



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALANNA SILVA HUK FARIAS

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM PACIENTES COM
INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA**

Londrina
2023

ALANNA SILVA HUK FARIAS

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM PACIENTES COM
INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito obrigatório à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Londrina
2023

ALANNA SILVA HUK FARIAS

ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito obrigatório à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Lourenço
Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dra. Natália Medeiros Dias Lopes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. André Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 07 de dezembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Esses dois anos de mestrado foram intensos e desafiadores, e eu jamais conseguiria ter concluído esse processo se não fosse pela ajuda e dedicação de muitas pessoas ao meu redor.

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora, Prof. Dra Alessandra Cecchini que me apoiou, aceitando ser a minha orientadora e me ajudou muito durante esse processo. Sem o seu apoio não estaria conquistando o sonho de concluir o mestrado para seguir na carreira acadêmica.

Agradecimento mais do que especial ao meu marido Elcyo Pussi Farias que é meu grande companheiro e me incentiva sempre, sem você ao meu lado seria impossível concluir mais essa etapa. Agradecimento a minha filha Livia Huk Pussi Farias que foi minha inspiração para que eu deixasse um pouco a vida corrida na medicina e pudesse olhar com mais atenção para a carreira acadêmica, e ao meu filho João Romeu Huk Pussi Farias que me acompanhou dentro da barriga durante todo esse processo. Agradeço profundamente aos meus pais, Randolt Alberto Huk e Maria Jose D. da Silva Huk que nunca pouparam esforços para que eu continuasse estudando e tivesse todas as oportunidades necessárias, vocês sempre me apoiaram em todos os momentos com muito amor e sempre acreditaram em mim.

Agradeço às doutorandas Liara Freitas e Josi de Melo, ao doutorando Luca Trancolini e Thiago Nascimento e a mestranda Michele que me ajudaram imensamente na realização dos experimentos e sempre me acolheram com muito carinho, certamente sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido, vocês não pouparam esforços na colaboração desse trabalho.

Agradeço também às doutorandas Isabela Chagas, e novamente às doutorandas Liara Freitas e Josi de Melo e aos doutorandos Luca Trancolini e Walison Brito que me orientaram na elaboração desse trabalho, me ajudando nos dados estatísticos e nas interpretações.

Ao técnico de laboratório Jesus (Zui), pela disposição e ajuda durante os experimentos, tirando nossas dúvidas sempre com muito carinho.

À técnica de enfermagem Glucia e Fatinha, à enfermeira Juliane e ao secretário Gabriel do Hospital Santa Alice em Santa Mariana pela generosidade

em aceitarem me ajudar na coleta dos materiais e sempre estarem orientando os pacientes da melhor forma possível nas respostas dos questionários.

Agradecimento a direção do Hospital Santa Alice em Santa Mariana que não poupou esforços para que pudéssemos concluir esse trabalho.

Agradeço às professoras Dra. Glaura e ao prof. Dr. Rubens, membros da banca de Qualificação, pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste projeto.

Dedico este trabalho a todos os pacientes que aceitaram participar e sempre foram muito solícitos em me ajudar, vocês contribuíram para o melhor entendimento dessa doença.

FARIAS, Alanna Silva Huk. **Estresse oxidativo em pacientes com insuficiência venosa crônica** 77 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

Insuficiência Venosa Crônica (IVC) é definida como conjunto de manifestações clínicas causadas pela anormalidade do sistema venoso periférico. O "aprisionamento de leucócitos" é o mecanismo responsável pela elevada permeabilidade da parede venosa e estresse oxidativo nas veias doentes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil da resposta oxidativa de pacientes com IVC em estágios iniciais e em estágios avançados. Um total de 101 pacientes foram recrutados no ambulatório de Cirurgia Vasculardo Hospital Municipal Santa Alice – cidade de Santa Mariana - para participar da pesquisa entre setembro de 2022 e abril de 2023. Os pacientes responderam a um questionário sobre idade, hábitos e doenças crônicas e amostras de sangue foram coletadas para análise dos parâmetros de estresse oxidativo. Os pacientes foram estratificados em 2 grupos de acordo com a classificação da insuficiência venosa crônica CEAP (Clínica, Etiológica, Anatômica e Fisiopatológica). O grupo 1 (n=73) inclui pacientes classificados como CEAP1, CEAP2 e CEAP3, enquanto o grupo 2 (n=28) inclui pacientes classificados como CEAP4, CEAP5 e CEAP6. Os eritrócitos foram utilizados para quantificar hidroperóxidos de membrana, glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD) e atividade da catalase (CAT). Os resultados da análise dos dados sociodemográficos mostraram a prevalência do sexo feminino nos dois grupos ($p= 0,001$) e o número de gestações ($p= 0.002$) teve uma relação significativa entre os dois grupos. Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo, os pacientes do grupo 2 apresentaram níveis maiores ($p= 0,002$) de hidroperóxidos de membrana em relação ao grupo 1. A quantificação de GSH e SOD, e a atividade da CAT não se mostrou diferente entre os grupos. Baseado nos resultados pode-se inferir que há um desequilíbrio redox nos pacientes com IVC em estágios mais avançados pela presença importante de elevados níveis de hidroperóxidos de membrana.

Palavras-chaves: Radicais livres; Úlcera venosa; insuficiência venosa crônica; Espécies reativas de oxigênio; Hidroperóxidos de membrana.

FARIAS, Alanna Silva Huk. **Oxidative stress in patients with chronic venous insufficiency**. 77 f. Masters' dissertation (Post graduate Program in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Chronic Venous Insufficiency (CVI) is defined as a set of clinical manifestations caused by abnormalities in the peripheral venous system. "Leukocyte trapping" is the mechanism responsible for the high permeability of the venous wall and oxidative stress in diseased veins. The aim of this study was to characterize the oxidative response profile of patients with CVI in early and advanced stages. A total of 101 patients were recruited from the Vascular Surgery outpatient clinic of Santa Alice Municipal Hospital in the city of Santa Mariana to participate in the research between September 2022 and April 2023. Patients responded to a questionnaire regarding age, habits, and chronic diseases, and blood samples were collected for analysis of oxidative stress parameters. Patients were stratified into 2 groups according to the CEAP classification of chronic venous insufficiency (Clinical, Etiological, Anatomical, and Pathophysiological). Group 1 (n=73) included patients classified as CEAP1, CEAP2, and CEAP3, while Group 2 (n=28) included patients classified as CEAP4, CEAP5, and CEAP6. Erythrocytes were used to quantify membrane hydroperoxides, reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity. The analysis of sociodemographic data showed a prevalence of females in both groups ($p=0.001$), and the number of pregnancies ($p=0.002$) had a significant relationship between the two groups. Regarding oxidative stress parameters, patients in Group 2 showed higher levels ($p=0.002$) of membrane hydroperoxides compared to Group 1. Quantification of GSH and SOD, and CAT activity did not differ between the groups. Based on the results, it can be inferred that there is a redox imbalance in patients with more advanced stages of CVI due to the significant presence of high levels of membrane hydroperoxides.

Key-words: Free radicals; Venous ulcer; Chronic venous insufficiency; Reactive oxygen species; Membrane hydroperoxides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.A - C1: Telangectasias.....	17
Figura 1.B - C2: Varizes.....	17
Figura 1.C - C3: Edema	17
Figura 1.D - C4a: Hiperpigmentação/dermatite ocre.....	17
Figura 1.E - C4b: Dermatoesclerose/atrofia branca.....	17
Figura 1.F - C4c: Corona flebectásica	17
Figura 1.G - C5: Úlcera cicatrizada	17
Figura 1.H - C6: Úlcera ativa.....	17
Figura 2 - Insuficiência das válvulas venosas na IVC.....	20
Figura 3 - Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase e catalase.....	24
Figura 4 - Ciclo da glutathione peroxidase	24
Figura 5 - Vias de produção e depuração de espécies reativa de oxigênio	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CEAP	Clínica, Etiológica, Anatômica, Fisiopatológica
EVLA	Laserterapia endovenosa
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
FGF-b1	Fator de crescimento de fibroblastos beta 1
GO	Glutathione Oxidase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
IFN- γ	Interferon gama
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
IVC	Insuficiência Venosa Crônica
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases
mtDNA	DNA mitocondrial
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
NOS	Óxido nítrico sintetase
O ₂ ^{-•}	Ânion radical Superóxido
OH•	Radical hidroxil
SIH/SUS	Sistema de Informações Hospitalares do SUS
SOD	Superóxido dismutase
TGF-b1	Fator de crescimento beta-1
TIMPs	Inibidor das metaloproteinases
TNF	Fator de necrose tumoral
USG	Ultrassonografia
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VSM	Veia safena magna

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Insuficiência venosa crônica	11
1.2	Epidemiologia da insuficiência venosa crônica	11
1.3	Fatores de risco da IVC	12
1.4	Sinais e sintomas da insuficiência venosa crônica	12
1.5	Diagnóstico da insuficiência venosa crônica	13
1.6	Classificação da doença venosa crônica	15
1.7	Fisiopatologia da doença venosa crônica	19
1.8	Estresse oxidativo na IVC	21
1.9	Tratamento da doença venosa crônica	26
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
	ARTIGO	30
	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

A insuficiência venosa crônica (IVC) é definida como o conjunto de manifestações clínicas causadas pela anormalidade do sistema venoso periférico, ocorrendo nos membros inferiores. É uma doença crônica que provoca mudanças na qualidade de vida dos pacientes devido as suas complicações, como alteração na cor e textura pele e presença de ulcerações (RABE *et al.*, 2012).

Estudos apontam que até 80% da população possa apresentar graus mais leves da doença e que a evolução para os estágios mais severos se encontra entre 1 e 5 % em países desenvolvidos e entre 15-30% no Brasil. (RABE *et al.*, 2012; BENTES *et al.*, 2022). A morbidade dessa doença causa impactos sociais e financeiros, visto que a recorrência das ulcerações é alta quando não tratada corretamente. Cerca de 75% das úlceras em membros inferiores têm como origem a insuficiência venosa crônica (ABBADE; LASTÓRIA, 2006). O tratamento é longo e multidisciplinar, tendo um custo alto para o sistema público de saúde e para o paciente.

A IVC recebe uma classificação de gravidade, que do inglês recebe a sigla CEAP, sendo analisados a Clínica, Etiologia, Anatomia e Fisiopatologia da doença. Nesta classificação, as doenças menos graves estão na classificação CEAP 1-3 e as mais graves CEAP 4-6 (PORTER; MONETA, 1995).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

A IVC é uma doença incapacitante e com alta morbidade, que acomete pessoas de diferentes faixas etárias e que pode causar a aposentadoria precoce de indivíduos, bem como uma baixa qualidade de vida (LIMA, 2019). Dados do Ministério da Saúde mostram que a IVC, nos anos de 2008-2022, levou a um total de 198.304 internações no Brasil – 151.011 mulheres e 47.293 homens – representando 6% do número total de internamentos no Brasil nesse período (MACEDO; LOPES, 2023).

A maioria dos estudos mostrou que a IVC é mais prevalente entre as mulheres (BERGAN *et al.*, 2006; LIM; DAVIES, 2009) e em relação a raça mais prevalente nos pacientes com IVC foi verificado no San Diego Population Study (CRIQUI, 2003) que populações de origem europeia possuem uma maior prevalência de IVC do que a população negra ou asiática.

1.3 FATORES DE RISCO DA IVC

A maior prevalência de IVC ocorre com o aumento da faixa etária, no sexo feminino, em pacientes obesos, com histórico familiar de insuficiência venosa e em multíparas (RABE E *et al.*, 2012; RABE E *et al.*, 2006; CRIQUI, 2003). Os dados quanto a participação do tabagismo na origem da insuficiência venosa são controversos (FG *et al.*, 2001), ademais, reposição hormonal oral e os contraceptivos não aumentam o risco de varizes (JUKKALA TM; HAKAMA M, 2006).

Com relação as alterações genéticas, essas representam cerca de 17% dos casos de IVC (FIEBIG *et al.*, 2010), tendo sido as variantes genéticas nos genes EFEMP1, KCNH8 e SKAP2 relacionadas à susceptibilidade de desenvolvimento de IVC. Esses genes regulam a matriz extracelular, canais de potássio e sinalização celular, podendo estar envolvidos na fisiopatologia da IVC (ELLINGHAUS *et al.*, 2017). A mutação do gene C282Y da hemocromatose (HFE) e variantes do gene V34L do fator XII foram encontradas em pacientes com IVC, indicando possíveis implicações de longo prazo no risco de desenvolvimento de formas mais graves, com presença de úlceras venosas (ZAMBONI *et al.*, 2005).

1.4 SINAIS E SINTOMAS DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

Os sintomas da IVC são extremamente variáveis, sendo os mais comuns: sensação de peso, cansaço, coceira na pele, dor nas pernas do tipo queimação ou latejante, câimbras e edema nos membros inferiores (BERGAN, 1985). Esses sintomas podem interferir nas atividades diárias, principalmente em pacientes que precisam ficar em pé por longos períodos. Os sintomas pioram ao final do

dia, e o seu alívio pode ser alcançado pela elevação da perna, mobilização e exercício físico.

As veias varicosas podem sofrer tromboflebite, uma inflamação causada por um coágulo sanguíneo que se forma nas veias dilatadas. Além disso, os pacientes podem apresentar varicorragia que consiste no sangramento desses trajetos varicosos. A apresentação de casos graves com alteração na pele, como a dermatoesclerose, dermatite ocre, podem levar ao desenvolvimento de úlcera venosa (LABROPOULOS *et al.*, 2008). Cerca de 80% dos pacientes com úlcera venosa possuem insuficiência venosa primária e 20 a 30% têm insuficiência venosa secundária a um evento pós-trombótico (RABE *et al.*, 2006).

Embora a insuficiência venosa primária seja mais comum, é na síndrome pós trombótica que há maior taxa de desenvolvimento de úlcera venosa da forma mais grave, tornando o tratamento mais desafiador (LABROPOULOS *et al.*, 2008).

1.5 DIAGNÓSTICO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

O diagnóstico da IVC é realizado pelo exame físico associado ao ultrassom (USG) doppler e pela angioressonância e/ou angiotomografia venosa para casos mais graves. O exame físico deve ser iniciado com paciente em pé, após alguns minutos de ortostatismo, em uma sala com temperatura ambiente adequada, com boa iluminação, a fim de facilitar para o médico definir o tamanho, localização e distribuição das veias varicosas, presença e quantificação do edema (inchaço), eventuais alterações de pele como hiperpigmentação, eczema, atrofia branca e úlceras cicatrizadas ou abertas.

Após o exame em ortostatismo, o paciente permanece em decúbito dorsal e o restante do exame é concluído, incluindo palpação de pulsos para afastar alterações arteriais. Observa-se a morfologia e a localização dos vasos, a fim de definir se são veias reticulares ou telangiectasias, que diferem uma da outra de acordo com o seu diâmetro. Presença de colaterais abdominais e pélvicas sugerem obstrução das veias ilíacas. Veias dilatadas muito proximais à raiz da coxa e fora da projeção da crossa da safena podem sugerir varizes pélvicas.

A observação do paciente é feita com metodologia e sequência, examinando os dois membros inferiores de forma isolada e comparativamente (BRITO; VASCULAR, 2020). Dentre as manifestações da IVC pode-se observar a ocorrência de varizes primárias causadas pela insuficiência das válvulas por afastamento de suas cúspides. As varizes primárias são extensas, ocorrem tardiamente e em geral são indolores, exceto quando infectadas. Já as varizes secundárias ocorrem devido a uma causa adquirida, como presença de tromboflebite ou trombose venosa profunda anterior, presença de traumatismos prévios, ou varizes pélvicas.

As varizes secundárias tendem a ser unilaterais e o trajeto se apresenta de modo anárquico (BRITO; VASCULAR, 2020). As varizes congênitas acometem pacientes que possuem uma alteração anatômica desde o nascimento, contribuindo para o aparecimento de varizes (BRITO; VASCULAR, 2020). Esses pacientes apresentam varizes inclusive na adolescência ou até mesmo na infância.

Com relação as ulcerações venosas, essas têm a forma variada, os tecidos vizinhos apresentam outros sinais de hipertensão venosa tais como: eczema, hiperpigmentação e fibrose, sendo seu fundo róseo, eventualmente friável e sangrante. (GLOVICZKI *et al.*, 2011). Além do exame físico completo do paciente temos os exames complementares como o ultrassom (USG) doppler, que é sem dúvida a ferramenta diagnóstica inicial na abordagem de doenças venosas crônicas. Suas vantagens incluem ser um exame não-invasivo podendo ser repetido tantas vezes quanto necessário, reproduzível, permitindo tanto a avaliação anatômica do sistema vascular venoso, quanto sua fisiologia pela avaliação hemodinâmica do fluxo (MAGNUSSON *et al.*, 1995).

Outro exame que pode ser utilizado em alguns casos mais complexos é flebografia. O uso da flebografia em pacientes com varizes diminuiu significativamente com o advento da USG doppler. Na avaliação das veias superficial, perfurantes e profundas, USG doppler é pelo menos tão confiável quanto a flebografia (BAKER *et al.*, 1993). Em situações específicas como no diagnóstico de obstruções de veias pélvicas ou incompetência de veias gonadais e ilíacas e na avaliação de malformações vasculares, quando as alternativas

técnicas de imagem não são conclusivas, a flebografia representa uma boa alternativa. Na presença de malformação vascular, síndrome pós-trombótica complexa ou casos de varizes recorrentes, a flebografia pode ajudar a obter informações como a origem do refluxo como no envolvimento de perforantes e refluxo pélvico (BALDT *et al.*, 1996).

Já exames como a angioressonância e a angiotomografia venosa possuem indicação restrita, apesar dos grandes avanços nas técnicas de obtenção e reconstrução das imagens do sistema venoso. Suas principais indicações ainda residem nos casos em que o USG doppler não é conclusivo, em especial nos casos de estenose ou obstrução do segmento venoso ílaco-cava e insuficiência de veias gonadais em associação com varizes pélvicas (MARSTON *et al.*, 2011).

1.6 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA VENOSA CRÔNICA.

A classificação CEAP (Clinical-Etiology-Anatomy-Pathophysiology) é um padrão internacionalmente aceito para classificar pacientes com insuficiência venosa crônica. Desenvolvido em 1993, atualizado em 1996 e revisado em 2004, o CEAP é um sistema de classificação baseado nas manifestações clínicas dos distúrbios venosos crônicos, no entendimento atual da etiologia, da anatomia envolvida e da patologia venosa subjacente (Tabela1). Em maio de 2017, o American Venous Fórum realizou mudanças que incluem: a) adição de Corona Flebectásica como a subclasse clínica C4c; b) a introdução do modificador “r” para veias varicosas recorrentes e úlceras venosas recorrentes e c) a substituição das descrições numéricas dos segmentos venosos por suas abreviaturas comuns (LURIE *et al.*, 2020).

Tabela 1- Classificação CEAP da doença venosa crônica	
C0	Sem sinais visíveis ou palpáveis de doença venosa;
C1	Telangiectasias e/ou veias reticulares
C2	Veias varicosas
C2r	Veias varicosas recorrentes
C3	Veias varicosas mais Edema
C4	Mudanças na pele e tecido celular subcutâneo secundário a doença venosa crônica
C4a	Hiperpigmentação ou eczema
C4b	Lipodermatoesclerose ou atrofia branca
C4c	Corona flebectásica
C5	Úlcera venosa cicatrizada
C6	Úlcera ativa
C6r	Úlcera venosa ativa recorrente
Classificação etiológica (E)	
Ec	Congênita
Ep	Primária
Es	Adquirida ou secundária (pós trombótica)
En	Sem causa conhecida
Classificação anatômica (A)	
As	Veias superficiais
Ad	Veias profundas
Ap	Veias perfurantes
An	Localização não definida
Classificação fisiopatológica (P)	
Pr	Refluxo
Po	Obstrução
Pr, o	Refluxo e obstrução
Pn	Sem fisiopatologia identificada

Fonte: Autoria própria

Na prática clínica, a classificação CEAP descreve o que o médico consegue observar no exame físico e no USG doppler, onde é possível avaliar a etiologia das varizes, sua localização e o mecanismo responsável para a sua manifestação. Essa classificação não leva em consideração os sintomas dos pacientes. Para isso existe outro sistema de classificação – Venous Clinical Severity Score, que considera o quanto a doença está interferindo na vida do paciente, na sua habilidade do trabalho e nas suas atividades diárias (VASQUEZ; MUNSCHAUER, 2008).

A figura 1.A evidencia uma perna com telangectasias (classificação CEAP1) que são veias menores que 1 milímetro de diâmetro que se desenvolvem logo abaixo da pele, geralmente de coloração avermelhada ou arroxeada. Diferente das varizes (classificação CEAP2), representadas na figura 1.B, que são veias tortuosas e dilatadas com diâmetro de até 3 mm. A figura 1.C evidencia uma perna com edema (classificação CEAP3), caracterizada por um inchaço presente na região distal de perna, independente do calibre das veias. A figura 1.D apresenta um membro com hiperpigmentação (classificação CEAP4a) que se caracteriza pelo acúmulo de hemossiderina na pele, conferindo a coloração acastanhada (dermatite ocre). A figura 1.E apresenta um quadro de lipodermatoesclerose ou atrofia branca (classificação CEAP4b) que se caracteriza pela presença de paniculite e endurecimento da pele. A mudança importante na nova classificação é a caracterização da Corona Flebectásica (classificação CEAP4c), representada na figura 1.F, que são telangectasias e varizes na região do tornozelo. Tais alterações se relacionam com pior desfecho, e presença de ulcerações (LURIE *et al.*, 2020). As figuras 1.G e 1.H apresentam o quadro de uma mesma paciente no início e ao final do tratamento em nosso ambulatório. A figura 1.G apresenta uma úlcera cicatrizada ao final do tratamento (classificação CEAP 5) e a figura 1.H apresenta uma úlcera ativa no início do tratamento (classificação CEAP6).

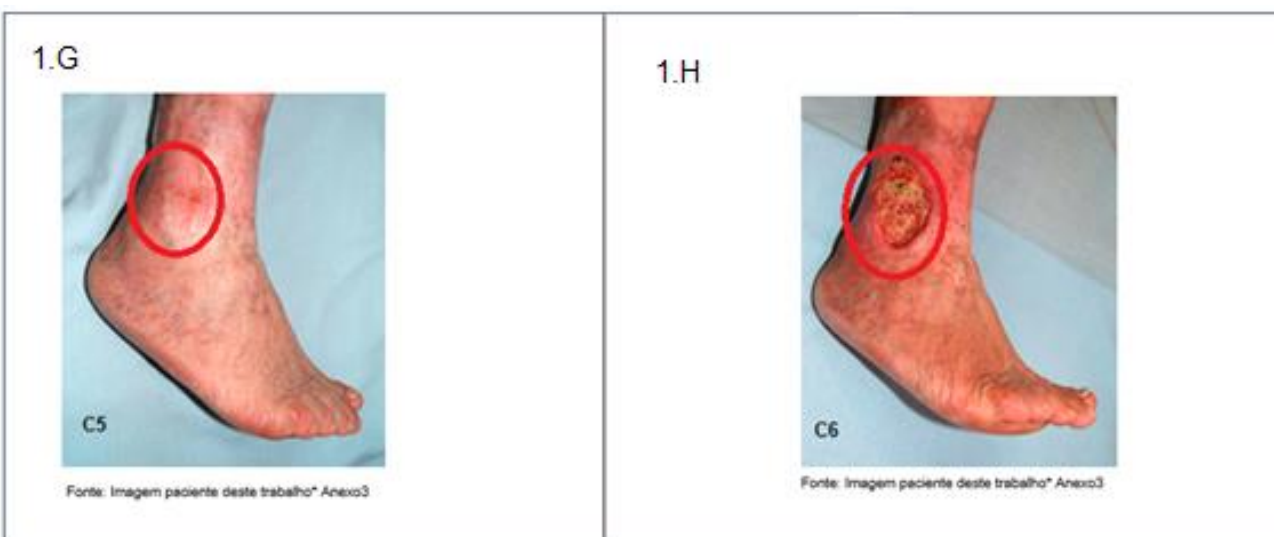


Figura 1.(A) CEAP 1 - Telangectasias. Porção posterior de coxa de membro inferior esquerdo, evidenciando presença de telangectasias (círculo vermelho). (B): CEAP 2 – Varizes. Porção lateral de coxa direita com presença de varizes (círculo vermelho). (C) CEAP 3 – Edema (círculo vermelho). Maléolo medial direito evidenciando edema de membro inferior. (D) CEAP 4a – Hiperpigmentação - dermatite ocre - (círculo vermelho). Presença de alteração na coloração da pele característica de pacientes com insuficiência venosa avançada. Tal alteração recebe o nome de dermatite ocre e ocorre devido ao depósito de hemossiderina na pele. (E) CEAP 4b - Lipodermatoesclerose – atrofia branca – (círculo vermelho). Maléolo lateral de membro inferior direito evidenciando esclerose das camadas mais profundas da pele. (F) CEAP 4c - Corona Flebectásica – Presença de telangectasias na região de maléolo lateral de membro inferior direito. (G) CEAP 5. Porção lateral de membro inferior direito com úlcera cicatrizada (círculo vermelho). (H) CEAP 6. Porção lateral de membro inferior direito com úlcera ativa (círculo vermelho).

1.7 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA VENOSA CRÔNICA

A hipertensão venosa e a incompetência valvular (Figura 2) são cruciais para a formação de varizes, ocasionando válvulas alargadas e hipotróficas, tornando o lúmen das varizes maior do que o lúmen de vasos saudáveis (COLLEGE, 2001). No entanto, a principal razão para essas mudanças permanece incerta. Descobertas recentes indicam que processos inflamatórios são essenciais para o desenvolvimento de válvulas incompetentes e remodelamento da parede venosa.

A teoria mais aceita descreve o "aprisionamento de leucócitos" como o mecanismo responsável pela elevada permeabilidade da parede venosa e estresse oxidativo nas veias (GRUDZIŃSKA; CZUBA, 2014). De acordo com tal teoria, os neutrófilos aderem ao endotélio de veias em situação de hipóxia, permanecendo ativados com liberação considerável de radicais livres. A produção aumentada de radicais livres por neutrófilos em veias varicosas foi observada em alguns trabalhos (Guzik B, *et al.*, 2011; Condezo-Hoyos *et al.*, 2013), sendo o principal responsável por este aumento, o NADPH oxidase (NOX) e a óxido nítrico sintase (NOS) (Hood ED, 2012). Ao mesmo tempo os mecanismos antioxidantes estão reduzidos, como a superóxido dismutase (SOD) que diminuiu a sua atividade e o potencial antioxidante total (GUZIK B *et al.*, 2011).

Os radicais livres, especialmente formas reativas de oxigênio e nitrogênio produzidos por neutrófilos e macrófagos ativos, causam degradação dos

principais componentes proteicos da parede venosa – colágeno e elastina - e causam destruição da membrana celular, o que é confirmado pelas concentrações elevadas de peroxidação lipídica encontradas nas varizes (KRZYŚCIAK; KÓZKA, 2011).

A sobrecarga micro circulatória causada pelo aumento do fluxo venoso leva a um comprometimento da drenagem venosa. Isto ocorre ou pela hipertensão venosa originada pelo refluxo de sangue oriundo de uma insuficiência das válvulas venosas (figura 2) ou por obstrução/refluxo que ocorre após um evento trombótico causando destruição dessas válvulas (ZUKOWSKI; NICOLAIDES; SZENDRO, 1991).

A drenagem venosa depende principalmente de um importante parâmetro hemodinâmico denominado pressão transmural (TMP) (BOLLINGER *et al.*, 1997). A TMP está aumentada em pacientes acometidos por IVC levando ao comprometimento da drenagem tecidual e, conseqüentemente, facilitando o início da cascata inflamatória. O aumento da TMP determina extravasamento de hemácias e depósitos dérmicos de hemossiderina ou fagócitos carregados de ferro (ZAMBONI, P *et al.*, 2008). Depósitos de ferro são visíveis, levando a dermatite ocre nas pernas de pacientes afetados por IVC grave.

A sobrecarga local de ferro gera radicais livres e ativa a função proteolítica de metaloproteinases (MMPs), podendo diminuir os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), causando alteração estrutural das válvulas, com hipertrofias e hiperplasias, diminuição de colágeno, diminuição de células musculares e de matriz extracelular (MEC) (WLASCHEK *et al.*, 2019). Isso contribui com a dilatação venosa, relaxamento venoso e perda do tônus venoso. Além disso, o aumento de hemossiderina e ferro férrico faz com que ocorra amplificação do estresse oxidativo e da inflamação nos tecidos circundantes, prejudicando ainda mais a cicatrização de feridas (WLASCHEK *et al.*, 2019). Nessa complexa rede de processos hemodinâmicos, celulares e moleculares, as MMP também aumentam secundariamente a estase venosa (WLASCHEK *et al.*, 2019).

Além de sua atividade proteolítica direta contra proteínas da MEC, proteoglicanos e glicocalix glicosaminoglicanos, as MMPs também modulam vias inflamatórias com aumento de quimiocinas, citocinas e receptores de superfície

celular (WALI; EID, 2002). Na verdade, as MMPs podem ativar precursores inativos de citocinas pró-inflamatórias; degradar fatores de crescimento e receptores; e contribuir para ampliar o microambiente pró-inflamatório, degradativo e pró-trombótico que leva à ativação de leucócitos e de fibroblastos residentes e liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (SAYER; SMITH, 2004; SPRAGUE, 2009). Estresses inflamatórios repetidos no endotélio venoso levam a lesões recorrentes na parede venosa, mantendo um estado inflamatório crônico (BERGAN *et al.*, 2006).

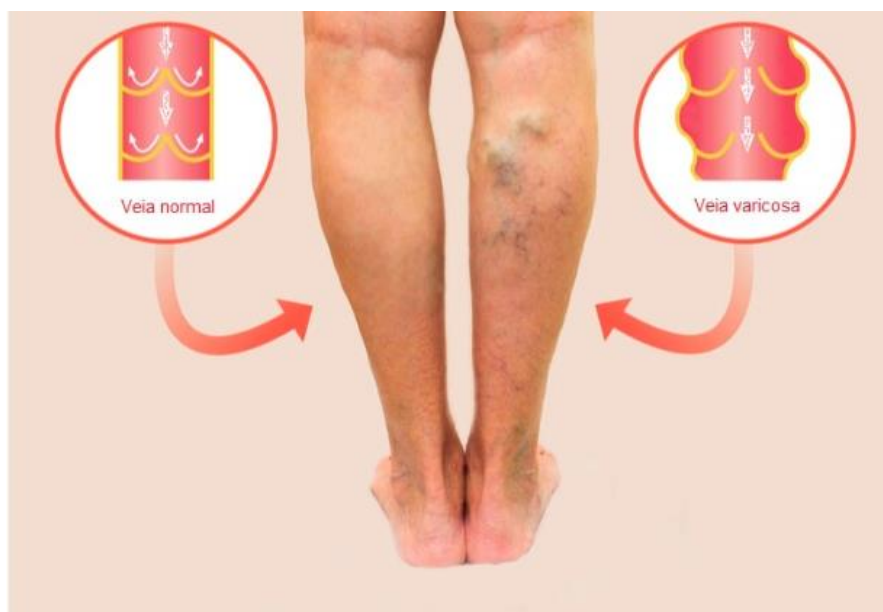


Figura 2: Apresentação da insuficiência das válvulas venosas na IVC. Fonte: [Varizes: causas, remédios, cirurgia, riscos e mais - Ativo Saúde \(ativosaude.com\)](#)

O desenvolvimento da ulceração venosa se inicia com a lesão primária da pele (que é o alvo final da hipertensão venosa crônica), com extravasamento de macromoléculas, como fibrinogênio e alfa-macroglobulina, e glóbulos vermelhos no interstício dérmico. Produtos de degradação de hemácias e proteínas extravasadas são quimioatraentes potentes e presumivelmente permitem o processo inflamatório crônico que ocorre nesses casos (AGUS; ARPAIA, 2001).

1.8 ESTRESSE OXIDATIVO NA IVC

O termo estresse oxidativo foi introduzido por Helmut Sies em 1991 e descreve “uma perturbação no balanço antioxidante/pró-oxidante em favor do

segundo, levando a um dano potencial (SIES H *et al*, 1991). Uma das classes das espécies reativas são os radicais livres, moléculas que apresentam um elétron desemparelhado na sua última camada de valência (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), reagindo com biomoléculas para doar o elétron excedente (sofrendo redução) ou receber um elétron (sofrendo oxidação) (MCCORD, 2000). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas formadas durante a redução parcial do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, mas também são produzidas no processo de fagocitose e pela atividade de enzimas como a NADPH oxidase, xantina oxidase e as enzimas do complexo citocromo P450 (MAGDER, 2006; QIANG *et al*, 2013; MOLONEY *et al*, 2018). Em quantidades moderadas, as espécies reativas são importantes para o funcionamento normal do organismo (MAGDER *et al*, 2006; REUTER *et al.*, 2010). Porém, quando o equilíbrio redox é rompido, elas podem gerar outras espécies mais reativas ((FERREIRA; MATSUBARA, 1997), como o radical hidroxil (OH•) que é o mais reativo e com maior potencial danoso, e reagir com proteínas, lipídeos e DNA das células provocando modificações bioquímicas (Fig. 3) (REUTER *et al.*, 2010).

Nas membranas celulares, as espécies reativas, como o peróxido de hidrogênio, são capazes de atravessar facilmente as membranas e em conjunto com metais de transição íons como ferro férrico ou cobre podem conduzir a geração do radical hidroxila, altamente tóxico, capaz de iniciar a peroxidação lipídica das membranas, que resulta na desestabilização estrutural e funcional destas membranas e na geração de moléculas como o malondialdeído (MDA) (REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY *et al.*, 2018).

As ERO estão envolvidas em todos os estágios da ferida e no processo de cicatrização. Migração, adesão, proliferação, neovascularização, remodelação e apoptose são os principais processos na cicatrização de feridas regulados por ERO (Drinkwater, *et al.*, 2003). Devido à sinalização subjacente e danos nessas vias, o estresse oxidativo pode resultar em distúrbios na cicatrização de feridas (Drinkwater *et al.*, 2003). Concentrações aumentadas de ERO nas feridas conduzem a uma sequência deletéria de eventos finalmente resultando no estado de não cura. A maioria das ERO são provavelmente

liberadas por neutrófilos e macrófagos e, em proporção ainda não conhecida, liberados por fibroblastos residentes e células endoteliais (WALI; EID, 2002).

Nas feridas crônicas existem inúmeras fontes de ERO, sendo a inflamação prolongada uma delas. Nesse caso, os neutrófilos que migram para o tecido danificado geram radicais de ânion superóxido em reação de hipóxia e isquemia/reperfusão resultando em estresse oxidativo (GRUDZIŃSKA; CZUBA, 2014). As ERO são conhecidas por interferir seletivamente nas vias de sinalização, resultando na ativação de fatores de transcrição que controlam a expressão de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 e interleucina-6, fator de necrose tumoral, interleucina-8 (SENET *et al.*, 2003), enzimas proteolíticas, incluindo membros das famílias metaloproteinases (MMP) (RAVANTI; KÄHÄRI, 2000).

O aumento da pressão hidrostática devido à pressão venosa causada pela insuficiência das válvulas pode ativar moléculas de adesão e seus receptores incluindo selectinas, B1- e B2-integrinas, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular (VCAM 1), potencializando assim o extravasamento contínuo de leucócitos ativados (LATTIMER *et al.*, 2016). Após um aumento na expressão dessas moléculas elas não retornam aos seus níveis basais. A adesão de leucócitos a células endoteliais em vênulas pós-capilares, por exemplo, é um passo inicial na inflamação e tal adesão também é induzida por ERO. Este efeito é abolido pela catalase, mas não pela superóxido dismutase, sugerindo que o peróxido de hidrogênio, e não o superóxido, seja a espécie oxidativa envolvida neste processo (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Altos níveis de ERO aumentam a adesão de leucócitos, assim como aumentam a migração de células inflamatórias para o tecido da ferida; células de Langerhans, células T e macrófagos, cada um sendo recrutado por mais de uma via molecular de adesão, para as diferentes regiões de úlceras venosas crônicas da perna. Além disso, níveis aumentados de ERO podem prejudicar a migração de queratinócitos *in vitro*, possivelmente retardando a reepitelização das feridas (SCHÄFER; WERNER, 2008).

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas, que irão neutralizar as ERO produzidas no organismo. Dentre as defesas enzimáticas podemos citar a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx). Já a glutathione (GSH), carotenos, ácido ascórbico (vitamina C), vitamina D, vitamina E, entre outros, pertencem a classe dos antioxidantes não enzimáticos (REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY *et al.*, 2018).

Em pacientes com úlceras crônicas nas pernas, níveis significativamente mais baixos de vitamina A e E foram encontrados (ROJAS; PHILLIPS, 1999). Agren *et al* (1986) mostraram que pacientes, diabéticos e não diabéticos, com insuficiência venosa crônica CEAP6 tinham níveis mais baixos de selênio, zinco e ferro em combinação com níveis séricos aumentados de cobre. O selênio é um importante cofator da enzima glutathione peroxidase e o cobre como metal de transição é capaz de conduzir a reação de Fenton com a liberação do radical hidroxila. Nas úlceras venosas de perna, devido ao dano na célula endotelial, ocorre extravasamento para o interstício de proteínas e eritrócitos contendo grandes quantidades de ferro ligado à hemoglobina. Após a destruição desses glóbulos vermelhos há liberação de hemoglobina levando a um aumento de ferro livre e ligado dentro da úlcera (ARPAIA, 2001).

A primeira defesa imunológica contra a infecção microbiana é a liberação de grandes quantidades de ERO por neutrófilos e macrófagos. Esta explosão respiratória é devida à ativação do complexo NADPH-oxidase (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) dentro da membrana plasmática (WERNER, 2008).

A catalase é uma enzima presente no citosol e nos peroxissomos, e que utiliza a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) como substrato para a conversão principalmente de H₂O₂ em água e oxigênio (Fig. 3).

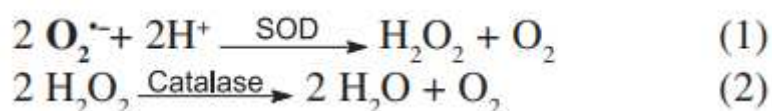


Figura 3- Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) (1) e catalase (2). Fonte: VASCONCELOS *et al.*, 2007

A SOD é uma metaloenzima localizada no citosol e na mitocôndria (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011; MOLONEY *et al.*, 2018). Sua principal função é reagir com o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) transformando-o em peróxido de hidrogênio H_2O_2 e oxigênio, sendo a primeira linha de defesa contra esse radical (Fig. 3).

A glutathiona peroxidase (GPx) é responsável por reduzir indiretamente o peróxido de hidrogênio durante o processo de oxidação da GSH (Fig. 4) (HUBER *et al* 2008). A glutathiona oxidase (GO) é uma enzima FAD dependente que converte GSH em glutathiona oxidada (GSSG) (Fig. 4) (WU *et al* 2013; OESTREICHER *et al*, 2018). A glutathiona redutase (GR) é uma flavoproteína que também utiliza o NADPH como substrato para converter GSSG a GSH (Fig. 4), proporcionando a manutenção das defesas antioxidantes, já que GSSG é resultado da exposição de GSH a um agente oxidante (FERREIRA *et al*, 1997; BARREIROS *et al*, 2006).

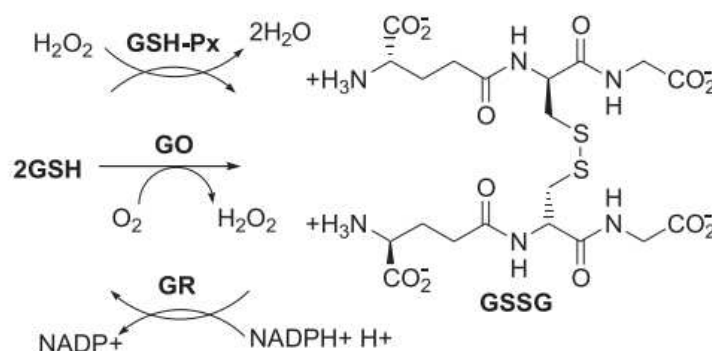


Figura 4- Ciclo catalítico da glutathiona: conversão de GSH a GSSG pelas enzimas glutathiona peroxidase (GSH-px) ou glutathiona oxidase (GO) e redução de GSH a GSGG pela enzima glutathiona redutase (GR). Fonte: HUBER, ALMEIDA, 2008.

Os níveis de GSH, SOD, catalase e GPx são regulados por vias de sinalização, entre elas, uma das mais importantes é a relacionada ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) (QIANG *et al*, 2013; MOLONEY *et al*, 2018).

Outra via de sinalização envolvida na resposta ao estresse é a da p53 (MOLONEY *et al*, 2018). Quando a célula apresenta níveis elevados de espécies reativas, a p53 modifica a expressão de genes criando um estado pró-oxidativo para indução da morte celular (GAMBINO *et al.*, 2013).

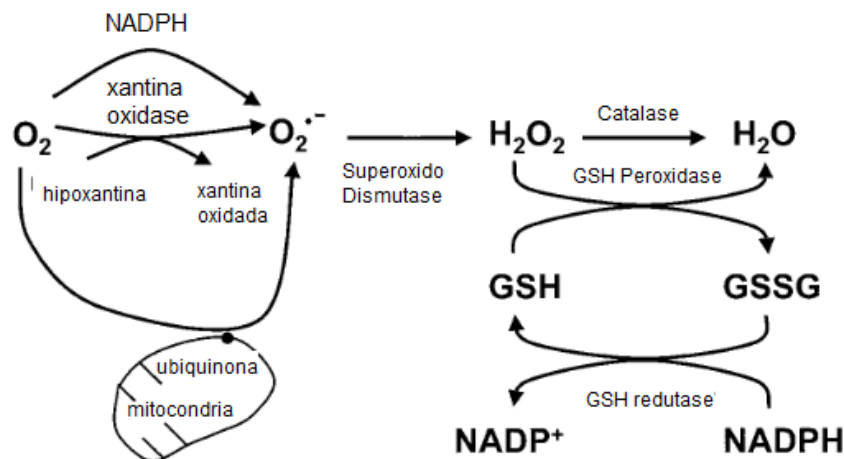


Figura 5- Vias de produção e depuração de espécies reativas de oxigênio (ROS) Fonte: DRÖGE, WULF, 2002.

1.9 TRATAMENTO DA DOENÇA VENOSA CRÔNICA

A avaliação das varizes progrediu muito nas últimas 2 décadas com a ampla disponibilidade de ultrassonografia doppler. O tratamento das varizes também sofreu grandes mudanças com a introdução de técnicas de ablação endovenosa percutânea, incluindo laserterapia endovenosa (EVLA) (HOGGAN BL *et al*, 2009) e ablação por radiofrequência (RFA) (LUEBKE *et al*, 2008) e escleroterapia líquida ou com espuma. (Schwartz *et al*, 2011).

Tratamento cirúrgico aberto com flebectomia (retirada) das safenas realizado sob anestesia com bloqueio (raquianestesia) tem sido largamente substituído por procedimentos percutâneos baseados em tratamentos ambulatoriais que podem ser realizados sob anestesia local com resultados similares, mas com menos desconforto para o paciente, melhorando a qualidade de vida da paciente no pós-operatório e retorno precoce ao trabalho (Sam *et al*, 2004).

O tratamento medicamentoso tem sido utilizado há décadas, mas passivo de controversa (Ramelet *et al*, 2005). Os medicamentos podem ser classificados em dois grupos: fármacos naturais e sintéticos, como naftazona e dobesilato de cálcio, respectivamente (Allaert, 2012). Os principais modos de ação das drogas venoativas são para diminuir a permeabilidade capilar, diminuir a liberação de mediadores inflamatórios ou melhorar o tônus venoso (Ramelet *et al*, 2005).

Drogas não venoativas, como a pentoxifilina, reduzem a ativação dos glóbulos brancos e o ácido acetilsalicílico inibe a função plaquetária e possuem um efeito anti-inflamatório (Ramelet *et al*, 2005).

Portanto, o tratamento da doença venosa crônica deve ser individualizado. Dependendo principalmente do status de saúde do paciente, assim como do seu objetivo final (Ramelet *et al*, 2005). Apesar dos avanços no tratamento da IVC, é imprescindível conhecimento sobre dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a progressão desta doença. O estresse oxidativo é um dos mecanismos ainda não totalmente compreendidos, e a elucidação destes mecanismos são essenciais para que novas abordagens terapêuticas possam ser aplicadas.

2) JUSTIFICATIVA

A insuficiência venosa crônica é uma doença prevalente na população, podendo provocar mudanças na qualidade de vida dos pacientes devido as suas complicações, como dor, redução da mobilidade, mudanças na coloração pele e presença de ulcerações. A morbidade dessa doença causa impactos sociais e financeiros, visto que a recorrência das ulcerações é alta quando não tratada corretamente. Além disso, o impacto psicossocial devido ao constrangimento, emoções negativas, ansiedade, depressão, perda da autoestima, dependência estão presentes, reduzindo a qualidade de vida desses pacientes.

Algumas características como o diâmetro das varizes, pigmentação da pele (CEAP 4), lipodermatoesclerose (CEAP 4), atrofia branca (CEAP 4) e inflamação local, como eczema, eritema, celulite determinam uma maior gravidade da doença. Porém, estudos mostram que mesmo aqueles pacientes com alterações menores, como telangectasias em região de tornozelo – corona flebectásica (CEAP 4c), podem evoluir para ulcerações, o que torna importante o estudo de comparação entre a doença inicial e a doença avançada, a fim de que possamos entender quais são os pontos chaves que fazem com que uma paciente desenvolva úlcera e outra não. Até o momento os artigos mostram que a inflamação tem papel chave na perpetuação da úlcera crônica, porém, poucos artigos relacionam os níveis de estresse oxidativo nos diferentes níveis de gravidade da doença venosa crônica. Não foi localizado, até o momento, nenhum estudo que apresente uma análise do estresse oxidativo permitindo avaliar a doença venosa no seu estágio inicial e no seu estágio avançado. Por este motivo, o presente trabalho avaliou estes parâmetros para enriquecer o conhecimento sobre a insuficiência venosa crônica e seus diferentes desfechos e gravidades.

3) OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o nível de estresse oxidativo sistêmico de pacientes com Insuficiência Venosa Crônica em dois grupos de acordo com a gravidade de sua classificação e apresentação clínica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar as enzimas antioxidantes SOD e catalase no sangue de paciente com IVC em estágio inicial e em estágio avançado;
2. Medir os níveis de glutathiona reduzida no sangue de paciente com Insuficiência Venosa Crônica em estágio inicial e em estágio avançado;
3. Quantificar os hidroperóxidos de membrana nos eritrócitos de pacientes com Insuficiência Venosa Crônica em estágio inicial e em estágio avançado.

A) ARTIGO

O presente trabalho foi realizado na Universidade Estadual de Londrina nos laboratórios de Patologia Molecular e de Fisiopatologia e Radicais livres, sendo as amostras obtidas no Ambulatório de Cirurgia Vascular, no Hospital Santa Alice, cidade de Santa Mariana - Paraná. Os dados obtidos permitiram a produção de um artigo científico que será submetido para publicação na revista internacional VASA (European Journal of Vascular Medicine).

<https://www.hogrefe.com/us/journal/vasa>

“Análise da formação de hidroperóxidos de membrana e da atividade antioxidante da Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione reduzida em pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio inicial e em estágio avançado de insuficiência venosa crônica.”

Alanna Silva Huk Farias¹; Liara Freitas Cavalcanti ¹, Luca Kiichi Suzuki Trancolin¹, Jose de Melo¹, Michelle Sanchez Carrijo¹; Isabela Chagas Silva¹; Thiago Henrique Daniel do Nascimento¹, William Capellari Fumegali¹; Rubens Cecchini²; Alessandra Lourenço Cecchini¹

¹Laboratório Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil.

²Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil

Correspondência do autor: Alessandra Cecchini

Email: alececchini@uel.br

Fax: +55 (43) 3371-4267

Phone: +55 (43) 3371-4529.

Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051-990, Paraná, Brasil.

RESUMO

Insuficiência venosa crônica (IVC) é definida como conjunto de manifestações clínicas causadas pela anormalidade do sistema venoso periférico. Estudos apontam que 80% da população pode apresentar graus mais leves, e a evolução para os estágios mais severos pode chegar a 30% em países subdesenvolvidos. A resposta inflamatória participa da patogênese dessa doença, assim como o estresse oxidativo. O objetivo desse artigo é caracterizar o perfil da resposta oxidativa sistêmica de pacientes com IVC que se apresentam em estágios iniciais e em estágios avançados da doença. Um total de 101 pacientes com IVC foram estudados. Os pacientes foram estratificados em 2 grupos de acordo com a classificação CEAP. O grupo 1 (n=73) inclui pacientes em estágio inicial da doença, enquanto o grupo 2 (n=28) inclui pacientes em estágio avançado. Os eritrócitos foram utilizados para quantificar a glutatona reduzida (GSH), a atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT) e produção de hidroperóxidos de membrana. O sexo dos participantes ($p= 0.001$) e o número de gestações ($p= 0.001$) demonstraram ter uma relação significativa com a gravidade da doença. Quando comparados os parâmetros de estresse oxidativo entre os dois grupos, os pacientes do grupo 2 demonstraram uma maior produção ($p= 0.002$) de hidroperóxidos de membrana em relação ao grupo 1. A quantificação de GSH e a atividade da SOD e catalase não demonstraram diferença significativa entre os dois grupos. Com isso, podemos concluir que apesar dos antioxidantes estudados não terem demonstrado alteração entre os dois grupos, não se descarta que o estresse oxidativo possa estar ocorrendo no grupo 2 (doença mais avançada), uma vez que existe uma maior formação de hidroperóxidos de membrana. Assim, estudos adicionais devem ser realizados para se estabelecer a via pela qual o estresse oxidativo está sendo estimulado, bem como suas formas de diminuí-lo.

Palavras-chaves: Radicais livres. Úlcera venosa, insuficiência venosa crônica. Espécies reativas de oxigênio, hidroperóxidos de membrana. "

Introdução

A insuficiência venosa crônica (IVC) é uma doença prevalente na população e provoca mudanças na qualidade de vida dos pacientes devido as suas complicações, como as mudanças na coloração da pele e presença de ulcerações (RABE *et al.*, 2012), sendo a causa provável o aumento da permeabilidade da parede venosa (GRUDZIŃSKA; CZUBA, 2014) e o aprisionamento de leucócitos nas válvulas das veias varicosas, ocasionando estresse oxidativo nesses vasos (GWOZDZINSKI *et al.*, 2021). De acordo com tal teoria, os neutrófilos aderem ao endotélio de veias em situação de hipóxia, permanecendo ativados com liberação considerável de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GUZIK, *et al.*, 2011; CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2013).

Os radicais livres, especialmente formas reativas de oxigênio e nitrogênio produzidos por neutrófilos e macrófagos ativos, causam degradação dos principais componentes proteicos da parede venosa – colágeno e elastina, contribuindo com a ocorrência da vasodilatação característica desses vasos doentes. Além disso, a hipóxia desempenha um papel significativo na fisiopatologia das veias varicosas (GHADERIAN *et al.*, 2010). Na hipóxia há baixa concentração de oxigênio e alta concentração de dióxido de carbono, o que leva a queda do pH e, conseqüentemente, aumento dos íons de ferro livres da transferrina. A maior concentração de ferro causa aumento no número de reações de radicais livres, produzindo outras espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células inflamatórias, bem como naquelas células presentes na parede das veias varicosas (ZAMBONI *et al.*, 2008).

A sobrecarga local de ferro pode gerar radicais livres ou ativar uma hiperatividade proteolítica de metaloproteinases (MMPs) e/ou diminuir os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), causando alteração estrutural das válvulas, com hipertrofias e hiperplasias, diminuição de colágeno, diminuição de células musculares e matriz extracelular (MEC), contribuindo com a dilatação venosa, relaxamento venoso e perda do tônus venoso (WLASCHEK *et al.*, 2019). Neste contexto, a maioria das ERO são liberadas por neutrófilos e macrófagos e, em concentração ainda não conhecida, liberados por fibroblastos residentes

e células endoteliais. As ERO são conhecidas por afetar seletivamente as vias de sinalização, resultando na ativação de fatores de transcrição que controlam a expressão de uma variedade de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 e interleucina-6, fator de necrose tumoral, interleucina-8 (SENET *et al.*, 2003), enzimas proteolíticas, incluindo membros das famílias metaloproteinases (RAVANTI; KÄHÄRI, 2000).

Estudo recente mostra que a presença de úlcera venosa pode ocorrer inclusive em pacientes com lesões menores, antes consideradas lesões estéticas – corona flebectásica (LURIE *et al.*, 2020). Isso justifica a necessidade de investigar a fisiopatologia e fatores envolvidos na insuficiência venosa crônica. Assim, esse estudo pretende mostrar o perfil oxidativo e antioxidante sistêmico de pacientes com insuficiência venosa crônica em estágios inicial e avançado da doença.

Materiais e Métodos

População e desenho experimental

O grupo experimental foi composto por 101 pacientes com doença venosa crônica, população amostral escolhida por conveniência, recrutados no Ambulatório de Cirurgia Vascular do Hospital Santa Alice, cidade de Santa Mariana- Paraná, no período de setembro de 2022 a abril de 2023 (CAAE nº 60739622200005231). Esses pacientes foram divididos em dois grupos (Grupo 1 e Grupo 2), de acordo com a sua classificação CEAP. Grupo 1: CEAP 1, CEAP2, CEAP3 e Grupo 2: CEAP4, CEAP5, CEAP6.

Os critérios de exclusão foram: gestantes, menores de 18 anos, pacientes acamados, pacientes com úlcera diabética, pacientes que tiveram ou têm câncer, insuficiência cardíaca congestiva e/ou insuficiência renal avançada. Após explicação do estudo e assinatura do termo de consentimento, foi coletada amostra de sangue. Os pacientes responderam a um questionário para obter informações como idade, hábitos (tempo de permanência em pé e prática de exercício físico) e presença de doenças crônicas.

Amostras de Sangue

O sangue periférico foi obtido por punção venosa de todos os participantes em um tubo de heparina para hemácias. Todo o material foi centrifugado a 1331 x G por 5 minutos a 4°C. O soro foi armazenado a -20°C. Os eritrócitos foram lavados três vezes com 1mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% seguido de centrifugação a 1331 x G por 5 minutos a 4°C e posteriormente armazenados em Alsever a 4°C por um período máximo de 4 dias.

Parâmetros de Estresse Oxidativo Sistêmico

A proteína total foi medida para expressar os resultados da atividade da glutatona reduzida (GSH), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e da lipoperoxidação de membrana induzida por Terc-Butil. As hemácias foram diluídas 1:800 em água destilada e misturadas com reagente cúprico (1:1), repousando em temperatura ambiente por 10 minutos. Logo após, foi adicionado o reagente Folin e incubado em banho maria durante 10 minutos à uma temperatura de 50°C. As concentrações das amostras foram determinadas (mg), utilizando albumina sérica bovina para a curva de concentração padrão e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 660 nm (Shimadzu UV-1650 PC) (Lowry, 1951 modificado por Miller, 1959).

A lipoperoxidação foi determinada por quimiluminescência de acordo com Gonzalez-Flecha et al (1991), com base na oxidação de fosfolipídios presentes na membrana eritrocitária induzida por Terc-Butil hidroperóxido, a reação é avaliada em tempo real por 40 minutos. Os eritrócitos foram diluídos 1:1200 em tampão fosfato monobásico 10 mM, pH 7,4 NaCl 0,9%. A reação foi iniciada com adição do Terc-Butil e a curva analisados no luminômetro (Berthols Technologies; Lumat 3; LB 9508) e os resultados foram expressos pico de emissão, velocidade e área sob a curva.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método desenvolvido por Marklund & Marklund (1974) em eritrócitos. A oxidação foi medida em espectrofotômetro 420nm a 37°C. Os resultados foram expressos em U SOD/g de proteína, considerando que uma unidade de SOD é capaz de inibir 50% da auto-oxidação do pirogolol.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1984), que se baseia na decomposição do peróxido de hidrogênio diretamente relacionado à sua absorção em 240 nm em espectrofotômetro UV-1650 PC UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japão). As hemácias foram diluídas 1:80 em água destilada e diferentes volumes foram incubados em um sistema incluindo 1 M de tampão TRIS e 200 mM de solução de H₂O₂. Os resultados foram expressos em valores de absorbância por minuto por mililitro de amostra (Vabs min⁻¹ ml⁻¹). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida pelo método descrito por Marklund & Marklund (1974) em eritrócitos, baseado na inibição da auto-oxidação do pirogalol. A reação foi medida em espectrofotômetro com leitura cinética a 420nm UV-1650 PC UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japão) a 37° graus Celsius, com tampão TRIS 1 M, pirogalol e água. Os resultados foram expressos em U SOD/gPT. A concentração de GSH foi determinado nos eritrócitos acordo com Tietze (1968) em espectrofotômetro a 412 nm.

Análise estatística

As variáveis contínuas foram descritas com média e seu respectivo desvio padrão (DP). As variáveis categóricas foram apresentadas em números absolutos e percentuais e comparadas usando o teste qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher realizado no SPSS versão 24.0 (SPSS; Chicago, IL, EUA). Para a análise de parâmetros de estresse, os dados foram analisados usando GraphPad Prism (versão 6; San Diego, CA, EUA).

Para verificar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student para dados paramétricos e para dados não paramétricos o teste de Mann-Whitney. Os dados paramétricos foram expressos como média ± desvio padrão e os dados não paramétricos foram expressos como mediana com o intervalo interquartil. Valores ≤0,05 foram considerados estatisticamente relevantes.

Resultados

A tabela 1 mostra as características demográficas dos grupos de estudo. Em ambos os grupos se observa um predomínio do sexo feminino: Grupo 1

(classificação CEAP 1, CEAP 2, CEAP 3) n= 65 [89,0%], Grupo 2 (classificação CEAP 4, CEAP 5, CEAP 6) n= 17 [60,7%], dados estatisticamente significativos (p= 0.001). Porém, quando se faz a divisão de sexo dentro de cada grupo, observa-se uma maior proporção de pacientes homens (39,3%) no grupo 2, quando comparado com apenas 11% no grupo 1. A idade também foi um dado estatisticamente significativo (p= 0.047), onde pacientes do grupo 1 apresentaram uma idade média de 50,77 anos ($\pm 11,33$) e pacientes do grupo 2 tiveram uma idade média de 59,04 anos ($\pm 9,73$).

No grupo 1, 50,7% dos pacientes responderam trabalhar em pé (mais que 6 horas por dia) e no grupo 2, 42,9% dos pacientes tiveram a mesma resposta não havendo diferença significativa entre os grupos (p= 0.481). Ambos os grupos não apresentaram diferença significativa quanto a prática de exercício físico (p=0.562) sendo que a maioria de ambos os grupos respondeu não realizar atividade física, Grupo 1= 61,6%; Grupo 2= 67,9%.

Tabela 1- Características demográficas de pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio inicial – GRUPO 1 (CEAP1, CEAP2, CEAP3) e pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio avançado – GRUPO 2 (CEAP4, CEAP5, CEAP6). (n=101).

Característica	GRUPO 1 (n=73)		GRUPO 2 (n=28)		p valor
	N	%	N	%	
IDADE Média \pm DP	50,7 \pm 11,3		59,4 \pm 9,7		0.047*
Sexo	N	%	N	%	
Homem (%)	8	11,0	11	39,3	0.001*
Mulher (%)	65	89,0	17	60,7	
Trabalho em pé					
Sim	37	50,7	12	42,9	0.481
Não	36	49,3	16	57,1	
Exercício Físico					
Sim	28	38,4	9	32,1	0.562
Não	45	61,6	19	67,9	

Dados categóricos foram apresentados como número e porcentagem, e dados contínuos como desvio padrão e média. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de p < 0,05*.

A tabela 2 apresenta dados clínico-patológico dos pacientes. Das comorbidades investigadas (trombose, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, cardiopatia, depressão, ansiedade) nenhuma apresentou diferença significativa dentro dos dois grupos. Com relação ao número de gestações, esta apresentou diferença significativa entre os dois grupos ($p= 0.001$), em concordância com a literatura que apresenta uma relação positiva entre um maior número de gestações com o aumento da gravidade na insuficiência venosa crônica.

A obesidade apresentou diferença significativa dentro dos dois grupos. A grande maioria dos pacientes respondeu não ser obeso – 69,9% dos pacientes no grupo 1 e 89,3% dos pacientes no grupo 2, tendo uma diferença significativa ($p= 0.043$).

Quanto aos hábitos tabagistas, não houve diferença entre os dois grupos ($p=0.865$), sendo que a grande maioria dos pacientes do grupo 1 (83,6%) e do grupo 2 (82,1%) responderam não terem o hábito de fumar.

Sintomas clínicos como dor na perna, edema (inchaço) e claudicação (dor ao caminhar) não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos, sendo a grande maioria dos pacientes sintomáticos. 86,3% dos pacientes do grupo 1 e 82,1% dos pacientes no grupo 2 responderam ter sintomas de dor na perna, 53,4% dos pacientes do grupo 1 e 71,4% dos pacientes do grupo 2 relataram episódios de edema nos membros inferiores e 50,7% dos pacientes do grupo 1 e 67,9% dos pacientes do grupo 2 responderam ter sintomas de claudicação.

Analizamos também a realização do tratamento cirúrgico de safenectomia entre os dois grupos, que mostrou ter diferença significativa ($p= 0,008$). A maioria dos pacientes dentro dos dois grupos respondeu não terem realizado tratamento cirúrgico de varizes, porém quando analisamos a proporção entre os grupos vemos que no grupo 2 existe uma proporção maior de pacientes (28,5%) que realizaram o procedimento cirúrgico contra apenas 8,2% no grupo 1.

Tabela 2- Características clínico-patológicas de pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio inicial – GRUPO 1 (CEAP1, CEAP2, CEAP3) e pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio avançado – GRUPO 2 (CEAP4, CEAP5, CEAP6. (n=101).

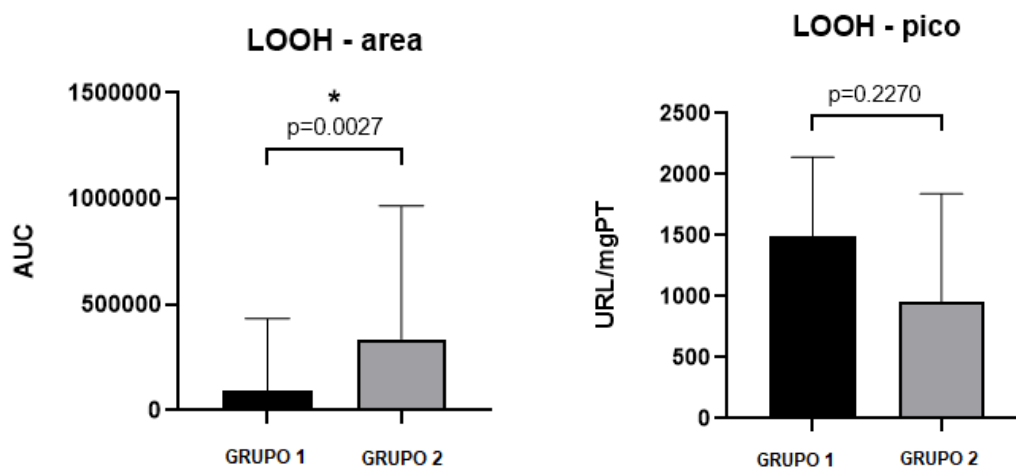
Característica	GRUPO 1 (n=73)		GRUPO 2 (n=28)		p valor
	N	%	N	%	
Cirurgia de Safenectomia					
Sim	6	8,2	8	28,6	0.008*
Não	67	91,8	20	71,4	
Dor na perna					
Sim	63	86,3	23	82,1	0.599
Não	10	13,7	5	17,9	
Edema					
Sim	39	53,4	20	71,4	0.100
Não	34	46,6	8	28,6	
Claudicação					
Sim	37	50,7	19	67,9	0.120
Não	36	49,3	9	32,1	
Trombose					
Sim	3	4,1	4	14,3	0.071
Não	70	95,9	24	85,7	
Hipertensão					
Sim	30	41,1	15	53,6	0.259
Não	43	58,9	13	46,4	
Diabetes Mellitus					
Sim	10	13,7	5	17,9	0.599
Não	63	86,3	23	82,1	
Cardiopata					
Sim	8	11,0	6	21,4	0.173
Não	65	89,0	22	78,6	
Depressão					
Sim	25	34,2	5	17,9	0.107
Não	48	65,8	23	82,1	
Ansiedade					
Sim	39	53,4	9	32,1	0.055
Não	34	46,6	19	67,9	

Tabela 2- Características clínico-patológicas de pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio inicial – GRUPO 1 (CEAP1, CEAP2, CEAP3) e pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio avançado – GRUPO 2 (CEAP4, CEAP5, CEAP6). (n=101).

Característica	GRUPO 1 (n=73)		GRUPO 2 (n=28)		p valor
	N	%	N	%	
Obesidade					
Sim	22	30,1	3	10,7	0.043*
Não	51	69,9	25	89,3	
Tabagismo					
Sim	12	16,4	5	17,9	0.865
Não	61	83,6	23	82,1	
Gestação					
1-3 gestações	51	69,9	9	32,1	0.002*
4 ou + gestações	8	11,0	6	21,4	
Nenhuma gestação	14	19,2	13	46,4	

Dados categóricos foram apresentados como número e porcentagem. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05^*$.

Quando comparados os parâmetros de estresse oxidativo entre os dois grupos, os pacientes do grupo 2 demonstraram um aumento significativo ($p= 0.002$) de hidroperóxidos de membrana em relação ao grupo 1 (figura 1).



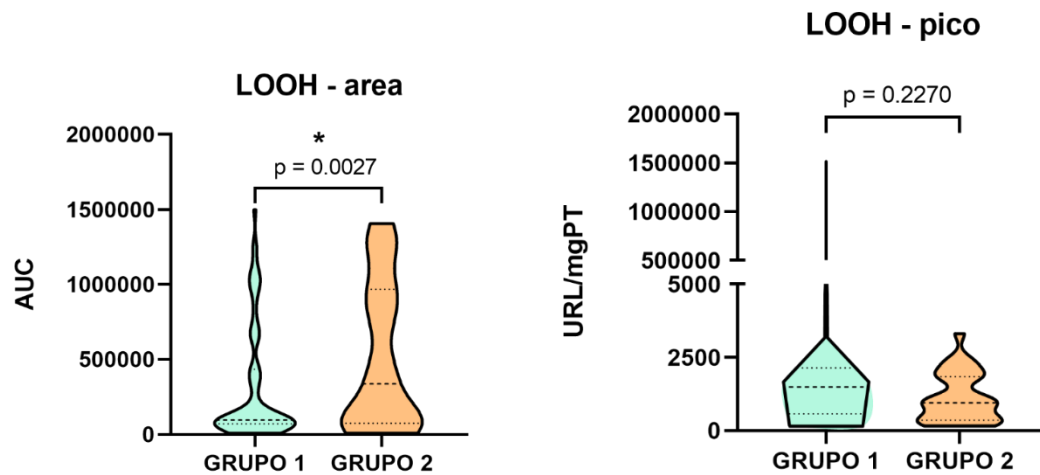
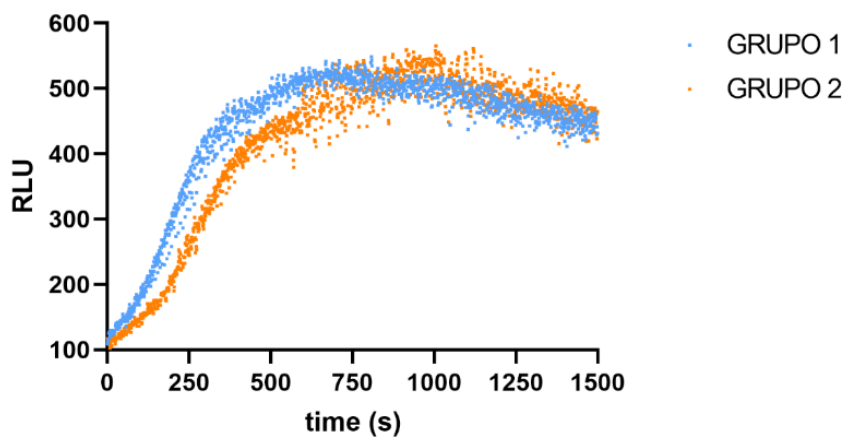


Figura 1- Parâmetros de estresse oxidativo sistêmico em eritrócitos. Comparação da área máxima e pico de emissão da peroxidação lipídica em pacientes do Grupo 1 e Grupo 2

* indica diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como mediana com intervalo interquartilico.

MÉDIA DA LEITURA BRUTA



	GRUPO 1	GRUPO 2	P-VALOR
AREA	95337 (70677 – 433778)	337174 (74767 – 967087)	0.0027 *
PICO	1488 (527 – 2140)	951 (360 – 1841)	0.2270
V. MAX	0.3654 (0.1640 – 0.7861)	0.3583 (0.1100 – 0.8591)	0.9041

Os valores da área, pico e velocidade máxima foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e estão representados como mediana e intervalo interquartilico. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 2- Gráfico evidencia a média da leitura bruta da lipoperoxidação de membrana de eritrócitos dos pacientes do Grupo 1 e do Grupo 2. Tabela mostra a comparação da área máxima, pico de emissão da peroxidação lipídica e velocidade máxima de peroxidação lipídica em pacientes do Grupo 1 e Grupo 2

Para a defesa antioxidante não enzimática não observamos diferença significativa nos níveis de glutatona reduzida (GSH) entre os grupos 1 e grupo 2 ($p= 0.1583$). (Figura 3)

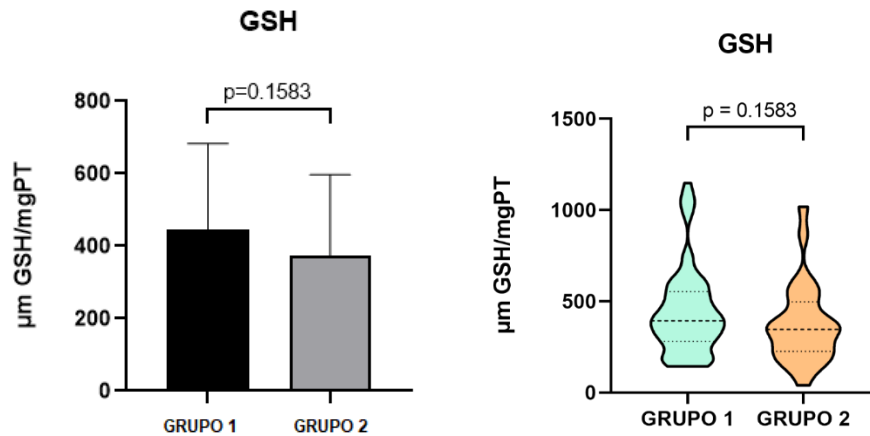


Figura 3- Comparação da glutatona reduzida (GSH) no Grupo 1 e no Grupo 2. Os dados foram expressos como mediana com intervalo interquartilico.

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD e Catalase) não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos. (Fig 4)

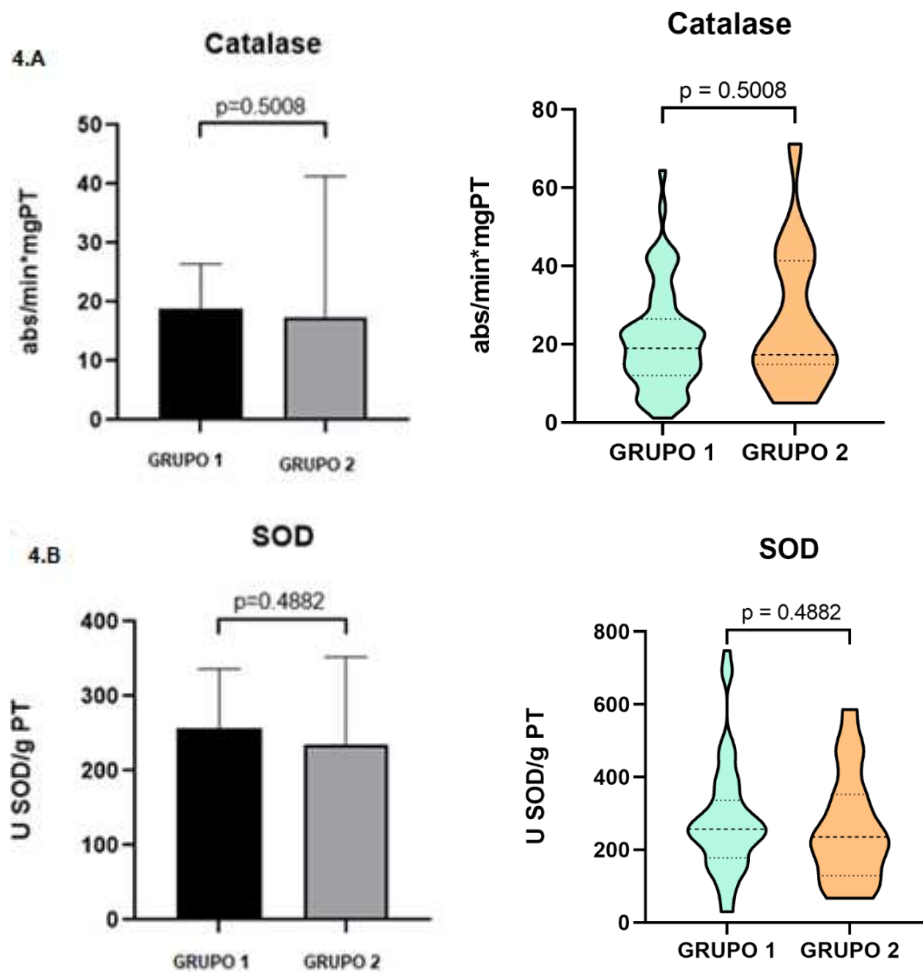


Figura 4- Parâmetros de estresse oxidativo sistêmico em eritrócitos. (4.A) Comparação da atividade da enzima catalase em pacientes do grupo 1 e do grupo 2. (4.B) Comparação da atividade da superóxido dismutase (SOD) em pacientes do grupo 1 e do grupo 2. ns: não significativo. Os dados foram expressos como mediana com intervalo interquartilico.

Através da análise de componentes principais (PCA), uma técnica da estatística multivariada que transforma um conjunto de variáveis originais em componentes principais independentes entre si, conseguimos reduzir a massa de dados, gerar índices e agrupar as classificações CEAP (1-6) com base em suas variações (figura 5). Na figura 6 podemos analisar a interferência de cada variável do estresse oxidativo para determinar a posição de cada grupo.

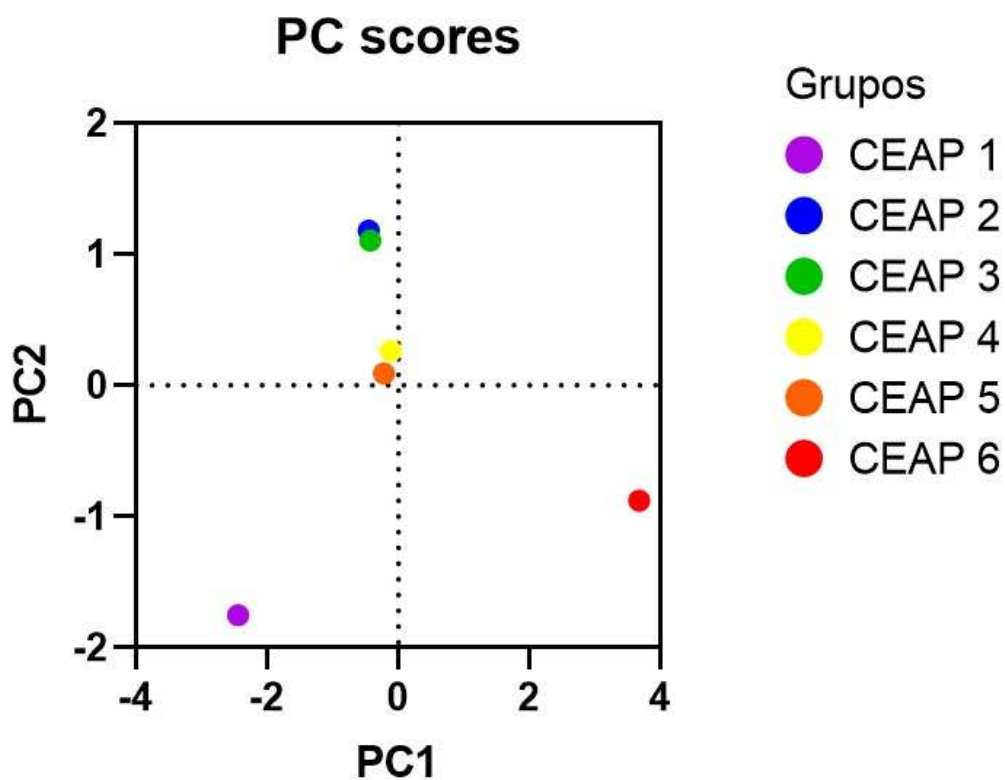


Figura 5- Análise do Principal Componente. Parâmetros de estresse oxidativo sistêmico em eritrócitos analisados em pacientes CEAP 1 - CEAP 6.

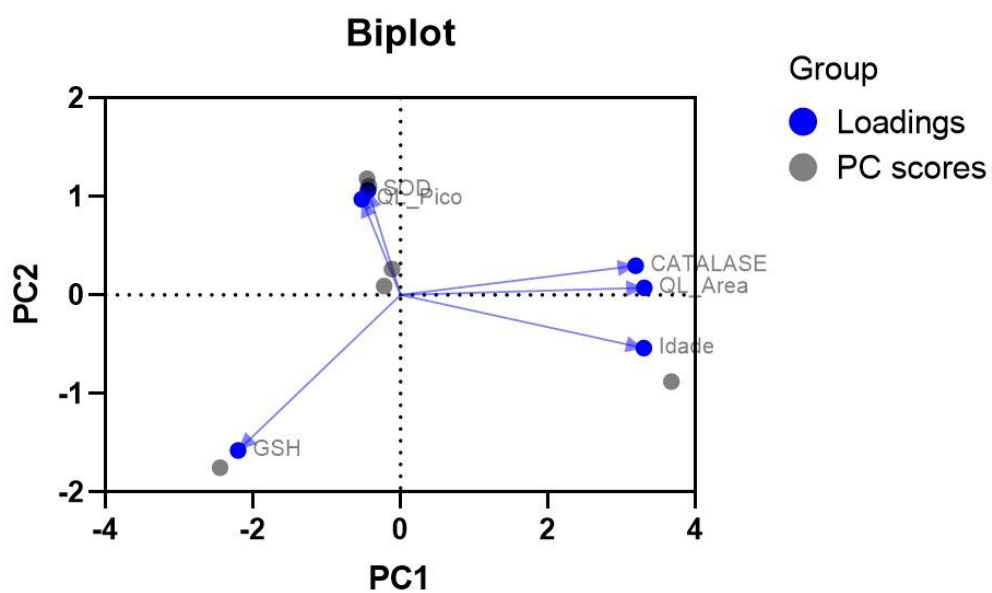


Figura 6- Análise do Principal Componente. Análise isolada dos parâmetros de estresse oxidativo sistêmico em eritrócitos em pacientes CEAP 1 - CEAP 6.

Discussão

A insuficiência venosa crônica é uma doença altamente prevalente, afetando todos os níveis sociais, trazendo para os pacientes perda da qualidade de vida, autoestima e perfil laboral. Essa situação piora quando a doença evolui para úlceras venosas nos membros inferiores. Apesar de ter uma baixa mortalidade, apresenta uma alta morbidade, sem tratamento farmacológico eficaz necessitando na grande maioria dos casos de tratamento cirúrgico. Assim, a compreensão dos mecanismos que ocasionam a progressão desfavorável da IVC pode auxiliar na escolha terapêutica dos pacientes que se encontram nos estágios iniciais da doença.

O presente estudo está em concordância com os achados da literatura científica (RABE *et al*, 2012; CRIQUI, 2003; JUKKALA TM; HAKAMA M, 2006) quanto a predominância do sexo feminino na IVC. A predominância do sexo feminino ocorre provavelmente devido a ação da progesterona, que acaba reduzindo o tônus da musculatura lisa, permitindo uma maior distensão venosa e comprometendo a ação das válvulas venosas (VIN; ALLAERT; LEVARDON, 1992).

Pacientes com a doença mais avançada (Grupo 2) representam 27,7% da população do nosso estudo, estando em concordância com a literatura nacional, que mostra 15-20% da população brasileira com insuficiência venosa crônica grave (BENTES *et al.*, 2022). Em nosso estudo 60% dos participantes se apresentava na 5ª e 6ª década de vida, idade em que os pacientes geralmente apresentam as maiores queixas e desenvolvimento de úlceras venosas. O tabagismo não foi um dado significativo, tendo uma prevalência em menos de 5% do total de pacientes analisados. Como já sabemos, o tabagismo não contribui para uma piora no desfecho da doença venosa, diferente da doença arterial periférica, em que o tabagismo exerce grande participação em sua etiologia.

Apesar de o dado “Trabalhar em pé” (mais do que 6 horas em pé) não ter apresentado uma diferença significativa ($p=0.481$), a permanência por longos períodos em pé contribui para um pior desfecho da doença venosa, com piora

dos sintomas e aumento da hipertensão venosa (BERENGUER F DE; DE AL, 2011)

A obesidade e a gestação apresentaram diferença significativa dentro dos dois grupos. Como os pacientes se auto classificavam como obesos ou não obesos, esse pode ter sido o motivo da baixa prevalência de pacientes obesos em ambos os grupos. Com relação a gestação foi questionado sobre o número de gestações, dentro do grupo 1 14,5% dos pacientes responderam terem tido 4 ou mais gestações, e 26,8% dos pacientes do grupo 2 responderam terem tido 4 ou mais gestações, corroborando com a literatura (RABE E *et al.*, 2012; RABE E *et al.*, 2006; CRIQUI, 2003) que apresenta um maior número de gestações como um fator de risco para aumento da gravidade da insuficiência venosa crônica. Das comorbidades investigadas (trombose, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, cardiopatia, depressão, ansiedade) nenhuma apresentou diferença significativa dentro dos dois grupos. Dessa forma podemos inferir que os grupos são homogêneos e tais doenças não interferem nos resultados da análise de perfil de estresse oxidativo estudado.

O estresse oxidativo local tem sido associado à patogênese da úlcera venosa e a sua não cicatrização, contribuindo com a evolução da doença venosa (JAMES, 2003). O estresse oxidativo e a inflamação são dois poderosos iniciadores e promotores da insuficiência venosa crônica que podem atuar sinergicamente. Há evidências de elevação de ERO na IVC produzidos por células inflamatórias infiltradas ou circulante (CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2013). A relação do estresse oxidativo com insuficiência venosa crônica pode ser vista em um estudo com modelo animal (BERGAN; PASCARELLA; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2008). Outro artigo compara os níveis de estresse oxidativo de pacientes controles com pacientes que apresentam insuficiência venosa crônica em estágio inicial (CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2013). A análise do estresse oxidativo em pacientes com insuficiência venosa crônica avançada, que apresentam úlcera venosa, é relatado no estudo de James (2003) onde foi estudado o envolvimento do estresse oxidativo na cicatrização da ferida. Dessa forma nenhum artigo apresenta uma análise do estresse oxidativo que permita avaliar a doença venosa em uma mesma população no seu estágio inicial e no seu estágio avançado.

GSH é o antioxidante não enzimático mais importante, atuando como um eliminador de espécies reativas de oxigênio (BAKADIA et al., 2021). No nosso estudo os grupos não apresentaram diferença significativa entre os níveis de GSH. Na análise de controles (Lopes et al., 2022) observamos níveis de GSH de 700 ($\mu\text{mol GSH/mL}$), o que nos permite concluir que os níveis de GSH estão diminuídos nos nossos grupos de pacientes (Grupo 1: 393,4 $\mu\text{mol GSH/mL}$; Grupo 2: 345,8 $\mu\text{mol GSH/mL}$). Há um conhecimento limitado sobre a atividade das enzimas antioxidantes em feridas crônicas. A atividade da glutathione peroxidase no sangue de pacientes com ulceração venosa diminuiu cerca de 15% (SA; MW; BHOWMICK A, 2001). Em modelo de feridas cutâneas em ratos com cicatrização normal, dentro do processo de cicatrização de feridas, houve uma diminuição na redução de glutathione, ácido ascórbico e vitamina E (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997). Em um estudo com humanos, CONDEZO-HOYOS et al., 2013 comparou controles com pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio inicial (CEAP 2) não apresentando diferença significativa nos níveis de GSH e ácido úrico no plasma. Outro estudo (HORECKA et al., 2018) comparou marcadores de estresse oxidativo em plasma de veias de membro superior e em plasma oriundo de veias varicosas do mesmo paciente com insuficiência venosa crônica. Nesse estudo não houve diferença significativa entre os níveis de GSH no plasma periférico e na veia varicosa do mesmo paciente. Em estudos com modelos animais, onde foram induzidas feridas em camundongos, foi observado um aumento importante nos níveis de GSH entre o 3º e o 5º dia da lesão, e em 14 dias a expressão do GSH quase diminuiu ao nível basal (STEILING et al, 1999).

Em nosso estudo, podemos interpretar a influência de cada variável dentro de cada classificação CEAP, através da análise PCA. A figura 6 nos permite avaliar que o que diferencia os pacientes CEAP 1 dos demais pacientes é a quantidade de GSH, estando presente em maiores concentrações nos pacientes com insuficiência venosa crônica em estágio inicial. Além disso, na figura 6 podemos avaliar que a quantidade de GSH está quase que inversamente proporcional ao lipoperoxidação de membrana (QI -área).

A catalase e a superóxido dismutase são defesas antioxidantes muito importantes que participam da desintoxicação de espécies reativas de oxigênio

(MOLONEY & COTTER, 2018). A catalase é responsável por converter H₂O₂ em H₂O e O₂ (KIRKMAN, GAETANI, 2007), enquanto a SOD é responsável por converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Um achado notável no estudo de STEILING (1999) foi a co-expressão de Cu/Zn-SOD (SOD1) + Mn-SOD (SOD2) e da catalase em modelos animais com doença venosa crônica e feridas. Esse resultado pode ser de importância biológica, uma vez que o peróxido de hidrogênio, na presença de metais de transição, pode dar origem ao radical hidroxila altamente reativo. Assim, a co-expressão de uma peroxidase com uma superóxido dismutase pode ser um mecanismo importante para evitar os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio.

Em nosso estudo, não observamos diferença significativa da catalase e da SOD entre os dois grupos avaliados. Porém, quando fazemos a análise PCA (figura 6) observamos que a atividade da catalase está aumentada nos pacientes CEAP 6 (estágio mais avançado), o que nos leva a pensar novamente sobre a importância do peróxido de hidrogênio, que pode estar elevado aumentando consequentemente a reação de Fenton, com maior produção de radical hidroxil e maiores lesões nas membranas das hemácias. Apesar de os relatos conflitantes, durante os estágios iniciais da insuficiência venosa crônica, marcadores como a catalase demonstrou estar diminuída (LOPES *et al.*, 2022; CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2013. Quando analisamos estudos que comparam controles com pacientes em estágio inicial (CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2013; HORECKA *et al.*, 2018) observou-se uma diminuição da atividade da catalase nos pacientes com IVC.

A atividade da SOD encontra-se aumentada no plasma das varizes quando comparado com o plasma periférico em pacientes com insuficiência venosa crônica (HORECKA *et al.*, 2018). Em modelos animais, onde as feridas foram induzidas em camundongos, observaram um aumento significativo na expressão da Cu/Zn-SOD (SOD1) e da Mn-SOD (SOD2), sendo que os níveis mais altos foram observados durante a fase inicial do reparo da ferida, quando ocorre a explosão oxidativa. Em nosso estudo os níveis de SOD estavam elevados em ambos os grupos.

As ERO podem levar a oxidação de proteínas e lipídios dentro da estrutura dos eritrócitos (GWOZDZINSKI *et al.*, 2021). Em nosso trabalho, o estresse oxidativo sistêmico também é revelado por níveis aumentados de peroxidação lipídica em pacientes do grupo 2, apesar de o grupo 1 apresentar um maior pico quando analisamos a lipoperoxidação de membrana. A presença de hidroperóxidos de membrana evidencia uma lesão pré-hemolítica na membrana dos eritrócitos, ou seja, já existe uma lesão por estresse oxidativo nessas células, sendo o próximo estágio a lesão total dessa membrana com posterior lise. Esses resultados demonstram que a produção de espécies reativas é capaz de promover danos oxidativos sistêmicos.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que o estresse oxidativo está presente nos dois grupos de pacientes com IVC, com uma maior prevalência nos pacientes mais graves, o que pode ser evidenciado por uma maior concentração de hidroperóxidos de membrana nos pacientes do Grupo 2. Assim como há uma maior concentração de antioxidantes, como a SOD, nos dois grupos e uma redução nos níveis de catalase e glutathione também em ambos os grupos.

8. ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes

“Estresse oxidativo em pacientes com e sem úlcera venosa.”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“Estresse oxidativo em pacientes com e sem úlcera venosa”**, a ser realizada nos hospitais, ambulatórios e consultórios relacionados: ambulatórios do Hospital Santa Alice em Santa Mariana, aos cuidados da médica Alanna Huk; ambulatório do Cismepar aos cuidados do médico Ricardo Bernardo em Londrina; no consultório da médica Alanna Huk e na clínica vascular (Clínica Vasculon) em Londrina.

Vamos comparar os perfis oxidativo dos participantes com úlcera com os participantes sem a úlcera nas pernas, e avaliar o quanto o estresse oxidativo está relacionado com a cicatrização da úlcera e com o seu aparecimento. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: após ser convidado a participar do trabalho, você assinará este termo de consentimento livre e esclarecido, estando você livre para perguntar caso tenha dúvidas.

Após responder a um questionário breve (no máximo 2 minutos) sobre aspectos sociodemográficos (escolaridade, cidade/região onde mora) e de hábitos de vida (se pratica exercício físico, se fica muito tempo em pé ou sentado, alimentares, se fuma ou fumou, se bebe bebidas alcoólicas e com qual frequência), você passará pela consulta médica o qual será submetido, tendo aceitado ou não participar do projeto. Durante a consulta será feita anamnese e exame físico. Essas informações serão coletadas para o presente projeto. Após a consulta médica você doará uma amostra de sangue (será coletado de uma veia em seu antebraço/braço), aproximadamente 5 ml, para que a equipe do projeto possa fazer a análise do estresse oxidativo. Lembrando que para a

realização do seu posterior procedimento cirúrgico você deverá fazer uma nova coleta de sangue.

Também seu histórico médico constante no prontuário será analisado. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa e tratamento. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas para os fins desta pesquisa e para pesquisas futuras e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Após as análises, as amostras serão armazenadas no Laboratório Patologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina para realização de futuras pesquisas (mas o senhor será consultado novamente sobre sua participação nestes estudos futuros).

Esclarecemos ainda, que você não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são indiretos, pois esperamos que este estudo possa fornecer ferramentas necessárias para entendermos a presença de úlceras venosas em membros inferiores em relação ao estresse oxidativo, assunto ainda pouco compreendido.

Quanto aos riscos, estes são mínimos, e são decorrentes da coleta de sangue que pode trazer algum desconforto, contudo será realizada por profissional altamente capacitado. Contudo ressaltamos que caso sinta algum desconforto, o senhor(a) será prontamente atendido pelos membros da equipe do projeto.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar Profa. Dra. Alessandra L. Cecchini Armani (3371-4529), Dra. Alana Huk (43 31588558), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue à você.

Londrina, ____ de _____ de 202_.

Pesquisador Responsável

RG: _____

_____ (**NOME POR EXTENSO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA**), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.

ANEXO 2 - Termo de Autorização de uso de imagem - Pacientes**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM**

Eu, _____,
portador da Cédula de

Identidade nº _____, inscrito no CPF sob nº
_____, residente à

Rua _____, nº _____, na cidade de
_____.

AUTORIZO o uso da imagem da minha lesão em fotos ou filme, sem finalidade comercial, para ser utilizada no trabalho(s) **“Estresse oxidativo em pacientes com e sem úlcera venosa”**

A presente autorização é concedida a título gratuito, abrangendo o uso da imagem acima mencionada em todo território nacional e no exterior, em todas as suas modalidades e, em destaque, das seguintes formas: (I) home page; (II) cartazes; (III) Artigos gerais; (IV) Revistas e Jornais Científicos. Por esta ser a expressão da minha vontade declaro que autorizo o uso acima descrito sem que nada haja a ser reclamado a título de direitos conexos à minha imagem ou a qualquer outro.

Londrina, ____ de _____ de 20__.

Assinatura

ANEXO 3 – Questionário Pacientes

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

DATA:

Idade:	Sexo:
Profissão:	Escolaridade:
Cidade:	
Pratica exercício	Qual exercício:
Fica muito em pé:	Fica muito tempo sentado:

➤ Questionário

Perguntas sobre sua saúde

Você tem algum desses problemas vasculares? (pode marcar mais do que um, se for o caso)

- Dor nas pernas
 Varizes
 Vasinhas/microvarizes
 Inchaço
 Trombose
 Úlcera/ferida
 Dor para caminhar
 Estenose de a. carótida
 Aneurisma
 Outros

Você tem ou já teve alguma dessas doenças? (pode marcar mais do que um, se for o caso)

- Hipertensão
 Diabetes
 Problemas de coração
 Infarto do miocárdio
 Trombose
 Obesidade
 Depressão
 Câncer
 Ansiedade
 AVC (derrame)
 Hipotireoidismo

Você usa algum medicamento de uso contínuo? (Ex. para controlar pressão, diabetes, colesterol, varizes etc). Se sim,

Qual (is)? _____

Você já fez alguma cirurgia? Sim Não Se sim, qual?

Você já foi internado em hospital? Sim Não Se sim, qual motivo?

Você tem alguma alergia? SIM NAO Se sim, a qual agente ou medicamento?

Você fuma? SIM NAO Se sim, quantos cigarros por dia? _____

Se você fumava: há quanto tempo parou? _____ anos. Por quanto tempo fumou? _____ anos

Algum parente tem (teve) varizes/ vasinhos? SIM NAO Quem? _____

Algum parente tem (teve) trombose? SIM NAO Quem? _____

Algum parente tem (teve) úlcera nas pernas? SIM NAO Quem? _____

Algum parente tem (teve) diabetes? SIM NAO Quem? _____

Se você for MULHER, responda as questões abaixo:

Você teve quantas gestações? _____ Teve algum aborto natural? _____

Você toma anticoncepcional? SIM NAO Qual? _____

Você já está na menopausa? SIM NAO

Se sim, toma terapia de reposição hormonal? SIM NAO Qual? _____

Hábitos Alimentares

Marque qual a frequência que consome os alimentos: 0, 1, 2, 3 ou 4 vezes, por dia (D) OU Por Semana (S) ou Por mês (M)

Tipo de alimento	D	S	M
Arroz branco, batata inglesa, macarrão			
Arroz ou macarrão integral, quinoa em grãos			
Feijões, lentilhas, grão de bico			
Peixes: salmão, atum, truta			
Carne vermelha			
Aves			
Ovos			
Batata doce, Aipim, Abóbora; inhame			
Couve, espinafre, rúcula, alface			
Couve flor, brócolis, abobrinha,			
Sopas e saladas			
Castanhas e sementes			
Frutas (secas ou frescas)			
Semente de Linhaça; chia, farelo de aveia,			
Leite, iogurte, Queijo,			
Pão de forma ou francês ou cereal matinal			
Pão artesanal e produtos com farinha integral			

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

DATA:

Embutidos (blanquet, presunto)			
biscoito crackers, barra de cereal,			
Cookies, bolo; balas, biscoito recheado			
Sobremesa Exemplo:			
Refrigerantes, sucos de caixinha, gatorade			
Alimentos prontos congelados-pizza, lasanha			
Alimentos orgânicos: <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> 25% <input type="checkbox"/> 50% <input type="checkbox"/> 75% <input type="checkbox"/> 100%			

Bebida alcoólica: Sim Não Qual tipo?
Quantas vezes por semana? Quantidade?

Declaro que as informações que prestei acima são verdadeiras e que tive oportunidade de esclarecer as dúvidas que apareceram durante o preenchimento dessa ficha

Nome completo

Assinatura

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

DATA:



Centro de Ética em
Psiquiatria, Evoluindo
Sempre Humano

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estresse oxidativo em pacientes com e sem úlcera venosa

Pesquisador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60739622.2.0000.5231

Instituição Proponente: CCB - Departamento de Ciências Patológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.583.949

Apresentação do Projeto:

*A insuficiência venosa crônica (IVC) é definida como o conjunto de manifestações clínicas causadas pela anormalidade do sistema venoso periférico, geralmente ocorrendo nos membros inferiores. É uma doença crônica muito comum que pode provocar mudanças na qualidade de vida dos pacientes devido as suas complicações, como as mudanças na pele e presença de ulcerações¹. Estudos internacionais e nacionais apontam que até 80% da população podem apresentar graus mais leves, e a evolução para os estágios mais severos está entre 1 e 5 % (internacionalmente) e 15-20% (nacionalmente)². A morbidade dessa doença causa impactos sociais e financeiros, visto que a recorrência das ulcerações é alta quando não tratada corretamente. O tratamento é longo e requer muitos especialistas, tendo um custo alto para as autoridades e para o paciente. Levando em consideração todos os aspectos do cuidado com pacientes com ulcerações incluindo visitas de médicos, cuidados de enfermagem, cuidados com feridas e ataduras aplicadas juntamente com compressão; tratamentos cirúrgicos e endovenosos; e internação por complicações relacionados à dor e infecções, o custo se torna exponencialmente elevado. Além disso, o impacto psicossocial devido ao constrangimento, emoções negativas, ansiedade, depressão, perda da autoestima, dependência, estão presentes. O nível de gravidade da IVC é organizado baseando-se em uma classificação – Classificação CEAP em anexo 1 – na qual são avaliados dados como a clínica que o paciente apresenta, etiologia da doença, local anatômico em que ocorre a doença e a sua fisiopatologia³. Acreditávamos que algumas características pudessem determinar uma maior

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

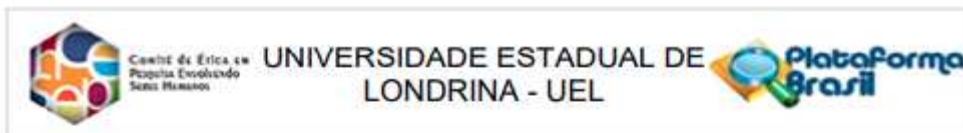
UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

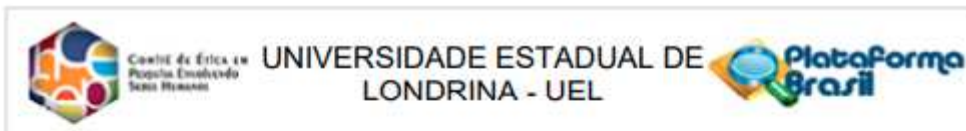
E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.583.949

gravidade, como o diâmetro das varizes, pigmentação da pele, lipodermatoesclerose, atrofia branca e inflamação local, como eczema, eritema, celulite. Porém, alguns estudos mostram que mesmo aqueles pacientes com pequenas alterações como telangiectasias menores podem evoluir para ulcerações. Dessa forma, entendemos que o processo inflamatório está associado com a IVC e com a evolução dela, necessitando redirecionar novas pesquisas para se concentrar na investigação dos marcadores sanguíneos circulantes nas IVC inicial e grave. A úlcera venosa é o resultado de uma série intrincada de eventos patológicos envolvendo hemodinâmica, alterações celulares e biomoleculares de macro e microcirculação, que são eventualmente transmitidos para a pele. Neste quadro complexo, o achado comum é a presença de hipertensão venosa. Vários fatores predisponentes (por exemplo, idade avançada, sexo feminino, predisposição genética, histórico familiar, gravidez, níveis de estrogênio, obesidade, posição prolongada – muito tempo em pé ou sentado - e fatores ambientais/ocupacionais têm sido destacados para promover a hipertensão venosa. Do ponto de vista etiológico, a IVC pode ser resultado congênito primário, ou distúrbios secundários. Predisposições genéticas, doenças como Klippel-Trenaunay, Park-Weber e síndromes de Ehlers-Danlos e mutações genéticas CADASIL e FOXC2, apesar de estarem presentes ao nascer, manifesta-se com significância clínica mais tardiamente. Outros pacientes sem distúrbios congênitos podem ser afetados pela IVC primária, e danos na parede das veias e válvulas podem aparecer antes do desenvolvimento clinicamente de hipertensão venosa reconhecida. Por outro lado, a presença de outras condições adquiridas (por exemplo, obstrução Venosa – trombose venosa) poderia predispor ao desenvolvimento de uma insuficiência venosa secundária. Na fisiopatologia, o acúmulo de sangue venoso devido à disfunção da válvula juntamente com o aumento da pressão venosa nas paredes da veia leva a uma alteração do estresse fisiológico, que normalmente mantém a fluidez sanguínea e inibem a ligação com as células sanguíneas. Essas forças de estresse mecânico alteram a integridade do endotélio, tanto interrompendo a camada protetora do glicocalix e promovendo ativação de células endoteliais. A ativação celular endotelial ocorre através da expressão de moléculas de adesão (por exemplo, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas) e pela liberação de moléculas quimioatrativas que favorecem o recrutamento, apego e migração de células brancas dentro da parede venosa e tecido intersticial. Como consequência, as moléculas de adesão proliferam e perdem sua capacidade de sintetizar fibras de colágeno, resultando assim no aparecimento de áreas hipertróficas, com contrariedade reduzida, aumento da rigidez e elasticidade prejudicada, que pioram completamente a capacidade da parede venosa de responder a pressões venosas aumentadas e preservar a fisiologia, fazendo com que ocorram as alterações de pele e úlceras. A avaliação das varizes progrediu muito nas últimas 2 décadas com

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.583.949

a ampla disponibilidade de ultrassonografia doppler. O tratamento das varizes também sofreu grandes mudanças com a introdução de técnicas de ablação endovenosa percutânea, incluindo laserterapia endovenosa (EVLA) e ablação por radiofrequência (RFA) e escleroterapia líquida ou com espuma. Tratamento cirúrgico aberto com flebectomia (retirada) das safenas realizado sob anestesia com bloqueio (raquianestesia) tem sido largamente substituído por procedimentos percutâneos baseados em tratamentos ambulatoriais que podem ser realizados sob anestesia local ou tumescente com resultados similares, mas com menos desconforto para o paciente, melhorando a qualidade de vida da paciente no pós-operatório e retorno precoce ao trabalho. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as úlceras representam 9% de toda mortalidade global, com muito mais números de internações associadas a emergência em comparação com outras causas de mortalidade. A cicatrização da ferida prossegue através de quatro fases: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. Embora os eventos complexos de cicatrização de feridas tenham sido histologicamente bem caracterizados, uma compreensão abrangente de eventos bioquímicos e celulares que controlam a cicatrização normal e patológica da ferida ainda está em estudo. A interrupção da homeostase é uma característica comum de várias condições patológicas¹. A espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente) são produzidas por praticamente todas as células e tecidos. Fontes de ROS e RNS incluem a cadeia respiratória mitocondrial, processos de autoxidação, NADPH oxidase, e síntese de óxido nítrico (NOS). Os papéis fisiológicos da ROS e RNS incluem, mas não se limitam à defesa do hospedeiro. Ocorre também durante o exercício, vasodilatação, regulação da transcrição e crescimento celular, apenas para citar alguns. A sinalização dos papéis de ROS e RNS requerem proteínas de sensor oxidativo, como ativador proteína 1 (AP-1, um heterodímero de c-Jun e c-Fos), fator de choque térmico 1 (HSF1) ou Keap-1. Além disso, uma extensa defesa antioxidante composta por pequenos antioxidantes moleculares e enzimáticos (por exemplo, glutatona, dismutase de superóxido, catalase e glutatona-peroxidase) opera para prevenir danos teciduais causados por ROS/RNS. O estímulo local da resposta inflamatória na Insuficiência Venosa Crônica é mediado pelas moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), citocinas como interleucina (IL-6 e 8) e fator de necrose tumoral (TNF). A geração de ROS e proteases por neutrófilos facilita a digestão do material fagocitado e, portanto, faz parte do reparo normal das feridas. No entanto, acredita-se que em feridas crônicas a atividade dos neutrófilos aumenta e há uma produção excessiva de proteases e ROS. Esses processos foram propostos como contribuidores para a cicatrização prejudicada de feridas crônicas. O papel de espécies oxidativas produzidas por outros tipos de células particularmente macrófagos, durante o período de cicatrização necessita de mais

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

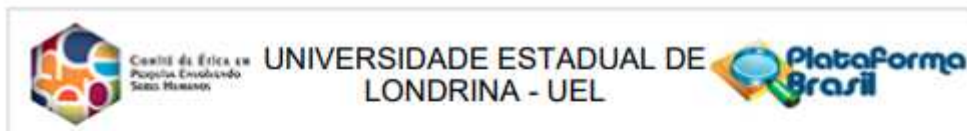
UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.583.949

investigação, assim como a real relação entre o estresse oxidativo e a IVC que atualmente não é adequadamente relatada na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS: Após aprovação do comitê de ética em pesquisa científica, serão avaliados um total de 300 pacientes participantes em um período de 4 anos (amostra por conveniência), que serão divididos em 2 grupos para avaliação: IVC sem apresentar úlcera e sem apresentar alteração de pele e IVC apresentando úlcera de diferentes graus nos membros inferiores. Dados de prontuário serão utilizados para a caracterização clínico-demográfica e será aplicado um questionário para caracterização dos hábitos e estilo de vida dos participantes. Serão feitas coletas de sangue para avaliação do estresse oxidativo através de quantificação de lipoperóxidos por HPLC e por quimiluminescência, peroxidação de proteínas pela medida de proteína carbonílica e níveis de tiol total por espectrofotometria e determinação de capacidade antioxidante total.

Hipótese: O aumento do estresse oxidativo participa ativamente da evolução da insuficiência venosa crônica.

Crítérios de exclusão: Gestantes, menores de 18 anos, pacientes acamados, pacientes com úlcera diabética, pacientes que tiveram ou têm câncer, trombose, insuficiência cardíaca congestiva e/ou insuficiência renal avançada.

Crítérios de inclusão: serão convidados a participar do estudo pacientes acima de 18 anos e que apresentam IVC com ou sem indicação cirúrgica.*

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar o estresse oxidativo sistêmico de pacientes com IVC (insuficiência venosa crônica) que apresentam ou não úlcera venosa.

Objetivo Secundário:

1. Comparar os marcadores de estresse oxidativo de pacientes com e sem úlcera venosa em membros inferiores;
2. Relacionar o estresse oxidativo com a capacidade de reparo/cicatrização da úlcera.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

*Riscos: são mínimos, e são decorrentes da coleta de sangue que pode trazer algum desconforto (hematoma ou dor). Todos os pacientes serão orientados a colocar uma compressa fria caso algum desses desconfortos ocorram. Além disso, a coleta será realizada por profissional altamente capacitado (enfermeiro ou técnico hospitalar qualificado), e dentro do ambiente hospitalar ou da clínica médica. No momento da coleta, a Dra. Alanna Huk estará presente e poderá assistir ao participante caso alguma intercorrência ocorra.

Endereço: LABESC - Sala 14

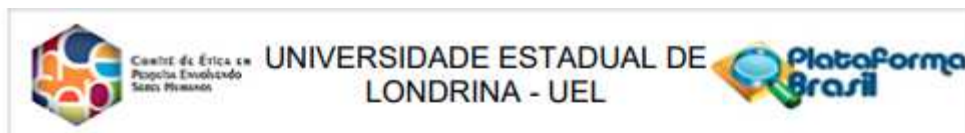
Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.583.949

Benefícios: com esse projeto poderemos compreender melhor o papel do estresse oxidativo na cicatrização das úlceras venosas, assim como a sua participação no desenvolvimento ou não desta complicação, podendo ser base para a tomada de decisão no tratamento complementar da IVC."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de Rosto

. Todos os campos preenchidos e devidamente assinada pelo Chefe de Departamento de Ciências Patológicas.

2. Orçamento

. Informa em orçamento detalhado o valor de R\$ 455,40 e acrescenta que "os laboratórios de Patologia Molecular e Fisiopatologia e Radicais Livres, da UEL contam com os materiais de consumo necessários para a realização da maior parte do projeto. Esses materiais foram adquiridos através de editais aprovados anteriormente que possibilitaram inserir as análises previstas nesse projeto como rotina no laboratório."

3. Cronograma

. Informa início do estudo em 01/09/2022

4. Riscos e Benefícios

. Foram adequadamente descritos nas informações básicas e no TCLE incluindo as providências que serão tomadas para minimizar os riscos, descritos como mínimos.

5. Anuência das instituições coparticipantes

. Anexadas as autorizações devidamente assinadas das seguintes instituições: Hospital Santa Alice, Cismepar, Consultório Dra. Alanna Huk e Clínica Vasculon.

6. TCLE

. Apresenta todas as exigências normativas.

7. Termo de Confidencialidade e Sigilo

. Informa uso de fonte secundária de dados (prontuário médico) e apresentou termo sob assinatura da pesquisadora principal.

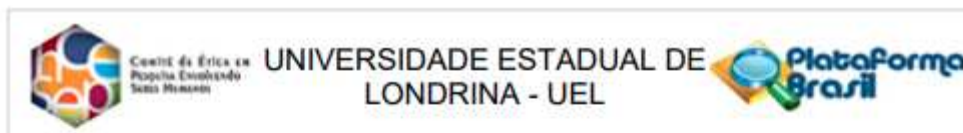
8. Questionário e escalas

. Foram apresentados como anexos na Brochura do Investigador.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos nos documentos do estudo.

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.583.949

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresentá-lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1983799.pdf	14/07/2022 16:50:16		Aceito
Outros	Termo_Sigilo_confidencialidade.pdf	14/07/2022 16:49:34	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	14/07/2022 16:43:49	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 5.583.949

Outros	VASCULON.jpeg	14/07/2022 16:20:49	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Outros	Carta_Allana.jpeg	14/07/2022 16:20:16	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Outros	Co_participante_CIS.pdf	14/07/2022 16:19:57	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Outros	CISMEPAR.pdf	14/07/2022 16:18:46	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/07/2022 16:18:00	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	14/07/2022 16:17:43	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 15 de Agosto de 2022

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares Russo
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

7.REFERÊNCIAS

AA, R.; BOISSEAU MR, A. C. Venoactive drugs in the management of chronic venous disease. An international consensus statement: current medical position, prospective views and final resolution. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 33, p. 309-e319, 2005.

ABBADE, L. P. F.; LASTÓRIA, S. Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 81, n. 6, p. 509–522, 2006.

AEBI H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. 1984;105:121-6.

AGUS, G. B.; ARPAIA, A. C. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic venous insufficiency. Italian College of Phlebology. **Int Angiol**, v. 20, n. 2, p. 1–73, 2001.

AGREN, M S et al. “Selenium, zinc, iron and copper levels in serum of patients with arterial and venous leg ulcers.” **Acta dermato-venereologica** vol. 66,3 (1986): 237-40.

AJ, L. et al. Progression of varicose veins and chronic venous insufficiency in the general population in the Edinburgh Vein Study. **J Vasc Surg Venous Lymphat Disord**, v. 3, p. 18–26, 2015.

ALLAERT, F. et al. Comparison of venous reflux assessed by duplex scanning and descending phlebography in chronic venous disease. **Meta-analysis of the impact of the principal venoactive drugs agents on malleolar venous edema**, v. 31, p. 400-e403, 1993.

BAKADIA, B. M. et al. The impact of oxidative stress damage induced by the environmental stressors on COVID-19. **Life sciences**, v. 264, n. 118653, p. 118653, 2021.

BAKER, S. R. et al. Comparison of venous reflux assessed by duplex scanning and descending phlebography in chronic venous disease. **Lancet**, v. 341, n. 8842, p. 400–403, 1993.

BALDT, M. M. et al. Preoperative imaging of lower extremity varicose veins: color coded duplex sonography or venography. **Journal of ultrasound**

in medicine: official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine, v. 15, n. 2, p. 143–154, 1996.

BENTES, L. G. DE B. et al. Perfil epidemiológico do tratamento cirúrgico de varizes no Brasil no período de 2010 a 2020. **Jornal vascular brasileiro**, v. 21, 2022.

BERENQUER F DE, A.; DE AL, S. Influencia da posição ortostatica na ocorrencia de sintomas e sinais clinicos de venopatias de membros inferiores em trabalhadores de uma grafica na cidade de Recife-PE. **Rev Bras Saude Ocupa**, p. 153–161, 2011.

BERGAN, J. J. Conrad Jobst and the development of pressure gradient therapy for venous disease. Em: BERGAN, J. J.; YAO, J. (Eds.). **Surgery of the veins**. [s.l: s.n.]. p. 529-e540, 1985

BERGAN, J. J. et al. Chronic venous disease. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 5, p. 488–498, 2006.

BERGAN, J. J.; PASCARELLA, L.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Pathogenesis of primary chronic venous disease: Insights from animal models of venous hypertension. **Journal of vascular surgery**, v. 47, n. 1, p. 183–192, 2008.

BL, C.; AL, M. Systematic review of endovenous laser therapy versus surgery for the treatment of saphenous varicose veins. **Ann Vasc Surg**, v. 23, p. 277–287, 2009.

BOLLINGER, A. et al. Microvascular changes in venous disease: an update. **Angiology**, v. 48, n. 1, p. 27–32, 1997.

Bonner Venenstudie der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie e epidemiologische Untersuchung zur Frage der Häufigkeit und Ausprägung von chronischen Venenkrankheiten in der städtischen und ländlichen Wohnbevölkerung. **Phlebologie**, v. 32, p. 1-e1400, 2003.

BRITO, C. J.; VASCULAR, C. Cirurgia Vascular, Cirurgia Endovascular, Angiologia. **Angiologia**, p. 2020–2029, [s.d.].

CAGGIATI, A. et al. Skin iron deposition characterises lipodermatosclerosis and leg ulcer. **European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 40, n. 6, p. 777–782, 2010.

CAVALLO, I. et al. Homocysteine and inflammatory cytokines in the clinical assessment of infection in venous leg ulcers. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 9, p. 1268, 2022.

COLLEGE, I. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic venous insufficiency. **Int Angiol**, v. 20, n. 2, p. 1–37, 2001.

CONDEZO-HOYOS, L. et al. A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. **Journal of vascular surgery**, v. 57, n. 1, p. 205–213, 2013.

CORDTS, P. R. et al. Could gut-liver function derangements cause chronic venous insufficiency? **Vascular surgery**, v. 35, n. 2, p. 107–114, 2001.

CRIQUI, M. H. Chronic venous disease in an ethnically diverse population: The San Diego population study. **American journal of epidemiology**, v. 158, n. 5, p. 448–456, 2003.

CV, R. et al. Chronic venous insufficiency: clinical and duplex correlations. The Edinburgh Vein Study of venous disorders in the general population. **J Vasc Surg**, v. 36, p. 520-e525, 2002.

DANIELSSON, G. et al. Flavonoid treatment in patients with healed venous ulcer: flow cytometry analysis suggests increased CD11b expression on neutrophil granulocytes in the circulation. **Vascular medicine (London, England)**, v. 8, n. 2, p. 83–88, 2003.

DE, A. D. Proximal long saphenous vein valves in primary venous insufficiency. **J Mal Vasc**, v. 25, p. 27–36, 2000.

DRINKWATER, S. L. et al. Increased but ineffectual angiogenic drive in nonhealing venous leg ulcers. **Journal of vascular surgery**, v. 38, n. 5, p. 1106–1112, 2003.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

EA, O.; GOEL, M.; DT, W. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. **Dermatol Surg**, v. 22, p. 525–529, 1996.

ELLINGHAUS, E. et al. Genome-wide association analysis for chronic venous disease identifies EFEMP1 and KCNH8 as susceptibility loci. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 43, n. 1, 1997.

FG, F. et al. Lifestyle risk factors for lower limb venous reflux in the general population: Edinburgh Vein Study. **Int J Epidemiol**, v. 30, p. 846–852, 2001.

FIEBIG, A. et al. Heritability of chronic venous disease. **Human genetics**, v. 127, n. 6, p. 669–674, 2010.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 2011.

Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. **Acta Biochim Pol**, v. 58, p. 89–94, 2011.

GHADERIAN, S. M. H. et al. Pathogenic mechanisms in varicose vein disease: the role of hypoxia and inflammation. **Pathology**, v. 42, n. 5, p. 446–453, ago. 2010.

GL, S.; PD, S. Immunocytochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate of varicose veins. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 28, p. 479–483, 2004.

GLOVICZKI, P. et al. 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**, v. 53, n. 5, p. 2S-48S, 2011.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free radical biology & medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

GRUDZIŃSKA, E.; CZUBA, Z. P. Immunological aspects of chronic venous disease pathogenesis. **Central-European journal of immunology**, v. 4, p. 525–531, 2014.

GUZIK, B. et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human varicose veins. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 121, n. 9, p. 279–286, 2011.

GWOZDZINSKI, L. et al. Alterations in the plasma and red blood cell properties in patients with varicose vein: A pilot study. **Cardiology research and practice**, v. 2021, p. 5569961, 2021.

HALLIWELL, B. JMC. **Free radicals in biology and medicine**, 1999.

HOOD ED, G. Antioxidant protection by PECAM-targeted delivery of a novel NADPH-oxidase inhibitor to the endothelium in vitro and in vivo. **J Control Release**, v. 163, p. 161–169, 2012.

HORECKA, A. Antioxidative mechanism in the course of varicose veins. **Phlebology**, v. 33, p. 464–469, 2018.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

IANNUZZI, A. et al. Varicose veins of the lower limbs and venous capacitance in postmenopausal women: relationship with obesity. **Journal of vascular surgery**, v. 36, n. 5, p. 965–968, 2002.

ILLIG, K. A.; RHODES, J. M. **Venous and lymphatic disease: a historical review**. London: Edward Arnold Publishers Ltd, 2009.

JAMES, C. V. Venous leg ulcers: potential algorithms of care. v. 34, p. 288–296, 2022.

JAMES, T. J. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers.” Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society. **European Tissue Repair Society**, v. 11, p. 172–176, 2003.

JUKKALA TM, M.; HAKAMA M, L. The effects of parity, oral contraceptive use and hormone Management of Chronic Venous Disease 721 replacement therapy on the incidence of varicose veins. **J Obstet Gynaecol**, p. 448-e51, 2006.

JÜNGER, M. Microcirculatory dysfunction in chronic venous insufficiency (CVI). **Pt**, v. 7, p. S3-12, 1994.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, v.32, n.1, p.44–50, 2007.

KRZYŚCIAK, W.; KÓZKA, M. Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. **Acta biochimica Polonica**, v. 58, n. 1, p. 89–94, 2011.

KUMAR, V. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patologicas Das Doencas**. 8. ed. [s.l.] Elsevier Editora Ltda, 2010.

LABROPOULOS, Nicos *et al*. The effect of venous thrombus location and extent on the development of post-thrombotic signs and symptoms. **Journal of Vascular Surgery**, v. 48, n. 2, p. 407-412, ago. 2008.

LATTIMER, C. R. et al. Are inflammatory biomarkers increased in varicose vein blood? **Clinical and applied thrombosis/hemostasis**, v. 22, n. 7, p. 656–664, 2016.

LIMA, Denis Camargo de. Varicose veins and occupational health: symptoms, treatment and prevention. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 17, n. 4, p. 589-593, 2019.

LEE, A. J. et al. Lifestyle factors and the risk of varicose veins: Edinburgh Vein Study. **Journal of clinical epidemiology**, v. 56, n. 2, p. 171–179, 2003.

LI, B. H. et al. IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 369, n. 2, p. 554–560, 2008.

LIM, C. S. et al. Venous hypoxia: A poorly studied etiological factor of varicose veins. **Journal of vascular research**, v. 48, n. 3, p. 185–194, 2011.

LIM, C. S.; DAVIES, A. H. Pathogenesis of primary varicose veins. **The British journal of surgery**, v. 96, n. 11, p. 1231–1242, 2009.

LINS, E. M. et al. Perfil epidemiológico de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de varizes de membros inferiores. **Jornal vascular brasileiro**, v. 11, n. 4, p. 301–304, 2012.

LOPES, N. M. D. et al. Role of papillary thyroid carcinoma patients with Hashimoto thyroiditis: evaluation of oxidative stress and inflammatory markers. **Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, v. 24, n. 12, p. 2366–2378, 2022.

LUEBKE, T. et al. Meta-analysis of endovenous radiofrequency obliteration of the great saphenous vein in primary varicosis. **Journal of endovascular therapy: an official journal of the International Society of Endovascular Specialists**, v. 15, n. 2, p. 213–223, 2008.

LURIE, F. et al. The 2020 update of the CEAP classification system and reporting standards. **Journal of vascular surgery. Venous and lymphatic disorders**, v. 8, n. 3, p. 342–352, 2020.

LYONS, O. T. A.; SAHA, P.; SMITH, A. Redox dysregulation in the pathogenesis of chronic venous ulceration. **Free radical biology & medicine**, v. 149, p. 23–29, 2020.

MACEDO, A. N.; LOPES, C. F. Análise do perfil epidemiológico das hospitalizações por veias varicosas das extremidades inferiores de 2018 a

2022: uma visão quantitativa e comparativa no Brasil. **Revista de Medicina**, v. 102, n. esp, 2023.

MAGDER, S. **Critical care (London, England)**, v. 10, n. 1, p. 208, 2006.

MAGNUSSON, M. et al. Colour Doppler ultrasound in diagnosing venous insufficiency. A comparison to descending phlebography. **European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 9, n. 4, p. 437–443, 1995.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARSTON, W. et al. Incidence of and risk factors for ilio caval venous obstruction in patients with active or healed venous leg ulcers. **Journal of vascular surgery**, v. 53, n. 5, p. 1303–1308, 2011.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American journal of medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, 2000.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MH, C.; FRONEK A, D.; BERGAN, J. Chronic venous disease in an ethnically diverse population: the San Diego Population Study. **Am J Epidemiol**, v. 158, p. 448-e56, 2003.

MILONSKI, J. DNA damage and oxidant-antioxidant status in blood of patients with head and neck cancer. **DNA and Cell Biology**, v. 34, n. 3, p. 213–219, 2015.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T.G. ROS signalling in the biology of cancer. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2018. p. 50-64.

MOORE, K. Venous leg ulcers - the search for a prognostic indicator. **International wound journal**, v. 4, p. 163–172, 2007.

MS, A.; HE, S. Selenium, zinc, iron and copper levels in serum of patients with arterial and venous leg ulcers. **Acta Derm Venereol**, v. 66, p. 237–240, 1986.

ONO, T. et al. Monocyte infiltration into venous valves. **Journal of vascular surgery**, v. 27, n. 1, p. 158–166, 1998.

PADBERG JR F, C. et al. Does severe venous insufficiency have a different etiology in the morbidly obese? Is it venous? **J Vasc Surg**, v. 37, p. 79–e85, 2003.

PERRIN, M.; RAMELET, A. A. Pharmacological treatment of primary chronic venous disease: rationale, results and unanswered questions. **European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 41, n. 1, p. 117–125, 2011.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PORTER, J. M.; MONETA, G. L. Reporting standards in venous disease: an update. International Consensus Committee on Chronic Venous Disease. **Journal of vascular surgery**, v. 21, n. 4, p. 635–645, 1995.

Prognostic role of factor XIII gene variants in nonhealing venous leg ulcers. **J Vasc Surg**, v. 44, p. 815–819, 2006.

Progress in MR imaging of the venous system. **Perspect Vasc Surg Endovasc Ther**, v. 21, p. 105–e116, 2009.

QIANG MA. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401–426, 2013.

RABE, E. et al. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program. **International angiology: a journal of the International Union of Angiology**, v. 31, n. 2, p. 105–115, 2012.

RABE E. Vein Bonn Study. **Phlebology** 2006:179e86

RAFFETTO, J. D. Pathophysiology of chronic venous disease and venous ulcers. **The Surgical clinics of North America**, v. 98, n. 2, p. 337–347, 2018.

RAFFETTO, J. D. Pathophysiology of wound healing and alterations in venous leg ulcers-review. **Phlebology**, v. 31, n. 1 Suppl, p. 56–62, 2016.

RAFFETTO, J. D. et al. Why venous leg ulcers have difficulty healing: Overview on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. **Journal of clinical medicine**, v. 10, n. 1, p. 29, 2020.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. **Phlebology**, v. 23, n. 2, p. 85–98, 2008.

RASIK AM, P. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defense enzymes in a healing cutaneous wound. **Free Radic Res**, v. 26, p. 93–101, 1997.

RAVANTI, L.; KÄHÄRI, V. M. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). **International journal of molecular medicine**, v. 6, n. 4, p. 391–407, 2000.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free radical biology and medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

ROHRER, M. J. et al. Platelet-monocyte aggregates in patients with chronic venous insufficiency remain elevated following correction of reflux. **Cardiovascular surgery (London, England)**, v. 10, n. 5, p. 464–469, 2002.

ROJAS, A. I.; PHILLIPS, T. J. Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitamins A and E, carotenes, and zinc. **Dermatologic surgery**, v. 25, n. 8, p. 601–604, 1999.

SA, A.-E.-A.; MW, F.; BHOWMICK A, M. Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers. **J Pathol**, v. 95, p. 616–623, 2001.

SAHARAY, M. et al. Leukocyte activity in the microcirculation of the leg in patients with chronic venous disease. **Journal of vascular surgery**, v. 26, n. 2, p. 265–273, 1997.

SAM, R. C. et al. The effect of superficial venous surgery on generic healthrelated quality of life. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 28, p. 253-e256, 2004.

SAYER, G. L.; SMITH, P. D. C. Immunocytochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate of varicose veins. **European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 28, n. 5, p. 479–483, 2004.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 58, n. 2, p. 165–171, 2008.

SCHWARTZ, L.; MAXWELL, H. Sclerotherapy for lower limb telangiectasias. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 2021, n. 12, p. CD008826, 2011.

SENET, P. et al. Randomized trial and local biological effect of autologous platelets used as adjuvant therapy for chronic venous leg ulcers. **Journal of vascular surgery**, v. 38, n. 6, p. 1342–1348, 2003.

SERRA, S.; CHETTY, R. *p16*. **Journal of clinical pathology**, v. 71, n. 10, p. 853–858, 2018.

SHUKLA, A.; RASIK, A. M.; PATNAIK, G. K. Depletion of Reduced Glutathione, Ascorbic Acid, Vitamin E and Antioxidant Defence Enzymes in a Healing Cutaneous Wound. **Free Radical Research**, v. 26, n. 2, p. 93–101, jan. 1997.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.

SILVA-FILHO, J. L.; CARUSO-NEVES, C.; PINHEIRO, A. A. S. IL-4: an important cytokine in determining the fate of T cells. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 1, p. 111-118, 2014.

SPRAGUE, A. H. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochem Pharmacol**, v. 78, p. 539–552, 2009.

STEILING, H.; MUNZ B, W. S. Different types of ROSscavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. **Exp Cell Res**, v. 247, p. 484–494, 1999.

STVRTINOVÁ, V. Lysosomal enzymes and superoxide production in polymorphonuclear leukocytes of patients with primary varicose veins. **Cor et vasa**, v. 34, p. 255–264, 1992.

STVRTINOVA, V. Inflammatory mechanisms involving neutrophils in chronic venous insufficiency of lower limbs. **Bratislavske lekarske listy**, v. 102, p. 235–239, 2001.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**. v. 27, p. 502-522, 1969.

Über die Unterbindung der Vena Saphena Magna bei Unterschenkel Varicen. **Beitr Z Clin Chir**, v. 1891, p. 195-e210, [s.d.].

VASCONCELOS, S. M. L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASQUEZ, M. A.; MUNSCHAUER, C. E. Venous Clinical Severity Score and quality-of-life assessment tools: application to vein practice. **Phlebology**, v. 23, n. 6, p. 259–275, 2008.

VIN, F.; ALLAERT, F. A.; LEVARDON, M. Influence of estrogens and progesterone on the venous system of the lower limbs in women. **The Journal of dermatologic surgery and oncology**, v. 18, n. 10, p. 888–892, 1992.

WALI, M. A.; EID, R. A. Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. **International angiology: a journal of the International Union of Angiology**, v. 21, n. 4, p. 337–343, 2002.

WLASCHEK, M. et al. Iron and iron-dependent reactive oxygen species in the regulation of macrophages and fibroblasts in non-healing chronic wounds. **Free radical biology & medicine**, v. 133, p. 262–275, 2019.

WLASCHEK, M. et al. Iron and iron-dependent reactive oxygen species in the regulation of macrophages and fibroblasts in non-healing chronic wounds. *Free Radic. Biol. Med*, v. 133, p. 262–275, 2019.

WLASCHEK, M.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound repair and regeneration*, v. 13, n. 5, p. 452–461, 2005.

YONEYAMA, H.; KAWASAKI, S.; MATSUSHIMA, K. **Regulation of Th1 and Th2 immune responses by chemokines. Springer seminars in immunopathology.** [s.l.] Springer-Verlag, 2000.

ZAMBONI, P. et al. Hemochromatosis C282Y gene mutation increases the risk of venous leg ulceration. *Journal of vascular surgery*, v. 42, n. 2, p. 309–314, 2005.

ZAMBONI, P. et al. Inflammation in venous disease. *International angiology: a journal of the International Union of Angiology*, v. 27, n. 5, p. 361–369, 2008.

ZUKOWSKI, A. J.; NICOLAIDES, A. N.; SZENDRO, G. Haemodynamic significance of incompetent calf perforating veins. *Br J Surg*, v. 78, 1991.