

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Fisioterapia

Jhefferson Miranda Alves

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO FENOTÍPICA DE SUBTIPOS
DE MONÓCITOS NA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA**

São Paulo

2020

Jhefferson Miranda Alves

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO FENOTÍPICA DE SUBTIPOS
DE MONÓCITOS NA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Fisioterapia da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Fisioterapia. Orientador: Profa. Dra. Carolina Nunes França.

São Paulo

2020

A479m Alves, Jhefferson Miranda

Modulação da expressão fenotípica de subtipos de monócitos na insuficiência venosa crônica / Jhefferson Miranda Alves. – São Paulo, 2020.

49 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Fisioterapia) – Universidade Santo Amaro, 2020.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Carolina Nunes França

1. Insuficiência venosa crônica. 2. Inflamação. 3. Subtipos de monócitos.
I. França, Carolina Nunes, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Jefferson Miranda Alves

Modulação da expressão fenotípica de subtipos de monócitos na Insuficiência Venosa Crônica

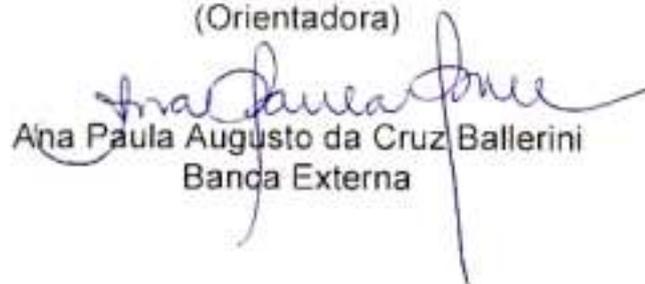
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Fisioterapia da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Data da Aprovação: 26/11/2020

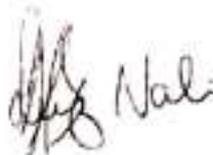
Banca Examinadora



Carolina Nunes França
Prof.^a Ma.
(Orientadora)



Ana Paula Augusto da Cruz Ballerini
Banca Externa



Luiz Henrique da Silva Nali
Banca Interna

Conceito Final: 9,5

Dedico este trabalho aos meus pais, Gerson e Vanderlúcia, a base de tudo, seus princípios de coragem, simplicidade e amor me nortearam até aqui, isso é a prova de que todos seus esforços, investimentos e dedicação valeram a pena. Aos meus avós, Eduardo e Natalícia, os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos. As minhas irmãs Nathália e Isadora, e ao meu sobrinho Heitor. A toda a minha família, eu consegui, e foi por vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Santo Amaro (UNISA), pela oportunidade e por todo aprendizado dentro desses quatro anos.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Carolina Nunes França. Pelo incentivo durante todo o percurso. Seu exemplo profissional e pessoal foi essencial para minha vida, e a sua motivação para a conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de graduação, especialmente à Natalia Souto. Obrigado pela convivência e aprendizado.

“Quando as pessoas veem bondade, elas esperam bondade. E eu não quero viver sob as expectativas de ninguém”.

Damon Salvatore

RESUMO

Introdução: A insuficiência venosa crônica (IVC) é caracterizada por disfunção do sistema venoso secundária à hipertensão venosa, causada por incompetência valvar e/ou obstrução do fluxo venoso, mais comumente nos membros inferiores. Fatores de riscos associados ao desenvolvimento da insuficiência venosa, como história pessoal de trombose e embolia venosa ou pulmonar, relacionadas também a hábitos posturais, como a hipertensão venosa causada por ortostatismo (ficar em pé ou sentado por longos períodos), obesidade, idade, sexo, estilo de vida, trabalho, dieta, uso de hormônios, gravidez, história familiar e muitos outros. Subtipos de monócitos são atraídos para os tecidos inflamados por mediadores quimiotáticos, tais como produtos da histamina, do complemento, leucotrienos, dentre outros. Por se tratar de uma doença inflamatória, acredita-se que exista uma associação de IVC com o fenótipo dos subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos).

Objetivo: Identificar, quantificar e caracterizar fenotipicamente subtipos de monócitos em pacientes com Insuficiência Venosa Crônica. **Métodos:** Trata-se de um estudo tipo caso-controle. Foram avaliados pacientes que se internaram para realização de Cirurgia de Varizes de Membros Inferiores na Santa Casa de Misericórdia de Santo Amaro. Além disso, houve um grupo controle, sem Insuficiência Venosa Crônica. Foram excluídos os pacientes que não apresentaram condições clínicas adequadas para responderem aos instrumentos de pesquisa (como, por exemplo, confusão mental). Os subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) foram avaliados por citometria de fluxo, com base na expressão de proteínas de superfície celular (CD14 e CD16). **Resultados e Discussão:** Após análise dos monócitos não-clássicos, intermediários e clássicos, respectivamente, as médias (erro-padrão das médias) nos grupos caso foram 4,66% (0,26), 46,79% (1,70), 39,52% (1,46). No grupo controle, as médias (erro-padrão das médias) foram 3,06% (0,22), 56,98% (2,61), 32,92% (2,25). Após comparação entre os grupos, houve maior porcentagem de monócitos clássicos e não-clássicos e menores níveis de monócitos intermediários no grupo caso ($p=0,019$; $p<0,0001$ e $p=0,002$, respectivamente. Teste de Mann-Whitney). Até onde se tem conhecimento, não há trabalhos na literatura que tenham comparado subtipos de monócitos em pacientes com e sem Insuficiência Venosa Crônica. O processo inflamatório associado à patologia pode justificar o aumento de monócitos clássicos (inflamatórios); os níveis elevados de monócitos não-clássicos (antiinflamatórios) requerem estudos adicionais, porém podem se associar à tentativa do organismo de conter o processo inflamatório, já que essas células têm a capacidade de remover debris das vasculaturas comprometidas pelo processo inflamatório. Monócitos intermediários têm sido considerados células em um estágio transitório de diferenciação, podendo originar os demais subtipos, de acordo com o microambiente ao qual os pacientes estão submetidos. **Conclusão:** O processo inflamatório associado à Insuficiência Venosa Crônica modula o fenótipo dos subtipos de monócitos.

Palavras-chave: Insuficiência Venosa Crônica, Inflamação, Subtipos de monócitos.

ABSTRACT

Introduction: Chronic venous insufficiency (CVI) is characterized by dysfunction of the venous system secondary to venous hypertension, caused by valve incompetence and / or obstruction of the venous flow, most commonly in the lower limbs. Risk factors associated with the development of venous insufficiency, such as a personal history of thrombosis and venous or pulmonary embolism, also related to postural habits, such as venous hypertension caused by orthostatism (standing or sitting for long periods), obesity, age, sex, lifestyle, work, diet, hormone use, pregnancy, family history and many others. Monocyte subtypes are attracted to inflamed tissues by chemotactic mediators, such as histamine, complement products, leukotrienes, among others. As it is an inflammatory disease, it is believed that there is an association between CVI and the monocyte subtype phenotype (classic, intermediate, and non-classical).

Objective: To identify, quantify and phenotypically characterize monocyte subtypes in patients with Chronic Venous Insufficiency. **Methods:** This is a case-control study. Patients who were admitted to perform lower limb varicose vein surgery at Santa Casa de Misericórdia de Santo Amaro were evaluated. In addition, there was a control group with no chronic venous insufficiency. Patients who did not have adequate clinical conditions to respond to the research instruments (such as mental confusion) were excluded. Monocyte subtypes (classical, intermediate and non-classical) were evaluated by flow cytometry, based on the expression of cell surface proteins (CD14 and CD16). **Results and Discussion:** After analyzing the non-classic, intermediate and classic monocytes, respectively, the means (standard error of the means) in the case groups were 4.66% (0.26), 46.79% (1.70) , 39.52% (1.46). In the control group, the means (standard error of the means) were 3.06% (0.22), 56.98% (2.61), 32.92% (2.25). After comparing the groups, there was a higher percentage of classic and non-classic monocytes and lower levels of intermediate monocytes in the case group ($p = 0.019$; $p < 0.0001$ and $p = 0.002$, respectively. Mann-Whitney test). As far as is known, there are no studies in the literature that have compared monocyte subtypes in patients with and without chronic venous insufficiency. The inflammatory process associated with the pathology may justify the increase in classic (inflammatory) monocytes; the elevated levels of non-classical monocytes (anti-inflammatory drugs) require additional studies, but they can be associated with the body's attempt to contain the inflammatory process, since these cells have the ability to remove debris from the vasculatures compromised by the inflammatory process. Intermediate monocytes have been considered cells in a transient stage of differentiation, and may originate the other subtypes, according to the microenvironment to which the patients are submitted. **Conclusion:** The inflammatory process associated with Chronic Venous Insufficiency modulates the phenotype of monocyte subtypes.

Keywords: Chronic Venous Insufficiency, Inflammation, Monocyte subtypes.

LISTA DE ABREVIATURAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
IVC	Insuficiência Venosa Crônica
DVC	Doença Venosa Crônica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
MMII	Membros Inferiores
<i>PBMC</i>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SCMSA	Santa Casa de Misericórdia de Santo Amaro
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T° amb	Temperatura ambiente
UNISA	Universidade Santo Amaro
URC	<i>Unisa Research Center</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Insuficiência venosa crônica	12
1.2 Epidemiologia	13
1.3 Fisiopatologia	13
1.4 Fatores de risco associados a IVC	14
1.5 Diagnóstico e Tratamento	17
1.6 Inflamação	18
1.7 Subtipos de Monócitos	19
1.7.1 Monócitos Clássicos	20
1.7.2 Monócitos Não Clássicos	20
1.7.3 Monócitos Intermediários	21
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVO	23
4. MÉTODOS	24
4.2. Critérios de Inclusão e Exclusão	24
4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	24
4.4 Caracterização fenotípica de subtipos de monócitos	24
4.5 Análise estatística	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	41
ANEXO B - QUESTIONÁRIO SÓCIODEMOGRÁFICO ECONÔMICO	43
ANEXO C – QUESTIONÁRIO DOS FATORES DE RISCO PARA DOENÇA VENOSA	45
ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	47
ANEXO E – FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS .	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência venosa crônica

A insuficiência venosa crônica (IVC) é caracterizada por disfunção do sistema venoso secundária à hipertensão venosa, causada por incompetência valvar e/ou obstrução do fluxo venoso, mais comumente nos membros inferiores (MMII). É uma doença de evolução lenta e de baixa letalidade, uma afecção bastante comum na população jovem e de meia idade, principalmente em mulheres, sendo sua prevalência progressiva com o aumento da idade. As veias varicosas atingem um terço da população de ambos os sexos entre 18 e 64 anos, uma vez que afeta pessoas de diferentes faixas etárias, podendo acarretar sérios problemas socioeconômicos¹.

Além do comprometimento estético, a IVC pode causar sinais e sintomas de dor, sensação de peso nos membros inferiores e câibras que resultam em complicações e sequelas, que podem levar à redução da capacidade funcional do indivíduo, influenciando negativamente na qualidade de vida dos pacientes, levando em consideração fatores clínicos, etiológicos, anatômicos e fisiopatológicos (CEAP), a classificação da IVC consiste no diagnóstico mais completo com os quais permite-se caracterizar o quadro da doença de acordo com sua progressão, considerando que os sinais e sintomas da IVC podem ter influência negativa entre a gravidade da IVC e a piora na qualidade de vida dos indivíduos².

A história clínica e um meticoloso exame físico fornecem o diagnóstico de IVC grave devido à presença de suas características como hiperpigmentação, edema, úlceras ativas ou cicatrizadas.

Com relação aos critérios etiológicos e patológicos, a classificação clínica é dividida em: C0 (sem sinais de doença venosa), C1 (telangiectasiase veias reticulares), C2 (veias varicosas), C3 (edema), C4 (alterações subcutâneas; divide-se em C4a, que representa alterações na pigmentação e eczema, e C4b, lipodermatoesclerose e atrofia branca) C5 (úlceras de estase cicatrizada) e C6 (úlceras de estase aberta). Com uma alta prevalência mundial a IVC, varia de menos de 1 a 73% em mulheres e de 2 a 56% em homens, enquanto a sua prevalência no Brasil

varia de 41,25 a 62,79% nas mulheres e de 13,97 a 37,9% nos homens, tendo, porém, uma grande variedade de incidência considerando os fatores que predispõe. São classificados clinicamente como de classe 1 e 2, respectivamente, os pacientes portadores de varizes e veias reticulares, e o tratamento mais empregado para essas classes é o cirúrgico por mini incisões para as colaterais e perfurantes, e a safenectomia parcial quando indicada, além do tratamento da croça das safenas quando insuficiente³.

1.2 Epidemiologia

Quanto à epidemiologia de pessoas afetadas pela IVC, tem sido atribuídos vários fatores para o aparecimento de varizes nos membros inferiores (MMII), destacando então a gravidez e a obesidade ambas as duas nas mulheres, considerada por alguns autores como fator relevante para o desenvolvimento das varizes dos membros inferiores a obesidade acaba sendo então o maior problema de saúde pública em todos os países industrializados e desenvolvidos, bem caracterizado nas mulheres em idade avançada, histórico familiar de varizes dos MMII, e uso de hormônios.⁴

A partir da terceira década de vida, atingindo então o indivíduo em plena maturidade, quando a sua capacidade de trabalho é maior, a incidência da IVC é mais alta. No Sistema Único de Saúde (SUS), a IVC é a 14^a causa de afastamento temporário do trabalho, e a 32^a de invalidez permanente. Diversos estudos epidemiológicos mostraram que as varizes, na maioria das vezes, são bilaterais, e quando unilaterais não existem diferenças na frequência de aparecimento entre os dois membros.⁵

1.3 Fisiopatologia

O funcionamento adequado do sistema venoso periférico depende de uma série de válvulas unidirecionais e bombas musculares, que promovem uma boa circulação venosa, a tríade de Virchow explica a fisiopatologia da IVC, com a estase venosa, lesão endotelial e a hipercoaguabilidade. A IVC desenvolve quando a pressão venosa é aumentada e o retorno venoso é prejudicado por vários mecanismos. Hipertensão venosa não diminuída pode resultar em alterações dérmicas com

hiperpigmentação, fibrose de tecido subcutâneo, denominada “lipodermatosclerose” e eventual ulceração⁶.

A estase venosa é vista como o principal fator predisponente da IVC, levando ao aumento da quantidade de sangue dentro das veias decorrente da diminuição do fluxo sanguíneo, dilatando-as passivamente, e uma redução consequente da velocidade do fluxo sanguíneo,⁶ causando então uma perturbação do fluxo laminar e um depósito celular constituído por uma rede de fibrina que prende tais elementos, predispondo à formação de uma trombose venosa profunda (TVP)⁷.

Anormalidade nas funções da bomba muscular da panturrilha desempenham um papel significativo na fisiopatologia da IVC, e a doença pode continuar progredindo quando o tratamento não é adequado⁸.

1.4 Fatores de risco associados a IVC

Vários fatores de risco têm sido associados ao desenvolvimento da IVC, como história pessoal de trombose e embolia venosa ou pulmonar, relacionados também a hábitos posturais⁹, como a hipertensão venosa causada por ortostatismo (ficar em pé ou sentado por longos períodos), obesidade, idade, sexo, estilo de vida, trabalho, dieta, uso de hormônios, gravidez, história familiar e muitos outros¹⁰.

Estudos têm mostrado que o exercício físico pode ter uma série de benefícios como reduzir o edema dos membros inferiores; melhorando o desempenho hemodinâmico do músculo da panturrilha por meio do fortalecimento desses músculos; e aumentando a aptidão cardiorrespiratória, com benefício na capacidade, qualidade de vida e redução dos sintomas da IVC. Exercícios como alongamento e fortalecimento de músculos dos membros inferiores associados com exercícios aeróbicos que visam melhorar retorno venoso, como por exemplo a caminhada, pode ser útil na prevenção da progressão da doença. Os estudos relacionados ao efeito do exercício físico devem considerar tipos de protocolos (intensidade, frequência e tempo), tamanho da amostra e homogeneidade de acordo com a gravidade da doença¹¹.

A IVC é identificada na maioria dos idosos no estágio clínico avançado, pois a incidência e a gravidade da trombose venosa profunda são aumentadas com a idade. No entanto, hoje o significado destas doenças na população idosa ainda está mal compreendido, decorrente disso a qualidade de vida é negativamente afetada nos pacientes. A idade, a imobilização e a obesidade são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da IVC nos idosos¹².

Vários estudos também sugeriram um componente genético que contribui para a frouxidão das paredes das veias. A regulação desses genes pode estar implicando no desenvolvimento de varizes nas veias. Isto é feito comparando RNA de varizes e veias normais, os níveis de RNA do tecido fornecem padrões de expressão examinando genes específicos no tecido doente¹³.

Os fatores genéticos responsáveis pelo desenvolvimento da IVC são promissores, mas requer um trabalho mais aprofundado para validar as evidências existentes¹⁴.

Nos pacientes obesos e sobrepesos, além da maior compressão das veias abdominais pelo aumento do volume abdominal, os hábitos de vida sedentários também podem estar relacionados ao desenvolvimento das varizes dos membros inferiores por ineficiência da bomba muscular da panturrilha¹⁵.

A flebesidade é outro fator de risco entre a obesidade e a IVC, pois apresenta evidência na relação fisiopatológica e clínica, descrevendo a relação entre obesidade e doenças venosas. Sugerindo então que a obesidade e seus fatores podem ser importantes na etiologia dos sintomas "venosos" comuns, associando um paciente obeso a um pior quadro clínico¹⁶.

A IVC apresenta uma alta prevalência mundial, tendo, porém, uma grande variedade de incidência dependendo dos fatores considerados. A prevalência varia de menos de 1 a 73% em mulheres e de 2 a 56% em homens, enquanto no Brasil a sua prevalência varia de 41,25 a 62,79% nas mulheres e de 13,97 a 37,9% nos homens¹⁷.

Essas diferenças podem ser explicadas pelos distintos critérios usados para definição da IVC, e pelas pessoas que vivem em regiões mais desenvolvidas que correm maior risco porque estão expostos a um estilo de vida sedentário, um baixo consumo de fibras e constipação¹⁸.

Os fatores hormonais associados são resultados decorrentes da frequência maior entre as mulheres. Pois deve-se considerar que as mulheres procurem mais por tratamentos um desses reflexos são as razões estéticas, procurando por tratamento três vezes mais do que os homens¹⁹.

A doença venosa periférica quando associada ao diabetes que afeta de 2% a 5% das populações ocidentais, as complicações clínicas do diabetes podem alterar a função e estrutura vascular, apresenta maior risco de complicação com aparecimento de úlceras de membros inferiores. Muitas das complicações clínicas do diabetes podem ser atribuídas a alterações na função e estrutura vascular, conseqüentemente levando a uma ulceração, lesionando o órgão final irrigado e morte²⁰.

Outro fator de risco importante da IVC refere-se às questões socioeconômicas, embora não haja evidência da relação direta com a causa ou efeito da doença venosa em relação ao trabalho, tais como longos períodos na mesma posição sendo em pé ou sentado, segundo o consenso atual na opinião médica relaciona o trabalho ao quadro clínico e o desenvolvimento da IVC²¹.

Um estudo mostrou que a alta prevalência de ortostatismo prolongado pode estar relacionada à pacientes portadores de IVC que permaneciam por mais tempo sentados durante o período de trabalho, quando comparados a indivíduos sem a doença. A maioria dos pacientes avaliados eram do sexo feminino, com idade maior que 40 anos, sedentários e não apresentavam sobrepeso ou obesidade, desenvolviam atividades laborais com ortostatismo prolongado e tinham baixa escolaridade²².

O funcionamento inadequado da bomba muscular da panturrilha é outra complicação que contribui para a IVC, ou seja, qualquer processo que atrapalhe o bom funcionamento da musculatura da panturrilha dificulta a circulação venosa, associada ou não à disfunção valvular, é responsável então pela hipertensão venosa, acumulando excessivamente no tecido subcutâneo líquido e fibrinogênio resultando em edema, lipodermatosclerose e por fim ulceração. Estudos mostraram que, a influência do fortalecimento da panturrilha obteve bons resultados em pacientes portadores de IVC, auxiliando na recuperação dos problemas venosos decorrente da melhora da função muscular da panturrilha²³.

1.5 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da IVC é clínico, por meio da anamnese, exame físico e complementares. Considerados então os principais sinais e sintomas da IVC como formigamento, inchaço, dor, queimação, sensação de peso, cansaço de MMII, câibras musculares, e fadiga. Os sintomas tendem a se acentuar durante o dia, após longos períodos em ortostase e melhoram com a elevação dos membros²⁴.

É feita a anamnese contendo então a queixa e duração dos sintomas, hábitos de vida, doenças vasculares anteriores especialmente a TVP, dentre outros. Em seguida, o paciente deve ser examinado em pé (dez minutos) para observação dos MMII. Pode-se também, detectar se a dilatação das varizes é resultado de refluxo e dilatação do sistema das veias safenas internas ou das externas por meio de manobras especiais, ou, eventualmente, se decorre de veias perforantes insuficientes²⁵.

Na avaliação clínica procuram-se sinais de IVC, com inspeção dos membros inferiores desde os pés até a virilha, o exame físico deve ser iniciado após alguns minutos de ortostatismo com o paciente em pé, em uma sala contendo temperatura ambiente adequada e boa iluminação, facilitando então na hora do profissional avaliador definir a localização, o tamanho, a distribuição das veias varicosas, alterações de pele (hiperpigmentação), presença e quantificação do edema, atrofia branca e úlceras cicatrizadas ou abertas. Após o exame em ortostatismo, o restante do exame é concluído em decúbito dorsal, inclui todas as faces de ambos os membros

inferiores, que são avaliados individualmente e em seguida comparados um em relação ao outro²⁶.

O tratamento é baseado no exame físico, o cirurgião vascular vai optar pelo melhor e mais adequado tipo de tratamento das varicosidades. A cirurgia é o único tratamento com dados de eficácia em longo prazo, outros tratamentos menos invasivos são associados com menor deficiência e menos dor²⁷. O tratamento vai depender do tipo de varizes, as telangectasias e as veias reticulares são tratadas por meio da escleroterapia com injeção de substâncias irritantes ao endotélio venoso, as veias varicosas são tratadas por procedimentos cirúrgicos, retirando as veias dilatadas e as safectomias com a interrupção dos pontos de refluxo interno e externo e de eventual ligadura das veias perforantes insuficientes²⁸.

1.6 Inflamação

Classicamente dividida em aguda e crônica, a inflamação envolve uma série de interações moleculares, uma reação do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos. A aguda é a resposta inicial à lesão celular e tecidual, predominando fenômenos de aumento de permeabilidade vascular e migração de leucócitos, particularmente neutrófilos, com o objetivo principal de eliminar o agente agressor. Caracteriza-se pelos sinais cardinais da inflamação, com uma resposta sistêmica na forma neutrofílica e febre, caracterizando então a fase aguda. O segundo estágio é chamado inflamação crônica, relacionado a vários tipos de doenças crônicas como doenças cardiovasculares²⁹.

Os fenômenos da inflamação são mediados por substâncias químicas (histamina, cininas, fator ativador de plaqueta, citocinas, prostaglandinas e leucotrienos), oriundas do plasma, do endotélio, das células do conjuntivo, dos leucócitos e plaquetas, cuja interação é complexa gerando uma resposta inflamatória que regulam a inflamação, estas substâncias são oriundas do plasma, dos leucócitos, das plaquetas, do endotélio e do tecido conjuntivo. Os fatores de transcrição, enzimas inflamatórias, citocinas inflamatórias e quimiocinas são os principais mediadores moleculares que estão envolvidas no desencadeamento da inflamação³⁰.

1.7 Subtipos de Monócitos

Monócitos são grandes células precursoras originadas da medula óssea, que circulam pelo sangue por alguns dias antes de migrarem para os tecidos, onde amadurecem e desenvolvem diferentes tipos de macrófagos e células dendríticas (CDs), que desempenham várias funções, principalmente na defesa imunológica, homeostase e reparo tecidual³¹.

Os monócitos foram inicialmente definidos com base na morfologia e citotóxica e, posteriormente, por citometria de fluxo que foi baseada nas propriedades de dispersão de luz e em marcadores de superfície celular como CD14 receptor de lipopolissacarídeo (LPS) e CD16 (Fc γ Receptor III), células essas importantes na inflamação. Baseada na expressão dos receptores lipopolissacarídeos (LPS) CD14 e CD16, foram definidas duas subpopulações de monócitos: CD14++CD16- e monócitos CD16-positivo, e posteriormente, foi identificada uma terceira subpopulação (monócitos intermediários), que correspondem a um estágio transitório de diferenciação³².

Semelhante a outros leucócitos, como linfócitos, as evidências sugerem que a diversidade de funções atribuídas aos monócitos pode refletir a heterogeneidade celular e para monócitos do sangue humano, uma subdivisão em 3 subconjuntos, sendo então, clássico, não clássico e intermediário, as funções são específicas de cada subtipo, diferenciando entre si relativamente ao seu, tráfego, tamanho, expressão de receptores imunes e quando estimulados a capacidade de se diferenciar³³.

Monócitos são atraídos para os tecidos inflamados por mediadores quimiotáticos, tais como produtos da histamina, do complemento, leucotrienos, IP-10 ("Interferon-gamma-induced protein 10"), e MIP-1 e 2 ("macrophage-inflammatory protein-1 e 2"). A concentração destes fatores aumenta durante a inflamação, quando convertido em macrófago aumenta a sua capacidade fagocítica e antimicrobiana, devido ao macrófago apresentar um maior número de lisossomos os quais permitem assegurar importantes funções fisiológicas³⁴.

1.7.1 Monócitos Clássicos

Os monócitos clássicos (CD14 + + CD16) representam 85% do total do número de monócitos na circulação sanguínea e produzem citocinas como IL-6 e IL-8 e quimiocinas como CCL2 e CCL3, são células inflamatórias recrutadas da medula óssea e reservatórios esplênicos para locais de inflamação ativa, que respondem a muitos estímulos originado de tecido danificado ou infectado e produz citocinas inflamatórias, são bons ativadores de linfócitos T CD4+. Possuem alta capacidade fagocítica em relação às subpopulações de monócitos intermediários e não clássicos e alta atividade microbicida³⁵⁻³⁶.

1.7.2 Monócitos Não Clássicos

Os monócitos não clássicos (CD14 + CD16 + +), considerados os mais maduros entre as subpopulações, por possuírem maior expressão de CD16, representam 5 a 10% do número total de monócitos circulantes, alguns são derivados de monócitos clássicos, mas também podem surgir de forma independente³⁷.

Monócitos não clássicos (CD14 + CD16 + +) são os maiores produtores de citocinas pró-inflamatórias, quando comparados com as demais subpopulações, são células reparadoras que removem detritos da vasculatura e produzem altos níveis de fatores anti-inflamatórios, responsáveis pelo recrutamento de células para o local da inflamação³⁸.

Monócitos não clássicos (CD14 + CD16 + +) patrulham ativa e continuamente o lado luminal do endotélio vascular tanto no estado estacionário quanto durante a inflamação, mostraram fagocitar micropartículas e mediar a remoção de células endoteliais danificadas na vasculatura. Portanto, podem funcionar para reparar a vasculatura ou remover lipídios da circulação em condições inflamatórias ateroscleróticas prejudiciais, e estudos sugerem que esse subtipo pode reparar a vasculatura ou remover lipídeos do sangue na doença aterosclerótica³⁹.

1.7.3 Monócitos Intermediários

Os monócitos intermediários (CD14 + + CD16 +) correspondem de 5 a 15% do número total de monócitos na corrente sanguínea, são considerados potentes indutores de inflamação, altamente fagocíticas que produzem altos níveis de mediadores inflamatórios e por produzirem alto níveis de TNF e baixos níveis de IL-10, tem a importante capacidade em algumas condições, como na remoção de células apoptóticas, apresentam um grau de maturação maior do que os monócitos clássicos, relacionados com a diferenciação em macrófagos e células dendríticas. Como os monócitos intermediários eram considerados parte da subpopulação de monócitos não clássicos, foram negligenciados em diversos estudos anteriores, mas mostraram relevância clínica em pacientes com alto risco cardiovascular, onde a contagem de monócitos intermediários mostrou-se elevada nesses indivíduos⁴⁰.

2. JUSTIFICATIVA

A Insuficiência Venosa Crônica em membros inferiores tem uma alta prevalência na população mundial e brasileira. A avaliação de biomarcadores inflamatórios pode ser útil para uma melhor avaliação dos mecanismos fisiopatológicos associados à doença.

3. OBJETIVO

Avaliar os subtipos de monócitos em pacientes com Insuficiência Venosa Crônica internados e submetidos a Cirurgia de Varizes na Santa Casa de Misericórdia de Santo Amaro, e compará-los a um grupo de indivíduos sem a doença.

4. MÉTODOS

4.1. Tipo de Estudo e População Estudada

Trata-se de um estudo tipo caso-controle. Foram avaliados pacientes que se internaram para realização de Cirurgia de Varizes de Membros Inferiores na Santa Casa de Misericórdia de Santo Amaro. Além disso, houve um grupo controle, sem Insuficiência Venosa Crônica.

4.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

Serão incluídos no estudo indivíduos com e sem Insuficiência Venosa Crônica que estivessem conscientes e organizados no momento da entrevista. Os pacientes que não apresentaram condições clínicas adequadas para responderem aos instrumentos de pesquisa (como, por exemplo, confusão mental) ou que iniciaram a participação e logo desistiram, foram excluídos.

4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Foram colhidos aproximadamente 15 mL de sangue periférico dos pacientes em tubos com EDTA (para evitar coagulação), sendo acrescido Ficoll-Hypaque (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) e centrifugado a 800 g, 22°C por 20 minutos, havendo separação de células mononucleares por gradiente de concentração. Posteriormente, as células obtidas foram lavadas em PBS. Em seguida, foram adicionados 3 mL de cloreto de amônio por 2 minutos (para a lise das hemácias). As amostras foram centrifugadas e foi adicionado 1 mL de solução para congelamento (DMSO + soro fetal bovino); as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido.

4.4 Caracterização fenotípica de subtipos de monócitos

As células mononucleares do sangue periférico foram centrifugadas e imunomarcadas por 30 minutos à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos: CD14 conjugado com alofocianina - APC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) e CD16 conjugado com isotiocianato de fluoresceína - FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Como controles foram analisadas células marcadas com os isotipos

IgG₁ APC (BD, Biosciences, Franklin Lakes, USA) e IgG₁ FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Imediatamente após este processo, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD Biosciences, San Jose, USA) com análise feita pelo software Cell Quest Pro. Os subtipos de monócitos foram expressos em porcentagem (%), sendo adquiridos aproximadamente 50.000 eventos.

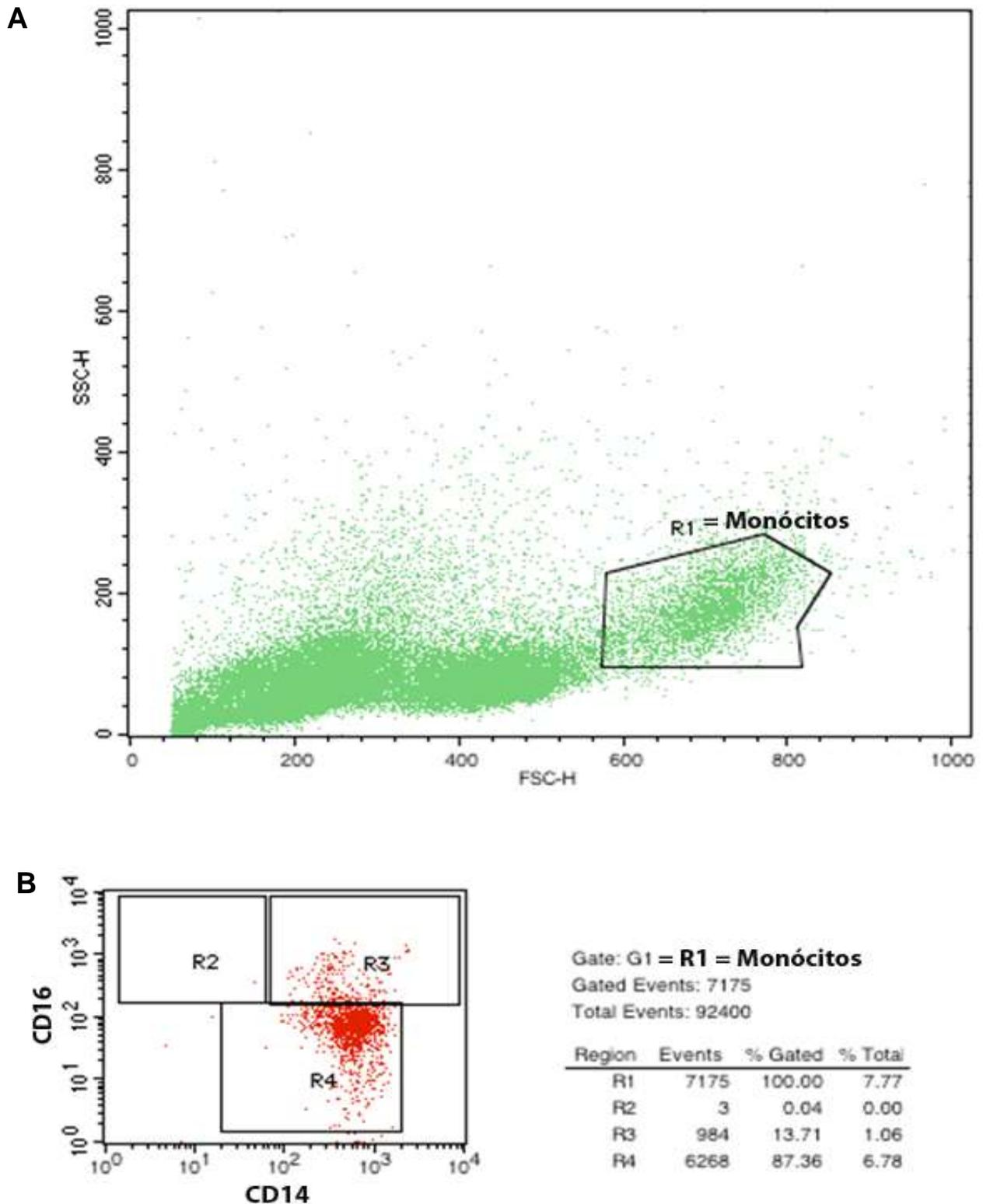


Figura 1. Análise por Citometria de Fluxo de subtipos de monócitos. **A)** Tamanho (FSC-H) x complexidade (SSC-H), R1 = região de monócitos; **B)** Amostra marcada com os anticorpos anti-CD14 FITC e anti-CD16 PE, identificando-se três subpopulações de monócitos: R2 = Não-clássicos, R3 = intermediários e R4 = clássicos.

4.5 Análise estatística

Para análise dos dados, foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, conforme a natureza das variáveis. Fixou-se o nível de significância em $p < 0,05$.

4.6 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro, sob parecer número 3.041.271.

5. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta dados gerais da amostra. No grupo caso (n=47), 98% eram do sexo feminino; a idade média (desvio-padrão – DP) foi de 47 (10). No grupo controle (n=61), 77% eram mulheres, houve uma média (DP) de idade de 50 (14). Houve maior percentagem de mulheres no grupo caso ($p=0,001$, Teste do Quiquadrado), sem diferenças significantes entre os grupos para idade ($p = 0,2$; Teste t não pareado).

Tabela 1. Características gerais da amostra

Grupo	Sexo feminino, n (%)	Valor de p*	Idade média (DP)	Valor de p#
Caso	46 (98)	0,001	47 (10)	0,2
Controle	47 (77)		50 (14)	

DP = desvio-padrão

*Teste do Quiquadrado

#Teste t não pareado

As figuras 2-4 representam os dados obtidos para os subtipos de monócitos, comparando casos e controles. No grupo caso, as médias (erro-padrão das médias – EPM) de monócitos não-clássicos, intermediários e clássicos foram, respectivamente, 4,66 (0,26); 46,79 (1,70) e 39,52 (1,46). No grupo controle, as médias (EPM), foram, respectivamente, 3,06 (0,22); 56,98 (2,61) e 32,92 (2,25). Após comparação entre os grupos pelo Teste de Mann-Whitney, foram encontradas aumento de monócitos não-clássicos e clássicos no grupo caso ($p < 0,0001$ e $p = 0,019$, respectivamente) e redução de monócitos intermediários ($p = 0,002$).

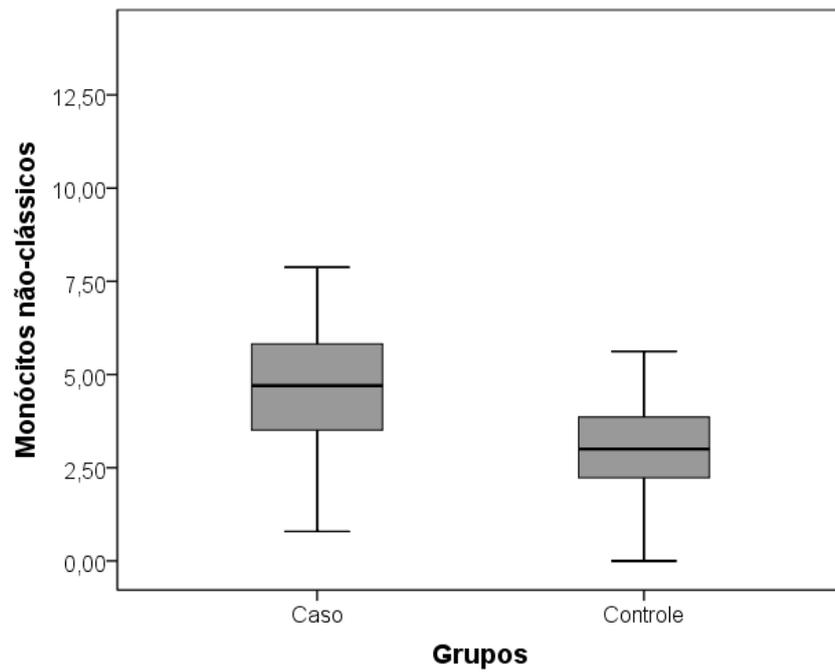


Figura 2. Box-plots representando as porcentagens de monócitos não-clássicos nos grupos caso e controle. Teste de Mann-Whitney, $p < 0,0001$.

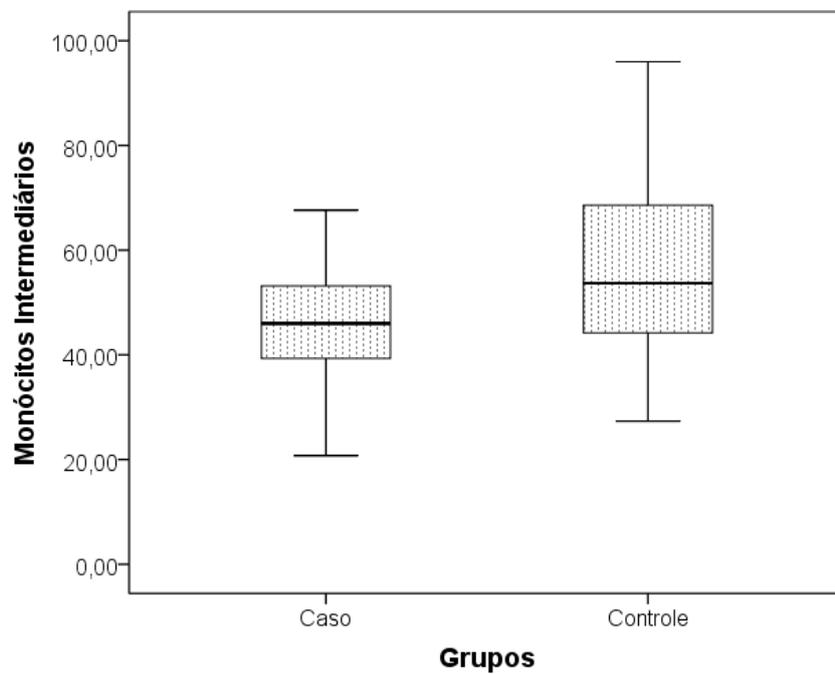


Figura 3. Box-plots representando as porcentagens de monócitos intermediários nos grupos caso e controle. Teste de Mann-Whitney, $p = 0,002$.

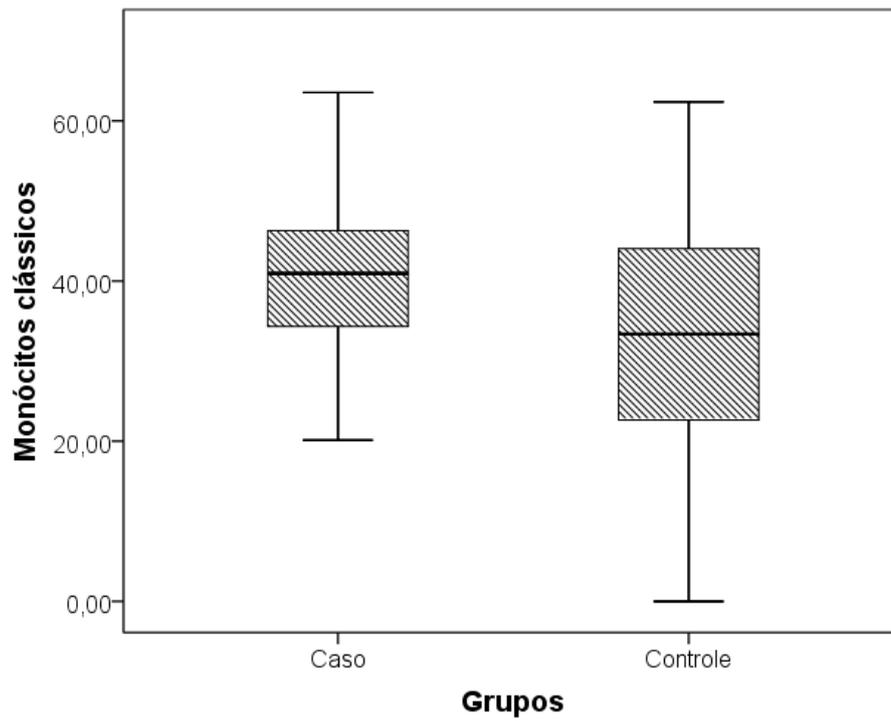


Figura 4. Box-plots representando as porcentagens de monócitos clássicos nos grupos caso e controle. Teste de Mann-Whitney, $p < 0,0001$.

6. DISCUSSÃO

Os monócitos circulantes constituem uma população heterogênea, com fenótipos e funções distintas entre as suas três subpopulações. Neste estudo, foi caracterizado e expresso os subconjuntos de monócitos (clássicos, não-clássicos e intermediários) de amostras de sangue periférico em pacientes com gravidade variável de Insuficiência Venosa Crônica (IVC).

A tabela de características gerais da amostra em relação ao sexo, mostrou que no grupo caso houve um número maior de casos no sexo feminino (98%) quando comparado ao grupo controle (77%), relacionado então quanto a prevalência da IVC, como no estudo de Mekky et al, no qual mostrou que acomete mais indivíduos do sexo feminino em 73%, quando comparado aos homens que a prevalência é de 56%⁴¹.

Em relação a idade no grupo caso foi de 47 e no grupo controle de 50, os resultados do estudo não mostrou diferença significativa, mas em um estudo feito por Beaglenole et al, encontrou diferença nas taxas de prevalência em relação a idade com a IVC em diferentes populações, o estudo mostrou que a prevalência de veias varicosas visíveis foi maior entre brancos hispânicos levando em consideração a hiperpigmentação, edema e a úlcera, e sendo menor entre os asiáticos. O estudo de Beaglenole et al, também resultou em um número maior de mulheres associada a IVC⁴².

Se tratando da expectativa de vida da população mundial, que devido a uma série de fatores está aumentando, o número de pessoas com a IVC está crescendo, e o aumento da idade faz com que aumente a gravidade e as complicações da doença⁴³.

No presente trabalho, houve aumento de monócitos clássicos e não clássicos e diminuição do subtipo intermediário no grupo caso (com Insuficiência Venosa Crônica) quando comparado ao grupo controle (sem a doença).

O estudo de Choi et al, evidenciou que a alta contagem de monócitos clássicos e não clássicos (inflamatórios), foi maior em indivíduos do sexo masculino do que em indivíduos do sexo feminino, sendo então um alto risco para a mortalidade. Neste caso

a contagem de monócitos é um método fácil de medir o alto risco da doença cardiovascular⁴⁴.

Segundo o estudo de Lee et al, a expressão celular de CD14 e CD16, definem as funções e os fenótipos dos subconjuntos de monócitos, no qual corrobora que o subtipo de monócito clássicos (pró-inflamatório), estão relacionados e responsáveis por atuarem na inflamação crônica, tendo então, uma melhor compreensão dos mecanismos inflamatórios para desenvolver futuras estratégias de tratamento⁴⁵.

Outro estudo que também mostrou um maior número de monócitos clássicos, mas em pacientes hospitalizados com Doença Arterial Coronariana (DAC) foi o de Höpfner et al, no qual evidencia a importância fisiopatológica dos monócitos do sangue na aterosclerose, e mostra a diferenciação de monócitos clássicos para monócitos intermediários. Destarte o estudo corrobora para a importância dos monócitos CD14++ em doenças cardiovasculares⁴⁶.

Segundo o estudo de Berg et al, os subtipos de monócitos (CD14 CD16) elevados, caracterizam eventos cardiovasculares. Em seu segundo estudo, os resultados mostraram contagens elevadas de monócitos clássicos no grupo caso, em uma comparação com o grupo sem a doença, a porcentagem de monócitos clássicos aumentou no início do estudo no grupo com os eventos cardiovasculares⁴⁷.

Na doença Aterosclerótica Crônica o estudo de Krychtiuk et al, descrevem que o mecanismo de adesão de monócitos para o endotélio também predomina a caracterização do subtipo de potentes monócitos clássicos (pró-inflamatórios), submetido a um processo inflamatório sendo agudo ou crônico⁴⁸.

Passacuale et al, em um modelo experimental de inflamação relacionou a ativação de plaquetas com um aumento na porcentagem de monócitos na circulação principalmente da subpopulação de clássicos CD14++ e não clássicos CD16+. Esses dados evidenciam a modificação que ocorrem em monócitos circulantes, submetido a um processo inflamatório, fazendo com que esse fenômeno seja impulsionado pela

expressão da subpopulação de clássicos CD14++ e não clássicos CD16+ com a ação plaquetária em doenças cardiovasculares favorecendo a importância dos monócitos⁴⁹.

Apesar de citar as controvérsias sobre a subpopulação de monócitos intermediários, o estudo de Lo et al, mostrou uma relação positiva para monócitos intermediários (CD14++CD16+), podendo indicar um risco aumentado em pacientes assintomáticos com placa ou estenose coronária grave, sendo importante então para medir o alto risco de doença cardiovascular. Monócitos intermediários têm sido considerados células em um estágio transitório de diferenciação, podendo originar os demais subtipos, de acordo com o microambiente ao qual os pacientes estão submetidos.⁵⁰.

Outra fonte importante associada a Insuficiência cardíaca e ao aumento da idade, Schaenman et al observou que em pacientes mais velhos com um quadro inflamatório crônico, os resultados demonstraram um aumento na frequência da subpopulação de monócitos clássicos pró-inflamatórios (CD14++CD16-), isso mostra que essa avaliação do fenótipo e a expressão de citocinas torna-se uma ferramenta importante na identificação de fatores de risco para a progressão e complicações cardiovasculares com o avanço da doença⁵¹.

Em um estudo que fala sobre o monócito e a diferenciação do macrófago como subconjuntos que contribuem para a aterosclerose, na qual as citocinas podem provocar mudanças funcionais em monócitos em um quadro inflamatório, resultando um número aumentado de CD14++ por longa duração mesmo semanas após a eliminação do agente agressor do organismo, ou por um processo crônico. Resultando em maior produção de células imunes, ou seja, os monócitos são células chave na patogênese da Aterosclerose quanto a sua gravidade, e o mecanismo molecular dessa produção é essencial para desenvolvimento terapêutico, e a evolução da modulação fenotípica para prevenção de doenças⁵².

Importante ressaltar que a contagem de monócitos em pacientes com Doença Arterial Coronariana, os subtipos de monócitos CD16+ estão aumentados com a função de recrutamento para tecidos inflamados, regulando então, a imunidade e o controle da inflamação no tecido⁵³.

Monócitos CD14 + clássicos são críticos para a depuração de Low Density Lipoproteins (LDL), enquanto monócitos CD16 + incluindo monócitos intermediários e não clássicos com função anti-inflamatória, têm níveis de expressão e função renal em pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC). Embora muito mais evidências apoiem que os monócitos clássicos são monócitos pró-inflamatórios, mas no estudo de Yang et al, mostrou que implicam em um possível papel da migração dos linfonodos, diferenciando-se em macrófagos e subtipos de células dendríticas associados a inibição da resposta imune no organismo⁵⁴.

Justo Junior et al, em seu estudo, além de modular os subtipos de monócitos e a expressão de importantes marcadores associados às suas funções, observou também a sua capacidade de adesão ao endotélio, sendo então que o recrutamento e adesão dos monócitos ao endotélio ativado nos locais de formação de lesão é uma etapa essencial para o desenvolvimento da aterosclerose. Portanto, seus resultados sugerem há participação das subpopulações de monócitos no processo aterosclerótico associado com a gravidade da doença⁵⁵.

A literatura relata consistentemente que os monócitos circulantes no sangue independentemente do subtipo, são elevados na inflamação, envolvidos pelo processo inflamatório contribuindo para a aterogênese, o estudo de MarcosJubilar et al, corrobora quando descreve que os monócitos clássicos tornam-se uma subpopulação predominante encontrados em placas ateroscleróticas e em mediadores inflamatórios, MarcosJubilar et al, relata que em outros estudos os monócitos clássicos são os primeiros a aparecer no sangue periférico, associado com o quadro inflamatório crônico ou agudo da doença, no entanto em seu estudo não observou essa associação, mas neste estudo, houve um número maior de monócitos clássicos inflamatórios no grupo caso com a Insuficiência Venosa Crônica⁵⁶.

Podendo ser usado como novos biomarcadores para a restratificação de pacientes com Insuficiência Cardíaca (IC) levando em consideração a gravidade da doença, Amir et al, relacionou a citocina anti-inflamatória e o subconjunto de monócitos, no qual mostrou que os subtipos de monócitos não clássicos estão mais predominantes em pacientes com a IC, mas não evidencia que está tão presente em pacientes saudáveis do grupo controle⁵⁷.

7. CONCLUSÃO

Destarte, uma vez que os aumentos na contagem dos subtipos de monócitos clássicos, não clássicos e intermediários estão consistentemente associados a Insuficiência Venosa Crônica, é um biomarcador suficiente de doenças inflamatórias crônicas e agudas.

A avaliação de fatores relacionados aos subtipos de monócitos comparados com a Insuficiência Venosa Crônica deveria ser melhor avaliada e descrita na literatura.

REFERÊNCIAS

1. Engelhorn CA, Coral FE, Soares ICM, Corrêa GFA, Ogeda JP, Hara LY, et al. Patterns of saphenous reflux in men with chronic venous insufficiency. *J Vasc Bras.* 2016 Out.-Dez.; 15(4):268-274
2. Ribeiro-Samora GA, Carvalho MLV, Moura RMF, Pereira DAG. Limitação do VEINES QOL/SYM em discriminar a gravidade da insuficiência venosa crônica. *J Vasc Bras.* 2020;19:e20180096.
3. Santos, R. F. F. N. dos, Porfírio, G. J. M., & Pitta, G. B. B. (2009). A diferença na qualidade de vida de pacientes com doença venosa crônica leve e grave. *Jornal Vascular Brasileiro*, 8(2), 143–147.
4. Beebe-Dimmer, J. L., Pfeifer, J. R., Engle, J. S., & Schottenfeld, D. (2005). The Epidemiology of Chronic Venous Insufficiency and Varicose Veins. *Annals of Epidemiology*, 15(3), 175–184.
5. Lee AJ, Evans CJ, Allan PL et al. Lifestyle factors and the risk of varicose veins: Edinburgh Vein Study. *J Clin Epidemiol* 2003; 56:171-9.
6. Eberhardt, R. T., & Raffetto, J. D. (2014). Chronic Venous Insufficiency. *Circulation*, 130(4), 333–346.
7. Penha, G. de S., Damiano, A. P., Carvalho, T. de, Lain, V., & Serafim, J. D. (2009). Mobilização precoce na fase aguda da trombose venosa profunda de membros inferiores. *Jornal Vascular Brasileiro*, 8(1), 77–85.
8. Padberg FT Jr, Johnston MV, Sisto SA. Structured exercise improves calf muscle pump function in chronic venous insufficiency: a randomized trial. *J Vasc Surg.* 2004;39:79–87.
9. Escudero Rodríguez J-R, et al. Prevalencia y características clínicas de la enfermedad venosa crónica en pacientes atendidos en Atención Primaria en España: resultados del estudio internacional Vein Consult Program. *Cir Esp.* 2013
10. Seidel, A. C., Mangolim, A. S., Rossetti, L. P., Gomes, J. R., & Miranda Jr, F. (2011). Prevalência de insuficiência venosa superficial dos membros inferiores em pacientes obesos e não obesos. *Jornal Vascular Brasileiro*, 10(2), 124–130.
11. Araujo DN, Ribeiro CTD, Maciel ACC, Bruno SS, Fregonezi GAF, Dias FAL. Physical exercise for the treatment of non-ulcerated chronic venous insufficiency. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016, Issue 12. Art. No.: CD010637.
12. Bozkurt AK, Balkanay OO. Approach to venous diseases in the elderly. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2017;45(Suppl 5) 102–7.

13. Criqui, M. H., Denenberg, J. O., Bergan, J., Langer, R. D., & Fronek, A. (2007). Risk factors for chronic venous disease: The San Diego Population Study. *Journal of Vascular Surgery*, 46(2), 331–337.
14. Krysa, J., Jones, G. T., & Van Rij, A. M. (2012). Evidence for a genetic role in varicose veins and chronic venous insufficiency. *Phlebology: The Journal of Venous Disease*, 27(7), 329–335.
15. Alberti LR, Petroianu A, França DC, Silva TMF. Relação entre exercício físico e insuficiência venosa crônica. *Rev Med Minas Gerais*. 2010;20:30-5.
16. Davies, H. O., Popplewell, M., Singhal, R., Smith, N., & Bradbury, A. W. (2016). Obesity and lower limb venous disease – The epidemic of phlebesity. *Phlebology: The Journal of Venous Disease*, 32(4), 227–233.
17. Beebe-Dimmer, J. L., Pfeifer, J. R., Engle, J. S., & Schottenfeld, D. (2005). The Epidemiology of Chronic Venous Insufficiency and Varicose Veins. *Annals of Epidemiology*, 15(3), 175–184
18. Zolotukhin, I. A., Seliverstov, E. I., Shevtsov, Y. N., Avakiants, I. P., Nikishkov, A. S., Tatarintsev, A. M., & Kirienko, A. I. (2017). Prevalence and Risk Factors for Chronic Venous Disease in the General Russian Population. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 54(6), 752–758.
19. Krijnen, R. M. A., de Boer, E. M., & Bruynzeel, D. P. (1997). Epidemiology of Venous Disorders in the General and Occupational Populations. *Epidemiologic Reviews*, 19(2), 294–309.
20. De Luccia N. Doença vascular e diabetes – *J Vasc Br* 2003, Vol. 2, Nº1
21. BERTOLDI CML, PROENÇA RPC. Venous insufficiency and its relation with work conditions in the foodservice sector. *Rev. Nutr., Campinas*, 21(4):447-454, jul./ago., 2008
22. Lins, E. M., Barros, J. W., Appolônio, F., Lima, E. C., Barbosa Junior, M., & Anacleto, E. (2012). Perfil epidemiológico de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de varizes de membros inferiores. *Jornal Vascular Brasileiro*, 11(4), 301–304.
23. Lima RCM, Santiago L, Moura RMF, Filaretti FAS, Souza CSA, Evangelista SSM, Britto RR Effects of calf muscle strengthening on venous hemodynamics and on quality of life in a person with chronic venous insufficiency. *J Vasc Br* 2002, Vol. 1, Nº3
24. Gloviczki, P., Comerota, A. J., Dalsing, M. C., Eklof, B. G., Gillespie, D. L., Gloviczki, M. L., ... Wakefield, T. W. (2011). The care of patients with varicose veins and associated chronic venous diseases: Clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery and the American Venous Forum. *Journal of Vascular Surgery*, 53(5), 2S–48S

25. Castro e Silva M, Cabral ALS, Barros Jr N, Castro AA, Santos MERC. Diagnóstico e tratamento da Doença Venosa Crônica. Normas de Orientação Clínica da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascul ar (SBACV). 24 de setembro de 2002.
26. Kikuchi R. Junior WC. Moura MRL. Insuficiência venosa crônica diagnóstico e tratamento. Normas de Orientação Clínica da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascul ar (SBACV). Novembro de 2015
27. Murad MH, Coto-Yglesias F, Zumaeta-Garcia M, et al. A systematic review and meta-analysis of the treatments of varicose veins. *J Vasc Surg* 2011; 53(5 Suppl):49S-65S.
28. Segundo GAAD. Aspectos fisiológicos no surgimento das telangiectasias nos membros inferiores e a importância da biomedicina estética. Instituto de Ensino Superior e Pesquisa – INESP. Recife, 2016.
29. Dummer, C. D., Thomé, F. S., & Veronese, F. V. (2007). Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 53(5), 446–450.
30. Kunnumakkara, A. B., Sailo, B. L., Banik, K., Harsha, C., Prasad, S., Gupta, S. C., ... Aggarwal, B. B. (2018). Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? *Journal of Translational Medicine*, 16(1).
31. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., ... Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74–e80.
32. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identificação e caracterização de uma nova subpopulação de monócitos no sangue periférico humano. *Sangue*. 1989; 74 (7): 2527-2534.
33. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, 2(1), 1.
34. Shibuya, Mayume Dias Avaliação de subpopulações de monócitos e marcadores de ativação na hanseníase e nas reações hansênicas. Salvador, 2014. 82 f.
35. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., & Heine, G. H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, 118(12), e50–e61.
36. Ancuta P, Rao R, Moses A, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16 monocytes. *J Exp Med*. 2003;197(12): 1701-1707.

37. Ziegler-Heitbrock, L. (2006). The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(3), 584–592
38. Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C. C., & Hanna, R. N. (2015). Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(6), 1306–1316.
39. Wong, K. L., Tai, J. J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., ... Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118(5), e16–e31.
40. Merino, A., Buendia, P., Martin-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R. e Carracedo, J. (2011) exposição de monócitos Senescent CD14 + CD16 + atividade pró-inflamatória e pró-aterosclerótica. *J. Immunol.* 186, 1809–1815.
41. Mekky S, Schilling RSF, Walford J. Varicose veins in women cotton workers. Um estudo epidemiológico na Inglaterra e no Egito. *BMJ.* 1969; 2: 591–595.
42. Beaglehole R, Prior IAM, Salmond CE, Davidson F. Varicose veins in the south paci fi c. *Int J Epidemiol.* 1975; 4: 295–299
43. Pappas PJ, Lakhanpal S, Nguyen KQ, et al. The Center for Vein Restoration Study on presenting symptoms, treatment modalities, and outcomes in Medicare-eligible patients with chronic venous disorders. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 2018;6(1):13–24.
44. Choi, S. H., Kim, J. H., Lim, S., Lim, J. Y., Kim, K. W., Park, K. S., & Jang, H. C. (2016). Monocyte count as a predictor of cardiovascular mortality in older Korean people. *Age and Ageing*, 46(3), 433–438. doi:10.1093/ageing/afw226
45. Lee, J.-W., Cho, E., Kim, M.-G., Jo, S.-K., Cho, W. Y., & Kim, H. K. (2013). Proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes are associated with vascular stiffness in predialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Research and Clinical Practice*, 32(4), 147–152.
46. Höpfner, F., Jacob, M., Ulrich, C., Russ, M., Simm, A., Silber, R. E., ... Schlitt, A. (2019). Subgroups of monocytes predict cardiovascular events in patients with coronary heart disease. The PHAMOS trial (Prospective Halle Monocytes Study). *Hellenic Journal of Cardiology*.
47. Berg, K. E., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Bryngelsson, C., Hedblad, B., Fredrikson, G. N., ... Björkbacka, H. (2012). Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ Monocytes Predict Cardiovascular Events. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 5(1), 122–131.
48. Krychtiuk, K. A., Kastl, S. P., Hofbauer, S. L., Wonnerth, A., Goliash, G., Ozsvár-Kozma, M., ... Speidl, W. S. (2015). Monocyte subset distribution in

- patients with stable atherosclerosis and elevated levels of lipoprotein(a). *Journal of Clinical Lipidology*, 9(4), 533–541.
49. Passacquale, G., Vamadevan, P., Pereira, L., Hamid, C., Corrigan, V., & Ferro, A. (2011). Monocyte-Platelet Interaction Induces a Pro-Inflammatory Phenotype in Circulating Monocytes. *PLoS ONE*, 6(10), e25595. doi:10.1371/journal.pone.0025595
 50. Lo, S.-C., Lee, W.-J., Chen, C.-Y., & Lee, B.-C. (2017). Intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte predicts severe coronary stenosis and extensive plaque involvement in asymptomatic individuals. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, 33(8), 1223–1236.
 51. Schaenman, J. M., Rossetti, M., Sidwell, T., Groysberg, V., Sunga, G., Liang, E., ... Deng, M. (2018). Association of Pro-Inflammatory Cytokines and Monocyte Subtypes in Older and Younger Patients on Clinical Outcomes after Mechanical Circulatory Support Device Implantation. *Human Immunology*.
 52. Amengual, J., & Barrett, T. J. (2019). Monocytes and macrophages in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 30(5), 401–408.
 53. Kim, J.-H., Lee, Y.-J., & Park, B. (2019). Higher monocyte count with normal white blood cell count is positively associated with 10-year cardiovascular disease risk determined by Framingham risk score among community-dwelling Korean individuals. *Medicine*, 98(17), e15340.
 54. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, 2(1), 1.
 55. Justo Junior, Amauri da Silva. Quantificação e caracterização das populações de monócitos na aterosclerose humana. 2016. 1 recurso online (80 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP.
 56. Marcos Jubilar M, Orbe J, Roncal C, Fernández Montero A, Colina I, Rodil R, et al. Análisis de subpoblaciones monocitarias na relação com os fatores cardiovasculares. *Clín Investig Arterioscler*. 2019; 31: 152-159.
 57. Amir, O., Spivak, I., Lavi, I., & Rahat, M. A. (2012). Changes in the Monocytic Subsets CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺⁺CD16⁻ in Chronic Systolic Heart Failure Patients. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1–9.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Convidamos V.Sa. a participar da pesquisa: “Fatores de Risco associados à Insuficiência Venosa Crônica em pacientes submetidos à cirurgia de varizes na Santa Casa de Misericórdia de Santo Amaro”, sob responsabilidade do pesquisador ANA PAULA AUGUSTO DA CRUZ BALLERINI, orientada pela PROFESSORA DRA CAROLINA NUNES FRANÇA, e, co-orientada pela PROFESSORA DRA PATRÍCIA COLOMBO tendo por objetivo avaliar os fatores de risco associados com a doença, as eventuais diferenças em diabéticos e não diabéticos, observar a atuação da atenção básica e a evolução da doença no período estudado. Para realização deste trabalho usaremos o(s) seguinte(s) método(s): questionários e entrevistas. Esclarecemos que manteremos em anonimato, sob sigilo absoluto, durante e após o término do estudo, todos os dados que identifiquem o sujeito da pesquisa usando apenas, para divulgação, os dados inerentes ao desenvolvimento do estudo. Quanto aos riscos e desconfortos, pode haver algum constrangimento para responder o questionário. Caso você venha a sentir algo dentro desses padrões, comunique ao pesquisador para que sejam tomadas as devidas providencias. Os benefícios esperados com o resultado desta pesquisa são melhor compreensão de alguns aspectos associados à doença vascular, a partir do perfil epidemiológico, e espera-se tomar providências a partir dos achados para melhor prevenção, tratamento, controle e evolução da doença. O (A) senhor (a) terá os seguintes direitos: a garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta; a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si ou para seu tratamento (se for o caso); a garantia de que em caso haja algum dano a sua pessoa (ou o dependente), os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores e/ou pela instituição responsável.

Inclusive, acompanhamento médico e hospitalar (se for o caso). Caso haja gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelo pesquisador. Nos casos de dúvidas e esclarecimentos o (a) senhor (a) deve procurar as pesquisadoras responsáveis (Profa. Dra. Carolina Nunes França, Profa. Dra. Patrícia Colombo de Souza e Dra. Ana Paula Augusto da Cruz Ballerini), que podem ser encontradas no Campus I da Universidade de Santo Amaro – UNISA, endereço Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: 2141-8687. Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-

UNISA) – Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: 2141-8687, ou ainda por meio do e-mail: pesquisaunisa@unisa.br.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e interrupção da participação no estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de qualquer benefício que o sujeito de pesquisa tenha obtido junto à Instituição, antes, durante ou após o período deste estudo.

As informações obtidas pelos pesquisadores serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Em caso de dano pessoal, diretamente relacionado aos procedimentos deste estudo (nexo causal comprovado), a qualquer tempo, fica assegurado ao participante o respeito a seus direitos legais, bem como procurar obter indenizações por danos eventuais.

Uma via deste Termo de Consentimento ficará em seu poder.

São Paulo, ____/____/____

ANEXO B - QUESTIONÁRIO SÓCIODEMOGRÁFICO ECONÔMICO

Data da aplicação: ____/____/____

Levantamento de dados do Prontuário:

Dias de internação na SCMSA _____

Diagnóstico: _____

Doença: aguda () crônica ()

Dados Pessoais: Idade: _____ Gênero: Fem. () Masc. ()

1 - Qual seu estado civil?

A) Casado () B) Solteiro () C) Separado () D) União estável () E) Viúvo ()

2 - Quantas pessoas moram com você? (incluindo filhos, irmãos, parentes e amigos); _____

3 - A casa onde você mora é?

A) Própria () B) Alugada () C) Cedida ()

4) Sua casa está localizada em?

A) Zona rural () B) Zona urbana ()

5) Quantos anos você tem de escolaridade? _____

A) Primeiro Grau Incompleto () B) Primeiro Grau Completo () C) Segundo Grau Completo () D) Segundo Grau Incompleto () E) Superior Incompleto () F) Superior Completo () G) Pós- Graduação () _____

6) Você tem alguma religião?

A) Não () B) Sim () Qual? _____

7) Frequenta sua religião?

Não () B) Sim ()

8) Você trabalha atualmente?

A) Não () B) Sim ()

9) É aposentado?

Não () B) Sim ()

8) Qual sua renda mensal aproximada em salários mínimos?

9) Você recebe benefício social governamental? _____

qual? _____ valor atual: _____

10) Você contribui na renda familiar?

A) Não () B) Sim ()

ANEXO C – QUESTIONÁRIO DOS FATORES DE RISCO PARA DOENÇA VENOSA

1. Apresenta Obesidade/ Sobrepeso? Sim() IMC_____

Não()

2. Tem história familiar de Varizes? Sim() Pai () Mãe () Ambos()

Não () Não sabe ()

3. Pratica algum tipo de atividade física? Sim() Qual_____

Não()

4. Trabalha em pé muitas horas ao dia? Sim() Quantas horas_____

Estático_____

Não()

5. Já operou de varizes anteriormente? Sim() Há quanto tempo_____

Quantas vezes_____

Não()

6. Toma medicação para varizes? Sim() Qual_____

Não()

7. Usa Meia Elástica? Sim() Qual_____

Não()

8. Faz tratamento de alguma outra doença? Sim() Qual_____

Não()

9. Já teve Úlcera Varicosa? Sim()

Não()

10. Já teve algum episódio de trombose? Sim()

Não()

11. Tem história familiar de trombose? Sim()

Não()

12. Já ficou internado por complicações de varizes? Sim()

Não()

ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modulação da expressão fenotípica de subtipos de monócitos e receptores de quimiocinas no infarto agudo do miocárdio por estatinas

Pesquisador: Carolina Nunes França

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 72411417.4.0000.0081

Instituição Proponente: Universidade de Santo Amaro - UNISA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.275.621

Apresentação do Projeto:

Não houve alteração.

Objetivo da Pesquisa:

Não houve alteração.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve alteração.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não houve alteração.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Autorização do Complexo URC - Unisa, foi apresentado devidamente preenchido e assinado.

Pendência atendida.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

UF: SP

Município: SÃO PAULO

CEP: 02.450-000

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

**UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA**



Continuação do Parecer: 2.275.621

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_931187.pdf	24/08/2017 22:30:18		Aceito
Outros	AnuenciaURC.docx	24/08/2017 22:29:13	Carolina Nunes França	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_ CEP_940105.pdf	26/07/2017 08:58:26	Carolina Nunes França	Aceito
Folha de Rosto	FRCAROLINAFRANCA.pdf	24/07/2017 11:55:57	Carolina Nunes França	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFAPESP2017UNISA.doc	24/07/2017 11:53:07	Carolina Nunes França	Aceito
Outros	Coparticipante.docx	01/07/2017 19:52:47	Carolina Nunes França	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AuxilioRegularFAPESPCEPUNISA.docx	01/07/2017 19:47:04	Carolina Nunes França	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 14 de Setembro de 2017

**Assinado por:
José Antonio Silveira Neves
(Coordenador)**

Endereço: Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

ANEXO E – FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Modulação da expressão fenotípica de subtipos de monócitos e receptores de quimiocinas no infarto agudo do miocárdio por estatinas			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 80			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Carolina Nunes França			
6. CPF: 051.052.926-77		7. Endereço (Rua, n.º): JOAO DE BARROS SOCORRO 155, apto 96B SAO PAULO SAO PAULO 04764090	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (11) 7309-2554	10. Outro Telefone:
		11. Email: carolufscar24@gmail.com	
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: 19, 07, 17		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Universidade de Santo Amaro - UNISA		13. CNPJ: 18.301.267/0004-27	14. Unidade/Órgão:
15. Telefone: (11) 1141-8687		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: Patrícia Colombo de Souza		CPF: 152867418-56	
Cargo/Função: Coordenação de Pesquisa			
Data: 20, 07, 17		 Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			