



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Leonardo de Oliveira Pimentel

**Perfil de microRNA comparativo em pacientes com
diferentes graus de doença venosa crônica.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida
Coorientadora: Prof(a). Dra. Patricia Pintor dos Reis

**Botucatu
2023**

Leonardo de Oliveira Pimentel

Perfil de microRNA comparativo em pacientes com diferentes graus de doença venosa crônica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida
Coorientadora: Prof(a). Dra. Patricia Pintor dos Reis

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Pimentel, Leonardo de Oliveira.

Perfil de microRNA comparativo em pacientes com diferentes graus de doença venosa crônica / Leonardo de Oliveira Pimentel. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Winston Bonetti Yoshida

Coorientador: Patricia Pintor dos Reis

Capes: 40102041

1. Varizes. 2. Prognóstico. 3. Tratamento. 4. Veia safena. 5. MicroRNAs.

Palavras-chave: Doença venosa crônica; Prognóstico; Tratamento; Veia safena magna; microRNA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Benedito e Ana Maria**, que nunca mediram esforços para criar seu filho com muito amor e carinho, e que sempre me apoiaram em meus estudos e me instigaram a buscar o conhecimento. Minha eterna gratidão por tudo!

À minha namorada **Tatiana**, que ao longo desses anos sempre me deu forças para continuar seguindo em frente na busca de meus objetivos, com muito amor, carinho e sabedoria. Obrigado por sempre confiar em mim!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu orientador **Dr. Winston Bonetti Yoshida**, por me receber com grande entusiasmo como seu aluno. Agradeço por todas as oportunidades oferecidas nesses três anos de pesquisa para o meu crescimento profissional, por toda a paciência, apoio e assistência. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos!

À **Dra. Patricia Pintor dos Reis**, por toda assistência, oportunidades oferecidas e pelo convite para fazer parte do Molecular Oncology Lab.

À **Mariana Rodrigues Santesso**, pela disponibilidade, por toda a assistência e pela grande amizade que construímos. Aos colaboradores desse trabalho: **Dr. Jan Janzen, Eduardo Rezk, Dra. Tainara Felix, Dr. Matheus Bertanha, Dr. Rainer Lapa e Dr. Márcio de Carvalho** pelo suporte fundamental e dedicação aos resultados.

Ao **Dr. Ricardo Yoshida** do Hospital Regional de São José dos Campos, pelas amostras fornecidas.

Ao **Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho, Dra. Selma Raymundo, Dra. Sarah Santiloni Cury, Dr. Robson Francisco Carvalho e Dr. Edwaldo Edner Joviliano** pela disponibilidade e assistência.

À **Dra. Cintia Yuri Matsumura** e ao **Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa** por todo o apoio e conhecimento compartilhado no PAADES.

À todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu.

À todos os funcionários da secretaria da pós-graduação do Programa de Cirurgia e Medicina Translacional, em especial, à **Márcia Fonseca Piagentini Cruz** por toda a paciência e ajuda constante.

À todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu.

E também um agradecimento especial a todos os meus amigos que acompanharam de perto as etapas desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, processos nº 2018-06422-8 e nº 2020/02702-6.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

RESUMO

A ocorrência de varizes primárias pode estar associada à idade, obesidade, número de gravidezes e postura em pé. Varizes também são mais prevalentes em pacientes com antecedentes familiares de varizes, o que suscitou investigações genéticas em pacientes com esta doença. Somente 5 estudos avaliaram a expressão de microRNAs (miRNAs) na fisiopatologia da mesma, sendo 4 em veias varicosas e 1 no sangue. Entretanto, somente em 1 destes estudos foi investigado todo o espectro de pacientes com varizes (Classificação *Clinical-Etiology-Anatomy-Pathophysiology*, CEAP), mas sem grupo controle.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi determinar e comparar o perfil global de expressão de microRNAs (miRNAs) em amostras de veias varicosas de pacientes com doença venosa crônica (DVC), classificadas desde CEAP 2 até CEAP 5, sendo um grupo CEAP O, C0 o controle (veias safenas excedentes usadas como enxertos).

Métodos: Os pacientes com DVC tinham todas varizes primárias, e diagnóstico clínico e mapeamento dúplex e foram submetidos à cirurgia de varizes por fleboextração da veia safena magna. As veias safenas magnas foram divididas em 3 grupos: Grupo 1- CEAP (C2 + C3), Grupo 2 (CEAP C4 + C5) e controles (C0) para análise da expressão global de miRNAs e análise histológica. A expressão de miRNAs foi quantificada pela plataforma *GeneChip microRNA array* (Thermo Fisher Scientific). Os miRNAs com expressão aumentada ou diminuída nas veias de pacientes comparado com controles, foram utilizados para análises de predição de genes-alvo e subsequentemente estes genes foram mapeados em vias moleculares, através de ferramentas de bioinformática.

Resultados: Um total de 153 miRNAs teve níveis desregulados de forma estatisticamente significativa no Grupo 1 vs. Controle (19 diminuídos e 134 aumentados) e 120 miRNAs no Grupo 2 vs. Controle (14 diminuídos e 106 aumentados). Os miRNAs: miR-23a-5p e miR-7977, estavam exclusivamente desregulados com níveis significativamente aumentados nas amostras do Grupo 2, associados a classes de CEAP mais graves. Outros miRNAs como miR-6753-5p e miR-6795-5p foram encontrados no Grupo 1 regulando MMPs e TIMPs, importantes no remodelamento vascular. Além disso, as amostras do Grupo 2 apresentaram espessuras significativamente maiores das veias safenas nas análises histológicas.

Conclusões: Nossos resultados são inéditos em comparação com a literatura sobre miRNA's em DVC e nos levam a hipotetizar que a expressão aumentada dos miRNAs:

miR-23a-5p e miR-7977 poderiam estar envolvidos em doenças venosas crônicas clinicamente mais graves. Além disso, os miRNA's (miR-6753-5p e miR-6795-5p) encontrados nas formas menos graves poderiam estar envolvidos na regulação de MMPs e TIMPs e nas alterações inflamatórias. Estudos futuros de validação funcional destes miRNAs e seus genes-alvo, são requeridos para elucidar como a alteração destes miRNAs e desregulação das vias identificadas levariam ao desenvolvimento e progressão de doenças venosa crônica de maior gravidade.

Palavras-chave: doença venosa crônica; microRNA; veia safena magna; prognóstico; tratamento.

ABSTRACT

The occurrence of primary varicose veins may be associated with age, obesity, number of pregnancies and standing posture. Varicose veins are also more prevalent in patients with a family history of varicose veins, which has prompted genetic research into patients with this disease. Only 5 studies have evaluated the expression of microRNAs (miRNAs) in the pathophysiology of varicose veins, 4 in varicose veins and 1 in blood. However, only 1 of these studies investigated the full spectrum of patients with varicose veins (Clinical-Etiology-Anatomy-Pathophysiology classification, CEAP), but without a control group.

Objective: The aim of this study was to determine and compare the global expression profile of microRNAs (miRNAs) in varicose vein samples from patients with chronic venous disease (CVD), classified from CEAP 2 to CEAP 5, with a CEAP O, C0 group being the control (surplus saphenous veins used as grafts).

Methods: The patients with CVD all had primary varicose veins, clinical diagnosis and duplex mapping and underwent varicose vein surgery by phleboextraction of the great saphenous vein. The great saphenous veins were divided into 3 groups: Group 1- CEAP (C2 + C3), Group 2 (CEAP C4 + C5) and controls (C0) for analysis of the global expression of miRNAs and histological analysis. The expression of miRNAs was quantified using the GeneChip microRNA array platform (Thermo Fisher Scientific). The miRNAs with increased or decreased expression in the veins of patients compared to controls were used for target gene prediction analysis and subsequently these genes were mapped onto molecular pathways using bioinformatics tools.

Results: A total of 153 miRNAs had statistically significant downregulated levels in Group 1 vs. Control (19 decreased and 134 increased) and 120 miRNAs in Group 2 vs. Control (14 decreased and 106 increased). The miRNAs: miR-23a-5p and miR-7977, were exclusively downregulated with significantly increased levels in Group 2 samples, associated with more severe CEAP classes. Other miRNAs such as miR-6753-5p and miR-6795-5p were found in Group 1 regulating MMPs and TIMPs, important in vascular remodeling. In addition, Group 2 samples showed significantly greater saphenous vein thickness in histological analyses.

Conclusions: Our results are unprecedented compared to the literature on miRNAs in CVD and lead us to hypothesize that the increased expression of miRNAs: miR-23a-5p and miR-7977 could be involved in clinically more severe chronic venous diseases. In addition, the miRNAs (miR-6753-5p and miR-6795-5p) found in less severe forms could be involved

in the regulation of MMPs and TIMPs and in inflammatory changes. Future functional validation studies of these miRNAs and their target genes are required to elucidate how the alteration of these miRNAs and deregulation of the identified pathways would lead to the development and progression of more severe chronic venous diseases.

Keywords: chronic venous disease; microRNA; great saphenous vein; prognosis; treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de diferentes apresentações clínicas da DVC, de acordo com a classificação CEAP.....	16
Figura 2: Equipamento Affimetrix e chips usados no presente estudo.....	22
Figura 3: Critérios de inclusão, exclusão e amostras selecionadas.....	24
Figura 4: Exemplos da classificação CEAP: A=C2; B= C3; C= C4 e D=C5.....	28
Figura 5: Diagrama de Venn, ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos nos casos comparados com o controle.....	29
Figura 6: Rede de interação do miR-7977 e seus genes alvo.....	38
Figura 7: Rede de interação do miR-23a-5p e seus genes alvo.....	39
Figura 8: Painel mostrando espessamento da parede venosa conforme os grupos das amostras totais (n=34).....	40
Figura 9: Painel mostrando espessamento da parede venosa conforme os grupos das amostras selecionadas (n=27).....	41
Figura 10: Alterações histomorfológicas das veias safenas de acordo com a classificação CEAP. (A=CEAP C2; B= CEAP C3; C= CEAP C4; D= CEAP C5; E e F = C0 - controls).....	42
Figura 11: Fisiopatologia da doença venosa crônica.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes selecionados para expressão de miRNA.....	25
Tabela 2: miRNAs diferencialmente expressos nos grupos 1 (G1 - CEAP 2 e CEAP 3) e grupo 2 (G2 - CEAP 4 e CEAP 5). FC: Fold change; FDR: False Discovery Rate.....	30
Tabela 3: Vias moleculares enriquecidas, para os genes-alvo dos miRNAs com expressão diferencial exclusiva no Grupo 1 (CEAP 2 e 3).....	32
Tabela 4: Vias moleculares enriquecidas, para os genes-alvo dos miRNAs com expressão diferencial exclusiva no Grupo 2 (CEAP 4 e 5).....	33
Tabela 5: Comparação entre os miRNA do Grupo 1 expressos no presente trabalho com os observados em estudos prévios da literatura.....	34
Tabela 6: Comparação entre os miRNA do Grupo 2 desregulados no presente trabalho com os observados em estudos prévios da literatura.....	34
Tabela 7: Genes alvo dos miRNAs desregulados e possível relação com doenças cardiovasculares.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

miRNAs	microRNAs
CEAP	Classificação Clínica-Etiológica-Anatômica-Patológica
DVC	Doença venosa crônica
MMPs	Metaloproteinases de matriz
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TGF-3	Fator de transformação do crescimento
VEGF	Fator de transformação do crescimento
RNA	Ácido ribonucleico
ncRNAs	RNAs não codificadores
VSM	Veia safena magna
IMC	Índice de massa corporal
FFPE	Tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
FDR	False Discovery Rate
FC	Fold change
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
ADAM10	ADAM Metallopeptidase Domain 10
CLOCK	Clock Circadian Regulator
CRP	C-Reactive Protein
KCNH8	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 8
ADAMTS4	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 4
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase
CASP3	Caspase 3
IGF1	Insulin Like Growth Factor 1
SMAD 2	SMAD Family Member 2
ICAM1	Molécula de adesão intercelular-1
tRFs	RNA derivados de tRNA
NO	Óxido nítrico
PGI2	Prostaciclina

mirDIP	microRNA Data Integration Portal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
FVL	Fator V de Leiden
MEC	Matriz extracelular

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivo	18
3. Delineamento Experimental e Metodologia Considerações Éticas	19
4. Pacientes e métodos	19
4.1. Tipo de estudo, critérios de inclusão e de exclusão	19
4.2. Grupos de estudo	20
4.3. Coleta das amostras/histologia	20
4.4. Extração do RNA	21
4.5. Quantificação da expressão de miRNAs	21
4.6. Análises computacionais	22
4.7. Análise bibliográfica	22
4.8. Análise histológica	23
4.9. Análise estatística	23
5. Resultados	23
5.1. Dados demográficos e anatomopatológicos	23
5.2. Perfil de expressão dos miRNAs	28
5.3. Análises computacionais	31
5.4. Resultados: Grupo 1 versus controle	31
5.5. Resultados: Grupo 2 versus controle	33
5.6. Resultados da Pesquisa bibliográfica	34
5.7. Histologia	40
6. Discussão	43
7. Limitações e pontos fortes	48
8. Conclusão	48
REFERÊNCIAS	49
6. Apêndices	52
6. Anexo 1	60
6. Anexo 2	61

1 Introdução

A doença venosa crônica (DVC) é muito prevalente no mundo todo, acometendo até 40% das mulheres e até 17 % dos homens¹. A DVC pode ser causada por episódio prévio de trombose venosa profunda ou fístula arteriovenosa adquirida ou congênita² ou pode estar relacionada com varizes primárias de membros inferiores³. No Brasil estima-se prevalência de varizes em 47,6% da população, sendo que 3,6% destes com DVC e úlceras de estase cicatrizadas ou abertas⁴. As úlceras venosas são de difícil tratamento e provocam enormes constrangimentos para os pacientes e custos elevados de tratamento no sistema de saúde⁵⁻⁷.

Os pacientes com formas mais graves em geral são de baixo nível socioeconômico, com pouca formação escolar, com cerca de 64% deles apresentando recorrência das úlceras, 49,2% com dificuldades para o trabalho e inatividade, com 75% dos pacientes apresentando sobrepeso⁸.

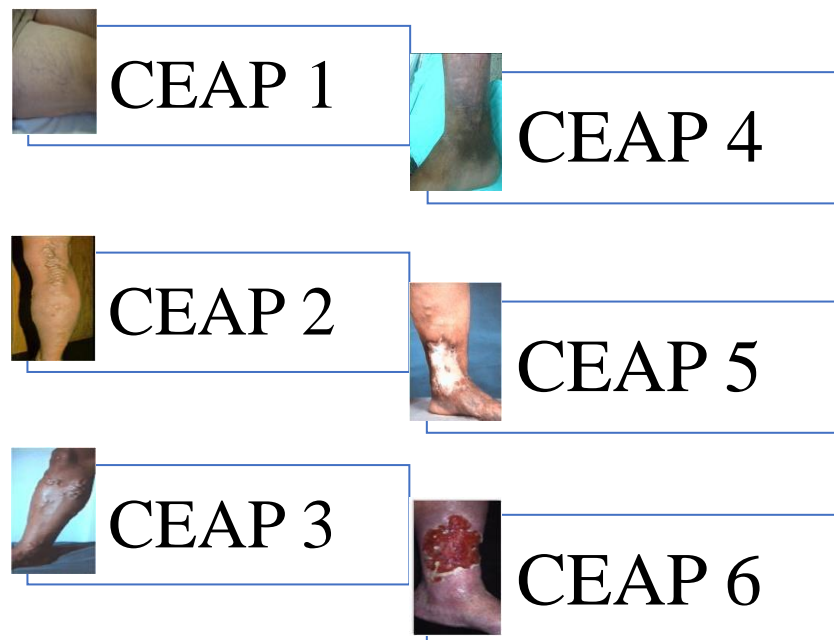
Além da prevalência alta é uma doença especialmente limitante para os pacientes com dermatoesclerose e úlceras, pois estas úlceras são de difícil cicatrização, provocam uma grande queda na qualidade de vida e grande impacto econômico, com dificuldade de obtenção de empregos, ausência no trabalho, inapetência e baixa autoestima. Em nosso meio, o tempo médio desde o aparecimento das úlceras venosas e o atendimento médico é de 36 meses⁷, sendo que a primeira consulta para este problema ocorreu em média após 10 anos desde o aparecimento da mesma⁸. Em casuística de nossa Instituição, as úlceras permanecem sem cicatrização por 1 ano em 40,7% dos casos, por 1-5 anos em 29,1%, por 5-10 anos em 11,7% dos casos e por mais de 10 anos em 16,5% dos casos⁸. No Brasil, a insuficiência venosa crônica foi a 14^a causa de perda de salários e 32^a causa de aposentadorias por doença^{5,6}.

Estimativas de custo de diagnóstico e tratamento desses pacientes chegam a 2,5 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos⁹. No Brasil, o SUS despense o correspondente a ~72 milhões de dólares americanos no tratamento de varizes dos membros inferiores e úlceras venosas⁶. Os pacientes com úlceras venosas se aposentam no Brasil em média com 54,8 anos de idade e o tempo médio de afastamento no trabalho para tratamento das úlceras é de 18,4 meses⁵. Além disso, a qualidade de vida dos pacientes fica extremamente prejudicada⁷.

As diferentes apresentações clínicas da DVC foram uniformizadas na Classificação CEAP (C = Clinical Class; E = Etiological classification; A = Anatomical

classification; P= Pathophysiology)⁷ A classificação clínica compreende: CEAP 0= normal; CEAP 1 = Telangiectasias (até 1 mm) e veias reticulares (até 2 mm); CEAP 2 = Veias Varicosas; CEAP 3 = Veias varicosas + edema; CEAP 4 = Veias varicosas + dermatite de estase; CEAP 5 = Veias varicosas + úlcera venosa cicatrizada; CEAP 6 = Veias varicosas + úlcera venosa aberta. Na **Figura 1**, abaixo, apresentamos exemplos de cada classe clínica.

Figura 1- Exemplos de diferentes apresentações clínicas da DVC, de acordo com a classificação CEAP.



Fonte: Porter e cols. J Vasc Surg. 1995.

O fato da DVC ser mais prevalente em pacientes com antecedentes familiares de varizes¹⁰, suscitou uma série de investigações sobre mecanismos genéticos em sua gênese e alterações na expressão de proteínas em casos com esta doença¹¹⁻¹⁴. Gemmati e cols¹⁵ verificaram uma associação entre o genótipo FPN1-8GG e risco de DVC (risco 4.3; IC 95% 1.6-12) e de úlcera venosa (risco 4.98; IC 95% 1.82-14.9). Lee e cols.¹⁶ identificaram 82 genes com expressão aumentada na DVC, incluindo-se o gene *BIFH3* relacionado ao fator de transformação do crescimento (TGF-3), da tubulina, lumican, actinina, colágeno tipo I, versican, actina e tropomiosina. Em revisão sistemática da

literatura¹⁷ encontrou-se 38 estudos relevantes apontando importantes genes/proteínas associados a DVC, tais como metaloproteinases, fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), FOXC2, hemocromatose e vários tipos de colágeno. Esses achados revelaram a importância da pesquisa para identificação de genes implicados na DVC, entretanto, ainda há certa dificuldade em replicar os resultados em coortes especiais destes pacientes¹¹.

Para nosso conhecimento, poucos estudos avaliaram a expressão de microRNAs (miRNAs) na fisiopatologia da mesma. Cui e cols¹⁸ relataram 14 miRNAs com alterações na expressão em veias safenas de 5 pacientes do sexo masculino com DVC e 5 controles do mesmo sexo, dos quais 9 estavam com expressão aumentada e 5 com expressão diminuída. Esse estudo confirmou a expressão alterada de 3 miRNAs (miR-34a, miR-155 e miR-202). Entretanto, os autores restringiram-se à análise apenas de pacientes com varizes moderadas (CEAP C 4). Os próprios autores enfatizaram, nas conclusões do estudo, a necessidade de ampliar o espectro de avaliação da doença, incluindo-se pacientes com varizes menos graves (CEAP C 3) e mais graves (CEAP C5-C6), além do grupo C4 estudado. Em estudo de Anwar cols¹⁹, foi identificada a expressão diferencial de 7 miRNAs, sendo que níveis aumentados de expressão dos miRNAs miR-4959, miR-135a e miR-216a-5p foram destacados, pois regulam vias de sinalização que influenciam diretamente a proliferação celular, uma característica importante associada à doença. Os autores analisaram 8 casos com varizes (sem mencionar o CEAP) e 8 controles. Biranvand e cols²⁰ avaliaram em macrófagos de sangue total de 10 pacientes com varizes e 10 normais (sem menção ao CEAP, sexo e idade), os níveis de expressão de alguns RNAs não codificadores (ncRNAs) e MMP9. Observaram pela reação de cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-qPCR) que o lncRNA-GAS5, miRNA-661, miRNA-1202 e MMP9, estavam envolvidos na doença varicosa. Já o estudo de Cao e cols²¹, feito em 10 veias varicosas extraídas cirurgicamente (sem mencionar a classificação CEAP) de pacientes de ambos sexos com média de 63 anos de idade, comparados com 10 amostras excedentes de veias safenas normais de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização coronariana, concluiu que o miR-199a-5 poderia regular a alteração do fenótipo das células musculares lisas através do gene alvo *FOXC2* durante a formação da veia varicosa. Huang e cols²² avaliaram 33 veias safenas de pacientes com varizes (18 mulheres e 15 homens), com CEAP's C3 (n=3), C4 (n=9), C5 (n=3) e C6 (n=18), sem incluir grupo controle. Observaram que o miR-202 estava com expressão aumentada nos tecidos varicosos, com diminuição da expressão do marcador de contração SM-22 alfa e

aumento da expressão da vimentina e colágeno I. O miR-202 afeta a transição fenotípica das células musculares lisas, com alvo na expressão do PGC-1alfa, o que poderia ser, segundo os autores, um novo alvo para terapêutica das veias varicosas.

Em revisão sistemática de Zalewski e cols⁵¹ foram identificados artigos que mostraram a associação entre miRNAs e a doença venosa crônica. Os autores desta revisão fizeram uma compilação de sete artigos, os quais descreveram cerca de 50 diferentes miRNAs expressos e que poderiam estar atuando como biomarcadores.

Em um estudo de metanálise realizado pelo nosso grupo²³, foram apontados vários miRNAs que poderiam estar envolvidos em alterações vasculares, incluindo-se vários daqueles indicados na regulação de fatores de crescimento e proteínas e associados em estudos genéticos prévios de outros autores sobre DVC. Estes tipos de estudos podem contribuir para a identificação de vias moleculares reguladas por miRNAs e com papel na patogênese da doença. Adicionalmente, miRNAs e genes-alvo regulados pelos miRNAs podem representar biomarcadores com utilidade clínica no diagnóstico, prognóstico e desenvolvimento de novos tratamentos beneficiando pacientes acometidos por DVC.

Em revisão de Hosin e cols²⁴, foi demonstrada paralelamente a utilidade clínica de miRNAs na diferenciação de pacientes com doença arterial, comparando com indivíduos não afetados, inclusive para predição de eventos cardiovasculares. Na doença arterial coronariana, estudos similares apontaram novos caminhos para o diagnóstico desta doença^{25,26}.

Uma vez colocado o quadro de gravidade da insuficiência venosa crônica, é importante continuar estudando o perfil genético das várias variantes clínicas da mesma. Este tipo de estudo envolvendo aspectos genéticos das doenças, permitiu estabelecer com relativa segurança a probabilidade de desenvolvimento por exemplo do cancer de mama, bem como seu prognóstico. Estudos dessa natureza avaliando-se todas as classes da insuficiência venosa crônica, mapeando-se os genes e mRNAs envolvidos e detectando-se possíveis diferenças entre-classes, podem no futuro ajudar os sistemas de saúde a discriminar os pacientes com maior potencial de desenvolvimento de formas mais graves da doença e estabelecer políticas públicas de rastreamento, prevenção, diagnóstico e tratamento direcionadas para esses casos, antecipando-se assim ao aparecimento de formas mais graves e com complicações. Futuramente, kits diagnósticos (patenteáveis) de custo reduzido, poderão ser produzidos para esta detecção, em benefício dos pacientes.

2 Objetivo

Determinar e comparar o perfil global de expressão de miRNAs em VSM insuficientes de pacientes portadores de doença venosa crônica (DVC) em diferentes graus de gravidade da doença; CEAP C2 e C3 (menos graves), *versus* C4 e C5 (doença mais grave), em comparação com controles representados por excedentes de VSM normais (CEAP C0) de pacientes submetidos a restaurações vasculares.

3 Delineamento Experimental e Metodologia Considerações Éticas

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Número do Parecer: 3.836.330).

4 Pacientes e métodos

4.1. Tipo de estudo, critérios de inclusão e de exclusão

Foi realizado um estudo prospectivo transversal para avaliação do perfil global de expressão de miRNAs em tecido varicoso (VSM) de pacientes diagnosticados com varizes primárias (diagnóstico clínico e por meio do exame de ultrassom - mapeamento dúplex). Todos os pacientes foram recrutados sequencialmente no Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e do Hospital Regional de S. José dos Campos - SP.

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com etiologia primária das varizes, anatomia envolvendo a VSM e/ou veias superficiais, e /ou veias perfurantes, e somente refluxo na classificação fisiopatológica.

Foram excluídos pacientes menores que 18 anos, na vigência de gravidez ou puerpério, que tenham realizado cirurgias prévias, com diagnóstico de flebites, trombose venosa profunda, etiologia congênita ou secundária das varizes, envolvimento de veias profundas, fisiopatologia por obstrução, e doenças inflamatórias, como: infecções graves, celulites, linfangites, ou doenças crônicas associadas, em uso de medicações perenes para tratamento da DVC. Na classificação CEAP 6 a exclusão foi feita por conta de presença de úlcera aberta, que poderia portar infecções ou servir de porta de entrada para as mesmas e provocar possíveis complicações na cirurgia convencional. Para o

estudo de expressão de miRNA foram selecionados segmentos das veias com alterações macroscópicas mais pronunciadas. Para o grupo controle foram recrutados pacientes >18 anos, ambos sexos, CEAP C0. Pacientes de todos grupos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2. Grupos de estudo

Foram constituídos os seguintes grupos: Grupo Controle: CEAP C0 (n=6); Grupo 1: CEAP C2 + CEAP C3 (n=12) ; Grupo 2: CEAP C4 + CEAP C5 (n=9) . O tamanho da amostra de cada grupo foi estimado tendo por base o estudo de Cui e cols sobre miRNA em DVC¹⁶, no qual uma amostra de 5 pacientes por grupo foi suficiente para tal. Por conta da pandemia de Covid-19 não foi possível atingir completamente as metas de tamanho amostral, notadamente para pacientes com CEAP C5.

Dados demográficos das pacientes foram compilados, incluindo idade, raça, CEAP completo, histórico familiar de doença varicosa, atividade física, sintomas , tipo de trabalho, número de partos, uso de meia elástica e índice de massa corporal (IMC), comorbidades e medicações em uso. Resultados de exames laboratoriais de rotina para as respectivas cirurgias foram também compilados. Foram feitas fotografias dos membros inferiores acometidos com câmera fotográfica profissional ou do telefone celular.

4.3. Coleta das amostras/histologia

As porções mais alteradas das veias safenas magnas dos pacientes com varizes foram colhidas logo após a fleboextração das mesmas durante a cirurgia de varizes. As veias safenas magnas dos pacientes utilizadas no grupo controle (CEAP 0) foram obtidas somente de segmentos excedentes dessas veias durante cirurgias de enxertos para reconstrução arterial ou coronariana. As amostras de veias foram: lavadas em salina até completa eliminação de resíduos de sangue na luz e superfície das mesmas e imediatamente fixadas em formalina neutra a 10%; uma parte representativa de cada amostra foi utilizada para extração do RNA e outra parte emblocada em parafina em cassetes apropriados para cortes dos slides e coloração dos exames histológicos. Os cassetes foram encaminhados para o VascLab em Berna, Suíça. Foi usada a coloração HE e Verhoeff-Van Gieson. As avaliações histológicas foram feitas no Laboratório Vasc-Path (Berna- Suíça), sob supervisão do Patologista Vasculare - Dr. Jan Janzen, analisando

as alterações estruturais e espessamento das camadas adventícia, média e íntima^{27,28}.

4.4. Extração do RNA

Para extração do RNA, as veias foram trituradas com bisturi e passaram por três fases: a primeira fase teve como objetivo a digestão com proteinase, a segunda fase o isolamento do RNA total e a terceira fase a purificação do RNA. O RNA foi extraído utilizando o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (otimizado para extrair RNA de amostras fixadas em formalina). As amostras de RNA foram quantificadas e avaliadas para qualidade utilizando o *NanoDrop 8000* (Thermo Scientific).

4.5. Quantificação da expressão de miRNAs

A análise da expressão de miRNAs no tecido varicoso das pacientes e controles foi realizada utilizando-se a plataforma GeneChip® miRNA 4.0 Array (Affymetrix), que contém sondas para todos os 2.588 miRNAs mapeados no genoma humano e anotados no banco de dados de miRNAs, o miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Essa plataforma inclui sondas de miRNAs endógenos (controles internos) as quais são necessárias para normalização dos resultados de expressão de miRNAs. Os experimentos seguiram o protocolo do fabricante (Affymetrix). Resumidamente, em uma primeira etapa, as amostras foram submetidas à incorporação de uma cauda poli-A à extremidade 3' da molécula de RNA, seguido por um segundo passo de reação de ligação e biotilação da cauda 3'-poli A do RNA. O RNA então marcado com biotina foi hibridizado no cartucho – plataforma GeneChip® miRNA 4.0 array, para cada amostra e detectado com o conjugado Avidina-Peroxidase (*Avidin-PE*), que se liga ao RNA marcado com biotina com forte afinidade. Os cartuchos de *array* de miRNA foram então colocados em bandejas no forno de hibridização e incubados a 48°C com rotação de 60 rpm por 16 a 18 horas. Após a hibridização, cada *array* foi preenchido com tampão que permitiu atingir a temperatura ambiente antes da lavagem e da coloração. O procedimento de lavagem foi realizado na estação de fluídos. Os passos de lavagem e coloração foram realizados utilizando o roteiro de fluídos apropriado para os cartuchos. Os dados foram exportados para análises posteriores, que foram realizadas utilizando o programa Expression Console (Affymetrix/ Thermo Fisher Scientific) para compactação, normalização e controle de qualidade dos dados^{29-30, 29}.

Figura 2- Equipamento Affimetrix e chips usados no presente estudo.



Fonte: thermofisher.com

4.6. Análises computacionais

Para a predição de genes-alvo de miRNAs, utilizamos o miRDIP (<https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>)³⁰, uma ferramenta que inclui mais de 48,6 milhões de interações de genes alvo dos miRNAs. No mirDIP foi utilizado um critério de filtragem de “very high” (top 1%) para a identificação de genes regulados pelos miRNAs identificados. Para a identificação de vias, foi utilizada a ferramenta EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)³¹⁻³³.

4.7. Análise bibliográfica

Foi realizada adicionalmente uma pesquisa bibliográfica de todos os miRNAs e genes alvo identificados neste estudo, com o intuito de detectar potenciais comparações. A estratégia de busca usada foi: “GENE” AND “chronic venous disease”, tendo sido pesquisada na base de dados PubMed, WOS, LILACS, Scielo e nas citações dos artigos

relacionados.

4.8. Análise histológica

As análises histopatológicas foram feitas no Laboratório VascPath em Berna, Suíça, pelo Professor Jan Janzen, com o qual temos um acordo de cooperação científica internacional. Os blocos de parafina com as amostras foram enviados para este Laboratório, onde foram feitos os cortes e coloração das lâminas. As lâminas foram avaliadas pelo Prof. Jan Janzen através de protocolos apropriados^{28,34}. As camadas íntima, média e adventícia foram escrutinadas para espessamentos, alterações morfológicas, inflamatórias e estruturais de seus tecidos constituintes.

4.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Transcriptome Analysis Console (TAC) (Affymetrix/Thermo Fisher Scientific), o qual possui ferramentas de análise para testes de qualidade da hibridização (QC), normalização dos dados com sondas controle incluídas no array em plataforma integrada ao LIMMA (Linear Models for Microarray Data) package³⁵. Com este programa foi feita também a identificação de miRNAs com expressão diferencial entre amostras clínicas *versus* controles (níveis de expressão ≥ 2 para mais e para menos). Foi utilizado um valor de $p < 0,05$. Aplicamos a correção de Bonferroni para seleção de miRNAs estatisticamente significativos ($p < 0,000019$), bem como a correção de FDR (0,01 ou 1%) para diminuir a probabilidade de resultados falso-positivos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aprovado pelo CEP - FMB-Unesp (**Anexo 1**).

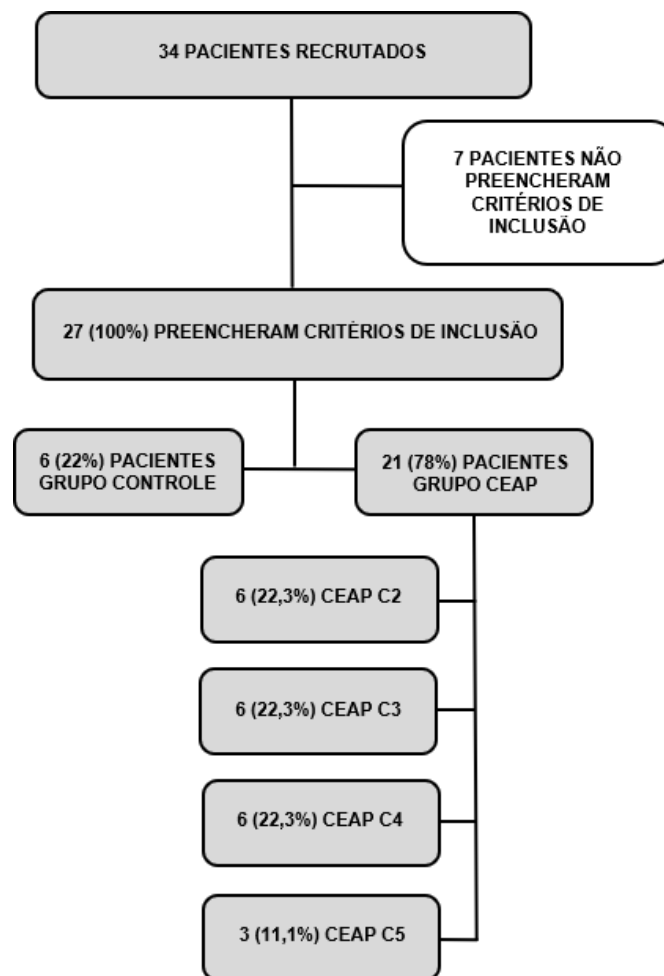
5 Resultados

5.1. Dados demográficos e anatomopatológicos

Foram coletadas 34 amostras de veias de pacientes com varizes de membros inferiores, sendo selecionados 28 de pacientes com DVC e 6 controles (**Tabela 1**). Os casos CEAP- C5 foram menos frequentemente operados, por conta da alternativa de

tratamento por meio de esclerosantes; além disso, devido ao cancelamento de todas as cirurgias eletivas pela pandemia da COVID-19, não foi possível coletar todas as amostras CEAP 5, e ficaram faltando 3 amostras para completar o grupo inicialmente proposto. Apesar do avanço da vacinação durante a pandemia de Covid-19, persistiu o cancelamento de cirurgias eletivas no período de coleta. A **Figura 3** elenca os critérios de inclusão, exclusão e amostras selecionadas para o estudo.

Figura 3 - Critérios de inclusão, exclusão e amostras selecionadas para estudo.



Fonte: material elaborado pelo autor

Tabela 1- Dados clínicos dos pacientes selecionados para expressão de miRNA.

Característica	Casos de Varizes (n=21)	Casos Controle (n=6)
Idade	29-68	48-78
Sexo: Masculino	0 (0%)	4 (67%)
Sexo: Feminino	21 (100%)	2 (33%)
Etnia: Branco	20 (95%)	6 (100%)
Etnia: Negro	1 (5%)	0 (0%)
CEAP II	6	NA
CEAP III	6	NA
CEAP IV	6	NA
CEAP V	3	NA
Controle	NA	6
Sinais e Sintomas		
Dor em Peso	13 (62%)	NA
Dor de Outro Tipo	10 (48%)	NA
Câimbras	13 (62%)	NA
Pernas Inquietas	4 (19%)	NA
Edema	8 (38%)	NA
Formigamento	4 (19%)	NA
Úlceras	2 (10%)	NA
Pigmentação	5 (24%)	NA
Dermatoesclerose	2 (10%)	NA
Flebites	1 (5%)	NA
Eczemas	2 (10%)	NA
Erisipelas	1 (5%)	NA

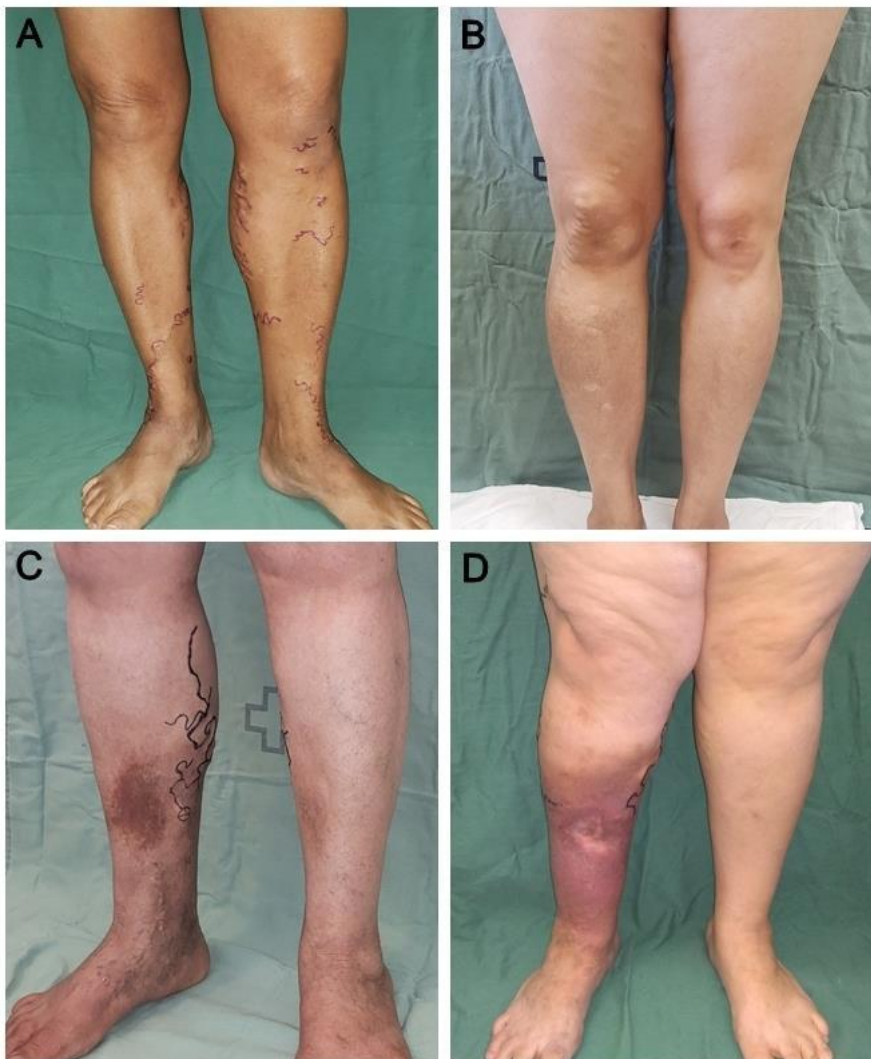
Nevos/Aranhas Vasculares	3 (14%)	NA
Telangiectasias	6 (29%)	NA
Veias Reticulares (1-3mm)	8 (38%)	NA
Corona Flebectasia	0 (0%)	NA
Prejuízo Estético	7 (33%)	NA
Prurido	2 (10%)	NA
Antecedentes Pessoais		
Obesidade	4 (19%)	NA
Histórico Familiar de Varizes	16 (76%)	NA
Multigesta (>2)	10 (48%)	NA
TEP Prévio	1 (5%)	NA
HAS	6 (29%)	NA
DM com Insulina	3 (14%)	NA
DM sem insulina	4 (19%)	NA
Doenças Cardiovasculares	0 (0%)	NA
Cirurgia Prévia de Varizes	5 (24%)	NA
Tromboflebitis Prévias	3 (14%)	NA
Terapia Hormonal	4 (19%)	NA
Posição Laboral: Sentada	1 (5%)	NA
Posição Laboral: Em pé	9 (43%)	NA
Doença Renal Crônica (DRC)	0 (0%)	NA

Dislipidemia	6 (29%)	5 (83%)
Tabagismo	2 (10%)	NA
Tabagismo Prévio	2 (10%)	NA
Sedentarismo	3 (14%)	NA
Atividade Física Moderada/Intensa	2 (10%)	NA

5.2. Perfil de expressão dos miRNAs

Das 34 amostras coletadas (28 com DVC e 6 controles) foram selecionadas 27 para análise do perfil de miRNA por conta da limitação do número de kits, ou seja, foram selecionadas aquelas como maiores alterações da parede vascular (Figura 4). Para analisar o perfil de microRNAs nos pacientes com doença venosa crônica e com varizes, essas 27 amostras foram divididas em 3 grupos: Grupo Controle (CEAP 0; n=6), Grupo 1 (CEAP 2 e CEAP 3; n=12), Grupo 2 (CEAP 4 e CEAP 5; n=9). A Figura 4 mostra exemplos das classes CEAP.

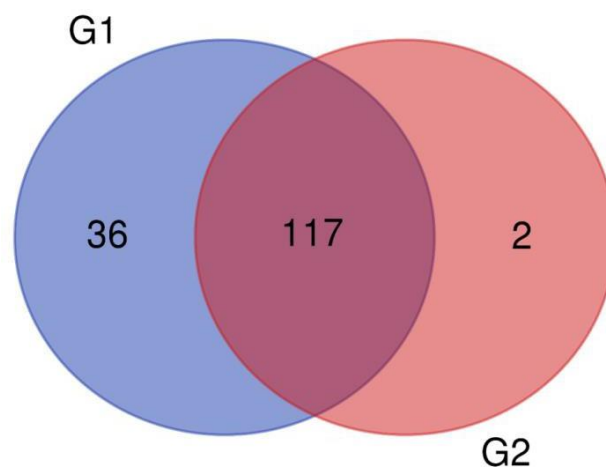
Figura 4- Exemplos da classificação CEAP: A=C2; B= C3; C= C4 e D=C5.



Fonte: Fotos de pacientes feitas pelo autor e/ou colaboradores deste estudo.

Utilizando um nível de alteração (*Fold change*, FC) ≥ 2 e ≤ -2 e Razão Falso Negativo (*False Discovery Rate*, FDR) $\leq 0,0001$, foram identificados 153 miRNAs com expressão diferencial significativa no Grupo 1 vs. Controle (19 com diminuição e 134 com aumento de expressão) (**Tabela Suplementar 1**) e 120 miRNAs com expressão diferencial significativa no Grupo 2 vs. controle (14 com diminuição e 106 com aumento de expressão) (**Tabela Suplementar 2**). Comparando os miRNAs com FC ≥ 2 e ≤ -2 e FDR $\leq 0,0001$, nos Grupos 1 e 2, identificamos que 117 deles eram comuns entre os grupos; 36 exclusivos do Grupo 1 (G1) e 2 exclusivos do Grupo 2 (G2) (**Figura 5 e Tabela 2**).

Figura 5. Diagrama de Venn, construído com a ferramenta Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos nos casos comparados com o controle. Foram identificados 117 miRNAs comuns aos Grupos 1 e 2; 36 miRNAs exclusivos do grupo 1 e 2 miRNAs exclusivos do grupo 2.



Fonte: material elaborado pelo autor

Tabela 2. miRNAs diferencialmente expressos nos grupos 1 (G1 - CEAP 2 e CEAP 3) e grupo 2 (G2 - CEAP 4 e CEAP 5). FC: *Fold change*; FDR: *False Discovery Rate*.

miRNAs exclusivos G1		
miRNA ID	Log2FC	FDR P-val
hsa-miR-6750-5p	-3,2	4,42E-06
hsa-mir-550a-1	-3,1	1,59E-05
hsa-mir-550a-2	-3,1	1,59E-05
hsa-mir-550a-3	-3,1	1,59E-05
hsa-miR-4706	-2,0	4,52E-06
hsa-miR-187-5p	2,1	0,0001
hsa-miR-6753-5p	2,1	2,73E-05
hsa-miR-373-5p	2,2	0,0001
hsa-miR-6511a-5p	2,3	6,39E-05
hsa-mir-423	2,3	2,59E-05
hsa-miR-6815-5p	2,3	1,01E-05
hsa-miR-4322	2,4	1,30E-05
hsa-miR-7106-5p	2,4	6,92E-05
hsa-miR-7112-5p	2,4	6,18E-05
hsa-miR-1914-3p	2,5	4,42E-05
hsa-miR-6845-5p	2,5	1,54E-06
hsa-miR-6785-5p	2,5	2,83E-05
hsa-miR-501-3p	2,6	2,89E-05
hsa-miR-4665-5p	2,6	3,22E-05
hsa-miR-6820-5p	2,6	5,82E-05
hsa-miR-500a-3p	2,7	6,37E-05
hsa-miR-504-3p	2,7	4,00E-05
hsa-miR-6860	2,8	2,72E-05
hsa-miR-6824-5p	2,9	1,26E-05
hsa-miR-532-5p	2,9	4,56E-05
hsa-miR-6795-5p	3,0	0,0001
hsa-miR-6781-5p	3,1	2,97E-06
hsa-miR-3177-3p	3,1	0,0001
hsa-miR-5739	3,1	3,80E-05

hsa-miR-6746-5p	3,2	2,91E-05
hsa-miR-425-5p	3,3	0,0001
hsa-miR-4442	3,4	0,0001
hsa-miR-4667-5p	3,7	3,03E-06
hsa-miR-5195-3p	3,8	5,82E-05
hsa-let-7b-5p	3,9	6,97E-05
hsa-miR-133a-3p	3,9	0,0001
hsa-miR-423-5p	5,1	3,01E-06
miRNAs exclusivos G2		
miRNA ID	Lo2FC	FDR P-val
hsa-miR-7977	6,9	9,77E-05
hsa-miR-23a-5p	3,5	6,43E-05

5.3. Análises computacionais

Conforme descrito em Métodos, foi usada a ferramenta miRDIP (<https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) para predição de genes-alvo dos miRNAs. Essa análise foi focada nos miRNAs identificados como exclusivos de cada grupo (G1 e G2).

5.4. Resultados: Grupo 1 versus controle

Um total de 5999 interações desses 36 miRNAs foi detectado exclusivamente desregulado em amostras do Grupo 1 (**Tabela Suplementar 3**). Foram utilizados estes genes para a predição de vias de sinalização utilizando a ferramenta Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>).

Na **Tabela 3**, são destacadas as vias moleculares enriquecidas, identificadas pelo KEGG Pathways 2021³⁶ e WikiPathways 2021³⁷ e que apresentam um potencial papel na patogênese de doenças vasculares.

Tabela 3. Vias moleculares enriquecidas, para os genes-alvo dos miRNAs com expressão diferencial exclusiva no Grupo 1 (CEAP 2 e 3).

Via molecular	p-valor	genes-alvo dos miRNAs que participam da via	Fonte
Wnt signaling	0.00007970	<i>CAMK2B;GSK3B;CTBP2;CHD8;PRICKLE1;NKD1;LRP6;PPP3CA;MAPK9;MAPK8;CCND2;FRAT2;PPP3R2;PPP3CC;DVL3;CAMK2G;WNT4;PRKCG;TCF7L2;FZD3;TCF7L1;PRKCB;WNT3A;CSNK1A1;WNT7B;CTNNBIP1;NFATC3;KREMEN1;AXIN1;NFATC2;PRKCA;NFATC1;CSNK1E;SENP2;DKK2;NFATC4;VANGL1;PLCB3;VANGL2;DAAM1;DAAM2;NOTUM;PLCB1</i>	<i>WikiPathway, 2021</i>
VEGF signaling pathway	0.0005478	<i>PRKCG; MAP2K1; PRKCB; SPHK2; SRC; PXN; PIK3R3; NFATC2 ;PRKCA; PIK3R2; PTGS2; PTK2; MAPK13; CDC42; PPP3CA; NRAS; PPP3CC; PPP3R2; MAPKAPK3; AKT2; MAPKAPK2; MAPK1 ;KRAS; MAPK3</i>	<i>KEGG, 2021</i>

5.5. Resultados: Grupo 2 versus controle

Da mesma maneira, a predição de genes-alvo regulados pelos miRNAs exclusivos do G2 foi realizada pelo miRDIP (**Tabela Suplementar 4**). Esta análise resultou em 353 genes regulados por 2 miRNAs. Os 353 genes foram utilizados em análise *in silico* na base de dados EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) para identificação de vias moleculares.

Foram destacadas na **Tabela 4**, as vias moleculares enriquecidas, identificadas pelo KEGG³⁶ e Pathways 2021³⁷ e que apresentariam um potencial papel na patogênese de doenças vasculares, salientando que os dois miRNAs identificados no grupo 2 já foram correlacionados com arteriosclerose e doenças cardiovasculares.

Tabela 4. Vias moleculares enriquecidas, para os genes-alvo dos miRNAs com expressão diferencial exclusiva no Grupo 2 (CEAP 4 e 5).

Via molecular	p-valor	genes-alvo do miR-23a-5p	genes-alvo do miR-7977	Fonte
RAS signaling	0.0115	<i>CDC42; NGFR; GRIN2A; GNGT2; CSF1; KSR1; IGF2; FGFR1</i>	<i>KDR; PLCG2; ABL2; STK4; PLA2G6; IGF1R</i>	<i>KEGG, 2021</i>
RAS signaling	0.0162	<i>CDC42; NGFR; GRIN2A; GNGT2; KSR1; FGFR1</i>	<i>KDR; PLCG2; ABL2; STK4; PLA2G6; IGF1R</i>	<i>WikiPathway, 2021</i>

Após a análise dos resultados completos, a pesquisa dos achados relevantes ao grupo 2 é apresentada abaixo, com doença grave (CEAP 4 e 5), por se tratar do grupo mais relevante e de interesse à identificação futura de biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos.

5.6. Resultados da Pesquisa bibliográfica

Foram pesquisados por meio de busca em bases de dados PubMed e citações de artigos, todos os 153 miRNAs com expressão diferencial significativa no Grupo 1 e os 120 miRNAs com expressão diferencial significativa no Grupo 2, com especial atenção para artigos relacionados à doença venosa crônica. Na **Tabela 5** foram destacados miRNAs do Grupo 1 encontrados em comum na literatura. Na **Tabela 6** foram destacados miRNAs do Grupo 2 encontrados em comum na literatura.

Tabela 5. Comparação entre os miRNA do Grupo 1 expressos no presente trabalho com os observados em estudos prévios da literatura. (Setas para cima= superexpressão e seta para baixo= subexpressão)

Grupo 1			
Referências	miRNA	Literatura	Nossos dados
Cui e cols.	miR-127-3p	↑	↑
Zalewski e cols.	miR-92a-3p	↓	↑
Zalewski e cols.	miR-25-3p	↓	↑

Tabela 6. Comparação entre os miRNA do Grupo 2 desregulados no presente trabalho com os observados em estudos prévios da literatura. (Setas para cima= superexpressão e seta para baixo= subexpressão)

Grupo 2			
Referências	miRNA	Literatura	Nossos dados
Cui e cols.	miR-127-3p	↑	↑
Zalewski e cols.	miR-92a-3p	↓	↑
Zalewski e cols.	miR-25-3p	↓	↑

Na **Tabela 7** destacamos os genes mais frequentemente mencionados na literatura em pesquisas envolvendo a doença venosa crônica.

Tabela 7. Genes alvo dos miRNAs desregulados e possível relação com doenças cardio-vasculares.

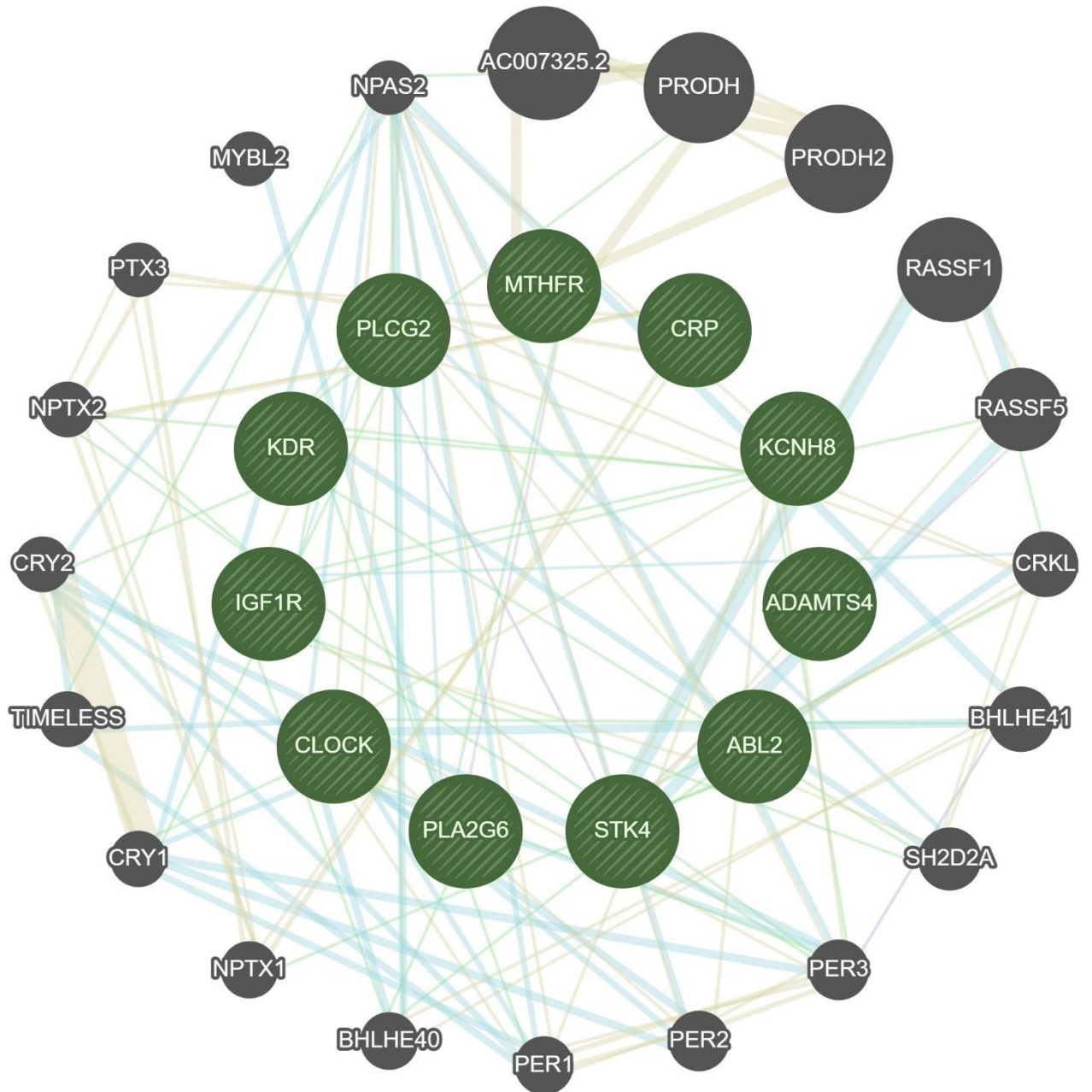
Gene	Função	miRNA
ADAM10	Metaloproteinase responsável pela clivagem de proteínas, como TNF-alfa e E-caderina. Está relacionada a angiogênese.	miR-23a-5p
CLOCK	Regula expressão de genes relacionados a ciclo circadiano. (Achado inédito, mas sem aparente relação com doença cardiovascular)	miR-7977
CRP	Produção de marcador inflamatório C-reativa. É frequentemente usada como indicador de risco de doenças cardiovasculares, como AVC e infarto.	miR-7977
KCNH8	Codifica para uma proteína (HERG1) que é importante na regulação do ritmo cardíaco e pode estar associada a distúrbios cardíacos.	miR-7977
ADAMTS4	Metaloproteinase responsável pela quebra de moléculas de proteoglicanos presentes na matriz extracelular.	miR-7977

KDR	Codifica para o receptor de tirosina quinase VEGFR2, proteína encontrada em células endoteliais dos vasos sanguíneos. VEGFR2 é importante na angiogênese e é ativada pela ligação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).	miR-7977
MTHFR	Supressão da atividade de protease em tecidos submetidos à remodelação da matriz extracelular. Produção da enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase, responsável pelo metabolismo do ácido fólico e homocisteína. Importante no metabolismo de neurotransmissores como serotonina, dopamina e adrenalina. Hiperhomocistemia está relacionada com trombose venosa	miR-7977 miR-4665-5p miR-6511a-5p miR-6750-5p miR-7112-5p miR-6820-5p
MMP2	Degradação de colágeno tipo IV, um dos principais componentes da matriz extracelular (MEC).	miR-6753-5p
TIMP2	Degradação de colágeno tipo IV, um dos principais componentes da matriz extracelular (MEC).	miR-6753-5p
CASP3	Ativação de apoptose celular.	let-7b-5p

IGF1	Diferenciação, proliferação e crescimento celular. Sua expressão alterada parece estar relacionada a DVC.	miR-425-5p miR-4665-5p miR-6750-5p
SMAD2	Atua com mediador de sinais do Fator Transformador de Crescimento Beta TGF- β . Regula proliferação, apoptose e diferenciação celular.	miR-532-5p miR-3177-3p miR-6815-5p

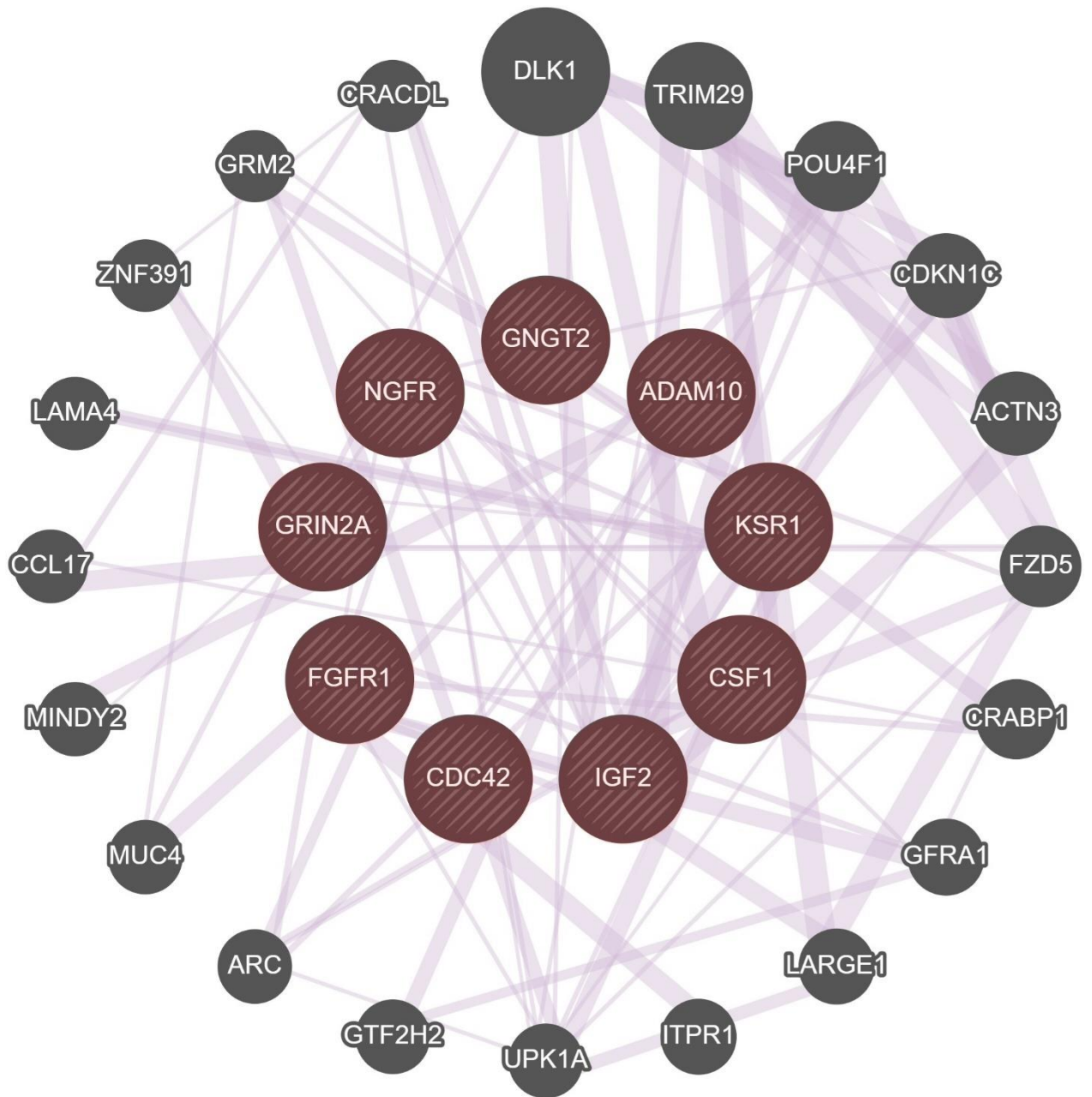
Em síntese, as redes de interação (Figura 6 e 7) demonstram os principais genes alvo de cada miRNA exclusivo do Grupo 2. Nesta rede é possível visualizar os genes enriquecidos para a via de sinalização RAS e também os genes mais citados na literatura que implicam em processos importantes na fisiopatologia vascular.

Figura 6- Rede de interação do miR-7977 e seus genes alvo.



Fonte: Genemania (<https://genemania.org>)

Figura 7- Rede de interação do miR-23a-5p e seus genes alvo.



Fonte: Genemania (<https://genemania.org>)

5.7. Histologia

Para análise da parede venosa foram estudadas todas as 34 amostras coletadas e também, em separado, as amostras selecionadas (n=27). Os resultados estão nas Figuras 8 e 9. Na Figura 10 são mostrados exemplos de alterações histológicas típicas de cada grupo.

Figura 8 – Espessamento médio dos vasos (μm) de todas as amostras (n=34) de acordo com os grupos e análise estatística. A espessura total no Grupo 2 foi significativamente maior que no Grupo 1 e sua razão foi menor que o controle.

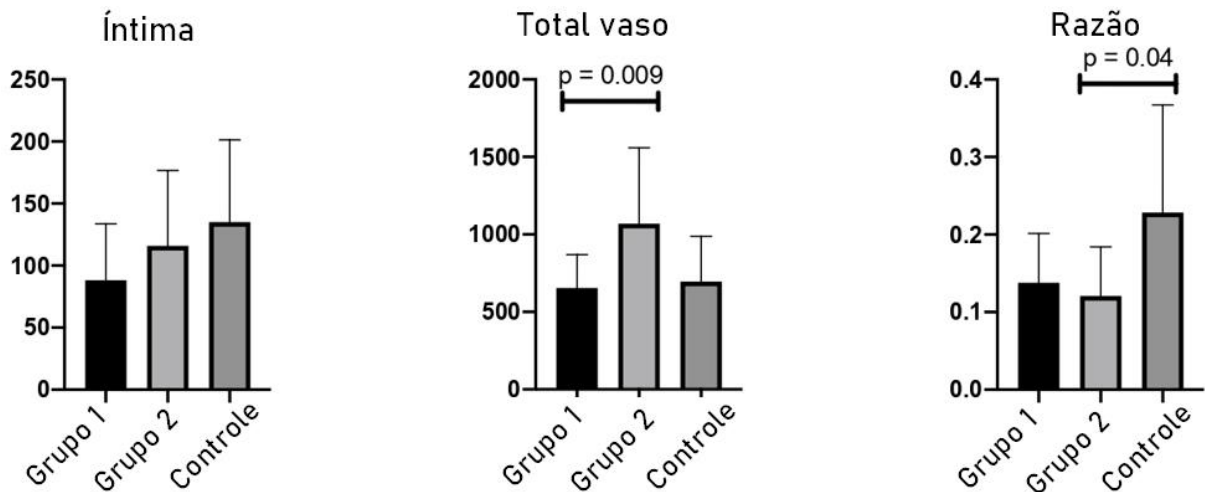


Figura 9 - Espessamento médio dos vasos (μm) de todas as amostras ($n=27$) de acordo com os grupos e análise estatística. A espessura total no Grupo 2 foi significativamente maior que no Grupo 1 e sua razão foi menor que o controle.

AMOSTRAS SELECIONADAS PARA O PROJETO (N=27)

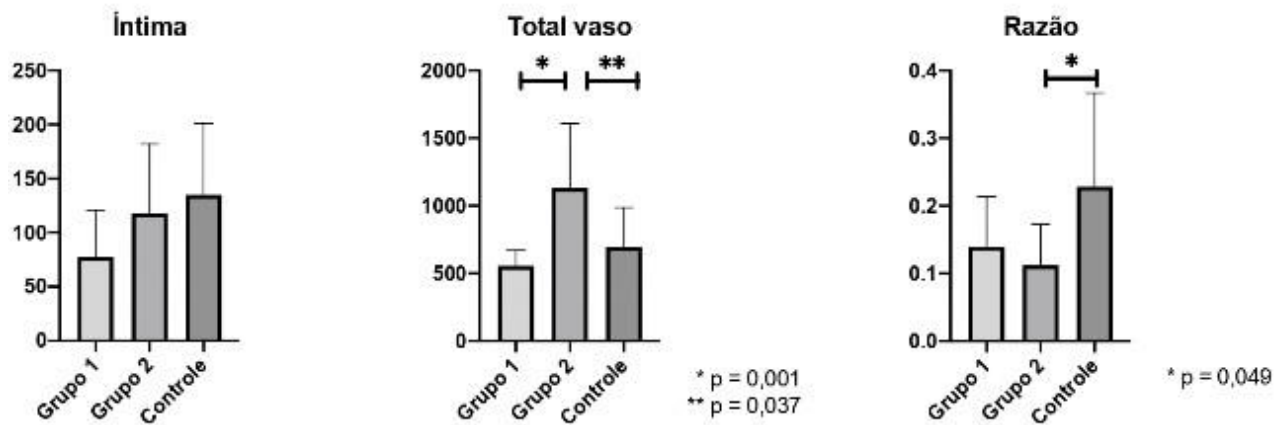
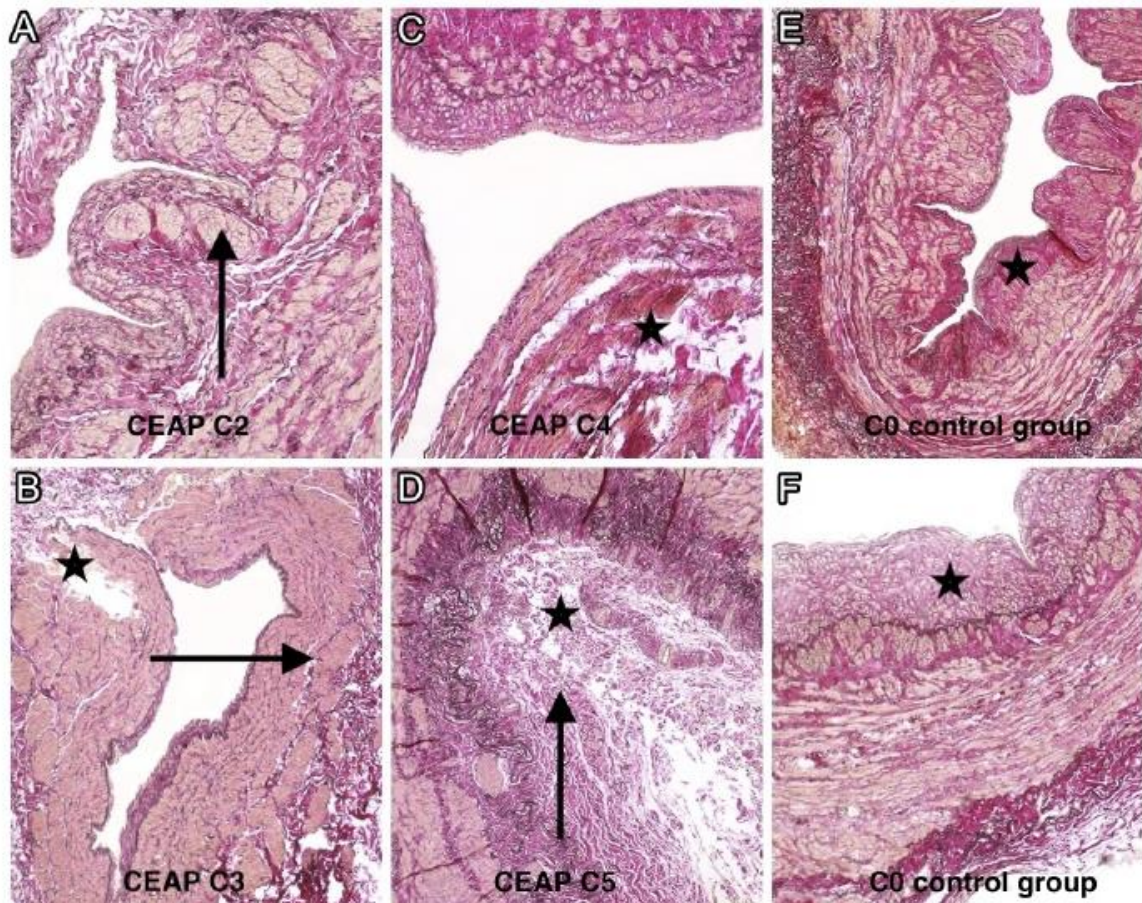


Figura 10- Alterações histomorfológicas das veias safenas de acordo com a classificação CEAP. (A=CEAP C2; B= CEAP C3; C= CEAP C4; D= CEAP C5; E e F = C0 -controles). **A-** Hiperplasia nodular leiomiomatosa (seta), coloração de Elastica-van-Gieson, 100 x. **B-** Edema na túnica média e adventícia (seta/asterisco), coloração de Elastica-van-Gieson, 40 x. **C-** Edema na túnica adventícia (asterisco), coloração de Elastica-van-Gieson, 100 x. **D-** Membrana elástica interna fragmentada e fibrose subendotelial (seta/asterisco), coloração de Elastica-van-Gieson, 100 x. **E, F** – Controle grupo com espessamento intimal (asterisco). Coloração Elastica-van-Gieson, 100 x.



Discussão

Foi utilizada a ferramenta GeneChip® miRNA Array para a quantificação da expressão de miRNAs. Essa plataforma contém sondas específicas para todos os 2.588 miRNAs mapeados no genoma humano e catalogados no miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Essa plataforma incorpora sondas de miRNAs endógenos, que funcionam como controles internos e são essenciais para a normalização dos resultados de expressão de miRNAs. As vantagens desta tecnologia são: (1) Cobertura abrangente dos miRNAs mapeados no genoma humano, sendo capaz de interrogar todas as sequências de miRNAs maduros anotadas no miRBase (<https://www.mirbase.org/>); (2) Não requer grande quantidade de amostra (necessário apenas 13 ng de RNA total) e é otimizada para amostras fixadas em formalina; (3) O software acoplado permite análises de normalização e análises com correção estatística; (4) A experiência em outros estudos têm mostrado resultados consistentes e validados²⁹.

A variação nas técnicas laboratoriais e classificação clínica dos pacientes diversa ou por vezes inexistente nos estudos prévios, poderiam explicar a diversidade e resultados de regulação por vezes antagônicos encontrados pelos diferentes autores prévios.

Em relação à fisiopatologia da DVC, a predisposição individual às doenças venosas é influenciada por fatores genéticos e ambientais. Força de cisalhamento baixa e alterações da integridade endotelial, desencadeiam a expressão de moléculas de adesão e ativação leucócitos-endotelial, que iniciam uma resposta inflamatória caracterizada pela expressão de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz. Esses processos contribuem para a alteração na estrutura da parede venosa e para a disfunção das válvulas, o que leva à dilatação e insuficiência venosa, hipertensão venosa e perturbação da microcirculação. O estado inflamatório persistente, associado à atividade das metaloproteinases de matriz e à expressão de citocinas, causa dano tecidual e degradação, resultando em alterações na pele e no aparecimento de úlceras venosas na perna³⁸ (Figura 11).

Figura 11- Fisiopatologia da doença venosa crônica.



Fonte: material elaborado pelo autor

As análises histológicas do presente trabalho mostraram espessuras significativamente maiores das veias safenas do Grupo 2 (CEAP C4+C5). Esses resultados mostraram que quanto mais graves as apresentações clínicas, mais pronunciado foi o espessamento que ocorreu na parede das veias. A apresentação clínica no Grupo 2 foi também correlacionada com alterações histológicas mais graves, além do espessamento. O espessamento da parede de venosa poderia estar associado a interação entre a hipertensão venosa crônica e alterações inflamatórias presentes nas formas mais graves da DVC.

A fibrose (espessamento da parede vascular) resulta de um desequilíbrio entre deposição e remoção de componentes da matriz extracelular, sendo sua degradação mediada por metaloproteinasas, e estas são reguladas por inibidores fisiológicos

(TIMPs)³⁸. As metaloproteinases da matriz (MMPs) consistem em mais de vinte tipos e são classificadas em quatro grupos distintos. O primeiro grupo é constituído pelas collagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), que têm a capacidade de degradar os colágenos fibrilares I, II e III. O segundo grupo inclui as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), que degradam o colágeno amorfo e a fibronectina. O terceiro grupo é composto pelas estromalinas (MMP-3, MMP-7 e MMP-10), que são capazes de degradar componentes da membrana basal, tais como colágeno IV e V, laminina e outras proteínas como a fibronectina. Por último, as metaloproteinases do tipo membrana (MT-MMP) degradam o colágeno I e III, fibronectina, laminina, entactina/nidogênio, tenascina e perlecan, além de ativarem outras MMPs³⁸⁻⁴⁰. A interferência de miRNAs (miR-6753-5p e miR-6795-5p) desregulados neste processo poderia resultar na desregulação de MMPs e TIMPs³⁸.

Na fisiopatologia da DVC, a MMP2 e TIMP2 são comumente citados como reguladores de manutenção e degradação da parede vascular⁴¹. O estudo de Serralheiro et al⁴². demonstrou que a expressão genética de TIMP2 (inibidor da metaloproteinase) estava diminuída em pacientes com DVC, quando comparada com amostras controle. A expressão de MMP2 estava aumentada em estágios avançados de varizes⁴². Nossos resultados mostraram os miRNA's (miR-6753-5p e miR-6795-5p) estariam relacionados com MMP2 e TIMP2 pois regulariam a expressão em genes com alvo nas MMP's e TIMP's, em estágios iniciais da DVC.

Além disso, os microRNAs são conhecidos por regularem a expressão genética pós-transcricionalmente¹⁸. Dentre os miRNAs identificados como reguladores das MMPs e TIMPs na DVC em nossos dados, o miR-6753-5p regula positivamente a expressão de MMP2, enquanto o miR-6795-5p regula negativamente a expressão de TIMP2. Como resultado disso, a desregulação da expressão de MMP2 e TIMP2 aparentam ser fundamental na degradação e deposição de fibras de colágeno e elastina na parede venosa³⁹.

Uma variedade de citocinas oriundas de leucócitos levaria à formação de ambientes pró-inflamatório e inflamatório e ativaria as MMP . Esses ambientes contribuiriam também na dilatação do músculo liso, relaxamento, proteólise e a formação de úlcera venosa.⁴³ A perda da integridade da parede venosa e das válvulas estariam intimamente relacionadas a modificações em células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos, que resultam em uma hipertensão venosa ambulatória crônica^{38,44,45}.

Na fisiopatologia da DVC são achados importantes: o aumento dos mediadores inflamatórios (ICAM1, fator de von Willebrand) e fatores de crescimento (TGF b1, FGF-b), além de metaloproteinases da matrix²⁷. No presente estudo, foram encontrados miRNA's e genes regulados por eles envolvendo estes marcadores (Tabela 6).

A resposta inflamatória na DVC é mediada pela ação coordenada de vários tipos de células, incluindo leucócitos como macrófagos, monócitos, linfócitos T e mastócitos, juntamente com moléculas sinalizadoras como moduladores inflamatórios e quimiocinas. A resposta inflamatória também é caracterizada pela expressão de citocinas, ativação de vias reguladoras, fatores de crescimento e atividade de metaloproteinases, que desempenham um papel importante na perpetuação da inflamação e nas alterações patológicas observadas na DVC⁴⁵. Alguns dos achados do presente trabalho, mostraram relação de miRNAs com alguns destes fatores, favorecendo este processo (Tabela 6).

A cascata inflamatória da DVC acarreta na sintetização e proliferação de citocinas, como por exemplo o fator transformador de crescimento β 1 (TGF- β 1), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1) e muitos outros, provenientes do processo inflamatório⁴⁵. Ortega et al⁴⁶. demonstraram uma série de alterações na expressão de citocinas inflamatórias em pacientes que desenvolveram DVC durante o período gestacional, destacando-se: IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 e TNF- α . No presente estudo observou-se que as citocinas IL-10 e IL-13 apareceram expressas conjuntamente ao miRNA let-7b-5p em casos menos graves de varizes. O miRNA let-7b-5p já foi relacionado anteriormente como um importante regulador da produção de macrófagos e um biomarcador potencial em insuficiências cardíacas⁴⁶⁻⁴⁸.

Nas análises de enriquecimento de vias moleculares do presente estudo, as vias de sinalização Wnt e VEGF foram encontradas associadas a miRNAs desregulados nas amostras G1. A via Wnt, juntamente com as vias de sinalização de cálcio e MAPK, foram relacionadas à patogênese da doença venosa crônica⁴⁹ quando regulados por fragmentos de RNA derivados de tRNA(tRFs). A via VEGF exibe propriedades angiogênicas e atua como um fator de proteção vascular ao aumentar a síntese de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), além de manter vias de sinalização antiapoptóticas para promover a integridade do endotélio. Essas ações resultam na inibição da proliferação de células musculares lisas e no aumento das propriedades anti-inflamatórias e antitrombogênicas do endotélio⁵⁰.

Os miRNAs exercem um papel fundamental na regulação de genes alvo específicos de DVC, incluindo varizes⁵¹. O aumento e a diminuição da expressão desses miRNAs podem ser um fator decisivo no desenvolvimento e progressão da doença, impactando em sua gravidade e evolução clínica⁵².

Por meio de aplicação da análise de Clusters hierárquico⁵³, Cui et al.¹⁸ identificaram um aumento significativo da expressão do miR-127-3p, miR-34a, miR-376a, miR-376c e miR-654-3p em pacientes com graus avançados de DVC. Outros miRNAs (miR-34a, miR-155 e miR-202) com expressão aumentada foram descobertos por outros autores, através da técnica de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa)⁵⁴, os quais atribuíram um papel primordial desses miRNA's em processos biológicos e doenças vasculares, sendo possível também em DVC⁵⁵. Confrontando esses dados com os do presente estudo, demonstrou-se igualmente um aumento da expressão do miR-127-3p em todos os estágios clínicos de DVC dos pacientes.

Utilizando banco de dados integrativo (mirDIP)³¹, detectou-se genes alvo do miR-7977 presentes em G2 (CEAP C4 e C5). Os genes KCNHR8, ADAMTS-4, KDR, MTHFR foram identificados como possíveis fatores de relevância no processo de desenvolvimento de varizes.⁵⁶⁻⁵⁷ Esses genes podem desempenhar papéis críticos em diferentes etapas do complexo mecanismo fisiopatológico que leva à formação de varizes^{56,57}. ADAMTS-4, junto a MMP-1, MMP-8 e ADAM-17 parecem estar envolvidas no retardo da cicatrização de feridas e em complicações irreversíveis de DVC⁵¹. Estudos recentes mostraram que o polimorfismo do gene MTHFR estaria potencialmente associado com trombose venosa superficial^{57,58}. Ekim et al.⁵⁸ investigaram amostras de 98 pacientes com varizes por meio de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), e concluíram que a coexistência do polimorfismo de MTHFR, com o polimorfismo de Fator V de Leiden (FVL) e mutação do gene da protrombina (G20210A), poderiam influenciar o desenvolvimento de trombose venosa profunda em tais pacientes. Em nossos dados, a enzima MTHFR esteve relacionada como gene alvo dos miRNAs (miR-4665-5p, miR-6511a-5p, miR-6750-5p, miR-6746-5p, miR-7112-5p, miR-6820-5p) no G1 e o miRNA (miR-7977) no G2. Entre os genes mais estudados em DVC, a mutação do gene FOXC2 foi frequentemente associada à insuficiência das válvulas primárias em membros inferiores, considerando sua importância para o desenvolvimento e/ou manutenção das mesmas⁵⁹.

Limitações e pontos fortes

Constituem limitações do presente estudo a amostra reduzida e, em parte pela pandemia de Covid-19, o número de kits disponíveis. Além disso, deve-se mencionar certa heterogeneidade das amostras com predominância de pacientes do sexo feminino para DVC e masculino para os controles. Finalmente, a falta de validação dos resultados o qual deverá ser objeto de estudos posteriores. Como pontos fortes destacam-se o uso de técnica moderna e atual de detecção dos miRNAs, abrangência de tipos clínicos, englobando pacientes com graus desde mais leves até mais graves da doença, bem como uso de grupo controle. Finalmente ressalte-se a comprovação da doença venosa através do estudo histológico das veias.

Conclusão

Em conclusão, os miRNAs desregulados encontrados exclusivamente na doença menos avançada podem influenciar na modulação da expressão de genes envolvidos na regulação da matriz extracelular, em processos inflamatórios e em vias de sinalização implicadas na remodelação vascular. Além disso, os miRNAs desregulados encontrados exclusivamente na doença mais avançada foram associados um papel na regulação de genes enriquecidos para uma via de sinalização relacionada a proliferação, sobrevivência e crescimento celular.

Referências

1. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, et al. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol* 2005;15:175-84.
2. Abbade LP, Lastoria S. Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment. *Int J Dermatol* 2005;44:449-56.
3. Lim CS, Davies AH. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg* 2009;96:1231-42.
4. Maffei FH, Magaldi C, Pinho SZ, et al. Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: prevalence among 1755 inhabitants of a country town. *Int J Epidemiol* 1986;15:210-7.
5. Abbade LP, Lastoria S, de Almeida Rollo H, et al. A sociodemographic, clinical study of patients with venous ulcer. *Int J Dermatol* 2005;44:989-92.
6. de Araujo IC, Yoshida WB, Abbade LP, et al. The pernicious cycle of VLUs in Brazil: epidemiology, pathogeny and auxiliary healing methods. *J Wound Care* 2013;22:186-8, 190, 192-3.
7. de Souza EM, Yoshida WB, de Melo VA, et al. Ulcer due to chronic venous disease: a sociodemographic study in northeastern Brazil. *Ann Vasc Surg* 2013;27:571-6.
8. Abbade LP, Lastoria S, Rollo Hde A. Venous ulcer: clinical characteristics and risk factors. *Int J Dermatol* 2011;50:405-11.
9. Valencia IC, Falabella A, Kirsner RS, et al. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:401-21; quiz 422-4.
10. Serra R, Buffone G, de Franciscis A, et al. A genetic study of chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg* 2012;26:636-42.
11. Krysa J, Jones GT, van Rij AM. Evidence for a genetic role in varicose veins and chronic venous insufficiency. *Phlebology* 2012;27:329-35.
12. Naoum JJ, Hunter GC. Pathogenesis of varicose veins and implications for clinical management. *Vascular* 2007;15:242-9.
13. Grant Y, Onida S, Davies A. Genetics in chronic venous disease. *Phlebology* 2017;32:3-5.
14. Anwar MA, Georgiadis KA, Shalhoub J, et al. A review of familial, genetic, and congenital aspects of primary varicose vein disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:460-6.
15. Gemmati D, Federici F, Catozzi L, et al. DNA-array of gene variants in venous leg ulcers: detection of prognostic indicators. *J Vasc Surg* 2009;50:1444-51.
16. Lee S, Lee W, Choe Y, et al. Gene expression profiles in varicose veins using complementary DNA microarray. *Dermatol Surg* 2005;31:391-5.
17. Bharath V, Kahn SR, Lazo-Langner A. Genetic polymorphisms of vein wall remodeling in chronic venous disease: a narrative and systematic review. *Blood* 2014;124:1242-50.
18. Cui C, Liu G, Huang Y, et al. MicroRNA profiling in great saphenous vein tissues of patients with chronic venous insufficiency. *Tohoku J Exp Med* 2012;228:341-50.
19. Anwar MA, Adesina-Georgiadis KN, Spagou K, et al. A comprehensive characterisation of the metabolic profile of varicose veins; implications in elaborating plausible cellular pathways for disease pathogenesis. *Sci Rep* 2017;7:2989.
20. Biranvand AS, Khosravi M, Esfandiari G, et al. Associations between miR-661, miR-1202, lncRNA-HOTAIR, lncRNA-GAS5 and MMP9 in differentiated M2-macrophages of patients with varicose veins. *Int Angiol* 2018;37:451-456.
21. Cao Y, Cao Z, Wang W, et al. MicroRNA199a5p regulates FOXC2 to control human vascular smooth muscle cell phenotypic switch. *Mol Med Rep* 2021;24.
22. Huang X, Liu Z, Shen L, et al. Augmentation of miR-202 in varicose veins modulates phenotypic transition of vascular smooth muscle cells by targeting proliferator-

- activated receptor-gamma coactivator-1alpha. *J Cell Biochem* 2019;120:10031-10042.
23. Bertoni N, Pereira LM, Severino FE, et al. Integrative meta-analysis identifies microRNA-regulated networks in infantile hemangioma. *BMC Med Genet* 2016;17:4.
 24. Hosin AA, Prasad A, Viiri LE, et al. MicroRNAs in atherosclerosis. *J Vasc Res* 2014;51:338-49.
 25. Zhi H, Wang L, Ma G, et al. Polymorphisms of miRNAs genes are associated with the risk and prognosis of coronary artery disease. *Clin Res Cardiol* 2012;101:289-96.
 26. Parizadeh SM, Ferns GA, Ghandehari M, et al. The diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in coronary artery disease: A novel approach to disease diagnosis of stable CAD and acute coronary syndrome. *J Cell Physiol* 2018;233:6418-6424.
 27. Dhanarak N, Kanchanabat B. Comparative histopathological study of the venous wall of chronic venous insufficiency and varicose disease. *Phlebology* 2016;31:649-53.
 28. Porciunculla MM, Leiderman DBD, Altenfeder R, et al. Clinical, ultrasonographic and histological findings in varicose vein surgery. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2018;64:729-735.
 29. Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;98:12-23.
 30. Huang H-Y, Lin Y-C-D, Li J, et al. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database. *Nucleic acids research* 2020;48:D148-D154. *Nucleic Acids Res*
 31. Tokar T, Pastrello C, Rossos AE, et al. mirDIP 4.1—integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic acids research* 2018;46:D360- D370. *Nucleic Acids Res*
 32. Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics* 2013;14:1-14.
 33. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research* 2016;44:W90-W97. *Nucleic Acids Res.* 2016
 34. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, et al. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Current protocols* 2021;1:e90. *Curr Protoc.* 2021
 35. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research* 2015;43:e47-e47. *Nucleic Acids Res.*
 36. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Sci* 2021.
 37. Correto é *Protein Sci.* 2022;31:47-53
 38. Kutmon M, Riutta A, Nunes N, et al. WikiPathways: capturing the full diversity of pathway knowledge. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D488-94.
 39. NUNES L de C. Avaliação Da Expressão de Metaloproteinases, TIMP-1 e Da Esclerose Vasculare Nas Endometrites Crônicas Das Éguas. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu; 2006.
 40. Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999 Dec;1(15):1349-65.
 41. Goffin F, Munaut C, Frankenne F, et al. Expression Pattern of Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases in Cycling Human Endometrium1. *Biol Reprod.* 2003;69(3):976-984.
 42. Huh S, Choi HH, Kim H kee, Kim SJ. The Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in the Wall of Great Saphenous Vein in Patients with Varicose Veins. *J Korean Surg Soc.* 2010;79(Suppl 1):S16.
 43. Serralheiro P, Novais A, Cairrão E, Maia C, Costa Almeida C, Verde I. Variability of MMP/TIMP and TGF-β1 Receptors throughout the Clinical Progression of Chronic

- Venous Disease. *Int J Mol Sci.* 2017;19(1):6.
44. Raffetto JD, Ligi D, Maniscalco R, Khalil RA, Mannello F. Why Venous Leg Ulcers Have Difficulty Healing: Overview on Pathophysiology, Clinical Consequences, and Treatment. *J Clin Med.* 2020;10(1):29.
 45. Raffetto JD. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. *Surg Clin North Am.* 2018;98(2):337-347. doi:10.1016/j.suc.2017.11.002.
 46. Ortega MA, Gómez-Lahoz AM, Sánchez-Trujillo L, et al. Chronic Venous Disease during Pregnancy Causes a Systematic Increase in Maternal and Fetal Proinflammatory Markers. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16):8976. doi:10.3390/ijms23168976.
 47. Nematian SE, Mamillapalli R, Kadakia TS, Majidi Zolbin M, Moustafa S, Taylor HS. Systemic Inflammation Induced by microRNAs: Endometriosis-Derived Alterations in Circulating microRNA 125b-5p and Let-7b-5p Regulate Macrophage Cytokine Production. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(1):64-74.
 48. Marques FZ, Vizi D, Khammy O, Mariani JA, Kaye DM. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(8):1000-1008.
 49. Yu C, Wang X, Hong Y, et al. Expression profile of tRNA-derived fragments and their potential roles in human varicose veins. *Mol Med Rep.* 2019;20(4):3191-3201.
 50. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1512-1520.
 51. Serra R, Gallelli L, Butrico L, et al. From varices to venous ulceration: the story of chronic venous disease described by metalloproteinases. *Int Wound J.* 2017;14(1):233-240.
 52. Zalewski D, Ruszel K, Stępniewski A, et al. miRNA Regulatory Networks Associated with Peripheral Vascular Diseases. *J Clin Med.* 2022;11(12):3470.
 53. Petegrosso R, Li Z, Kuang R. Machine learning and statistical methods for clustering single-cell RNA-sequencing data. *Brief Bioinform.* 2020;21(4):1209-1223.
 54. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179-e179.
 55. Raucci A, Macrì F, Castiglione S, Badi I, Vinci MC, Zuccolo E. MicroRNA-34a: the bad guy in age-related vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(23):7355-7378.
 56. Ellinghaus E, Ellinghaus D, Krusche P, et al. Genome-wide association analysis for chronic venous disease identifies EFEMP1 and KCNH8 as susceptibility loci. *Sci Rep.* 2017;7(1):45652.
 57. Shadrina AS, Smetanina MA, Sokolova EA, et al. Allele rs2010963 C of the VEGFA gene is associated with the decreased risk of primary varicose veins in ethnic Russians. *Phleb J Venous Dis.* 2018;33(1):27-35.
 58. Fernández-Peralta AM, González-Aguilera JJ. MTHFR polymorphisms in primary varicose vein disorder. *EBioMedicine.* 2015;2(2):104.
 59. Ekim M, Ekim H. Incidence of the MTHFR polymorphisms in patients with varicose veins. *Hippokratia.* 2017;21(4):175-179.
 60. Mellor RH, Brice G, Stanton AWB, et al. Mutations in FOXC2 Are Strongly Associated With Primary Valve Failure in Veins of the Lower Limb. *Circulation.* 2007;115(14):1912-1920.

APÊNDICES

APÊNCICE A – Tabela Suplementar 1

Transcript ID	G1 Avg (log2)	C Avg (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val
hsa-miR-4487	4,91	11,2	-77,86	1,79E-13	1,49E-10
hsa-mir-6722	5,48	8,19	-6,54	3,56E-11	8,43E-09
hsa-miR-6732-5p	8,2	11,05	-7,22	5,45E-11	1,25E-08
hsa-miR-6846-5p	7,22	10,29	-8,38	5,24E-10	7,33E-08
hsa-miR-378h	4,44	8,17	-13,25	1,36E-09	1,58E-07
hsa-mir-320e	6,8	9,98	-9,04	2,04E-09	2,18E-07
hsa-miR-4508	9,29	11,3	-4,04	3,36E-09	3,18E-07
hsa-miR-4743-5p	9,05	11,76	-6,56	6,20E-09	5,55E-07
hsa-miR-1226-5p	5,61	8,09	-5,56	7,00E-09	6,04E-07
hsa-miR-8075	7,13	10,67	-11,67	1,13E-08	8,99E-07
hsa-miR-6750-5p	3,33	6,49	-8,89	7,07E-08	4,42E-06
hsa-miR-4706	5,94	7,93	-3,98	7,30E-08	4,52E-06
hsa-miR-455-3p	6,77	8,73	-3,88	2,06E-07	1,13E-05
hsa-miR-7110-5p	6,32	8,46	-4,4	2,56E-07	1,36E-05
hsa-mir-550a-1	3,35	6,46	-8,62	3,21E-07	1,59E-05
hsa-mir-550a-2	3,35	6,46	-8,62	3,21E-07	1,59E-05
hsa-mir-550a-3	3,35	6,46	-8,62	3,21E-07	1,59E-05
hsa-miR-4492	6,71	8,82	-4,31	3,28E-07	1,61E-05
hsa-miR-6511b-5p	5,14	7,11	-3,94	1,33E-06	5,18E-05
hsa-miR-222-3p	7,82	1,03	110,42	5,45E-18	3,62E-14
hsa-miR-195-5p	7,76	1,19	95,15	5,44E-16	1,80E-12
hsa-miR-140-3p	8,12	2,16	62,54	1,03E-14	1,70E-11
hsa-miR-99a-5p	8,21	1,58	99,2	8,94E-15	1,70E-11
hsa-miR-181a-5p	6,52	1,35	35,88	4,62E-14	5,36E-11
hsa-miR-28-3p	6,81	1,01	55,82	4,85E-14	5,36E-11
hsa-miR-103a-3p	8,86	2,37	90,37	1,03E-13	9,79E-11
hsa-miR-342-3p	8,13	2,06	67,27	2,07E-13	1,53E-10
hsa-miR-151a-5p	8,38	2,22	71,18	2,52E-13	1,67E-10
hsa-miR-378a-3p	7,56	1,93	49,56	2,86E-13	1,72E-10
hsa-miR-143-5p	7	0,88	69,52	3,27E-13	1,81E-10
hsa-miR-22-3p	7,74	1,32	85,45	3,55E-13	1,81E-10
hsa-miR-93-5p	6,62	0,85	54,44	4,81E-13	2,28E-10
hsa-miR-361-5p	8,27	1,53	107,27	7,47E-13	3,30E-10
hsa-miR-199a-3p	7,7	0,94	109	1,48E-12	5,77E-10
hsa-miR-199b-3p	7,7	0,94	109	1,48E-12	5,77E-10
hsa-miR-27b-3p	8,88	2	117,74	2,91E-12	1,01E-09
hsa-miR-100-5p	9,09	1,53	188,42	2,87E-12	1,01E-09

hsa-miR-15b-5p	6,69	1,52	35,96	3,80E-12	1,26E-09
hsa-miR-4788	5,79	0,97	28,09	5,27E-12	1,66E-09
hsa-miR-28-5p	6,49	1,15	40,34	9,09E-12	2,74E-09
hsa-miR-3124-5p	4,31	1,13	9,03	1,10E-11	3,17E-09
hsa-miR-132-3p	5,48	1,2	19,45	1,34E-11	3,69E-09
hsa-miR-221-3p	6,86	1,39	44,19	1,46E-11	3,87E-09
hsa-miR-107	8,34	2,66	51,3	2,12E-11	5,40E-09
hsa-let-7i-5p	8,81	1,49	159,83	2,91E-11	7,15E-09
hsa-miR-30d-5p	6,05	1,38	25,39	5,73E-11	1,27E-08
hsa-miR-23b-5p	5,06	1,05	16,1	1,01E-10	2,15E-08
hsa-miR-193a-5p	7,44	3,17	19,32	1,33E-10	2,65E-08
hsa-miR-574-3p	7,28	2,16	34,63	1,40E-10	2,65E-08
hsa-miR-17-5p	6,37	1,26	34,67	1,40E-10	2,65E-08
hsa-let-7g-5p	7,63	1,19	86,86	1,35E-10	2,65E-08
hsa-miR-193b-5p	5,34	1,46	14,68	1,56E-10	2,79E-08
hsa-miR-25-3p	5,75	0,7	32,98	1,52E-10	2,79E-08
hsa-let-7e-5p	11,01	2,38	396,57	1,97E-10	3,43E-08
hsa-miR-6889-5p	5,09	1,65	10,81	2,77E-10	4,71E-08
hsa-miR-181b-5p	5,59	1,42	17,99	3,52E-10	5,83E-08
hsa-miR-126-3p	7,05	2,06	31,79	3,71E-10	5,98E-08
hsa-miR-27a-3p	7,93	2,45	44,57	3,78E-10	5,98E-08
hsa-miR-185-5p	5,96	1,62	20,24	4,81E-10	7,08E-08
hsa-miR-152-3p	5,94	1,11	28,55	4,74E-10	7,08E-08
hsa-miR-139-3p	4,09	1,19	7,44	5,30E-10	7,33E-08
hsa-miR-30a-5p	5,65	1,15	22,61	5,26E-10	7,33E-08
hsa-miR-744-5p	7,11	3,03	16,93	7,26E-10	9,63E-08
hsa-miR-3195	6,55	1,37	36,3	7,78E-10	9,93E-08
hsa-miR-4634	5,46	2,62	7,17	8,66E-10	1,08E-07
hsa-miR-99b-5p	9,12	1,48	199,13	8,81E-10	1,08E-07
hsa-miR-497-5p	5,57	0,99	24,06	1,28E-09	1,54E-07
hsa-miR-125a-5p	10,46	1,99	355,62	1,35E-09	1,58E-07
hsa-miR-423-3p	5,72	0,99	26,61	1,53E-09	1,75E-07
hsa-miR-92b-3p	5,3	1,19	17,34	1,62E-09	1,82E-07
hsa-miR-30c-5p	7,53	0,99	93,01	1,97E-09	2,14E-07
hsa-miR-191-5p	8,8	3,33	44,14	2,14E-09	2,25E-07
hsa-miR-130a-3p	5,48	0,91	23,77	2,27E-09	2,35E-07
hsa-miR-2110	4	1,12	7,33	2,59E-09	2,53E-07
hsa-miR-1307-3p	5,32	2,92	5,27	2,75E-09	2,65E-07
hsa-miR-106a-5p	6,27	1,47	27,91	3,72E-09	3,48E-07
hsa-miR-505-5p	4,08	1,06	8,08	5,74E-09	5,21E-07
hsa-miR-92a-3p	9,63	2,95	102,44	6,52E-09	5,77E-07
hsa-miR-378i	4,11	1,33	6,85	7,01E-09	6,04E-07
hsa-miR-139-5p	6,1	1,11	31,72	7,25E-09	6,16E-07

hsa-miR-29a-3p	6,67	1,38	39,11	1,01E-08	8,50E-07
hsa-miR-675-5p	3,87	0,98	7,4	1,09E-08	8,90E-07
hsa-miR-23a-3p	11,92	5,26	100,67	1,09E-08	8,90E-07
hsa-miR-214-3p	9,57	3,23	81,15	1,14E-08	8,99E-07
hsa-let-7d-5p	10,31	3,42	118,85	1,14E-08	8,99E-07
hsa-miR-23b-3p	12,27	5,07	147,77	1,20E-08	9,36E-07
hsa-miR-125a-3p	4,65	1,05	12,08	1,41E-08	1,09E-06
hsa-miR-16-5p	8,51	3,43	33,91	1,44E-08	1,10E-06
hsa-miR-3135b	7,11	2,71	21,21	1,55E-08	1,15E-06
hsa-miR-193b-3p	6,38	1,49	29,53	1,77E-08	1,31E-06
hsa-miR-6723-5p	4,67	1,5	8,98	1,97E-08	1,43E-06
hsa-miR-6845-5p	3,7	1,22	5,57	2,14E-08	1,54E-06
hsa-miR-151b	6,01	1,01	31,88	3,01E-08	2,12E-06
hsa-miR-125b-5p	11,35	4,76	96,9	3,40E-08	2,35E-06
hsa-miR-30a-3p	5,68	1,03	25,1	3,70E-08	2,53E-06
hsa-mir-361	5,84	3,41	5,41	4,24E-08	2,87E-06
hsa-miR-5572	4,97	1,91	8,38	4,29E-08	2,87E-06
hsa-miR-6781-5p	6,12	3,07	8,29	4,48E-08	2,97E-06
hsa-miR-423-5p	8,13	3,08	33,16	4,58E-08	3,01E-06
hsa-miR-4667-5p	5,13	1,41	13,14	4,66E-08	3,03E-06
hsa-miR-26a-5p	11,2	4,77	86,39	5,40E-08	3,48E-06
hsa-miR-6861-5p	4,66	1,24	10,71	6,27E-08	3,96E-06
hsa-miR-652-3p	4,52	1,1	10,7	7,87E-08	4,83E-06
hsa-miR-378c	5,12	1,01	17,23	1,03E-07	6,22E-06
hsa-miR-3188	5,53	1,57	15,62	1,52E-07	8,72E-06
hsa-miR-151a-3p	5,21	1,19	16,17	1,69E-07	9,58E-06
hsa-miR-6815-5p	3,33	1,03	4,91	1,80E-07	1,01E-05
hsa-miR-324-5p	4,88	1,62	9,63	1,84E-07	1,02E-05
hsa-miR-6824-5p	5,17	2,29	7,37	2,34E-07	1,26E-05
hsa-miR-24-3p	10,86	7,14	13,15	2,33E-07	1,26E-05
hsa-miR-4322	4,13	1,77	5,15	2,43E-07	1,30E-05
hsa-miR-5100	11,38	3,35	262,18	2,60E-07	1,37E-05
hsa-miR-199a-5p	6,15	1,22	30,53	2,67E-07	1,38E-05
hsa-miR-210-3p	3,98	1,13	7,24	2,93E-07	1,49E-05
hsa-miR-1185-2-3p	4,87	1,79	8,46	3,20E-07	1,59E-05
hsa-miR-145-5p	13,77	10,3	11,12	3,65E-07	1,75E-05
hsa-miR-1185-1-3p	4,9	1,47	10,79	5,10E-07	2,39E-05
hsa-let-7a-5p	11,94	5,21	105,97	5,23E-07	2,39E-05
hsa-mir-423	3,8	1,51	4,88	5,69E-07	2,59E-05
hsa-miR-6860	3,83	1	7,11	6,28E-07	2,72E-05
hsa-miR-143-3p	11,31	7,58	13,21	6,03E-07	2,72E-05
hsa-miR-6753-5p	4,11	1,99	4,35	6,34E-07	2,73E-05
hsa-miR-6785-5p	4,55	2,02	5,76	6,61E-07	2,83E-05

hsa-miR-501-3p	3,7	1,1	6,03	6,79E-07	2,89E-05
hsa-miR-6746-5p	4,46	1,3	8,93	6,92E-07	2,91E-05
hsa-miR-4665-5p	5,27	2,65	6,12	7,73E-07	3,22E-05
hsa-miR-5739	6,02	2,88	8,83	9,35E-07	3,80E-05
hsa-miR-504-3p	5,16	2,46	6,47	9,96E-07	4,00E-05
hsa-miR-1914-3p	3,43	0,97	5,52	1,11E-06	4,42E-05
hsa-miR-532-5p	3,91	0,97	7,69	1,15E-06	4,56E-05
hsa-let-7c-5p	12,79	7,29	45,02	1,35E-06	5,22E-05
hsa-miR-3187-3p	4,42	1,37	8,29	1,43E-06	5,48E-05
hsa-miR-6820-5p	4,85	2,21	6,22	1,55E-06	5,82E-05
hsa-miR-5195-3p	5,24	1,42	14,19	1,55E-06	5,82E-05
hsa-miR-10b-5p	5,13	0,97	17,83	1,63E-06	6,03E-05
hsa-miR-7112-5p	3,7	1,29	5,33	1,69E-06	6,18E-05
hsa-miR-500a-3p	3,91	1,23	6,41	1,75E-06	6,37E-05
hsa-miR-6511a-5p	4,65	2,37	4,87	1,76E-06	6,39E-05
hsa-miR-7106-5p	4,2	1,81	5,24	1,94E-06	6,92E-05
hsa-let-7b-5p	13,24	9,35	14,85	1,97E-06	6,97E-05
hsa-miR-127-3p	3,67	0,74	7,64	2,04E-06	7,20E-05
hsa-miR-3176	5,76	1,08	25,59	2,32E-06	8,14E-05
hsa-miR-187-5p	3,24	1,18	4,17	3,15E-06	0,0001
hsa-miR-373-5p	3,5	1,26	4,73	3,69E-06	0,0001
hsa-miR-29b-2-5p	3,67	1,23	5,44	3,97E-06	0,0001
hsa-miR-6795-5p	4,35	1,34	8,07	3,43E-06	0,0001
hsa-miR-3177-3p	4,28	1,2	8,44	4,41E-06	0,0001
hsa-miR-615-3p	4,12	0,88	9,44	4,56E-06	0,0001
hsa-miR-425-5p	4,38	1,04	10,13	4,90E-06	0,0001
hsa-miR-20a-5p	4,57	1,18	10,49	4,08E-06	0,0001
hsa-miR-4442	4,5	1,09	10,6	3,24E-06	0,0001
hsa-miR-133a-3p	4,88	0,95	15,21	3,84E-06	0,0001
hsa-miR-7975	7,73	1	106,45	4,45E-06	0,0001

APÊNDICE B – Tabela Suplementar 2

Transcript ID	G2 Avg (log2)	C Avg (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val
hsa-miR-222-3p	7,58	1,03	93,87	1,66E-17	1,10E-13
hsa-miR-195-5p	7,93	1,19	106,73	2,78E-15	9,23E-12
hsa-miR-99a-5p	7,93	1,58	81,46	2,01E-14	4,45E-11
hsa-miR-140-3p	8,12	2,16	62,16	4,61E-14	7,64E-11
hsa-miR-28-3p	6,7	1,01	51,55	8,14E-14	1,08E-10
hsa-miR-181a-5p	6,5	1,35	35,48	2,61E-13	2,47E-10
hsa-miR-143-5p	7,12	0,88	75,65	2,46E-13	2,47E-10
hsa-miR-342-3p	7,94	2,06	59,07	3,43E-13	2,84E-10
hsa-miR-4487	4,91	11,2	77,88	5,09E-13	3,75E-10
hsa-miR-103a-3p	8,91	2,37	93,05	6,82E-13	4,52E-10
hsa-miR-22-3p	8,01	1,32	103,26	1,01E-12	6,08E-10
hsa-miR-378a-3p	7,59	1,93	50,67	1,14E-12	6,16E-10
hsa-miR-151a-5p	8,02	2,22	55,69	1,21E-12	6,16E-10
hsa-miR-361-5p	8,1	1,53	95,15	1,64E-12	7,79E-10
hsa-miR-199a-3p	7,91	0,94	125,77	2,65E-12	1,10E-09
hsa-miR-199b-3p	7,91	0,94	125,77	2,65E-12	1,10E-09
hsa-miR-93-5p	6,12	0,85	38,69	6,72E-12	2,47E-09
hsa-miR-100-5p	9,08	1,53	187,95	6,50E-12	2,47E-09
hsa-miR-27b-3p	9,07	2	133,81	1,04E-11	3,63E-09
hsa-miR-28-5p	6,19	1,15	32,92	2,44E-11	8,09E-09
hsa-miR-221-3p	6,87	1,39	44,57	2,66E-11	8,41E-09
hsa-miR-15b-5p	6,31	1,52	27,54	3,98E-11	1,20E-08
hsa-miR-30d-5p	5,9	1,38	22,86	8,24E-11	2,37E-08
hsa-let-7i-5p	9	1,49	181,33	9,04E-11	2,50E-08
hsa-miR-107	8,37	2,66	52,27	9,86E-11	2,62E-08
hsa-let-7g-5p	7,58	1,19	83,46	1,68E-10	4,29E-08
hsa-miR-132-3p	5,02	1,2	14,15	1,82E-10	4,31E-08
hsa-miR-23b-5p	4,89	1,05	14,31	1,82E-10	4,31E-08
hsa-miR-193a-5p	7,58	3,17	21,18	2,00E-10	4,58E-08
hsa-miR-574-3p	7,04	2,16	29,42	3,07E-10	6,79E-08
hsa-miR-25-3p	5,63	0,7	30,51	3,81E-10	8,14E-08
hsa-miR-30a-5p	5,84	1,15	25,81	5,65E-10	1,17E-07
hsa-miR-3124-5p	3,66	1,13	5,77	6,62E-10	1,30E-07
hsa-miR-27a-3p	8,08	2,45	49,54	6,86E-10	1,30E-07
hsa-let-7e-5p	11	2,38	392,09	6,76E-10	1,30E-07
hsa-miR-4788	5,2	0,97	18,64	7,74E-10	1,39E-07
hsa-miR-30c-5p	7,29	0,99	78,94	7,60E-10	1,39E-07
hsa-miR-139-3p	3,86	1,19	6,36	8,06E-10	1,41E-07
hsa-miR-17-5p	5,88	1,26	24,6	1,00E-09	1,67E-07

hsa-miR-3195	6,86	1,37	44,73	1,22E-09	1,97E-07
hsa-miR-152-3p	6,01	1,11	29,91	1,39E-09	2,20E-07
hsa-miR-744-5p	7,19	3,03	17,93	1,51E-09	2,33E-07
hsa-miR-423-3p	5,75	0,99	27,17	1,61E-09	2,42E-07
hsa-miR-126-3p	7,06	2,06	32,05	1,65E-09	2,43E-07
hsa-miR-99b-5p	8,79	1,48	158,46	1,71E-09	2,44E-07
hsa-miR-125a-5p	10,73	1,99	429,83	1,73E-09	2,44E-07
hsa-miR-181b-5p	5,17	1,42	13,44	2,21E-09	2,99E-07
hsa-miR-193b-5p	5,35	1,46	14,83	2,59E-09	3,43E-07
hsa-miR-130a-3p	5,21	0,91	19,69	2,71E-09	3,53E-07
hsa-miR-6732-5p	8,59	11,05	5,49	5,01E-09	6,27E-07
hsa-mir-6722	6,1	8,19	4,25	5,31E-09	6,35E-07
hsa-miR-6889-5p	4,94	1,65	9,79	5,22E-09	6,35E-07
hsa-miR-92b-3p	5,41	1,19	18,6	5,36E-09	6,35E-07
hsa-miR-4508	9,3	11,3	4,02	7,21E-09	8,24E-07
hsa-miR-4634	5,61	2,62	7,96	9,05E-09	1,02E-06
hsa-miR-191-5p	8,21	3,33	29,52	1,01E-08	1,09E-06
hsa-miR-505-5p	3,71	1,06	6,28	1,57E-08	1,67E-06
hsa-miR-6846-5p	7,59	10,29	6,52	1,83E-08	1,90E-06
hsa-miR-92a-3p	9,42	2,95	88,56	1,81E-08	1,90E-06
hsa-miR-30a-3p	5,53	1,03	22,58	2,14E-08	2,18E-06
hsa-miR-185-5p	5,71	1,62	17,02	2,49E-08	2,46E-06
hsa-miR-193b-3p	6,29	1,49	27,93	2,46E-08	2,46E-06
hsa-miR-1307-3p	4,98	2,92	4,16	2,74E-08	2,59E-06
hsa-miR-2110	3,94	1,12	7,07	2,71E-08	2,59E-06
hsa-miR-497-5p	5,64	0,99	25,19	3,02E-08	2,82E-06
hsa-let-7d-5p	10,4	3,42	126,56	3,20E-08	2,94E-06
hsa-miR-139-5p	5,22	1,11	17,3	3,39E-08	3,08E-06
hsa-miR-23a-3p	11,82	5,26	93,82	3,56E-08	3,19E-06
hsa-miR-106a-5p	6,12	1,47	25,16	3,66E-08	3,24E-06
hsa-miR-378h	4,81	8,17	10,27	3,83E-08	3,34E-06
hsa-miR-3135b	7,27	2,71	23,67	3,99E-08	3,39E-06
hsa-miR-214-3p	9,5	3,23	77,01	3,96E-08	3,39E-06
hsa-miR-125b-5p	11,31	4,76	93,93	4,62E-08	3,78E-06
hsa-mir-361	5,74	3,41	5,03	4,98E-08	3,79E-06
hsa-miR-23b-3p	12,2	5,07	139,88	4,75E-08	3,79E-06
hsa-miR-29a-3p	6,53	1,38	35,59	5,51E-08	4,16E-06
hsa-miR-378i	3,89	1,33	5,87	6,76E-08	5,04E-06
hsa-miR-7110-5p	6,08	8,46	5,19	7,05E-08	5,13E-06
hsa-miR-1226-5p	5,93	8,09	4,45	7,23E-08	5,21E-06
hsa-miR-16-5p	8,49	3,43	33,29	8,24E-08	5,81E-06
hsa-miR-423-5p	8,3	3,08	37,3	1,12E-07	7,71E-06
hsa-miR-1185-2-3p	5,52	1,79	13,3	1,33E-07	8,58E-06

hsa-miR-199a-5p	6	1,22	27,45	1,38E-07	8,81E-06
hsa-miR-151b	5,72	1,01	26,08	1,42E-07	9,00E-06
hsa-miR-1185-1-3p	5,4	1,47	15,28	1,53E-07	9,34E-06
hsa-miR-4743-5p	9,53	11,76	4,68	1,70E-07	9,99E-06
hsa-miR-26a-5p	11,29	4,77	92,04	1,81E-07	1,05E-05
hsa-miR-4492	6,61	8,82	4,63	2,00E-07	1,15E-05
hsa-miR-5100	11,64	3,35	313,9	2,14E-07	1,21E-05
hsa-miR-378c	4,73	1,01	13,12	2,20E-07	1,23E-05
hsa-miR-652-3p	4,15	1,1	8,26	2,50E-07	1,39E-05
hsa-mir-320e	7,46	9,98	5,73	2,60E-07	1,41E-05
hsa-miR-125a-3p	4,38	1,05	10,03	2,83E-07	1,53E-05
hsa-miR-127-3p	4,14	0,74	10,55	2,91E-07	1,55E-05
hsa-miR-455-3p	6,52	8,73	4,63	4,62E-07	2,41E-05
hsa-miR-324-5p	4,44	1,62	7,08	5,15E-07	2,67E-05
hsa-miR-210-3p	4,17	1,13	8,22	5,40E-07	2,78E-05
hsa-miR-151a-3p	4,45	1,19	9,54	7,89E-07	3,96E-05
hsa-miR-10b-5p	4,9	0,97	15,27	8,26E-07	4,12E-05
hsa-miR-6723-5p	4,6	1,5	8,57	8,91E-07	4,31E-05
hsa-miR-3188	5,53	1,57	15,61	1,04E-06	4,98E-05
hsa-miR-675-5p	3,33	0,98	5,09	1,05E-06	5,03E-05
hsa-miR-8075	7,7	10,67	7,82	1,09E-06	5,16E-05
hsa-miR-7975	8,14	1	141,15	1,10E-06	5,16E-05
hsa-miR-5572	4,7	1,91	6,96	1,26E-06	5,64E-05
hsa-miR-145-5p	13,43	10,3	8,73	1,28E-06	5,64E-05
hsa-let-7a-5p	12,06	5,21	115,15	1,28E-06	5,64E-05
hsa-miR-24-3p	10,76	7,14	12,32	1,34E-06	5,83E-05
hsa-miR-23a-5p	4,7	1,24	10,97	1,48E-06	6,43E-05
hsa-miR-20a-5p	4,98	1,18	13,96	1,51E-06	6,48E-05
hsa-miR-29b-2-5p	3,92	1,23	6,46	1,66E-06	7,11E-05
hsa-miR-6511b-5p	5,12	7,11	3,98	1,75E-06	7,43E-05
hsa-miR-143-3p	11,31	7,58	13,2	2,25E-06	9,27E-05
hsa-miR-7977	9,55	2,7	115,97	2,39E-06	9,77E-05
hsa-miR-3187-3p	4,49	1,37	8,69	2,56E-06	0,0001
hsa-miR-6861-5p	4,44	1,24	9,23	3,62E-06	0,0001
hsa-miR-615-3p	4,54	0,88	12,6	3,60E-06	0,0001
hsa-miR-3176	5,1	1,08	16,16	3,45E-06	0,0001
hsa-let-7c-5p	12,82	7,29	46,16	3,83E-06	0,0001

APÊNDICE C – Tabelas Suplementares 3 e 4

Devido ao grande volume de dados, as tabelas suplementares 3 e 4 podem ser acessadas no seguinte link:

https://drive.google.com/drive/folders/1xgMM3gtduOyjZZUeleKdDS0-gSvFZwD1?usp=drive_link

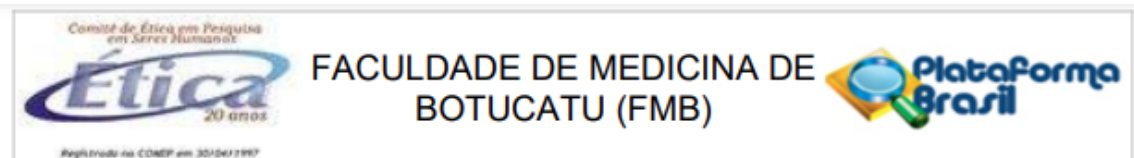
ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado aos participantes da pesquisa.

As Varizes de Membros Inferiores, por serem mais frequentes entre familiares, podem estar ligadas a fatores genéticos. De fato, já existem alguns estudos apontando determinados genes neste tipo de acometimento. A atividade dos genes, por outro lado, pode ser regulada por moléculas conhecidas como microRNAs, as quais geralmente reprimem genes associados à doença. O objetivo de nossa pesquisa será encontrar quais destes reguladores (microRNAs) estão associados a esta doença em comparação com veias normais sem varizes. Sendo assim solicitamos que nos seja permitido analisarmos um fragmento de sua veia safena retirada durante a cirurgia de varizes (em pacientes com varizes) ou de sobra de veia normal retirada para servir de ponte para cirurgia de restauração vascular (em pacientes com doença arterial e com dor de repouso, úlceras e gangrenas). Os resultados deste trabalho poderão trazer informações importantes para melhorar nosso conhecimento sobre o diagnóstico, para aprimorar o tratamento e identificar e prevenir chances de complicações desta doença. Os dados sobre sua doença, as veias e os resultados serão sigilosos e os resultados deverão ser publicados em revista médica de ampla divulgação.

ANEXO 2

Parecer Consubstanciado do CEP – Emenda de inclusão do discente como pesquisador no projeto.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Perfil de microRNA comparativo em pacientes com diferentes graus de insuficiência venosa crônica

Pesquisador: Winston Bonetti Yoshida

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 5

CAAE: 90125018.0.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia e Ortopedia

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO MESQUITA FILHO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.185.687

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda com a finalidade de inclusão do pesquisador Leonardo de Oliveira Pimentel, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional (CMT210081), mestrado acadêmico.

Resumo:

A ocorrência de varizes primárias pode estar associada à idade, obesidade, número de gravidezes e postura em pé. As varizes são mais prevalentes também em pacientes com antecedentes familiares de varizes, o que suscitou uma série de investigações sobre mecanismos genéticos em sua gênese e alterações na expressão de proteínas em pacientes com esta doença. Somente dois estudos avaliaram a influência da expressão de moléculas reguladoras da expressão gênica como os microRNAs (miRNAs) na fisiopatologia da mesma. Entretanto, estes estudos analisaram apenas pacientes com varizes moderadas (Classificação Clinical-Etiology-Anatomy-Pathophysiology, CEAP=4). Portanto, ainda há necessidade de ampliar o espectro de avaliação dessa patologia, incluindo-se pacientes com varizes de diferentes graus de gravidade da doença. Sendo assim, propomos determinar e comparar o perfil global de expressão de miRNAs em amostras de varizes de pacientes com insuficiência venosa crônica e com

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

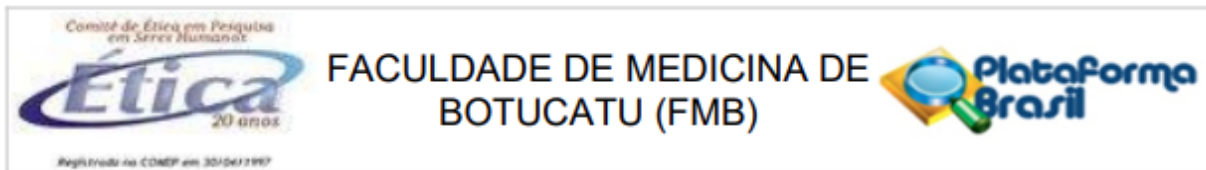
UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.185.687

varizes desde CEAP 3-4 até CEAP 5-6. Serão selecionados 10 pacientes (cinco com doença classificada em CEAP 3-4 e cinco CEAP 5-6) com varizes primárias, todos com diagnóstico clínico e de mapeamento duplex e submetidos à cirurgia de varizes. Desses pacientes, amostras de veias safenas magnas varicosas serão obtidas e utilizadas para análise da expressão de miRNAs. A expressão global de miRNAs será determinada utilizando a plataforma GeneChip microRNA array (Thermo Fisher Scientific). Os miRNAs com expressão anormal serão mapeados em vias moleculares potencialmente associadas ao desenvolvimento e progressão da doença. Estudos como esse podem ter importantes implicações futuras sobre o prognóstico e na identificação de novas estratégias de tratamento dos pacientes.

Hipótese:

Haveria vias moleculares reguladas por miRNAs e com papel na patogênese da doença. Adicionalmente, miRNAs e genes-alvo regulados pelos miRNAs podem representar biomarcadores com utilidade clínica no diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes acometidos por IVC

Metodologia Proposta:

Considerações Éticas: Esse projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu e será iniciado após a sua aprovação. **Pacientes e Amostras-** Tipo de estudo, critérios de inclusão e de exclusão: Propomos realizar um estudo transversal para avaliação do perfil global de expressão de miRNAs em tecido varicoso de pacientes diagnosticados com varizes primárias (diagnóstico clínico e por meio do exame de ultrassom - mapeamento dúplex). Todos os pacientes serão recrutados no Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Serão incluídos pacientes do sexo feminino (devido a maior prevalência da doença em mulheres e para a obtenção de grupos homogêneos de estudo), com etiologia primária das varizes, anatomia envolvendo veias superficiais, em especial a veia safena magna e veias perfurantes, e somente refluxo na classificação fisiopatológica. Serão excluídos pacientes menores que 18 anos, que tenham realizado cirurgias prévias, com diagnóstico de flebites, trombose venosa profunda, etiologia congênita ou secundária das varizes, envolvimento de

veias profundas, obstrução na fisiopatologia, e doenças inflamatórias, infecções graves, celulites, linfangites, ou doenças crônicas associadas, em uso de medicações perenes para tratamento da IVC. Na classificação CEAP 6 as úlceras venosas deverão estar livre de infecção ativa. Grupos de estudo As pacientes serão divididas em 2 grupos de 5 pacientes cada, de acordo com a

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

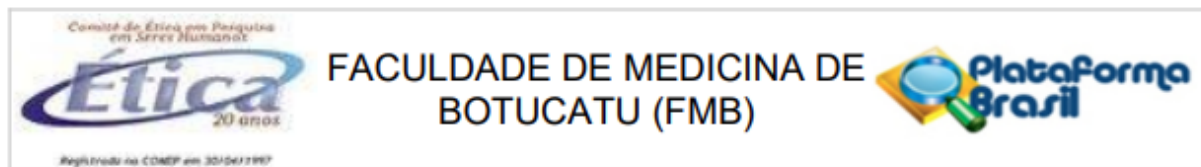
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.185.687

classificação CEAP: Grupo 1- CEAP 3 e 4; Grupo 2- CEAP 5 e 6. Um grupo de 5 pacientes sem doença varicosa servirá de controle. As pacientes dos três grupos (1, 2 e controle) serão pareadas por idade. O tamanho da amostra de cada grupo foi estimado tendo por base o único estudo sobre miRNA em IVC14, no qual uma amostra de 5 pacientes por grupo foi suficiente para tal. Dados demográficos das pacientes serão compilados, incluindo idade, raça, CEAP completo, histórico familiar de doença varicosa, atividade física, tipo de trabalho, número de partos, uso de meia elástica e índice de massa corporal (IMC). Resultados de exames laboratoriais de rotina para as respectivas cirurgias serão também compilados. Serão feitas fotografias dos membros inferiores acometidos com câmera fotográfica profissional. Coleta das amostras/histologia As porções mais varicosas das veias safenas magnas das pacientes com varizes serão colhidas logo após a fleboextração das mesmas durante a cirurgia de varizes. As veias safenas magnas das pacientes utilizadas no grupo controle serão obtidas somente de sobras (quando houver) dessas veias durante cirurgias de enxertos para reconstrução arterial. As amostras de veias serão lavadas em salina até completa eliminação de resíduos de sangue na luz e superfície das mesmas, imediatamente colocadas em criotubos, identificadas com códigos numéricos e armazenadas em freezer a -80°C . Amostras de cada espécimen serão fixadas em formol neutro a 10% e enviadas para exame histológico, utilizando as colorações HE, Mallory, Verhoeff-Van Gieson e tricromio de Masson. As avaliações histológicas serão feitas no Laboratório Vasc-Path (Berna- Suíça), sob supervisão do Patologista Vascular - Dr. Jan Janzen, analisando as alterações estruturais das camadas adventícia, média e íntima. Extração do RNAPara extração do RNA as veias descongeladas serão tratadas de forma a se retirar mecanicamente as camadas adventícia e íntima, restando somente a camada média. As amostras serão congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em com uso de pistilo e graal. O RNA será extraído utilizando o método padrão do Trizol17. As amostras de RNA serão quantificadas e avaliadas quanto à qualidade utilizando o NanoDrop 8000 (Thermo Scientific), disponível no laboratório de pesquisa. Quantificação da expressão de miRNAsA análise da expressão de miRNAs será realizada utilizando a plataforma GeneChip® miRNA 4.0 Array (Affymetrix), que contém sondas pa.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos pacientes do sexo feminino (devido a maior prevalência da doença em mulheres e para a obtenção de grupos homogêneos de estudo), com etiologia primária das varizes, anatomia envolvendo veias superficiais, em especial a veia safena magna e veias perforantes, e somente refluxo na classificação fisiopatológica.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3880-1609

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.185.687

Critério de Exclusão:

Serão excluídos pacientes menores que 18 anos, que tenham realizado cirurgias prévias, com diagnóstico de flebites, trombose venosa profunda, etiologia congênita ou secundária das varizes, envolvimento de veias profundas, obstrução na fisiopatologia, e doenças inflamatórias, infecções graves, celulites, linfangites, ou doenças crônicas associadas, em uso de medicações perenes para tratamento da IVC. Na classificação CEAP 6 as úlceras venosas deverão estar livre de infecção ativa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo é determinar e comparar o perfil global de expressão de miRNAs em varizes de pacientes com insuficiência venosa crônica (IVC) e com diferentes graus de gravidade da doença; CEAP 3-4 e 5-6.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Mínimos.

Benefícios:

Os benefícios serão a melhor compreensão da fisiopatologia da doença estudada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda com a finalidade de inclusão do pesquisador Leonardo de Oliveira Pimentel, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional (CMT210081), mestrado acadêmico, sem alterações de metodologia e objetivos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados anteriormente e na emenda foi apresentado carta de justificativa de emenda.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO da EMENDA apresentada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, a EMENDA apresentada encontra-se APROVADA.

Ao final da execução da pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

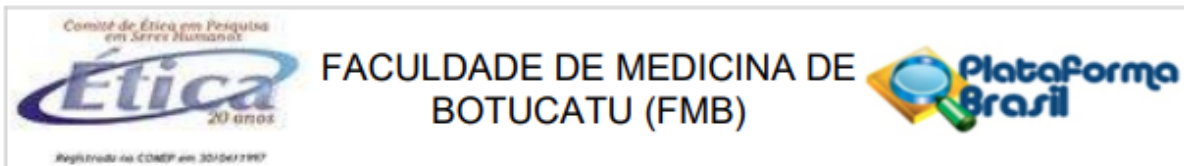
UF: SP

Telefone: (14)3880-1609

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.185.687

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_216023_2_E3.pdf	12/06/2023 15:05:40		Aceito
Outros	CartadeEmenda2.pdf	12/06/2023 15:00:56	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	miRNAvarizesSJC.pdf	04/12/2019 16:35:08	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
Outros	Oficio_emenda.pdf	11/07/2019 09:35:27	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_amostras.pdf	11/07/2018 14:03:13	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_alterado.docx	11/07/2018 14:02:47	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
Folha de Rosto	Winston.pdf	21/06/2018 08:45:14	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
Outros	anuencia_eap.pdf	07/05/2018 15:06:41	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	miRNAs_varizes_ja18.docx	02/02/2018 09:37:55	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
Orçamento	miRNA_varizes_budget.docx	01/02/2018 17:11:37	Winston Bonetti Yoshida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_miRNA_varizes.docx	01/02/2018 16:56:03	Winston Bonetti Yoshida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.185.687

BOTUCATU, 17 de Julho de 2023

Assinado por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br