenas para o TIMP3 e TIMP4.

Tabela 9 Expressão genética (média  $\pm$  erro padrão) de TGFBRs em função do grupo de pertença.

	Grupo com IVC		Grupo Controlo		t de Student p
	N	M $\pm$ EP	N	M $\pm$ EP	
TGFBR2	7	0.074 $\pm$ 0.028	12	1.229 $\pm$ 0.217	<0.001
TGFBR3	5	0.318 $\pm$ 0.047	11	0.6845 $\pm$ 0.156	0.317

Por último, a análise das médias da expressão genética dos TGFBRs nos dois grupos em estudo (tabela 9) revelou uma diminuição da expressão nas amostras do grupo com IVC. No caso do TGFBR2 a diferença entre as médias foi estatisticamente significativa.

## 4. Discussão dos resultados

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

Por um lado, a 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 o grupo com IVC, a caracterização destes indivíduos 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, ou com múltiplas gravidezes de termo (todos fatores de risco significativos para o desenvolvimento da IVC, de acordo com *Dindelli et al*[33] foram igualmente encontrados nas amostras de outros estudos.

### 4.1 Expressão genética de MMPs, TIMPs e TGFBRs em veias insuficientes da região maleolar, inguinal e colateral

Atendendo aos resultados nos testes de hipóteses foi possível verificar que nenhuma das hipóteses testadas (H1, H2 e H3) foi confirmada.

Como já foi mencionado, alguns estudos mostram diferenças estatisticamente significativas na expressão genética de MMPs e TIMPs entre veias varicosas de regiões distais e proximais[10, 25]. Neste estudo esta diferença não se verificou.

Uma explicação possível para estes resultados prende-se com o tamanho reduzido da amostra, que dificulta a deteção de diferenças estatisticamente significativas. Além disso, a maioria dos pacientes com IVC apresentava uma classificação CEAP C3, ou seja, um estágio intermédio de IVC. Numa amostra de pacientes caracterizada pelo predomínio dos estádios mais avançados da classificação CEAP seria eventualmente possível a deteção de diferenças, uma vez que as alterações típicas da patologia seriam mais evidentes.

Não é possível comparar os resultados obtidos para a expressão genética dos TGFBRs com outros equivalentes (até à data, inexistentes na literatura empírica). No entanto, admite-se a possibilidade de existência de diferenças na expressão genética destes recetores entre as três regiões anatómicas consideradas, embora não tenha sido possível detetá-las pelas razões acima mencionadas.

## 4.2 Expressão genética das MMPs, TIMPs e TGF $\beta$ Rs em veias saudáveis e insuficientes

Os resultados obtidos na comparação entre veias insuficientes e saudáveis permitiram confirmar parcialmente as hipóteses H4, H5 e H6.

Relativamente aos resultados da expressão genética das MMPs (hipótese H4), verificou-se que a MMP2 se encontrava diminuída nas veias insuficientes, quando comparadas com veias saudáveis. Os resultados são concordantes com alguns dos estudos anteriormente publicados que apontam para uma diminuição da expressão genética das MMPs (principalmente da MMP2)[10, 12, 21]. No entanto, noutros estudos esta diminuição não se verificou, tendo sido inclusivamente demonstrado um aumento da expressão genética das MMPs (MMP1, MMP2, MMP3, MMP7 e MMP9)[22-25]. Esta disparidade de resultados pode ser explicada pelos seguintes factos. Em primeiro lugar, alguns estudos apresentam erros metodológicos (utilização de amostras de veias macroscopicamente saudáveis colhidas em doentes com IVC para o grupo controlo) que podem ter comprometido os resultados. Em segundo lugar, os estudos anteriores não consideraram a classificação CEAP. Deste modo os resultados díspares podem ter ocorrido devido ao facto das amostras de veia analisadas pertencerem a doentes em fases da doença distintas. Propõe-se então que numa fase inicial da doença, e perante um aumento de pressão venosa e estase sanguínea, ocorra um aumento da expressão genética das MMPs e degradação de componentes da MEC (como o colagénio e elastina), permitindo o relaxamento da parede da veia e a acomodação de maior volume sanguíneo. Numa fase avançada da doença, mecanismos de compensação poderão intervir no sentido de conter a crescente dilatação das veias insuficientes. O processo crónico de inflamação local, lesão e cicatrização, poderá conduzir à diminuição da expressão genética das MMPs e consequente fibrose da parede venosa.

Relativamente à hipótese H5 verificou-se que os valores médios da expressão de TIMPs foram, à exceção da TIMP1, inferiores no grupo de veias insuficientes quando comparados com o grupo controlo - embora esta diminuição tenha sido estatisticamente significativa apenas para o TIMP3 e TIMP4. Na escassa literatura existente, foram demonstradas diferenças na expressão genética dos TIMPs entre veias insuficientes e saudáveis: no estudo de *Sansilvertri-Morel et al*[22] foi observada uma diminuição da expressão do TIMP2 em veias varicosas, já nos estudos de *Bradier-Commander et al*[12] e *Parra et al*[21] observou-se um aumento de expressão do TIMP1 nesse grupo de veias.

Como justificação para os resultados encontrados no presente estudo é possível propor que, uma vez que as MMPs e TIMPs são enzimas responsáveis pela homeostasia e remodelação da MEC, qualquer processo que altere o ténue equilíbrio dessas enzimas pode tornar-se

patológico. Apesar de a MMP2, o TIMP3 e o TIMP4 estarem diminuídos nas veias insuficientes não significa que essa diminuição seja equitativa. Assim sendo, poderão verificar-se processos de proteólise ou acumulação de matriz que destabilizam a homeostasia da MEC e que podem predispor à modificação estrutural da parede venosa.

Quanto aos resultados da expressão genética dos TGFBRs (H6), não existe na literatura nenhum estudo cujo resultado possa ser comparado com os resultados obtidos. No entanto, é possível sugerir que a expressão diminuída de TGFBR2 nas veias doentes poderá resultar do processo crónico inflamatório local que tenderá a diminuir a via de atuação do TGF- $\beta$ 1, no sentido de controlar essa inflamação crónica. É também necessário ter em conta que o TGFBR2 é um recetor de TGF- $\beta$ 1 e não demonstra necessariamente a quantidade de TGF- $\beta$ 1 no local. Outras possibilidades podem ser propostas: o TGF- $\beta$ 1 intervir independentemente dos seus recetores ou a diminuição de TGFBR2 em veias varicosas resultar de um *feedback* negativo, em face da maior quantidade local de TGF- $\beta$ 1.

### 4.3 Limitações do Estudo

A limitação mais evidente deste estudo prende-se com o reduzido número de amostras de veias analisadas, que influenciou o tratamento estatístico dos dados e também por isso a validade das suas conclusões. Esta limitação decorre do laborioso trabalho de recolha de amostras e de informação clínica (incluindo o estudo com eco-doppler venoso pré-operatório) ter sido efetuado por um só cirurgião.

Outra limitação presente é o facto dos grupos de participantes (IVC vs. controlos) não serem equivalentes relativamente às características demográficas e clínicas. Este facto poderá pôr em causa a validade dos resultados obtidos, pelo que será importante repetir a análise com grupos mais homogéneos de participantes.

No futuro, em investigações sobre o mesmo tema seria pertinente (I) organizar uma equipa de vários cirurgiões na recolha de amostras de veia, (II) obter uma amostra maior de participantes e agrupada em função da classificação CEAP, (III) estudar a atividade de MMPs/TIMPs, (IV) desenvolver estudos experimentais controlados com o objetivo de avaliar a influência do TGF- $\beta$ 1 na expressão genética de MMPs e TIMPs.

## 5. Conclusão

Não obstante a exaustiva investigação sobre a etiologia da DVC, a patogénese da doença continua por esclarecer. A constatação da relevância 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 exploratório apresentou dados cientificamente importantes. Foi possível verificar que, de um modo geral, tanto a expressão genética das MMPs como a dos seus inibidores se encontrava diminuída nas veias insuficientes.

Os resultados obtidos para os TGFBRs revestem-se de maior importância pelo simples fato de não existirem estudos publicados sobre a sua expressão genética em veias insuficientes. Assim, a expressão diminuída de TGFBR2 observada em veias doentes apoia a hipótese de haver uma dessensibilização da ação do TGF- $\beta$ 1, igualmente verificada noutras patologias (como na neoplasia do ovário[30]).

A replicação deste estudo numa amostra maior e, sobretudo, equivalente de participantes é desejável, uma vez que o conhecimento mais aprofundado da patogénese da IVC poderá promover o desenvolvimento de um tratamento farmacológico ou genético capaz de cessar o curso crónico inevitável desta patologia.

## 6. Bibliografia

1. Albuquerque de Matos A, M.A., Serra Brandão E, Cássio I, Barbosa J, França J, Recomendações no diagnóstico e tratamento da doença venosa crónica. 2011, Porto: Sociedade Portuguesa de Angiologia e Cirurgia Vascular.
2. Caggiati, A., et al., Nomenclature of the veins of the lower limbs: an international interdisciplinary consensus statement. *J Vasc Surg*, 2002. 36(2): p. 416-22.
3. Netter, F., Netter, Atlas De Anatomia Humana, Elsevier Health Sciences Brazil, 5<sup>a</sup> ed. 2011, London
4. Moore K, D.A., Agur A, Passos M, Araujo C., Anatomia Orientada para a Clínica. 7<sup>a</sup> ed. 2014.
5. Raffetto, J.D. and R.A. Khalil, Matrix metalloproteinases in venous tissue remodeling and varicose vein formation. *Curr Vasc Pharmacol*, 2008. 6(3): p. 158-72.
6. Eklof, B., et al., Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. *J Vasc Surg*, 2009. 49(2): p. 498-501.
7. Eklof, B., et al., Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg*, 2004. 40(6): p. 1248-52.
8. Lim, C.S. and A.H. Davies, Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg*, 2009. 96(11): p. 1231-42.
9. Xu, H.M., et al., Polymorphisms in MMP-9 and TIMP-2 in Chinese patients with varicose veins. *J Surg Res*, 2011. 168(1): p. e143-8.
10. Woodside, K.J., et al., Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg*, 2003. 38(1): p. 162-9.
11. Pfisterer, L., et al., Pathogenesis of varicose veins - lessons from biomechanics. *Vasa*, 2014. 43(2): p. 88-99.
12. Badier-Commander, C., et al., Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol*, 2000. 192(1): p. 105-12.
13. Segiet, O.A., et al., Biomolecular mechanisms in varicose veins development. *Ann Vasc Surg*, 2015. 29(2): p. 377-84.
14. Robertson, L., S.E. Yeoh, and D.N. Kolbach, Non-pharmacological interventions for preventing venous insufficiency in a standing worker population. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. 1: p. CD006345.
15. Brake, M., et al., Pathogenesis and etiology of recurrent varicose veins. *J Vasc Surg*, 2013. 57(3): p. 860-8.
16. Robertson, L., C. Evans, and F.G. Fowkes, Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology*, 2008. 23(3): p. 103-11.
17. Evans, C.J., et al., Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health*, 1999. 53(3): p. 149-53.

18. Jacob, M.P., Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*, 2003. 57(5-6): p. 195-202.
19. Woessner, J.F., Jr., MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol Biotechnol*, 2002. 22(1): p. 33-49.
20. Aravind, B., et al., Inhibitory effect of TIMP influences the morphology of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2010. 40(6): p. 754-65.
21. Parra, J.R., et al., Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J Vasc Surg*, 1998. 28(4): p. 669-75.
22. Sansilvestri-Morel, P., 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): p. 229-39.
23. Kowalewski, R., et al., Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol*, 2004. 23(2): p. 164-9.
24. Kosugi, I., et al., Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins. *Ann Vasc Surg*, 2003. 17(3): p. 234-8.
25. Gillespie, D.L., et al., Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *J Surg Res*, 2002. 106(2): p. 233-8.
26. Kowalewski, R., et al., Evaluation of transforming growth factor-beta signaling pathway in the wall of normal and varicose veins. *Pathobiology*, 2010. 77(1): p. 1-6.
27. Jacob, T., A. Hingorani, and E. Ascher, Overexpression of transforming growth factor-beta1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J Vasc Surg*, 2005. 41(3): p. 523-30.
28. Raffetto, J.D., Dermal pathology, cellular biology, and inflammation in chronic venous disease. *Thromb Res*, 2009. 123 Suppl 4: p. S66-71.
29. Pappas, P.J., et al., Regulation of matrix contraction in chronic venous disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009. 38(4): p. 518-29.
30. Antony, M.L., et al., Changes in expression, and/or mutations in TGF-beta receptors (TGF-beta RI and TGF-beta RII) and Smad 4 in human ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010. 136(3): p. 351-61.
31. Hochman, B., Nahas, F. X. Oliveira Filho, R. S., and Ferreira, L. M.. *Desenhos de pesquisa. Acta Cir. Bras.* [online]. 2005, 20 Suppl 2: p.2-9.
32. Pfaffl, M., *A to Z of Quantitative PCR.* International University Line. SA Bustin LaJolla, California. 2004, p. 87-112.
33. Dindelli, M., et al., Risk factors for varicose disease before and during pregnancy. *Angiology*, 1993. 44(5): p. 361-7.

## 7. Anexos

Anexo 1 Parecer da Comissão de Ética do Centro Hospitalar 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 livre e informado dos 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 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 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 livre e informado dos 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 metaloproteinases, (enzimas da parede venosa) e TGF- $\beta$ 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**

\_\_/\_\_/\_\_