

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
Programa de Pós-Graduação em Medicina

**Análise de biomarcadores circulantes modulados pela terapia
de fotobiomodulação em indivíduos com trombose venosa
profunda**

Aluno: Eduardo Alves Brigidio
Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Jr

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
Programa de Pós-Graduação em Medicina

EDUARDO ALVES BRIGIDIO

Tese apresentada para obtenção de título
de Doutorado em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-graduação em
Medicina da Universidade Nove de Julho.

Brigidio, Eduardo Alves.

Análise de biomarcadores circulantes modulados pela terapia de fotobiomodulação em indivíduos com trombose venosa profunda. / Eduardo Alves Brigidio. 2020.

72 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. José Antônio Silva Junior

1. Trombose venosa profunda. 2. Fotobiomodulação. 3. Óxido nítrico. 4. Inflamação. 5. MiRNAs.

I. Silva Junior, José Antônio. II. Título

CDU 616



São Paulo 29 de setembro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: EDUARDO ALVES BRIGÍDIO

Título da tese: ANÁLISE DE BIOMARCADORES CIRCULANTES MODULADOS PELA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO EM PACIENTES COM TROMBOSE VENOSA PROFUNDA

Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR Jose A Silva Jr

Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER Stella Regina Zamuner

Membro: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES Maria Cristina Chavantes

Membro: PROF. DR. OVIDIU BALTATU Ovidiu Baltatu

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha companheira e esposa Delma Ramos Brigidio, por não me deixar desistir nunca e sempre colaborar em tudo, me dando todo suporte necessário e sempre cobrando o meu melhor, mesmo nas horas mais difíceis nunca deixou de apoiar esse projeto. Com amor, Eduardo. Obrigado.

Ao meu filho João Victor Brigidio, meu melhor amigo e incentivador para realização dos projetos desde o mestrado e até o doutorado, sempre acreditou que seria um sucesso, apoiando-me e dando força, para não desistir nunca. Com amor filho. Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram para realização desse trabalho.

Ao Prof° Dr. José Antônio Silva Junior meu orientador de mestrado e doutorado por compartilhar seu vasto conhecimento científico e atender a todas dificuldades e necessidades, sempre disposto, com bom humor, nunca deixando de responder as minhas dúvidas e indagações. Ao senhor meu respeito e agradecimento, uma honra para mim ser seu aluno.

A Prof° Dra. Fernanda Marciano Consolim, Colombo pela competência da direção dessa pós graduação e entendimento de problemas pessoais dos seus alunos e pelo vasto conhecimento.

A Prof° Dra. Stella Regina Zamuner, pelo incentivo e interesse pelo projeto e colaboração em minha tese desde o início do mestrado até o doutorado, meus sinceros agradecimentos.

A Prof° Dra. Maria Cristina Chavantes, pelo seu entusiasmo pela fotobiomodulação que despertou interesse por esse tratamento e acabar em tese de doutorado, nossas conversas sempre levaram a idéias de trabalhos maravilhosos a serem realizados, minha admiração eterna.

Ao Prof° Dr. Humberto Dellê, pelas conversas enriquecedoras nos intervalos, nas apresentações do Reaserch Day sempre bem humorado e solícito.

Ao Prof° Dr. Cleber Pinto Machado, pelas aulas de estatística e sempre atualizado cientificamente o meu obrigado.

A Prof° Dra. Kátia de Angelis, pela dedicação e esforço nas aulas de redação científica onde pude aprender entre muitas coisas, que sempre se tem tempo para ler um paper, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof° Dr. Rodrigo Labat, pelos seus elogios, críticas, e pontuações assertivas sempre com muita elegância e galhardia, contribuindo de forma generosa, provendo maior conhecimento e evolução do nosso trabalho com toda sua cordialidade.

Ao Prof° Dr. Paulo de Tarso de Carvalho (*in memorian*) pela colaboração inestimável nos cálculos de uso da fotobiomodulação neste trabalho, minhas saudades.

Ao meu ex-residente e hoje assistente Adjaldes Moraes Jr., médico de capacidade extrema de dedicação integral e colaboração no estudo.

A minha colaboradora Patrícia Silva Dos Santos, que me suportou em dias de folgas com minhas dúvidas em preparação de aulas e sem seu esforço e atendimento aos meus apelos as apresentações não teriam a mesma qualidade.

Aos alunos da pós graduação, Érico F , Danila Marques, José Almir, Gabriel Silva, Camila Malta, Regiane Feliciano, em especial Allan Hatum que colaborou muito nos testes finais do nosso trabalho.

RESUMO

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença com alta morbidade e mortalidade que inclui a embolia pulmonar (EP) e trombose venosa profunda (TVP). A trombose venosa profunda é uma doença frequente e tem como característica sintomas pouco específicos, o que muitas vezes dificulta o seu diagnóstico. A terapia de fotobiomodulação (FBM) exerce efeitos anti-inflamatórios importantes como redução de mediadores químicos como as citocinas, aumento da geração de óxido nítrico (NO) e diminuição da migração de células inflamatórias. Recentemente foram relatadas alterações na expressão de microRNAs após a terapia de FBM. O objetivo deste projeto foi analisar a expressão elementos transcricionais como RNA mensageiro (RNAm) e microRNAs circulantes em indivíduos com TVP após a irradiação com terapia de FBM em comprimento de onda de 660 nm. Foram estudados 20 indivíduos com trombose subaguda em território femoropoplíteo e 10 indivíduos saudáveis como controle. Os sujeitos com TVP foram separados randomicamente em 2 grupos de 10 indivíduos. Destes, apenas um grupo recebeu a terapia de FBM. O sangue periférico de todos os sujeitos foi coletado antes e após ultrassonografia e irradiação. As análises de biomarcadores foram realizadas com PCR em Tempo Real, além de *Western blot* e dosagem da concentração de NO total. Observamos que indivíduos com TVP apresentam menor expressão de RNAm de eNOS, maior expressão de IL-6 e redução da concentração de NO em relação a indivíduos saudáveis. Entretanto, após a terapia de FBM, indivíduos com TVP apresentaram aumento da expressão de eNOS, diminuição da expressão de IL-6, aumento da concentração de NO total e modulação da expressão de biomarcadores circulantes como miR-195 e mir-338. Esta é a primeira vez que o efeito da terapia de FBM é observado em indivíduos com trombose venosa profunda subaguda, modulando elementos transcricionais que podem contribuir para o manejo da doença.

Palavras-chave: trombose venosa profunda, fotobiomodulação, óxido nítrico, inflamação, miRNAs.

ABSTRACT

Venous thromboembolism (VTE) is a disease with high morbidity and mortality that includes pulmonary embolism (PE) and deep vein thrombosis (DVT). Deep vein thrombosis is a common disease and has little specific characteristics, which often makes its diagnosis difficult. Photobiomodulation therapy (PBM) has important anti-inflammatory effects such as reduction of chemical mediators such as cytokines, increased generation of nitric oxide (NO) and decreased migration of inflammatory cells. Changes in microRNA expression have recently been reported after PBM therapy. The aim of the project was to analyze the expression transcriptional elements such as messenger RNA (mRNA) and circulating microRNAs in subjects with DVT after irradiation with FBM therapy. Twenty subjects with subacute thrombosis in femoropopliteal territory and 10 healthy subjects as control were studied. DVT subjects were randomly separated into 2 groups of 10 individuals. Of these, only one group received PBM therapy. PBM therapy was applied at wavelength 660 nm. The peripheral blood of all subjects was collected before and after ultrasound and irradiation. The biomarker analyzes were performed with Real-Time PCR, in addition to Western blot analysis and measurement of the total NO concentration. We observed that individuals with DVT have lower expression of eNOS mRNA, higher expression of IL-6 and reduced concentration of NO compared to healthy individuals. However, after PBM therapy, subjects with DVT increased eNOS expression, decreased IL-6 expression, increased total NO concentration and modulated expression of circulating biomarkers such as miR-195 and mir-338. This is the first time that the effect of PBM therapy has been observed in subjects with subacute deep venous thrombosis, modulating transcriptional elements that can contribute to the management of the disease.

Keywords: deep venous thrombosis, photobiomodulation, nitric oxide, inflammation, miRNA

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	anti-inflamatórios não-esteroides
COX-2	ciclo-oxigenase 2
eNOS	NOS endotelial
EP	Embolia pulmonar
FBM	Terapia de fotobiomodulação
HBPM	baixo peso molecular
HNF	heparina não fracionada
IL	Interleucina
iNOS	Isoforma induzível
LTD4	Leucotrieno D4
miRNA	microRNA
ncRNAs	Pequenos RNAs não codificantes
nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS3	Óxido nítrico sintase 3
NOSs	Sintetases de óxido nítrico
NPA	N-propil-L- arginina
PGE ₂	Prostaglandina E ²
RNAm	RNA mensageiro
TEV	Tromboembolismo venoso
TF	Fator Tecidual
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TVP	Trombose venosa profunda
USV	Ultrassom vascular
VWF	Fator de Von Willebrand

Sumário

1.INTRODUÇÃO	13
--------------------	----

1.1. Trombose venosa profunda	13
1.2. Diagnósticos de TVP.....	16
1.3. Tratamento da TVP.....	17
1.4. Ultrassonografia em diagnósticos vasculares	18
1.5. Óxido Nítrico	19
1.6. Sintetases de Óxido Nítrico (NOS).....	20
1.7. Fotobiomodulação.....	21
1.8 Epigenoma.....	24
1.8.1 MicroRNA.....	24
1.8.2. Trombose venosa e miRNAs	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo principal.....	28
2.2. Objetivos secundários:.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Indivíduos e grupos de estudo	29
3.2. Critérios de inclusão.....	29
3.3. Critérios de exclusão.....	30
3.4. Fotobiomodulação.....	30
3.5. Determinação da concentração total de NO	30
3.6. Análise da expressão gênica	30
3.6.1. Tratamento do RNA total e Integridade das amostras	31
3.6.2. Síntese de cDNA - Transcrição Reversa	31
3.6.3. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR.	32
4. Western blot.....	33
5. Análise estatística	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Quantificação do RNA extraído	34

6.2.	Análise de expressão gênica	35
6.3	Análise da expressão proteica de eNOS.....	37
6.4	Dosagem de NO	39
6.5	Análise de expressão gênica - microRNAs	40
6.6	Análise da correlação entre os miRNAs e genes alvos.....	45
7	DISCUSSÃO	48
8	CONCLUSÃO.....	52
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
10.	Anexos	72

1.INTRODUÇÃO

1.1. Trombose venosa profunda

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença com alta morbidade e mortalidade que inclui a 200.000 de pessoas ao ano sendo que aproximadamente 100.000 morrem por EP¹. Entre 250.000 a 500.000 pessoas ao ano, apresentem TEV sintomático, é o que se estima, sendo que, em menos da metade dos casos há sintomas de TVP tornando se o diagnóstico mais difícil, em consequência, a profilaxia e tratamento adequados não são realizados^{1,2}. Em nosso país em uma projeção feita pelo SUS são realizadas aproximadamente 68.000 internações ao ano em consequência de TEV, sendo que desse montante 15,2% desses indivíduos evoluem a óbito³.

Em estudo de Stein et al.⁴ sobre a incidência de TVP em indivíduos internados foi evidenciado que em 44.136 internações foram diagnosticados 271 casos de TVP em indivíduos com algum tipo de profilaxia ou não e, desses, 57 apresentaram EP. Em apenas um quarto a um quinto dos indivíduos com internações recentes (até 30 dias), tenha sido diagnosticado corretamente o TEV⁵. A TVP é caracterizada pela formação aguda de trombos em veias do sistema profundo, acomete mais comumente os membros inferiores, no entanto também pode ocorrer em outros sítios como veia cava, veias jugulares internas, no seio cavernoso e nos membros superiores^{6,7}.

A TVP é uma doença de alta prevalência e ocorre principalmente como complicação de outro processo patológico como neoplasias, infecções, pós-operatório de grandes cirurgias, traumas e imobilizações prolongadas dos membros inferiores, e a mesma também pode ocorrer de forma espontânea sem qualquer associação a outras doenças como observado nas trombofilias hereditárias^{8,6}. O quadro clínico da doença depende das veias acometidas e da extensão da trombose, e os sinais e sintomas apresentados são dor, edema e empastamento muscular (mais frequentes), aumento da cianose e dilatação das veias superficiais¹⁰. Nos membros inferiores a dor normalmente é localizada na panturrilha ou na coxa. Apesar de causarem grande desconforto para o paciente, os sintomas da TVP não são os mais importantes desta patologia e sim as complicações que podem surgir com a evolução da doença, sendo o trombo

embólico pulmonar (TEP), a mais temida delas¹⁰. O TEP é caracterizado pelo desprendimento do trombo das veias profundas e sua migração através da corrente sanguínea até atingir a artéria pulmonar onde provoca obstrução da circulação e infarto pulmonar¹⁰. Além da tromboembolia pulmonar outras complicações que podem ocorrer são a síndrome pós-trombótica e a gangrena venosa. A síndrome pós-trombótica é uma complicação tardia e apesar de ter mortalidade praticamente nula, apresenta morbidade importante e causa grandes problemas sócio-econômicos^{11, 12}.

Em 1856, Virchow descreveu, que para o desenvolvimento da trombose venosa era necessário a presença de pelo menos uma de três alterações – alteração da parede vascular, do fluxo sanguíneo e dos componentes do próprio sangue; ou seja, para ocorrer a TVP deve haver um ou mais destes três elementos: lesão endotelial, estase sanguínea e/ou hipercoagulabilidade, que caracterizam a tríade de Virchow. O desenvolvimento de trombos dentro das veias profundas se deve ao desequilíbrio entre os fatores trombolíticos e trombogênicos da circulação que decorre da ação dos elementos desta tríade. Na maioria dos casos de TVP dois ou mais destes fatores atuarão em conjunto para determinar a formação do trombo venoso¹³.

São muitos os fatores de risco que predis põem a formação da trombose venosa profunda, um fator é a idade, a TVP é mais comum após os 40 anos de idade, aumentando sua prevalência progressivamente com o aumento dela. A frequência de TEP também aumenta com a idade¹³. Este fato pode ocorrer devido à diminuição da resistência da parede venosa que causaria a dilatação da veia, diminuindo a velocidade do fluxo sanguíneo e facilitando a trombose. Em indivíduos com mais de 65 anos também se observa uma menor atividade fibrinolítica nas veias da perna, a imobilização é um dos principais fatores predisponentes de trombose venosa profunda¹⁴. Quanto maior o tempo de imobilização, maior o risco de TVP. Por esta razão, a TVP é uma doença frequente em indivíduos hospitalizados, acamados e ortopédicos¹⁴. Há relatos de casos de TVP decorrentes de imobilização sentada em viagens prolongadas (síndrome da classe econômica)^{8,10}. A obesidade é outro fator de risco para TVP em indivíduos acamados, seja pela dificuldade de mobilização do doente, seja pela própria diminuição da atividade fibrinolítica que ocorre em obesos¹⁴.

Na presença de veias varicosas, a TVP é duas vezes mais frequente em indivíduos portadores de varizes dos membros inferiores. Devido aumento da estase venosa em paciente com infecção, há maior predisposição à TVP, pois pode resultar em lesão do endotélio venoso⁸. Em procedimentos cirúrgicos, quanto mais prolongado for o tempo da cirurgia a que o paciente é submetido, maior o risco para TVP. Os indivíduos submetidos à anestesia geral têm maior risco de desenvolverem TVP que os submetidos à anestesia peridural ou raquidiana^{6,10}. No câncer, há um aumento da prevalência de TVP em duas a três vezes pela indução dos fatores pró-coagulantes¹⁰, enquanto que na quimioterapia, o risco para TVP aumenta devido à diminuição dos inibidores fisiológicos da coagulação^{8, 10}. Estudos mostram que indivíduos internados na UTI têm risco três vezes maior de desenvolverem TVP que os internados em enfermarias^{6, 10}.

Mulheres grávidas ou no período puerperal têm risco bastante aumentado de TVP, isto ocorre devido à estase venosa provocada pelo crescimento uterino e como consequência de alterações hormonais própria deste período. Após o parto ocorre também diminuição da atividade fibrinolítica devido à liberação de trombolastina tecidual durante a separação placentária¹⁵. Com o uso de anticoncepcionais orais, o risco de TVP é aumentado devido ao aumento dos níveis sanguíneos dos fatores de coagulação II, VII, IX e X, à diminuição dos níveis de antitrombina, já os contraceptivos orais também alteram a viscosidade sanguínea e a parede vascular, assim como a reposição hormonal com estrógenos na menopausa^{8,10,16}.

As trombofilias hereditárias são caracterizadas por deficiências de agentes trombolíticos determinadas geneticamente⁹. A mais comum é a mutação do fator V (presença do fator V de Leiden) que determina uma resistência a ação da proteína C ativada. Também são importantes as deficiências de outras proteínas como C e S, a deficiência da antitrombina e a mutação da protrombina (protrombina mutante G20210 A)^{8,17}.

Outras doenças também aumentam o risco de TVP como a policitemia, hipermocisteïnemia, trombocitose, lúpus eritematoso, artrite reumatoide, vasculites, entre outras¹¹. O risco de TVP em indivíduos com história pregressa de trombose venosa é aumentado em três a quatro vezes quando comparados com indivíduos sem episódio anterior de trombose^{6,10}. Portanto, os fatores de

risco mais prevalentes na TVP são idade superior a 40 anos, tempo de cirurgia maior que 60 minutos, TVP e EP prévias, insuficiência venosa crônica, obesidade, cardiopatia, presença de infecção, imobilização prolongada, terapia com estrogênio, acidente vascular encefálico, paralisia e paresia, trombofilias, presença de tumores malignos, e tipo de cirurgia, sendo as abdominais, ortopédica, ginecológica, urológica e vascular, as mais prevalentes^{2, 18-20}.

Há relatos que em 61% dos indivíduos cirúrgicos, a TVP ocorre a partir do 3º dia de pós-operatório, em 9% após uma semana, e em alguns casos, dependendo do tipo de cirurgia pode ocorrer até semanas após o procedimento cirúrgico²². A necessidade do diagnóstico preciso e precoce da TVP é fundamental para o bom resultado terapêutico e prevenção da EP e suas graves consequências.

1.2. Diagnósticos de TVP

O diagnóstico clínico da TVP não é tão fácil e, portanto, pode haver falhas diagnósticas, e existe grande possibilidade de não se fazer diagnóstico em indivíduos assintomáticos, e por outro lado, de se fazer diagnóstico equivocado em indivíduos sintomáticos, pois existem outras doenças que podem ter os mesmos sintomas que simulam a TVP²³. Em trabalho de Lennox et al.²⁴, utilizando a dosagem de dímero D em indivíduos com TVP sintomáticos, os autores obtiveram 91,3% de sensibilidade, 81,9% de especificidade e valor preditivo negativo de 96,6%, porém apresentando desvantagem de grande número de falsos positivos quando há concomitância de infecção, cirurgia recente e outras doenças clínicas. Entretanto, se o teste for negativo, ocorre o afastamento do diagnóstico de TVP na maioria das vezes, sendo hoje muito importante na triagem destes indivíduos.

Recentemente, alguns autores compararam o aumento de microRNAs com o dímero D²⁵. Assim, foi observada que esses biomarcadores circulantes poderiam ser usados na triagem de indivíduos com TVP com mesma efetividade diagnóstica do dímero D. A vantagem para o diagnóstico do TVP, é que se dosarmos biomarcadores circulantes específicos²⁵, poderiam ser encontrados biomarcadores que só aumentam na doença trombótica, não havendo necessidade de confirmação por métodos por imagem (THESIS).

1.3. Tratamento da TVP

O tratamento adequado da TVP consiste na parada da propagação (trombose secundária) e recorrência do trombo e, principalmente, em evitar a ocorrência de EP^{26, 27}. A essência de qualquer estratégia é para identificar principalmente a TVP proximal, na expectativa de que o início da anticoagulação no estágio pré sintomático possa prevenir EP fatal²⁸. Nesses casos em que há um fator desencadeante bem estabelecido para o desenvolvimento de tratamento da TVP proximal depende de alguns fatores como pós-operatório recente, problemas clínicos recentes transitórios e outros. Nesses casos em que há um fator desencadeante bem estabelecido para o desenvolvimento da TVP, e é transitório, o tempo de anticoagulação pode ser por um período de 3 meses, segundo alguns autores²⁹. Quando há presença de outros fatores como cardiopatias, cateter venoso central prévio, seqüela de acidente vascular cerebral e outros, a anticoagulação deve ser mantida por, pelo menos, 6 meses³⁰⁻³².

A necessidade de anticoagulação, nos casos de TVP distal é controversa; autores como Lagerstedt et al.³³ estudando os casos sintomáticos de TVP distal, evidenciaram propagação do trombo proximal nos indivíduos sem tratamento de 17,8% e, entre esses, houve apenas um caso de EP não fatal. Labropoulos et al.³⁴ evidenciaram uma progressão proximal do trombo em 13% dos indivíduos e somente em um caso houve EP não fatal. Observaram ainda que não houve diferença na propagação do trombo entre os indivíduos anticoagulados e naqueles em que não se optou pelo seu uso. Pinede et al.³⁵ evidenciaram que o tratamento por 6 ou 12 semanas na TVP distal são equivalentes quanto à taxa de EP, recorrência da TVP e riscos de sangramento.

Independente do segmento venoso acometido, quando indicada a anticoagulação deve ser iniciada com uso de heparina não fracionada (HNF) ou de baixo peso molecular (HBPM) e, conjuntamente, o anticoagulante oral, quando não houver contraindicações a esse tratamento³⁶.

1.4. Ultrassonografia em diagnósticos vasculares

A ultrassonografia aplicada às doenças vasculares é hoje o exame de maior aplicabilidade diagnóstica, e é baseada em técnica de imagem e medidas de velocidade de fluxo sanguíneo. Com a combinação da imagem anatômica denominada modo B, e detecção da onda de velocidade sanguínea, denominada análise espectral, o método foi popularizado com o nome duplex, Doppler ou ultrassonografia duplex³⁷⁻³⁹.

Esta técnica revolucionou o diagnóstico das doenças vasculares a partir da década de 80. Na década de 90, houve novo avanço na área com a combinação das imagens (modo B) e com a dinâmica do fluxo (cor), isso facilitou o estudo e as informações colhidas⁴⁰⁻⁴⁴. Mais recentemente houve uma evolução de técnicas de geração e processamento de imagens, técnicas digitais e de bandas largas de frequência que foram adaptadas a ecografia vascular, já as técnicas de construção de imagens aumenta o campo visual, criando uma imagem expandida e que facilita a visualização^{41,42}. Depois de processadas as imagens, apresentam melhor relação sinal ruído, além de muitos outros benefícios, como a colorização da escala cinza para colorida ou até perspectivas tridimensionais⁴³.

O ultrassom vascular (USV) é um exame não invasivo, sem uso de contraste ou irradiação, de fácil reprodução e de baixo custo em comparação à flebografia que ainda é considerada padrão ouro, além de hemodinâmico, possui índices de sensibilidade e especificidade de cerca de 90%⁴⁰⁻⁴⁵. Apresenta como vantagem a avaliação da luz venosa e sua parede, estruturas extrínsecas à veia e estuda a direção do fluxo^{46,47}. A ultrassonografia associada à codificação a cores e ao efeito Doppler veio revolucionar a prática vascular e cardiológica⁴⁸⁻⁵⁰.

Os primeiros trabalhos publicados utilizando o efeito Doppler para o estudo do sistema venoso datam de 1967, essa evolução da técnica deu-se, sobretudo, a partir de 1970, sendo os primeiros dez anos marcados pela utilização do Doppler contínuo numa tentativa de estudo funcional e hemodinâmico do sistema venoso⁴⁰⁻⁴⁵. Os estudos visavam quase sempre à trombose venosa e não o sistema venoso como um todo e só do aparecimento do Doppler pulsado e dos estudos de Claude Franceschi, que a insuficiência

venosa crônica começa a ser realmente estudada⁵¹⁻⁵⁴. Importante ressaltar que os resultados de imagem estão diretamente relacionados ao profundo conhecimento da anatomia vascular e, sobretudo, da hemodinâmica dos fluídos, pois sem este conhecimento pode haver graves equívocos diagnósticos e resultados de exames controversos, que comprometeriam o método⁵⁵⁻⁵⁷.

Assim o exame de USV no sistema venoso distal pode estudar a anatomia da rede venosa superficial e profunda, observando seus diâmetros, suas tributárias e prováveis variações anatômicas, sua parede e luz, testando a compressibilidade e conteúdo, comprovando sua perviedade, podendo assim diagnosticar a trombose aguda ou prévia, a espontaneidade do fluxo e sua movimentação às manobras, indicando segmentos pérvios⁵³⁻⁵⁵.

O USV é atualmente o método de escolha para o diagnóstico da TVP tanto na fase aguda como na crônica da doença. Isso ocorre devido à USV ter alta acurácia quando comparada à flebografia, que ainda é considerado o método padrão ouro para o diagnóstico da TVP. Acresce-se a isso o fato de a US ser um método não invasivo e sua execução ser bastante confortável para os indivíduos, sendo a USV de imagem (Modo B) permite a avaliação da imagem bidimensional da veia e dos tecidos vizinhos, possibilitando caracterizar a normalidade ou as alterações nas mesmas, além de identificar outras afecções que podem simular os sintomas e sinais da TVP (diagnóstico diferencial)^{55,56}.

Os critérios diagnósticos adotados para a avaliação com a USV na TVP como ausência ou diminuição de da compressibilidade venosa, trombo visualizado, aumento do diâmetro venoso, ausência do aumento do diâmetro mediante a manobra de valsalva, e imobilidade das válvulas são critérios diretos⁵⁶.

1.5. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio⁵⁷, sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato^{58,59}, possui efeito vasodilatador e modula reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo⁵⁹. É encontrado em proteínas intracelulares é um gás incolor e estável,

moderadamente solúvel em água e sua meia-vida varia de 3 a 60 segundos nas células do endotélio vascular, e na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina, produz o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima sintetase de óxido nítrico⁶⁰.

O NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a consequente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular⁶⁰. Quando o cGMP está alto, o cálcio intracelular aumenta, relaxando a células e ocorre a vasodilatação enquanto a difusão do NO para a musculatura lisa vascular estiver ocorrendo. Um aumento no fluxo de NO para a musculatura lisa vascular provoca maior relaxamento celular e maior vasodilatação. Se a formação de NO diminui, ocorre uma vasoconstrição moderada⁶¹, logo efeito vasodilatador do NO parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo pulsátil e força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares, no sistema circulatório, em particular, na coagulação sanguínea⁶².

O NO está envolvido com a cascata fibrinolítica e trombótica associada com dano endotelial, sendo que as propriedades antitrombóticas do NO resultam em parte da inibição da adesão e agregação plaquetária⁶³. A deficiência de NO foi associada com trombose arterial e nos vasos sanguíneos, o NO exerce função na modulação do diâmetro vascular e da resistência vascular pela sua habilidade em relaxar o músculo liso vascular⁶⁴. O NO inibe interações de elementos sanguíneos circulatórios com a parede do vaso e a deficiência de NO pode promover trombose vascular, reestenose, aterogênese e injúria da reperfusão⁶⁴. A diminuição da vasodilatação dependente do endotélio pode ser induzida por hipertensão, diabetes e/ou aterosclerose^{62, 64}.

1.6. Sintetases de Óxido Nítrico (NOS)

As sintetases de óxido nítrico (NOSs) são de uma família de enzimas que catalisam a produção de NO a partir de L-arginina⁶⁶. O NO faz importante sinalização celular, a molécula, ajuda a modular o tônus vascular, o tônus das vias aéreas e o peristaltismo, e está envolvido na angiogênese e

desenvolvimento neural^{67,68}. A geração de óxido nítrico é mediada por três isoenzimas de sintetases de óxido nítrico, a eNOS (NOS endotelial), nNOS (NOS neuronal) e a isoforma induzível (iNOS)⁶⁸, que são codificados por genes separados⁶⁶. Das três isoformas conhecidas desta enzima, duas são constitutivas e a terceira é induzível (iNOS)⁶⁹.

A nNOS é responsável pela geração de NO no tecido nervoso, tanto no SNC central, quanto periférico. A nNOS neuronal também desempenha um papel na comunicação celular pela associação com as membranas plasmáticas⁶⁹. A ação de nNOS pode ser inibida pela NPA (N-propil-L-arginina)⁶⁹. A iNOS não é cálcio dependente, ao contrário da regulação dependente de cálcio das enzimas constitutivas (nNOS e eNOS)⁷⁰. A iNOS foi descrita como cálcio-insensível, provavelmente devido à sua interação não covalente com a calmodulina (CaM)⁷¹, essa enzima produz grandes quantidades de NO com a estimulação, por citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama)⁷².

A eNOS também é denominada de óxido nítrico sintase 3 (NOS3), gera NO nos vasos sanguíneos e participa da regulação da função vascular. O gene que codifica a eNOS está localizado no cromossomo 7⁷³. A eNOS é uma NOS constitutiva e produz NO em endotélio vascular sob condições basais, mas a força de cisalhamento produzida pelo fluxo sanguíneo pode incrementar sua produção⁷⁴. O NO liberado no lúmen vascular é um potente inibidor de adesão e agregação plaquetária na parede vascular e também inibe a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, inibe a síntese de DNA, a mitogênese e a proliferação de células da musculatura lisa vascular e, também é responsável pela regulação da pressão sanguínea e contratilidade do músculo cardíaco⁷⁵⁻⁷⁷, sua expressão é restrita a células endoteliais vasculares⁷⁸.

1.7. Fotobiomodulação

A fotobiomodulação exerce efeitos anti-inflamatórios importantes nos processos iniciais da cicatrização como, redução de mediadores químicos, de citocinas, do edema, diminuição da migração de células inflamatórias e incremento de fatores de crescimento, contribuindo diretamente para o processo

de reabilitação tecidual, contudo a falta de padronização dificulta a escolha de parâmetros ideais⁷⁹.

Apesar de ser utilizado por mais de 50 anos, essa terapia não possui ainda parâmetros clínicos e protocolos estabelecidos, tratando-se da utilização deste recurso nas fases iniciais do reparo tecidual^{79,80}, devido principalmente à características específicas dos tecidos e da dose utilizada. A fotobiomodulação apresenta uma relação com as fases iniciais de reparo, observando-se a utilização de diferentes doses e comprimentos de ondas (632,8 a 904 nm)⁸⁰. Em estudos *in vitro*⁸⁰ foram utilizadas doses entre 2,2 e 16 J/cm², já dose de 5 J/cm² tem sido apontada como responsável por mudanças significativas *in vitro*, porém a dose de 16 J/cm² promove efeito inibitório sobre o crescimento celular em culturas, já em estudos *in vivo*, envolvendo animais, foram utilizadas doses entre 0,04 a 21 J/cm², com estudos em humanos, foram utilizadas doses entre 1,8 a 16 J/cm².

Os efeitos iniciais da interação entre o laser e o tecido biológico podem provocar a liberação de substâncias, como a histamina, serotonina, bradicinina, e modificar reações enzimáticas normais, acelerando ou retardando estas reações⁸¹. A irradiação laser pode proporcionar ainda aumento na produção de ATP, o que promoveria um aumento na eficiência da bomba sódio-potássio, com isso a diferença de potencial elétrico existente entre o interior e o exterior da célula é mantida com melhores resultados⁸¹.

A primeira fase do reparo tecidual é a inflamação, essencial para a preservação da integridade do organismo, ocorre envolvendo uma interação entre células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos) e células vasculares (endoteliais e músculo liso)⁸². Inicialmente, as células inflamatórias migram para o tecido-alvo por quimiotaxia, induzidas por mediadores químicos (histamina, prostaglandina - PGE2, leucotrienos - LTD4, interleucinas - IL1 e IL6, óxido nítrico - NO), que se ligam a receptores celulares e endoteliais, estimulando a resposta inflamatória⁸². Observa-se a ativação de outros mediadores de natureza lipídica (eicosanoides) e peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos) e a externalização de proteínas de adesão para leucócitos na superfície da membrana de células endoteliais voltada para a luz dos vasos, em decorrência do próprio trauma, ou da ativação celular⁸³. Assim, o microambiente tem sua composição físico-química alterada (baixa

tensão de O₂, diminuição do pH, presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio), sendo esta outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no processo⁸³.

A fotobiomodulação tem se mostrado uma alternativa anti-inflamatória com efeitos semelhantes aos observados na terapia com anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), inibindo e/ou diminuindo a concentração de prostaglandina (PGE₂), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e histamina^{84,85}. A ativação da cascata do ácido araquidônico em tecidos lesados, levando à diminuição da produção de PGE₂⁸⁴, posteriormente altera a produção de bradicinina e de muitos tipos de citocinas inflamatórias, além disso o aumento do fluxo sanguíneo local melhora a acidose, e simultaneamente promove a liberação e remoção de substâncias relacionadas à dor⁸³.

A fotobiomodulação promove ativação precoce da fase inflamatória do processo de reparo tecidual, causando exacerbação dos sinais da mesma⁸⁴. Esta ativação observada ocorreu devido à ativação vascular substancial nas primeiras 36 horas de reparo, assim a fotobiomodulação demonstrou reduzir a inflamação em uma variedade de situações clínicas⁸⁵.

Também foi observada inibição da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e interleucinas-1β, a partir destas células⁸⁶. Alguns autores observaram maior quantidade de fibroblastos em células irradiadas, evidenciando um aumento significativo na proliferação fibroblástica e diminuição do infiltrado inflamatório, concluindo que a fotobiomodulação acelera o processo de reparação tecidual⁸⁷⁻⁸⁹, desta forma parece ser capaz de modular a inflamação em vários tecidos e apresenta vantagens como método não-invasivo, não-farmacológico e com baixo índice de efeitos colaterais⁸⁸⁻⁹⁰.

A utilização da fotobiomodulação apresenta-se como uma alternativa terapêutica relevante devido aos seus efeitos biológicos em diferentes tecidos atuando em nível celular, local e sistêmico no organismo, sob modificações bioquímicas, bioelétricas, bioenergéticas, favorecendo a proliferação e maturação celular^{91,92}.

1.8 Epigenoma

O termo epigenética refere-se a todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA⁹³. Inclui o estudo de como ocorre a mudança de expressão espaço temporal de genes durante a diferenciação de um tipo de célula e como fatores ambientais podem mudar a maneira como os genes são expressos. Existem três mecanismos principais de alterações epigenéticas⁹³⁻⁹⁶:

1. Metilação do DNA,
2. Modificações de histonas
3. Ação de RNAs não codificadores - microRNAs.

Apesar da grande quantidade de informação adquirida nos últimos anos definindo a associação entre o perfil epigenômico e doenças humanas crônicas, os mecanismos através dos quais as informações incluídas em nosso genoma tornam-se fenotipicamente expressa em condições fisiológicas e patológicas ainda não é totalmente compreendido⁹⁷⁻⁹⁹. Certamente uma abordagem genética-epigenética combinado pode ser útil para desvendar mais segredos sobre como nosso genoma é expresso de forma diferente em um estado de doença⁹⁸⁻¹⁰⁰.

1.8.1 MicroRNA

MicroRNAs ou miRNAs, são uma classe conservada de pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs), de aproximadamente 20-22 nucleotídeos, produzidos endogenamente que regulam a expressão de genes ao nível pós-transcricional, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Eles foram originalmente encontrados no nematóide *Caenorhabditis elegans* (C.elegans) em 1993¹⁰¹ e mais tarde identificado em muitas plantas e mamíferos¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Em geral, os miRNAs são transcritos no núcleo pela RNA-polimerase II como um pri-miRNA. Pri-miRNAs são clivados em aproximadamente 70 nucleotídeos formando um precursor dos miRNAs, o pré-miRNA, pelo complexo microprocessador que contém uma enzima RNAase III chamada Drosha e seu

co-factor DGCR8¹⁰⁵. Os pré-miRNAs são depois exportados para o citoplasma pela proteína exportina-5 (Exp 5), onde eles são mais maduros, e clivados por outra endonuclease RNAase III, chamada Dicer, e pelo co-fator TRBP, que aumenta a estabilidade no reconhecimento do substrato e transferência do produto para o complexo de silenciamento induzido, formando um duplex com aproximadamente 20-25 nucleotídeos¹⁰³.

No citoplasma, os duplex de miRNA maduros são separados em duas cadeias de RNA, a cadeia de RNA guia (miRNA) e a cadeia de RNA passageira (miRNA*), que é normalmente degradada. O complexo de silenciamento (RISC) induzido por RNA, que contém a proteína Argonauta (Ago), é ativado pela presença do miRNA e dirige-se ao complexo de silenciamento (RISC) para o mRNA alvo¹⁰⁴. O local alvo do miRNA é muitas vezes presente na região 3' não traduzida (3'-UTR) do mRNA que contém as sequências complementares e os elementos de reconhecimento de miRNA designados (MRE). De acordo com a complementaridade perfeita ou imperfeita das sequências de miRNA-mRNA, miRNAs podem reprimir a expressão gênica pela degradação do mRNA¹⁰⁰.

Nos últimos anos, essas moléculas foram implicadas na regulação da homeostasia, e um número crescente de estudos tem investigado suas relações com o desenvolvimento da trombose¹⁰⁴. O papel no desenvolvimento relativo ao papel dos miRNAs na regulação da função plaquetária e homeostasia secundária e os fatores genéticos e ambientais que regulam miRNAs¹⁰⁵.

Estudos mostraram que múltiplos elementos do sistema hemostático podem ser regulados por miRNAs, abrindo novas e perspectivas interessantes não só para compreender os mecanismos moleculares envolvidos a fisiopatologia da hemostase, mas também para conceber novos diagnósticos e ferramentas antitrombóticas¹⁰⁵.

Os miRNAs podem desregular proteínas hemostáticas e sua influência na patologia trombótica e possuem uso potencial como marcadores diagnósticos e prognósticos de trombose¹⁰⁶. MiRNAs são os ncRNAs mais bem caracterizados e têm sido associados suscetibilidade à doença¹⁰⁷, mas, sem dúvida, o grande potencial dessas moléculas reside na sua utilização como biomarcadores. Além disso, miRNAs têm certas características que torná-los ideais como biomarcadores, não só no início da doença, mas também durante o desenvolvimento de complicações da doença ou a resposta aos tratamentos.

Além disso, miRNAs foram identificados em componentes celulares do sangue¹⁰⁸ e em diferentes fluidos corporais¹⁰⁹. Os níveis de miRNA no sangue têm sido associados à fisiopatologia da doença. Estudos que caracterizam miRNAs circulantes de plasma mostraram que são encontrados em microvesículas, ligadas a diferentes complexos proteicos ou circulando livremente¹¹⁰.

1.8.2. Trombose venosa e miRNAs

Apesar de uma incidência anual estimada de 1-3 casos / 1.000 indivíduos¹¹¹, poucos estudos investigaram a contribuição de miRNAs como preditores de tromboembolismo venoso. No diagnóstico de TVP ou EP, os sintomas geralmente são inespecíficos e a probabilidade clínica é baixa ou intermediária, portanto, a avaliação do dímero D pode ser apropriada¹¹². A análise de dímero D tem alta sensibilidade, mas também exibe baixa especificidade^{113,114}, o que sugere que valor preditivo negativo, assim, é necessário identificar novos marcadores.

Estudos que investigaram o papel dos miRNAs quantificaram o nível de miRNAs no soro de 38 indivíduos submetidos a cirurgia ortopédica em joelho ou quadril. Eles descobriram que os níveis de miR582, miR-195 e miR-532 em indivíduos que sofreram TVP após a cirurgia foram maior do que aqueles não submetidos à cirurgia¹¹⁵. Outro estudo realizado (usando plasma de 40 sujeitos: 20 indivíduos com história de TEV não provocado e 20 controles saudáveis pareados por idade e sexo) revelou perfil de miRNA composto por 5 miRNAs regulados em excesso e 4 miRNAs indivíduos versus controle¹¹⁶. Um ano depois, Wang et al. compararam o perfis de expressão miRNA no plasma de 238 indivíduos, descobrindo que miR-424-5p foram significativamente maiores, enquanto os níveis de miR-136-5p foram significativamente menor em indivíduos com TVP em comparação com indivíduos sem TVP²⁵. Surpreendentemente, de todos miRNAs caracterizados nos três estudos, apenas o miR-424-5p foi encontrado em dois indivíduos²⁵. Assim, estudos adicionais são necessários para delinear melhor os miRNAs confiáveis para uso marcadores de plasma de TVP. Notavelmente, todos os estudos foram realizados em indivíduos com TVP,

e atualmente não há dados sobre miRNAs prognósticos para trombose recorrente, o que seria de grande interesse¹¹⁷.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Analisar a expressão de biomarcadores circulantes modulados pela terapia de fotobiomodulação (FBM) em indivíduos com trombose venosa profunda

2.2. Objetivos secundários:

Quantificar a expressão gênica e proteica de eNOS em sujeitos com trombose venosa profunda após terapia de FBM;

Quantificar a expressão gênica de interleucina 6 (IL-6) em sujeitos com trombose venosa profunda após terapia de FBM;

Quantificar a expressão de biomarcadores circulantes (miR-424, miR-338, miR-195 e miR-582) em sujeitos com trombose venosa profunda após terapia de FBM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Indivíduos e grupos de estudo

Avaliamos prospectivamente 20 sujeitos de ambos sexos em dois grupos de 10 indivíduos com TVP subaguda no território femoropoplíteo em tratamento com anticoagulação de 30 a 180 dias do diagnóstico. Os sujeitos foram submetidos à coleta de sangue periférico (8 ml/coleta), antes e depois da terapia de fotobiomodulação. Os sujeitos com TVP foram pareados quanto à idade e sexo nos dois grupos experimentais. Os mesmos critérios foram utilizados para o recrutamento de indivíduos saudáveis. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas éticas e sanitárias da Instituição.

Os sujeitos com TVP foram separados em 2 grupos, onde o grupo TC foi constituído de 10 indivíduos (n=10) com TVP e irradiados com luz visível (sem fotobiomodulação). A denominação TC1 foi usada para indicar o período antes da ultrassonografia e irradiação e TC2 para indicar o período após a ultrassonografia e irradiação com luz visível nos mesmos sujeitos.

O grupo TF foi composto com indivíduos com TVP submetidos à aplicação de FBM. As denominações TF1 e TF2 correspondem aos períodos antes e depois da ultrassonografia e terapia de FBM, respectivamente. Os sujeitos do grupo TF2 foram submetidos à aplicação de laser de baixa intensidade por 4 minutos com energia total de 16,2J. O grupo Controle foi constituído de 10 indivíduos saudáveis (n=10), sem nenhuma intervenção, além da coleta de sangue.

3.2. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos entre 20 a 60 anos com TVP femoropoplíteo em tratamento de anticoagulação de 30 a 180 dias após concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

3.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos sujeitos sem anticoagulação plena e gestantes e indivíduos com sintomas de síndrome pós-trombótica, que dificulta a execução dos exames de ultrassom vascular.

3.4. Fotobiomodulação

Foi utilizado um cluster da marca Multi Radiance Medical's modelo GameDay. Os parâmetros utilizados foram comprimento de onda 660 nm, potência = 5 mW; Densidade de Potência = 5 mW/cm², Tempo aplicação total = 7 minutos (420 segundos), Área efetiva de iluminação de cada fonte de luz (sem sobreposição) = 1 cm², Ângulo de dispersão da luz = 90°, Densidade de Energia (fluência) = 2,1 J/cm²

3.5. Determinação da concentração total de NO

Os níveis séricos de NO foram medidos como nitrito / nitrato usando um kit de detecção colorimétrica da Arbor Assays (Ann Arbor, Mich), que permite a determinação total de produtos de NO na amostra. Todas as medidas foram realizadas a 540 nm por meio de um leitor de microplacas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os níveis de NO em cada amostra foram quantificados usando uma curva padrão e expressos como µM.

3.6. Análise da expressão gênica

Amostras do sangue periférico total foram homogeneizadas com Trizol[®] Reagent para extração do RNA total, conforme instruções do fabricante. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 seg. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5min. As amostras foram centrifugadas por 15min, 12000xg a 4°C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5ml estéril, e foram adicionados 500 µl de isopropanol

para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10min, e foram novamente centrifugadas (12000xg/4°C/10 min). Os sobrenadantes foram retirados, e os *pellets* de RNA foram lavados com 1ml de etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000xg/4°C/10 min), e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 50 ul de água DEPC, e armazenado a -80 ° C até a realização da reação de transcrição reversa.

3.6.1. Tratamento do RNA total e Integridade das amostras

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho NanoDrop ND-2000 espectrofotômetro (NanoDrop Products, Wilmington, DE, EUA) sendo que 1U A260 corresponde a 40ug de RNA/mL. Foram utilizadas apenas amostras livre de contaminantes (A260/A230 ~1,8) e de proteínas (A260/A280 = 1,8-2,0). A integridade do RNA total foi avaliada pela observação da proporção das bandas referentes aos rRNA 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (ThermoFisher, EUA). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1ug de RNA total (8 ul) foi incubado com 1 unidade (1 ul) de *DNase I/RNase Free* – (Thermofisher, EUA), na presença 1 ul de solução contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl₂ por 15 min a 37 °C, seguido de incubação a 65°C durante 10 minutos para inativação da DNase I.

3.6.2. Síntese de cDNA - Transcrição Reversa

Logo após o tratamento com DNase, foi realizada a reação de transcrição reversa (RTqPCR), para síntese do cDNA. Em 1 ug de RNA total tratado foram adicionados 2 µl de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl₂ 2,5 mM), 1 unidade de transcriptase reversa (1ul) (Thermofisher, EUA), 2µl de Randon Primer (Thermofisher, EUA) 0,8 µl de oligonucleotídeos (dNTPs, 100 mM) e 4,2 ul de H₂O ultra pura para uma reação final de 20 µl. As amostras foram então submetidas às seguintes incubações: 25°C por 10 min, 37°C por

120 min, 85°C por 5 min. Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20°C para futura realização da PCR em tempo Real.

3.6.3. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR

A reação de polimerização em cadeia em tempo real (Real-Time PCR) combina a amplificação do PCR com detecção fluorescente automatizada, realizada como auxílio do aparelho de detecção da sequência. A amplificação e aquisição dos dados foram realizadas com a sonda Taqman em equipamento Abi Prism 7500 Fast (Applied Biosystems) como descrito previamente¹⁰². Neste processo de excitação a captação de fluorescência é realizada em cada ciclo de amplificação do PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das sequências dos genes de interesse. O protocolo utilizado para a reação de PCR em tempo real foi o seguinte: em 1,0 µl de cDNA, foram adicionados 5 µl de Solução Taqman Universal Fast Master Mix 2X (Applied Biosystems, EUA) e água suficiente para 10 µl de reação em cada poço da placa com 96 poços. As amostras aplicadas em duplicata e então incubadas a 95°C por 20s, e passaram por 40 ciclos térmicos a 95°C por 3s, 60°C por 30s.

Os iniciadores (primers) utilizados para a reação de PCR para eNOS e GAPDH foram:

eNOSsense5'-CACCTTGGAGTTCACCCAGT-3'eantisense5'CCACTCGTACTTGGGATGC-3',	IL-6sense5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'e
antisense5'-TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG'eGAPDHsense5'ACAGTCAGCCGCATCTTC	T-3' e antisense 5'- TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC-3'.

Os primers de miRNAs foram:miR-195(5'-GCAGCACAGAAATATTGG-'e5'AACATGTCTGCGTATCTC-3'),miR-338(5'-ATATCCTGGTGCTGAGTG-3'e 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'),miR-424(5'-AGCAGCAATTCATGTTTTG-3'e5'-AACATGTCTGCGTATCTC-3')e miR-582(5'-CAGTTGTTCAACCAGTTAC-3'e5'-AACATGTCTGCGTATCTC-3').

O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Os genes diferencialmente expressos foram normalizados pelo nível de expressão do gene *housekeeping* GAPDH, cuja expressão mostra-se inalterada nas condições experimentais. O SDS 1.4 *Software for the 7500 Fast System* (Applied Biosystems) foi utilizado para o processamento dos dados.

Os valores de ΔCt das amostras foram determinados pela subtração do valor de Ct médio do mRNA do gene alvo a partir do valor médio de Ct do gene *housekeeping* GAPDH. O parâmetro $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para expressar os dados de expressão relativos.

4. Western blot

As amostras de proteínas foram extraídas de sangue periférico total e submetidas à eletroforese em minigel de poli(acrilamida). Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, os blots foram tratados com leite em pó desnatado a 5% diluídos em PBS-T (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) por 1 hora e incubados com anticorpo específico para eNOS, overnight na diluição 1:2000 (BD *Transduction Laboratories*, Lexington, KY, EUA). A marcação foi feita por meio da *peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody* (1:2000) usando sistema de quimioluminescência (ECL, Amersham). A normalização foi feita com a hibridização das membranas com o anticorpo para β -actina.

5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (SE). O *software* Prism 6.0 foi usado para análise estatística. As comparações entre os grupos foram feitas por ANOVA de uma ou duas vias com um teste post hoc de Tukey. Para qPCR, os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes; os dados foram analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. A significância foi definida como $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Quantificação do RNA extraído

Os RNAs extraídos das amostras biológicas foram quantificados e analisados quanto à integridade, mostrando-se funcionais para as análises posteriores, como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1. Quantificação de RNA extraído das amostras de sangue periférico coletadas com adição de EDTA de indivíduos com TVP antes e depois da ultrassonografia e FBM.

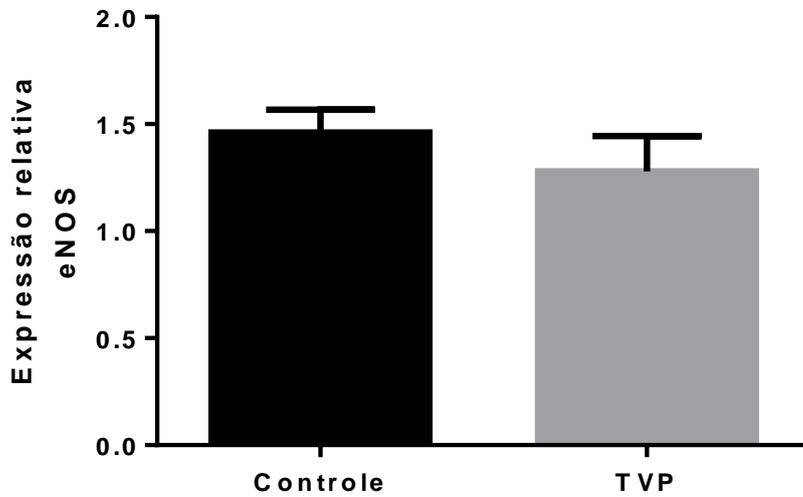
Grupo	Amostras	Concentração ng/ul	Absorbância nm 260/280
TVP controle inicial – TC1 1ª coleta	1	1065,9	2,00
	2	888,1	1,95
	3	1065,7	1,91
	4	978,6	1,93
	5	1094,6	1,99
	6	1111,7	2,05
	7	1438,6	2,00
	8	839,6	1,93
	9	958,2	1,89
	10	1049,3	1,95
TVP controle final – TC2 2ª coleta	11	863,1	1,94
	12	974,8	1,96
	13	1062,5	2,01
	14	984,8	1,93
	15	1056,8	1,91
	16	1291,6	2,00
	17	1129,5	1,95
	18	1040,8	1,92
	19	930,7	1,93
	20	949,5	1,98

TVP FBM inicial – TF1 1ª coleta	21	939,8	1,94
	22	847,3	1,99
	23	947,2	1,92
	24	1043,8	1,99
	25	1066,1	2,03
	26	1104,2	2,00
	27	934,6	1,89
	28	898,3	1,91
	29	959,8	2,04
	30	945,2	2,01
TVP FBM final – TF2 2ª coleta	31	899,9	2,03
	32	927,8	1,91
	33	999,4	2,03
	34	1076,3	1,98
	35	1022,2	1,99
	36	1193,2	1,94
	37	1049,5	2,02
	38	943,9	1,90
	39	988,4	1,97
	40	993,5	2,03

6.2. Análise de expressão gênica

A expressão de RNA mensageiro de eNOS foi analisada em indivíduos saudáveis e com TVP (Figura 1A). Nestes sujeitos, a expressão de eNOS foi semelhante, o mesmo perfil foi observado em indivíduos antes da primeira USV (grupos experimentais TC1 e TF1, Figura 1B). No entanto, a expressão de RNAm de eNOS no sangue periférico de indivíduos do grupo TVP irradiados com laser (TF2) foi significativamente maior em comparação com indivíduos com TVP não irradiados (TC2, Figura 1B; $p < 0,001$). O mesmo nível de significância foi observado entre os grupos TC1 e TF2 ($p < 0,001$) e entre os grupos TC2 e TF2 ($p < 0,001$), evidenciando o papel da terapia de fotobiomodulação na modulação de eNOS no sangue dos indivíduos com trombose venosa profunda (Figuras 1A e B).

A



B

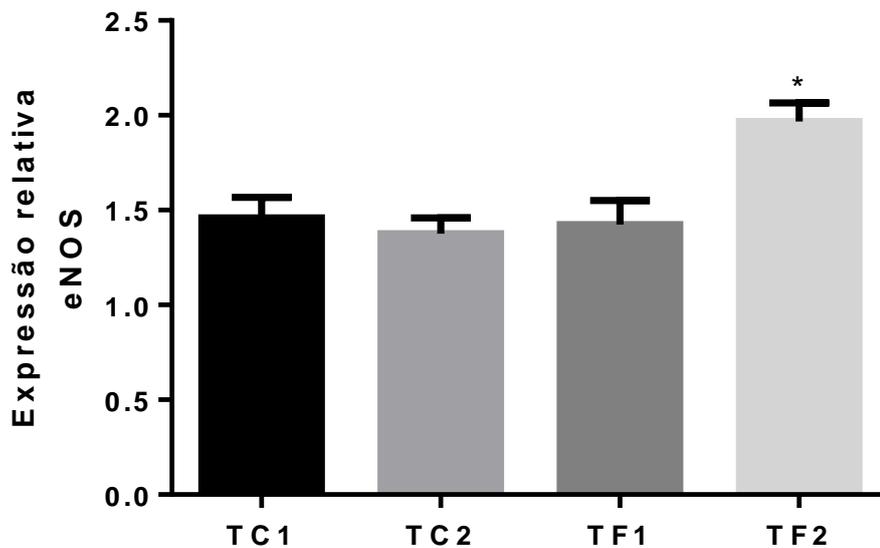


Figura 1. A) Quantificação da expressão de eNOS em sangue periférico de indivíduos com trombose venosa profunda (TVP) e indivíduos saudáveis (Controle); B) Expressão relativa de eNOS em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2), * $p \leq 0,001$ em relação aos demais grupos experimentais.

6.3 Análise da expressão proteica de eNOS

No sangue periférico de indivíduos com TVP e indivíduos saudáveis, realizamos a análise da expressão de eNOS por Western blot. Todos os grupos experimentais apresentaram expressão de eNOS semelhantes, exceto no grupo TF2, que apresentou níveis aumentados de expressão de eNOS em relação aos demais grupos experimentais (Figura 2).

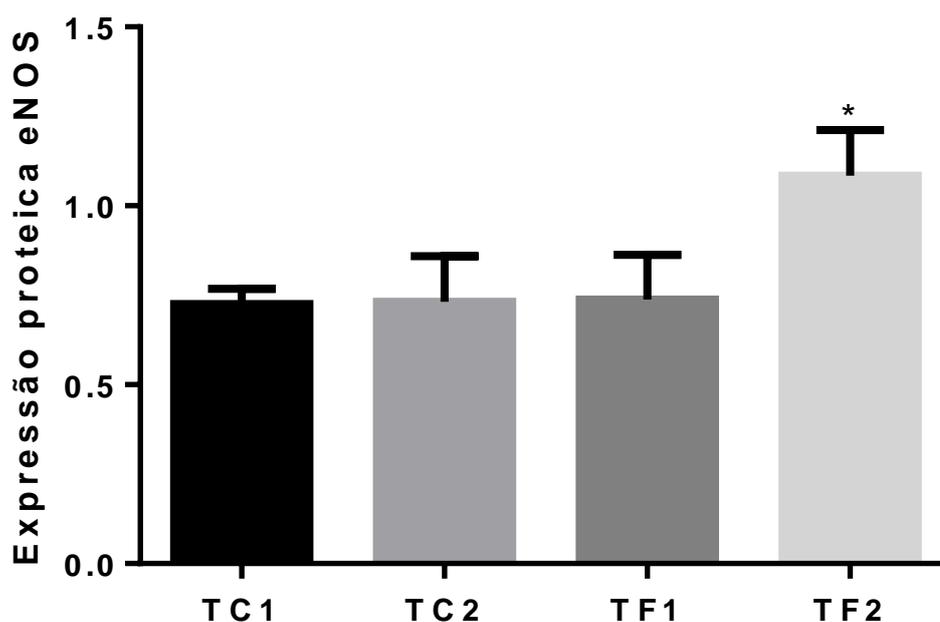
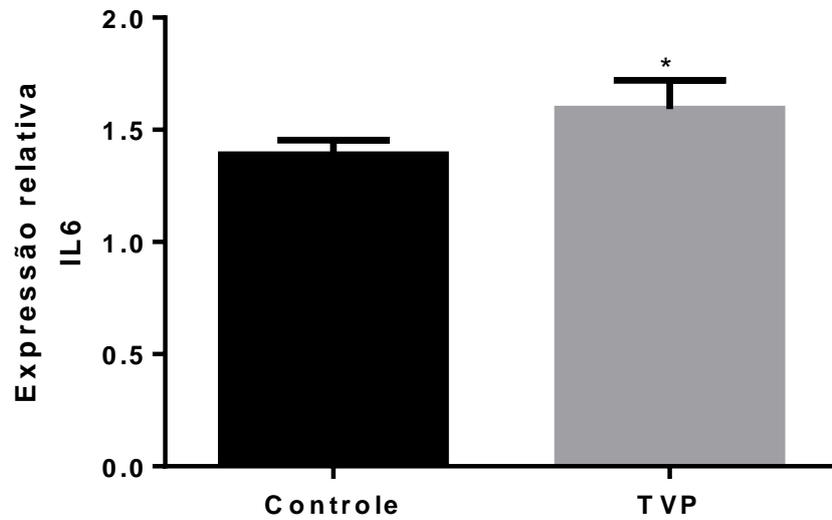


Figura 2. Expressão proteica de eNOS em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2), * $p < 0,001$ em relação aos demais grupos experimentais.

Em seguida analisamos a expressão de RNA mensageiro de IL-6 em indivíduos saudáveis e indivíduos com TVP (Figura 3A). A expressão de IL-6 foi maior em indivíduos com TVP em comparação com indivíduos saudáveis. A expressão de RNAm de IL-6 no sangue periférico de indivíduos do grupo TVP irradiados com laser (TF2) foi significativamente menor em comparação com indivíduos com TVP não irradiados (TC2, Figura 3B; $p < 0,05$). O mesmo nível de significância foi observado entre os grupos TC1 e TF2 ($p < 0,05$) e entre os grupos TC2 e TF2 ($p < 0,05$).

A



B

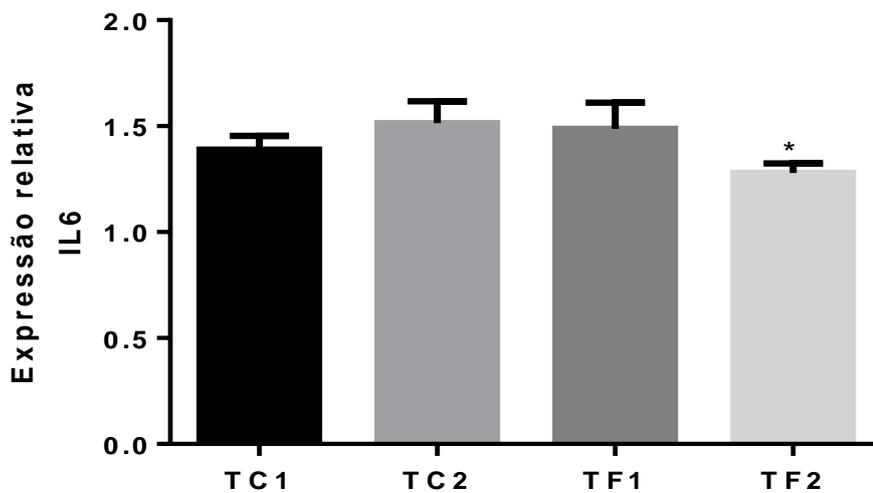
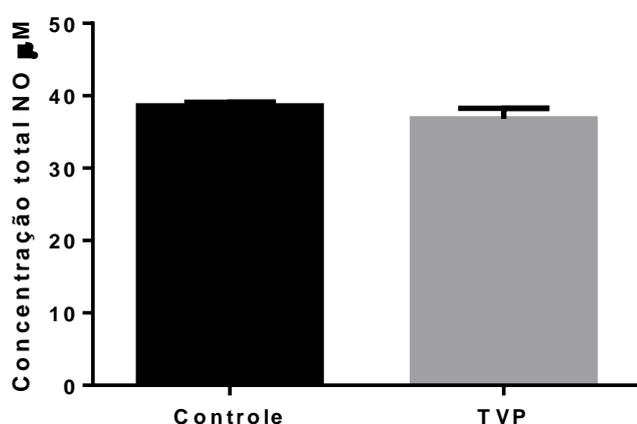


Fig 3. A) Quantificação da expressão de IL-6 em sangue periférico de indivíduos com trombose venosa profunda (TVP) e indivíduos saudáveis (Controle, * $p \leq 0,001$); B) Expressão relativa de IL-6 em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2), * $p \leq 0,05$ em relação aos demais grupos experimentais.

6.4 Dosagem de NO

Não observamos diferença entre os níveis de nitratos/nitritos detectados no sangue de indivíduos saudáveis e indivíduos com TVP (Figura 4A). Antes da primeira ultrassonografia vascular (indivíduos dos grupos TC1 e TF1) também não apresentaram diferença na dosagem de NO. Entretanto, no grupo TF2, o grupo após radiação, os níveis de NO foram maiores que todos os grupos experimentais (Figura 4B).

A



B

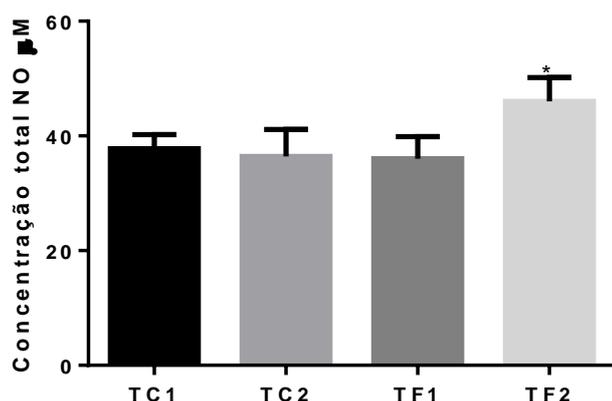


Figura 4. A) Determinação da concentração de NO (óxido nítrico) em sangue periférico de indivíduos com trombose venosa profunda (TVP) e indivíduos saudáveis (Controle); B) Níveis de concentração de NO (óxido nítrico) em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2), * $p \leq 0,001$ em relação aos demais grupos experimentais.

6.5 Análise de expressão gênica - microRNAs

Para examinar possíveis mecanismos de envolvimento do perfil de expressão de miRNAs na fisiopatologia da TVP, analisamos a expressão de 4 microRNAs (mir-338, mir-195, mir-424, mir-582) utilizando PCR em tempo real. A escolha destes microRNAs foi embasada em dados publicados em artigos e ferramentas de predição de alvos como TargetScan (<http://www.targetscan.org>) para avaliar a interação dos miRNAs em vias de ativação de NO ou na fisiopatologia da TVP. Os resultados da expressão gênica nos grupos experimentais foram dados pelo número de vezes (*fold change*) que apresentaram expressão aumentada (*upregulated*) ou diminuída (*downregulated*) quando comparados ao grupo Controle (Sham). A análise quantitativa da expressão de miR-338 evidenciou que, em indivíduos com TVP, foi encontrada uma menor expressão quando comparados com indivíduos saudáveis (Figura 5).

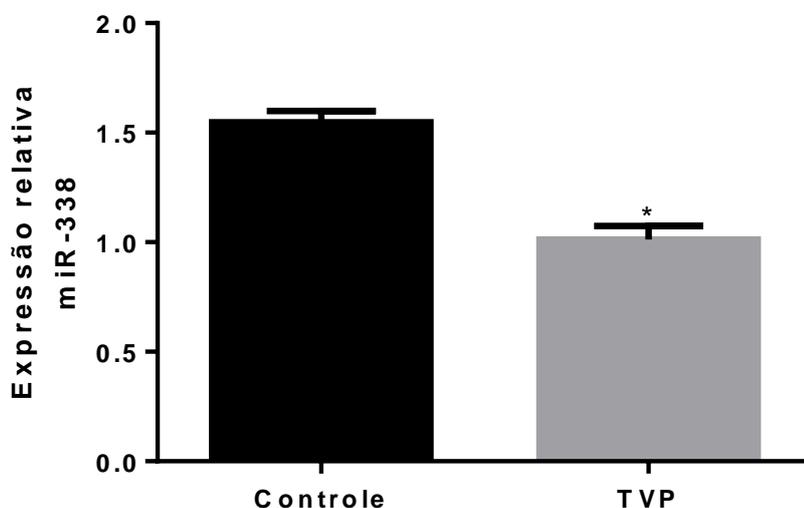


Figura 5. Quantificação da expressão de miR-338 em sangue periférico de indivíduos com trombose venosa profunda (TVP) e indivíduos saudáveis (Controle, * $p \leq 0,001$).

Antes da primeira USV, os grupos TC1 e TF1 apresentaram os mesmos níveis de expressão de miR-338. Entretanto, foi observado um aumento de expressão de miR-338 em indivíduos do grupo irradiado (TF2) em relação a todos grupos experimentais (Figura 6).

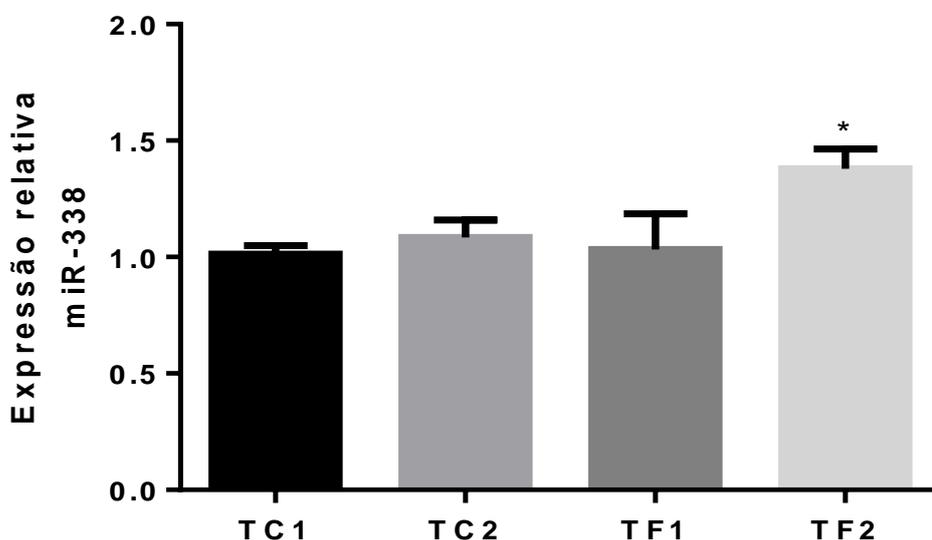


Figura 6. Expressão relativa de miR-338 em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2), * $p \leq 0,001$ em relação aos demais grupos experimentais.

De maneira semelhante, os indivíduos de TVP apresentaram maior expressão de miR-195 quando comparados com indivíduos saudáveis (Figura 7).

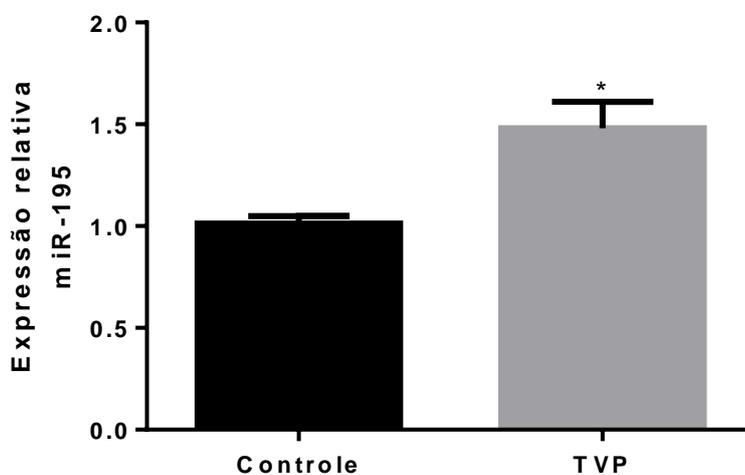


Figura 7. Quantificação da expressão de miR-195 em sangue periférico de indivíduos com trombose venosa profunda (TVP) e indivíduos saudáveis (Controle, * $p \leq 0,001$).

A terapia de fotobiomodulação provocou uma diminuição da expressão de miR-195 em indivíduos do grupo TF2 em comparação com o grupo TC1 – indivíduos com TVP sem intervenção (Figura 8).

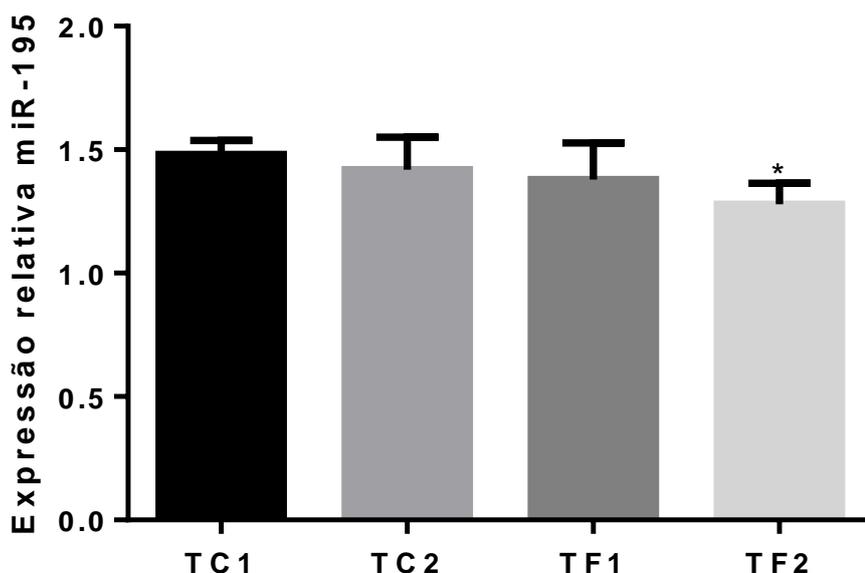


Figura 8. Expressão relativa de miR-195 em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2), * $p \leq 0,05$ em relação à TC1.

A expressão de miR-424 foi maior em indivíduos com TVP quando comparados com indivíduos saudáveis (Figura 9).

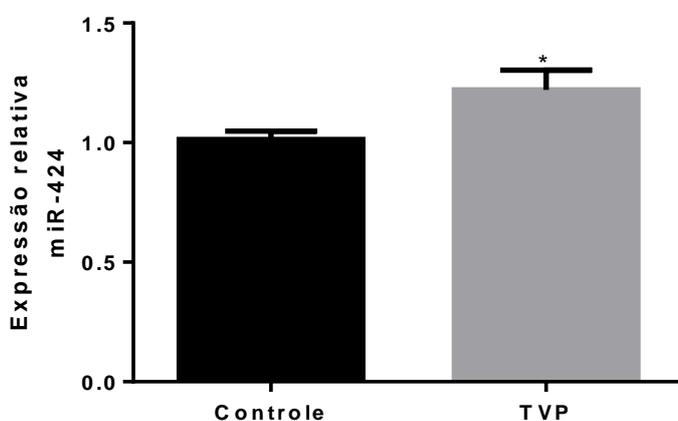


Figura 9. Quantificação da expressão de miR-424 em sangue periférico de indivíduos com trombose venosa profunda (TVP) e indivíduos saudáveis (Controle, * $p \leq 0,001$).

Entretanto, a terapia de fotobiomodulação não alterou a expressão de miR-424 em indivíduos com TVP (Figura 10).

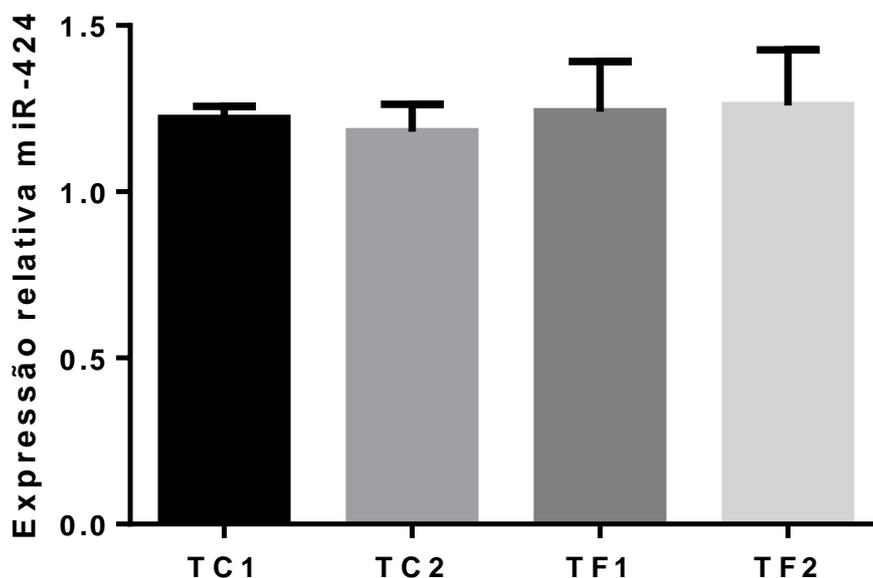


Figura 10. Expressão relativa de miR-424 em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2).

Em relação à expressão de miR-582, não foi detectada diferença entre indivíduos saudáveis e indivíduos com TVP (Figura 11).

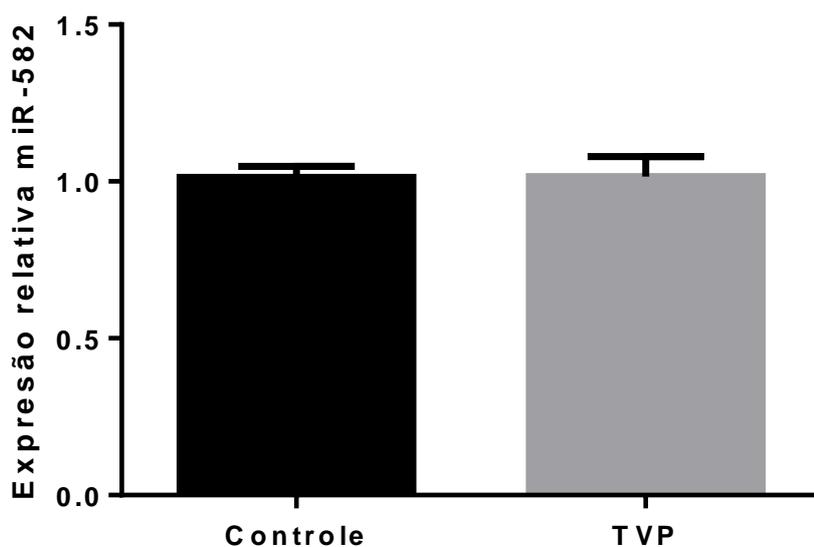


Figura 11. Quantificação da expressão de miR-582 em sangue periférico de indivíduos com trombose venosa profunda (TVP) e indivíduos saudáveis (Controle).

A terapia de fotobiomodulação também não alterou a expressão de miR-582 (Figura 12).

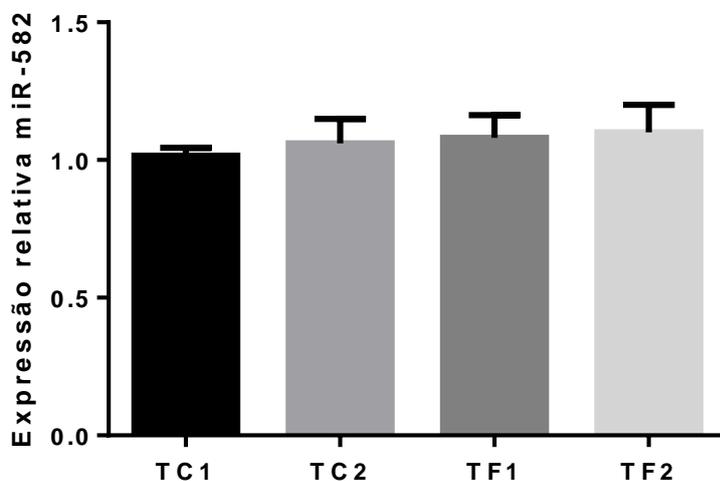


Figura 12. Expressão relativa de miR-582 em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia (TC1) e após ultrassonografia (TC2) e em indivíduos com TVP antes da ultrassonografia e fotobiomodulação (TF1) e após os procedimentos de ultrassonografia e fotobiomodulação (TF2).

6.6 Análise da correlação entre os miRNAs e genes alvos

Para avaliar a correlação entre os miRNAs de expressão significativamente diferenciada vs. Genes alvos foi utilizado o teste de correlação de Pearson, considerando significância de $p \leq 0,05$. Para esta análise, foram calculadas as correlações entre os miR-195 e miR-338 e o gene alvo eNOS e IL-6, respectivamente, antes (R1) e após a terapia de fotobiomodulação (R2) (Tabela 1).

Tabela 1: MicroRNAs com expressão correlacionada com o gene alvo após FBM.

MicroRNA	RNAm Alvo	R1	R2
miR-195	eNOS	-0,9235*	0,0987*
miR-338	IL-6	-0,9098*	0,2065*

As diferenças estatísticas foram calculadas, analisando o coeficiente de correlação de Pearson. Um valor de r positivo indica que a expressão de miRNAs é diretamente proporcional à expressão do RNA mensageiro (RNAm) do gene alvo. Um valor de R negativo indica que a correlação da expressão do RNAm gene alvo e do miRNA é inversa. R1 - correlação entre indivíduos com TVP (TC1); R2 – correlação entre indivíduos com TVP após FBM (TF2). * $p \leq 0,05$.

Ao correlacionar os miRNAs de expressão significativamente diferenciada vs. Genes alvos no grupo TF1, a expressão do miR-195 mostrou-se correlacionada negativamente com o gene eNOS ($R = -0,9235$; $p \leq 0,05$; Fig. 13).

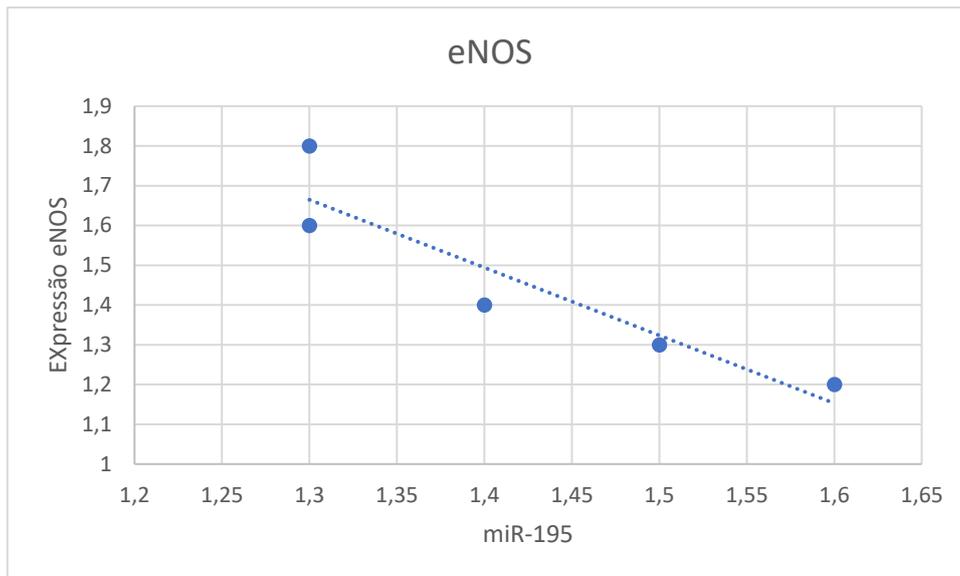


Figura 13. Mir-195 com expressão correlacionada com a expressão de eNOS em indivíduos com TVP. A linha representa a regressão linear, com correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.

Após fotobiomodulação (TF2), a correlação entre a expressão do gene eNOS e do miR-195 que antes era forte se tornou fraca ($r = -0,0987$; $p \leq 0,05$; Figura 14).

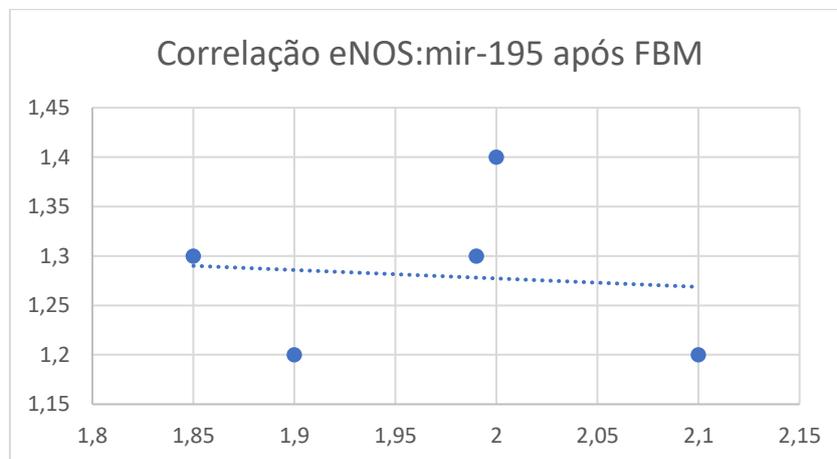


Figura 14. Mir-195 com expressão correlacionada com a expressão de eNOS em indivíduos com TVP tratados com FBM. A linha representa a regressão linear, com correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.

A expressão de miR-338 também se mostrou correlacionada negativamente com o gene IL-6 ($r = -0,9098$, $p \leq 0,05$; Fig.15).

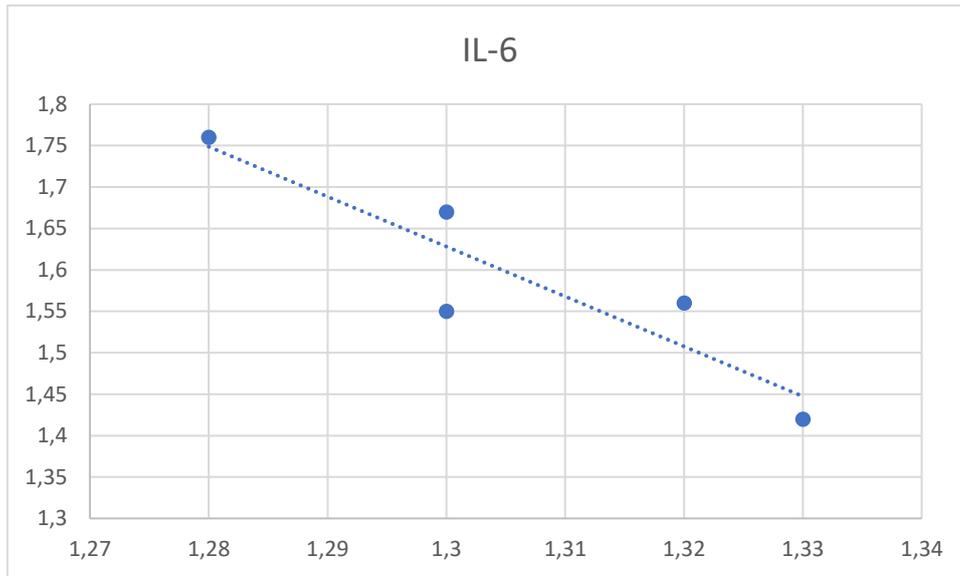


Figura 15. Mir-338 com expressão correlacionada com a expressão de IL-6 no grupo TF1. A linha representa a regressão linear, com correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.

A terapia de fotobiomodulação alterou a correlação de expressão de IL-6 e miR-338 nos grupos TF2 ($r = 0,2065$, $p \leq 0,05$, Figura 16).

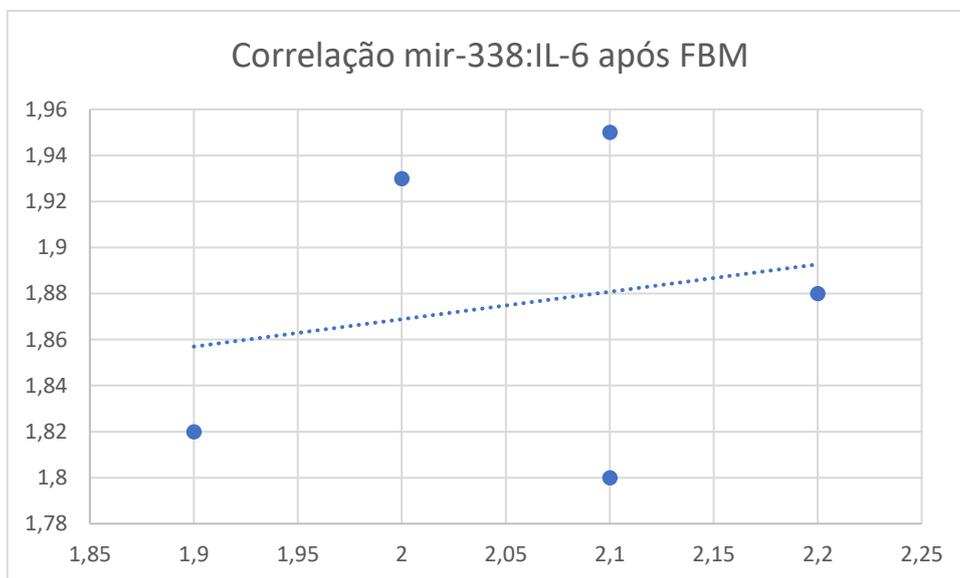


Figura 16. Mir-338 com expressão correlacionada com a expressão de IL6 em indivíduos com TVP tratados com FBM. A linha representa a regressão linear, com correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.

7 DISCUSSÃO

O tromboembolismo venoso (TEV), que inclui a embolia pulmonar (PE) e a trombose venosa profunda (TVP), é uma doença com alta mortalidade, prejuízo cardiovascular e diminuição da qualidade de vida²⁵. Nosso grupo é pioneiro em analisar o efeito da irradiação laser em indivíduos com trombose venosa profunda. Inicialmente verificamos o efeito da terapia de fotobiomodulação na vasodilatação de veias do membro inferior de indivíduos de TVP e a expressão da enzima sintetase de óxido nítrico induzida (iNOS) em sangue periférico. Nossos dados prévios evidenciaram um aumento significativo na expressão de iNOS em indivíduos tratados com terapia de fotobiomodulação e uma vasodilatação significativa em vasos periféricos à veia poplítea. Foi utilizada irradiação com comprimento de onda de $\lambda = 660$ nm que situa-se dentro do quadro óptico (cerca de 550-1000 nm) e que é absorvida pelos tecidos.

Muitos estudos apontam para a participação do óxido nítrico na TVP, especialmente com base em sua geração e sua ação vasodilatadora²⁵. Uma das enzimas geradoras de NO, a enzima sintetase de óxido nítrico endotelial (eNOS) desempenha um papel essencial na regulação da função endotelial e atua como um regulador principal do tônus vascular e da homeostase¹¹⁸. O envolvimento genético na TVP observado por vários autores. Grira e colegas (2016) evidenciaram que o polimorfismo do eNOS G894T está associado à TVP e pode ser considerado um fator de risco¹¹⁹. De fato, a proteína eNOS mutada se tornou instável. Foi demonstrado por um estudo *in vitro* que a proteína eNOS com aspartato na posição 298 é clivada, sugerindo que o gene da variante G894T eNOS tem um efeito funcional na proteína eNOS¹²⁰. Portanto, o polimorfismo pode reduzir a função da proteína eNOS, levando a uma redução da síntese de NO nas células endoteliais. Isso aumenta o risco de doença trombótica e aterosclerótica, incluindo trombose venosa profunda, reduzindo o efeito protetor do NO¹²¹.

No corrente estudo, apesar de não termos sequenciado o DNA de indivíduos com TVP para analisar o componente genético da doença, analisamos a expressão de eNOS e a concentração total de NO no sangue, além de biomarcadores transcricionais como miRNAs após a terapia de fotobiomodulação. Os elevados níveis de expressão de RNAm de eNOS em

indivíduos com TVP submetidos à terapia de fotobiomodulação sugerem um aumento da geração de NO. Corroborando este dado, também observamos um aumento da expressão proteica de eNOS em indivíduos com TVP irradiados. A terapia de fotobiomodulação possivelmente contribuiu para o aumento da quantidade de NO observado no sangue destes indivíduos pelo aumento da expressão de enzimas geradoras de NO, sejam elas eNOS e/ou iNOS (estudo prévio).

Os efeitos benéficos da terapia de fotobiomodulação sobre a biodisponibilidade de NO já foram reportados por vários autores¹²²⁻¹²⁵. Nossos resultados evidenciaram um aumento de NO em indivíduos com TVP após a terapia de FBM em comparação com indivíduos saudáveis. O NO endotelial regula vários processos fisiológicos, como a adesão agregação de plaquetas, afetando assim a propensão ou resistência à trombose e também pode modular proliferação de células de músculo liso vascular em resposta a lesão^{125,126}. A diminuição na quantidade de NO vascular biodisponível resulta em disfunção endotelial, resultando no desenvolvimento de doenças trombóticas^{121,124}.

Além disso, o NO é embricado no processo inflamatório pela ativação de receptores de bradicinina B2 que resulta em vasodilatação¹²⁵. A inflamação também tem sido associada à disfunção endotelial e pode ser acompanhado por trombose. Por exemplo, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1, aumentam a regulação a produção de TF e VWF, atenuando a expressão de óxido nítrico e prostaglandina I2¹²⁸.

Evidências recentes demonstraram que a TVP é intimamente relacionada a processos inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas¹²⁹. Atenção crescente tem sido dada à citocina pró-inflamatória IL-6. A interleucina -6 é uma proteína de ≈ 26 kDa, que é uma das principais citocinas inflamatórias e desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções.

A expressão aumentada de IL-6 tem sido observada no plasma de indivíduos com TVP, podendo desempenhar um papel vital na lesão inflamatória das células endoteliais vasculares. Entretanto, os fatores e vias de sinalização que desencadeiam a regulação positiva da IL-6 na TVP são ainda desconhecidos^{130,131}.

Nossos resultados evidenciaram um nível elevado de expressão de IL-6 em indivíduos com TVP. Embora sua expressão seja estritamente controlada por

mecanismos transcricionais, a síntese contínua desregulada de IL-6 desempenha um papel patológico na lesão tecidual e está envolvido em muitos diversos estudos que encontraram aumento da expressão de IL-6 em indivíduos com TVP e em modelos animais¹³²⁻¹³⁶. A terapia de fotobiomodulação em indivíduos com TVP reduziu os níveis de expressão de RNA mensageiro de IL-6. Esta ação antiinflamatória da terapia de FBM é amplamente conhecida^{82,137}.

Após a fotobiomulação, a biodisponibilidade de NO foi aumentada em indivíduos com TVP. Por ser um gás solúvel, o NO, quando liberado, fica imediatamente disponível após a irradiação¹²⁶ e além de vasodilatação, o óxido nítrico produzido pode inibir plaquetas e modular a coagulação sanguínea. O óxido nítrico derivado do endotélio também inibe a adesão de leucócitos ao endotélio¹³⁸, migração¹³⁹ e proliferação de células musculares vasculares¹⁴⁰ e estimula a migração e proliferação de células endoteliais¹⁴¹.

Na prática clínica o dímero D, um marcador de hipercoagulabilidade, é o único biomarcador utilizado clinicamente para a detecção de TVP. No entanto, possui baixa especificidade, porém alta sensibilidade para diagnóstico^{142,143}. O nível do dímero D também pode estar elevado não apenas na TVP, mas também em distúrbios não trombóticos, como infecção, coagulação intravascular disseminada, pós-cirurgia e acidente vascular cerebral¹⁴⁴. A p-selectina solúvel possui uma especificidade maior que o dímero D no diagnóstico de TVP dos membros inferiores¹⁴⁵. Entretanto, ainda necessita de validação e parâmetros devem ser estabelecidos¹⁴⁶. Assim, novos e menos invasivos marcadores moleculares são necessários para aliviar a dor dos indivíduos, além de economizar tempo e custo.

Os miRNAs circulantes, novos biomarcadores emergentes, podem auxiliar a diagnosticar a TVP com precisão e descobrir novos mecanismos subjacentes. Os miRNAs circulantes são estáveis no plasma e no soro¹⁴⁷ onde são facilmente detectados e analisados. Os miRNAs circulantes são abundantes e expressos de forma aberrante desempenhando papéis reguladores em várias doenças.

A expressão diferencial do miR-195 tem um papel importante não apenas na TVP, também está associada ao infarto agudo do miocárdio e está bem estabelecida no câncer¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. O aumento de expressão do miR-195 é observado em indivíduos com TVP^{115,151}. Nossos resultados corroboram os resultados

observados por estes autores, onde observamos o aumento da expressão de miR-195 em indivíduos com TVP. Os níveis circulantes deste miRNA se correlacionaram inversamente com os níveis de RNAm de eNOS. Qin e colaboradores observaram que o RNAm de eNOS é alvo do miR-195, possivelmente diminuindo a expressão de eNOS e conseqüentemente a produção de NO²⁵. Além disso, miR-195 apresentou menor expressão após terapia de fotobiomodulação em indivíduos com TVP, que apresentaram aumento da expressão de RNAm de eNOS.

A diminuída expressão do miR-338-5p em indivíduos com TVP foi negativamente relacionada para a expressão de IL-6¹⁵². De forma interessante, análise de bioinformática *in silico* sugere regiões complementares de ligação entre o miR-338-5p e o RNA mensageiro da IL-6 3'UTR. Assim, com base nestas observações, os autores propuseram que a diminuição do miR-338-5p pode ser uma das os gatilhos críticos para a expressão aprimorada de IL-6 na TVP¹⁵². A superexpressão do miR-338-5p inibiu efetivamente a expressão de IL-6 ao nível de RNAm e proteína, enquanto a supressão do miR-338-5p funcionou de maneira oposta. O miR-338-5p superexpresso poderia inibir a expressão de IL-6 e, por outro lado a diminuição de expressão de miR-338-5p poderia aumentar o processo inflamatório na TVP¹⁵².

Nossos resultados indicam que a expressão de miR-338 se mostrou diminuída em indivíduos com TVP, sendo que observamos que a expressão de IL-6 nestes indivíduos estava aumentada, havendo uma correlação inversamente proporcional entre miR-338 e IL-6. Entretanto, após a terapia de fotobiomodulação observamos aumento da expressão de miR-338 e diminuição da expressão de RNAm de IL-6. O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1b e IL-6 também foi associado ao aumento da expressão de miR-195^{153,154}. Assim, em nosso estudo, foi possível identificar dois miRNAs (miR-195 e -338) que poderiam participar da regulação da expressão de IL-6 em indivíduos com TVP.

A expressão de miR-424 foi regulada positivamente nas amostras de plasma e soro de indivíduos com TEV e foi independente e significativamente associado ao dímero D¹⁵⁵. Estudos de cultura celular sugerem que o miR-424 facilita a diferenciação de monócitos e regular o ciclo celular^{156,157}. O miRNA-424 superexpresso pode reduzir a proliferação, a migração de CEs¹⁵⁸. Como se sabe,

a regeneração e vasculogênese dos CEs contribuem para a formação e resolução do trombo¹⁵⁹. A alteração do nível de miR-424-5p na TVP foi observada anteriormente, sendo que os níveis circulantes de miR-424-5p foram elevados em indivíduos com TVP quando comparados com indivíduos saudáveis¹⁵⁴. Corroborando com os achados do estudo, nós também observamos aumento da expressão de miR-424 circulantes em indivíduos com TVP, embora o uso da terapia de fotobiomodulação não tenha sido capaz de modular esta expressão como observado nos miR-195 e -338.

Estudos in-silico mostraram que a expressão do miR-582 é regulada positivamente no TEV amostras de plasma de indivíduos²⁵. Com o aumento da expressão do miR-582, existe um aumento da taxa de proliferação e maior capacidade de migração das células de músculo liso. Em nosso estudo não observamos diferença de expressão entre indivíduos saudáveis e indivíduos com TVP. A terapia de fotobiomodulação não alterou os níveis circulantes de miR-582.

Em resumo, a terapia de fotobiomodulação quando aplicada em indivíduos com TVP com os parâmetros utilizados neste estudo foi capaz de aumentar a expressão de eNOS, aumentar a concentração de NO vascular, diminuir a expressão gênica de IL-6 e induzir a modulação de elementos de epigenética transcricionais como a expressão de miR-195 e -338 circulantes.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que os níveis circulantes de miRNAs -195, -338 e -424 estão alterados em indivíduos com TVP e especialmente o miR-195 e -338 são modulados pela terapia de fotobiomodulação. Estudos adicionais

sobre o papel desses miRNAs e sua ação são necessários para entender a ação seletiva da terapia de fotobiomodulação em processos transcricionais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Kakkar VV, Stringer MD. Prophylaxis of venous thromboembolism. *World J. Surg.* 1990; 14(5):670-8.

2-Geerts WH, Heit JA, Clagett GP, Pineo GF, Colwell CW, Anderson FA Jr, Wheeler HB. Prevention of venous thromboembolism. *Chest.* 2001; 119(1 Suppl):132S-175S.

3-Wheeler HB. Prevention of venous thromboembolism. Chest 2001; 119(1Suppl):176S-179S.

4-De Castro-Silva M. Venous thromboembolism in the State of Minas Gerais and its projection to Brazil: study based in 2,331,353 hospitalizations. Int Angiol 1997; 16(3): 193-6.

5. Stein PD, Patel KC, Kalra NK, El Baage TY, Savarapu P, Silbergleit A, Check FE. Deep venous thrombosis in a general hospital. Chest 2002; 122(3): 960-2.

6. Anderson FA Jr, Wheeler HB. Physician practices in the management of venous thromboembolism: a community-wide survey. J Vasc Surg. 1992; 16(5): 707-14.

7. White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of idiopathic deep venous thrombosis and secondary thromboembolism among ethnic groups in California. Ann Intern Med. 1998; 128(9): 737-40.

8. Franco RF. *Trombofilias Hereditárias*. In: Mafei FHA. Doenças Vasculares Periféricas. 3 ed. MEDSI: Rio Janeiro. 2002. p. 1387-96.

9. Yoshida WB. *Trombose Venosa Profunda dos Membros Superiores*. In Mafei FHA. Doenças Vasculares Periféricas. 3 ed. MEDSI: Rio Janeiro. 2002. p. 1433-41.

10. Lozano F. Actualización en trombosis venosa profunda que afecta a las extremidades inferiores : diagnóstico. Angiologia 2003; 55: 476-87

11. Aguiar ET. *Síndrome Pós-Trombótica*. In: Merlo I, Parente B, Komlós PP. Varizes e Teleangiectasias Diagnóstico e Tratamento. Revinter: Rio Janeiro. 2006. p. 307-12.

12. Haimovici H. *Trombose Venosa Isquêmica: Phaegmasia Cerúlea Dolens e*

Gangrena Venosa. In: Haimovici H. Haimovici Cirurgia Vasculuar Princípios e Técnicas. 4 ed. Di- Livros: Rio de Janeiro. 2000. p. 1275-89

13. Mello NA, Duque FLV. Trombogênese e Trombofilia. *J Vasc Br*. 2003; 2: 105-

14. Gómez-Medialdea R. Obesidad e implicaciones venosas (patologia venosa). *Angiologia*. 2003; 55: 120-22.

15. Silveira PRM. Trombose venosa profunda e gestação: aspectos etiopatogênicos e terapêuticos. *J Vasc Br*. 2002; 1: 65-70.

16. Santos MERC. Terapia de reposição hormonal e trombose. *J Vasc Br* 2002; 2: 17-22.

17. Reibschaid SM. *Tromboembolia Pulmonar: Incidência, Etiopatogenia e Fisiopatologia*. In: Mafei FHA. Doenças Vasculares Periféricas. 3 ed. MEDSI: Rio Janeiro. 2002. p. 1441-52

18. Heit JA, O'Faloon WM, Petterson TM, Lohse CM, Silverstein MD, Mohr DN, Melton LJ 3rd. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population based study. *Arch Intern Med*. 2002; 162(11): 1245-48.

19. Weinmann EE, Salzman EW. Deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 331(24):1630-41

20. Yeager RA, Moneta GL, Edwards JM, Taylor LM Jr, McConnell DB, Porter JM. Deep vein thrombosis associated with lower extremity amputation. *J Vasc Surg* 1995; 22(5):612.

21. Fowkes FJ, Price JF, Fowkes FG. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25(1): 1-5.

22. Kearon C. Natural history of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107(23Suppl 1): I22-30
23. Birdwell B. Recent clinical trials in the diagnosis of deep-vein thrombosis. *Curr Opin Hematol* 1999; 6(5): 275-9.
24. Lennox AF, Delis KT, Serunkuma S, Zarka ZA, Daskalopoulou SE, Nicolaides AN. Combination of a clinical risk assessment score and rapid whole blood D-dimer testing in the diagnosis of deep vein thrombosis in symptomatic patients. *J Vasc Surg* 1999; 30(5): 794-803.
25. Qin J, Liang H, Shi D, Dai J, Xu Z, Chen D, Chen X, Jiang Q. A panel of microRNAs as a new biomarker for the detection of deep vein thrombosis. *JThromb Thrombolysis*. 39 (2015) 215-221.
26. Morimoto Y, Sugimoto T, Mukai T, Okita Y, Okada M. Diagnosis of deep vein thrombosis using platelet scintigraphy. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 7(3):138-4
27. Patel S, Kazerooni EA. Helical CT for the evolution of acute pulmonary embolism. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185(1): 135-149.
28. Rosen CL, Tracy JA. The diagnosis of lower extremity deep venous thrombosis. *Emerg Med Clin North Am* 2001; 19(4): 895-912.
29. Fraser DG, Moody AR, Morgan PS, Martel AL, Davidson I. Diagnosis of lower-limb deep venous thrombosis: a prospective blinded study of magnetic resonance direct thrombus imaging. *Ann Intern Med* 2002;136(2): 89-98.
30. Ramzi DW, Leeper KV. DVT and pulmonary embolism: part II. Treatment and prevention. *Am Fam Physician* 2004; 69(12): 2841-8.
31. Hansson PO, Sörbo J, Eriksson H. Recurrent venous thromboembolism after

deep vein thrombosis: incidence and risk factors. Arch Intern Med 2000; 160(6): 769-74.

32. Lagerstedt CI, Olsson CG, Fagher BO, Öqvist BW, Albrechtsson U. Need for long-term anticoagulant treatment in symptomatic calf-vein thrombosis. Lancet 1985; 2(8454): 515-8

33. Labropoulos N, Kang SS, Mansour MA, Giannoukas AD, Moutzouros V, Baker WH. Early thrombus remodelling of isolated calf deep vein thrombosis. Eur J Vasc Endovasc Surg 2002; 23(4): 344-8.

34. Pinede L, Ninet J, Duhaut P, Chabaud S, Demolombe-Rague S, Durieu I, Nony P, Sanson C, Boissel JP; Investigators of the "Durée Optimale du Traitement AntiVitamines K" (DOTAVK) Study. Comparison of 3 and 6 months of oral anticoagulant therapy after a first episode of proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism and comparison of 6 and 12 weeks of therapy after isolated calf deep vein thrombosis. Circulation 2001; 103(20): 2453-60.

35. Bates SM, Ginsberg JS. Clinical practice. Treatment of deep-vein thrombosis. N Engl J Med 2004; 351(3): 268-77.

36. Sales Cunha Sx e Andros G atlas of duplex, ultrasonography. Apleton Davies, inc Pasadena CA 1988.

37. Taylor K BurnsP, Wells P, clinical application of, doppler ultrasound. Raven Press NY 1988.

38. Zierler BK. Ultrasonography and diagnosis of venous thromboembolism. Circulation 2004; 109(12 Suppl 1): I9-14.

39. Kelly J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ. Screening for subclinical deep-vein thrombosis. Q J M 2001; 94(10): 511-19.

40. Mattos MA, Londrey GL, Leutz DW, Hodgson KJ, Ramsey DE, Barkmeier LD,

Stauffer ES, Spadone DP, Sumner DS. Color-flow duplex scanning for the surveillance and diagnosis of acute deep venous thrombosis. *J Vasc Surg* 1992; 15(2):366-76.

41. Lohr JM, Hasselfeld KA, Byrne MP, Deshmukh RM, Cranley JJ. Does the asymptomatic limb harbor deep venous thrombosis? *Am J Surg* 1994; 168(2):184-7.

42. Mani R, Regan F, Sheridan J, Batty V. Duplex ultrasound scanning for diagnosing lower limb deep vein thrombosis. *Dermatol Surg*. 1995;21(4):324-326.

43. Powis RL. Angiodynography, a new real time look at the vascular system, *Appl Radiol* 1986;15:55-9

44. Dur AHM, Mackaay AJC, Rauwerda, JA. Duplex assessment of clinically diagnosed venous insufficiency. *Br. J. Surg.* 1992;79:155-156.

45. Neglén P, Raju S. Detection of outflow obstruction in chronic venous insufficiency. *Vasc Surg.* 1993;17:583-592.

46. Powis RL. Color flow imaging. *Radiographics* 1994;14:415-28. Meissner MH. Duplex follow-up of patients with DVT: does it have clinical significance? *Semin Vasc Surg* 2001; 14(3):215-21.

47. Cunha SS, Filho DM. Capítulo 2 IN: Guia prático de ultrassonografia vascular. Carlos Alberto Engellhorn, Domingos de Moraes Filho, Fanilda Souto Barros, Nostradamus Augusto Coelho capítulo 2, 9-12, 2011.

48. Wong JK, Duncan JL, Nichols DM. Whole-leg duplex mapping for varicose veins: observations on patterns of reflux in recurrent and primary legs, with clinical correlation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;25(3)267-275.

49. Cleridge SP, Labropoulos N, Partsch H, Myers K, Nicolaidis A, Cavezzi A.

Duplex ultrasound investigation of the veins in chronic venous disease of the lower limbs – UIP Consensus document. Part I Basic Principles. Eur J VascEndovasc Surg. 2006;31:83–92.

50. Engelhorn CA, Picheth FS, Castro Júnior N, Dabul Júnior NM, Gomes CS. Estudo do sistema venoso superficial com o duplex scan a cores. Cir. Vasc. Angiol. 1996;12(4):12-14.

51. Decamp PT. Ambulatory venous pressure determinations in postphlebitic and related syndromes. Surgery. 1951;29:365-380

52. Garcia-Gimeno M, Rodriguez-Camarero S, Tagarro-Villalba S et al. Duplex mapping of 2036 primary varicose veins. J Vasc Surg. 2009;49(3):681-690.

53. Zwiebel WJ. Introdução à ultrassonografia vascular. 2003;4:294- 305

54. Maffei FHA, Rollo HA. Trombose venosa profunda dos membros inferiores: Patogenia, Patologia, Fisiopatologia e diagnóstico. In :Maffei FHA, Lastória L, Yoshida WB, Rollo HÁ, GianniniM, Moura R Doenças vasculares periféricas.4 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008 p 1557-78.

55. Cogo A, Lensing AWA, WellsP, Prandoni Pet al. Noninvasive objective tests for the diagnosis of clinically suspected deep-vein thrombosis. Haemostasis 1995;25:27-39.

56. Rollo HA. Diagnóstico ultrassonográfico na trombose venosa profunda, embolia pulmonar e síndrome pós trombótica. IN: Maffei FHA, Lastória L, YoshidaWB, RolloHA, Giannini M, Moura R. Doenças vasculares periféricas.4 edição São Paulo: Guanabara Koogan; 2008 p 522-34

57. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. FASEB J, 1993;7:349-

83. Erdmann J, Stark K, Esslinger UB et al (2013) Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction. Nature 504:432–436 21.

58. Kiechele FL, Malinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol*, 1993; 100:567-75.
59. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992; 6:3051-64.
60. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43:109-42.
61. Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc* 1996; 209:1297-302.
62. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*, 1995; 221:220-35.
63. Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol*, 1995; 60:323-55.
64. Conger FD. Endothelial regulation of vascular tone. *Hosp Pract*, 1994; 15:117-26.
65. Wennmalm A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Int Med*, 1994; 235:317-27.
66. Wong GKT, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nephrol Dial Transplant*, 1996; 11:215-20.
67. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*, 2001; 88:756-62.
68. Chester AH, O'neil GS, Moncada S, Tadjkarimi S, Yacoub MH. Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Lancet*, 1990; 336:897-900.

69. Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation*, 1993; 88:2451-4.
70. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*, 1995; 82:1598-610.
71. Arndt H, Russell JB, Kurose I, Kubes P, Granger DN. Mediators of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules elicited by inhibition of nitric oxide synthesis. *Gastroenterology*, 1993; 105:675-679.
72. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1991; 88:4651-5.
73. Wennmalm A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Int Med*, 1994; 235:317-27.
74. Verhaar MC, Westerweel PE, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Free radical production by dysfunctional eNOS. *Heart* 2004, 90 (5): 494-5
75. Peixe JE, Marsden PA. Endoteliais da sintase do óxido nítrico: uma visão sobre a regulação de genes específicos de células no endotélio vascular. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006, 63 (2):15-16.
76. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium.. *Frontiers in Physiology* 2013,4: 347.
75. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*, 1993;7:349-83. Erdmann J, Stark K, Esslinger UB et al (2013) Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction. *Nature* 504:432–436 21.
76. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schawarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 1994; 23

77. Murrel GAC, Dolan MM, Jang D, Szabo C, Warren RF, Hannafin JA. Nitric oxide: an important articular free radical. *J Bone Joint Surg*, 1996; 78-A:265-74.
78. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43:109-42.
79. Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg*. 2006;24:474-9.
80. Medeiros JL, Nicolau RA, Nicola EM, dos Santos JN, Pinheiro AL. Healing of Surgical Wounds Made with lambda970-nm Diode Laser Associated or with Laser Phototherapy (lambda 655 nm) or Polarized Light (lambda 400-2000 nm). *Photomed Laser Surg*. 2010; 28:489-96.
81. Rocha JCT. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. *Rev Bras Promoção Saúde*. 2004;17:44-8.
82. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP, et al. Antiinflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wave lengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B*. 2007;89:50-5.
83. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Braz J Pharm Sci*. 2005;41:27-51.
84. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PS, Iversen VV, et al. Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Reduction of TNF Levels in Acute Inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2006;24:33-7
85. Sakihama H. Effect of a helium-neon laser on cutaneous inflammation. *Kurume Med J*. 1995;42:299-305.

86. Mizutani K, Musya Y, Wakae K, Kobayashi T, Tobe M, Taira K, et al. A Clinical Study on Serum Prostaglandin E2 with Low-Level Laser Therapy. *Photomed Laser Surg.* 2004;22:537-9.
87. Viegas VN, Abreu ME, Viezzer C, Machado DC, Filho MS, Silva DN, et al. Effect of Low-Level Laser Therapy on Inflammatory Reactions during Wound Healing: Comparison with Meloxicam. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:467-3.
88. Gavish L, Perez LS, Reissman P, Gertz SD. Irradiation with 780 nm Diode Laser Attenuates Inflammatory Cytokines but Upregulates Nitric Oxide in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages: Implications for the Prevention of Aneurysm Progression. *Lasers Surg Med.* 2008;40:371-8.
89. Rocha Jr AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol.* 2006;81:150-162.
90. Dall Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24:909-16.
91. Correa F, Martins RABL, Correa JC, Iversen VV, Joenson J, Bjordal JM. Low-Level Laser Therapy (GaAs =904 nm) Reduces Inflammatory Cell Migration in Mice with Lipopolysaccharide-Induced Peritonitis. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:245.
92. Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.* 2006;24:474-9.
93. Birney E. Chromatin and heritability: how epigenetic studies can complement genetic approaches. *Trends Genet.* (2011) 27 (5), 172–176.

94. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* (2007) 447 (7143), 433–440.
95. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* (2007)128 (4), 635–638
96. Baccarelli A, Tarantini L, Wright RO, Bollati V, Litonjua AA, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Repetitive element DNA methylation and circulating endothelial and inflammation markers in the VA normative aging study. *Epigenetics*. 2010; 5(3):222-8.
97. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ. Res.* (2012) 110 (3),483–495.
98. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* (2011) 123 (19), 2145–2156.
99. Lee WC, Chavez YE, Baker T, Luce BR. Economic burden of heart failure: A summary of recent literature. *Heart Lung*. 2004; 33(6):362-71.
100. Bartel DP. “microRNAs: target recognition and regulatory functions,” *Cell*, vol. 136,no. 2, pp. 215–233, 2009.
- 101 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, vol. 75,no. 5, pp.843–854, 1993.
102. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* (2007)128 (4), 635–638
103. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. “Many roads to maturity:microRNA biogenesis pathways and their regulation,” *Nature Cell Biology*, vol. 11, no. 3, pp. 228–234, 2009.

104. Krek D, Grun M, Poy N et al., "Combinatorial microRNA target predictions," *Nature Genetics*, vol. 37, no. 5, pp. 495–500, 2005.
105. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294 (2001) 853-858.
106. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 93 (2013) 327-358.
107. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (2002) 15524- 15529.
108. Teruel-Montoya R, Kong X, Abraham S, Ma L, Kunapuli SP, Holinstat M, Shaw CA, McKenzie SE, Edelstein LC, Bray PF. MicroRNA expression differences in human hematopoietic cell lineages enable regulated transgene expression. *PLoS One*. 9 (2014) e102259.
109. Thorsen M, Blondal T, Mouritzen P. Quantitative RT-PCR for MicroRNAs in Biofluids. *Methods Mol Biol*. 1641 (2017) 379-398.
110. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ. Res*. (2012) 110 (3), 483–495.
111. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J ClinInvest*. 122 (2012) 2331-2336.
112. Goldhaber SZ, Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Lancet*. 379 (2012) 1835-1846.

113. Philbrick JT, Heim S. The d-dimer test for deep venous thrombosis: gold standards and bias in negative predictive value. *Clin Chem.* 49 (2003) 570-574.
114. Le GG, Righini M. Controversies in the diagnosis of venous thromboembolism. *JThromb Haemost.* 13 Suppl 1 (2015) S259-S265.
115. Starikova I, Jamaly S, Sorrentino A, Blondal T, Latysheva N, Sovershaev M, Hansen JB. Differential expression of plasma miRNAs in patients with unprovoked venous thromboembolism and healthy control individuals. *ThrombRes.* 136 (2015)66-572.
116. Wang X, Sundquist K, Elf JL, Strandberg K, Svensson PJ, Hedelius A, Palmer K, Memon AA, Sundquist J, Zoller B. Diagnostic potential of plasma microRNA signatures in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 116 (2016): 328-336.
117. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer J.* 14 (2008) 1-6.
118. Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch.* 2016;468(7):1125-1137. doi:10.1007/s00424-016-1839-0.
119. Grira, N. , Abdelhafidh, N. , Ayoub, M. , Sendesni, R. , Adib, B. , Stambouli, N. , Othmani, S. , Aouni, Z. and Mazigh, C. (2016) Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in a Tunisian Deep Vein Thrombosis Group. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4, 33-41.
120. Li, Y.Y., Zhai, Z.G., Yang, Y.H., Pang, B.S., Wang, H.Y., Zhang, W., Zhao, L., Wang, J. and Wang, C. (2011) Association of the 894G>T Polymorphism in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene with Risk of Venous Thromboembolism in Chinese Population. *Thrombosis Research*, 127, 324-327.

121. Tesauro, M., Thompson, W.C., Rogliani, P., Qi, L., Chaudhary, P.P. and Moss, J. (2000) Intracellular Processing of Endothelial Nitric Oxide Synthase Isoforms Associated with Differences in Severity of Cardiopulmonary Diseases: Cleavage of Proteins with Aspartate vs. Glutamate at Position 298. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 2832-2835.
122. Chen CH, Hung HS, Hsu SH (2008) Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression. *Lasers Surg Med* 40(1):46–54.
123. Tuby H, Maltz L, Oron U (2006) Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med* 38(7):682–688
124. Houeild NN, Sekhejane PR, Abrahamse H (2010) Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. *Lasers Surg Med* 42(6):494–502.
125. Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N (2009) Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 47:256–263
126. Samoilova KA, Zhevago NA, Menshutina MA, Grigorieva NB (2008) Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic level: I. diabetic patients. *Photomed Laser Surg* 26(5):433–42.
127. Ancion, A., Tridetti, J., Nguyen Trung, M. L., Oury, C., & Lancellotti, P. (2019). A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Focus on Perindopril. *Cardiology and therapy*, 8(2), 179–191.

128. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis (2014). *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:130.
129. Branchford BR, Carpenter SL. The role of inflammation in venous thromboembolism. *Front Pediatr.* 2018;6:142. doi: 10.3389/fped.2018.00142
130. Sharma A, Singh K, Biswas A, Ranjan R, Kishor K, Pandey H, Kumar R, Mahapatra M, Oldenburg J, Saxena R. Impact of interleukin 6 promoter polymorphisms (-174 G > C, -572 G > C and -597 G > A) on plasma IL-6 levels and their influence on the development of DVT: a study from India. *Hematology.* 2018;23:833–838. doi: 10.1080/10245332.2018.1483546
131. Malaponte G, Polesel J, Candido S, Sambataro D, Bevelacqua V, Anzaldi M, Vella N, Fiore V, Militello L, Mazzarino MC, et al. IL-6-174 G > C and MMP-9-1562 C > T polymorphisms are associated with increased risk of deep vein thrombosis in cancer patients. *Cytokine.* 2013;62:64–69. doi: 10.1016/j.cyto.2013.02.017
132. Matos MF, Lourenço DM, Orikaza CM, Bajerl JA, Noguti MA, Morelli VM. The role of IL-6, IL-8 and MCP-1 and their promoter polymorphisms IL-6 -174GC, IL-8 251AT and MCP-1 -2518AG in the risk of venous thromboembolism: a case-control study. *Thromb Res.* 2011;128:216–220. doi: 10.1016/j.thromres.2011.04.016
133. Vormittag R, Hsieh K, Kaider A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Mannhalter C, Pabinger I. Interleukin-6 and interleukin-6 promoter polymorphism (-174) G > C in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2006;95:802–806.
134. Mahemuti A, Abudureheman K, Aihemaiti X, Hu XM, Xia YN, Tang BP, Upur H. Association of interleukin-6 and C-reactive protein genetic polymorphisms levels with venous thromboembolism. *Chin Med J (Engl).* 2012;125:3997–4002.

135. Wu J, Zhu H, Yang G, Wang Y, Wang Y, Zhao S, Zhao M, Peng S. IQCATAVV: To explore the effect of P-selectin, GPIIb/IIIa, IL-2, IL-6 and IL-8 on deep venous thrombosis. *Oncotarget*. 2017;8:91391–91401. doi: 10.18632/oncotarget.20588
136. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Hama M, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic IL-6 and its application to thrombus age estimation. *Int J Legal Med*. 2015;129:1021–1025. doi: 10.1007/s00414-015-1147-9
137. Manchini MT, Serra AJ, Feliciano Rdos S, et al. Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PLoS One*. 2014;9(7):e101270.
138. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96: 60-8.
139. Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney JF Jr, Welch GN, Loscalzo J. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 96: 2630-8.
140. Grag UC, Hassid A. Nitric oxide (NO) and 8-bromo-cyclic GMP inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1974-8.
141. Fukuo K, Inoue T, Morimoto S, et al. Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 669-72
142. Jacobs B, Obi A, Wakefield T. Diagnostic biomarkers in venous thromboembolic disease. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 2016;4:508–17.

143. Coleman DM, Wakefield TW. Biomarkers for the diagnosis of deep vein thrombosis. *Expert Opin Med Diagn* 2012;6:253–7.
144. Bates SM, Jaeschke R, Stevens SM, et al. Diagnosis of DVT: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141(2 suppl):e351S–418S.
145. Schaefer JK, Jacobs B, Wakefield TW, et al. New biomarkers and imaging approaches for the diagnosis of deep venous thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2017;24:274–81.
146. Ghozlan MF, Osman AA, Mahmoud HM, et al. Comprehensive study on laboratory biomarkers for prediction and diagnosis of deep venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;26:255–60.
147. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:145–56.
148. Zhao FL, Dou YC, Wang XF, et al. Serum microRNA-195 is down-regulated in breast cancer: a potential marker for the diagnosis of breast cancer. *Mol Biol Rep* 2014;41:5913–22.
149. Cai H, Zhao H, Tang J, et al. Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *J Surg Res* 2015;194:505–10.
150. Long G, Wang F, Duan Q, et al. Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction. *PLoS One* 2012;7:e50926.
151. Mo J, Zhang D, Yang R. MicroRNA-195 regulates proliferation, migration, angiogenesis and autophagy of endothelial progenitor cells by targeting GABARAPL1. *Biosci Rep*. 2016;36(5):e00396.

152. Zhang Y, Zhang Z, Wei R, et al. IL (Interleukin)-6 Contributes to Deep Vein Thrombosis and Is Negatively Regulated by miR-338-5p. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(2):323-334. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313137
153. Almeida MI, Silva AM, Vasconcelos DM, et al. miR-195 in human primary mesenchymal stromal/stem cells regulates proliferation, osteogenesis and paracrine effect on angiogenesis. *Oncotarget.* 2016;7(1):7-22.
154. Wang X, Sundquist K, Elf JL, et al. Diagnostic potential of plasma microRNA signatures in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 2016;116(2):328-336. doi:10.1160/TH16-01-0071
155. Jiang, Z., Ma, J., Wang, Q., Wu, F., Ping, J., & Ming, L. (2017). Circulating microRNA expression and their target genes in deep vein thrombosis: A systematic review and bioinformatics analysis. *Medicine*, 96(50), e9330.
156. Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19849–54.
157. Forrest AR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, et al. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. *Leukemia* 2010;24:460–6.
158. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LO, et al. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2595–606.
159. Kwaan HC, Samama MM. The significance of endothelial heterogeneity in thrombosis and hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2010;36:286–300.

10. Anexos

Tabela 3. Valores dos diâmetros das veias antes e após a irradiação laser em indivíduos com TVP.

Nome	Data de Nascimento	Membro acometido pela TVP	Data do Diagnóstico de TVP	Diâmetro da Veia Femoral Superficial	Diâmetro da Veia Poplítea	Diâmetro da Veia Gastrocnemias medial	Diâmetro da Veia Gastrocnemias lateral	Diâmetro da Veia Safena Parva
JS	04/07/1961	MIE	13/06/2015	104 mm / 115mm	177 mm / 92mm	75 mm / 96mm	35mm / 38mm	66mm / 66mm
IS	12/01/1989	MID	01/05/2015	8mm /89mm	57mm /55mm	65mm / 32 mm	7mm / 74mm	48mm / 74mm
AB	19/10/1977	MID	27/06/2015	47 mm/0,48mm	77mm/76mm	24mm/24mm	2mm/2mm	39mm/4mm
AS	12/03/1973	MIE	24/07/2015	1.24mm / 1,25mm	88mm / 86mm	23mm / 33mm	29mm / 27mm	74 mm /67mm
JR	22/01/1981	MIE	15/01/2015	5,5mm/5,2mm	6,1mm/6,1mm	2,9mm/2,4mm	1,8mm/2,4mm	3,9mm/3,3mm
DS	25/11/1971	MID	10/02/2015	6,8mm/6,8mm	6,1mm/6,4mm	2,3mm/1,8mm	2,5mm/2,8mm	2,0mm/2,0mm
WP	11/02/1962	MID	05/02/2015	8,4mm/7,7mm	6,7mm/7,4mm	5,5mm/4,7mm	2,5mm/2,4mm	6,8mm/6,5mm
MF	15/10/1952	MID	15/09/2015	6,2mm/6,1mm	4,1mm/4,7mm	2,4mm/3,4mm	2,2mm/2,2mm	3,4mm/3,7mm
MA	22/02/1973	MIE	11/07/2015	7,4mm/7,6mm	5,2mm/5,6mm	3,0mm/3,2mm	2,4mm/3,2mm	4,0mm/4,3mm
RO	21/01/1977	MIE	05/06/2015	6,6mm/6,3mm	4,1mm/4,4mm	2,8m/2,6mm	3,2mm/2,8mm	3,6mm/3,2mm
JB	17/07/1972	MIE	20/04/2016	6,6mm/6,6mm	4,3mm/4,1mm	1,8mm/1,7mm	1,3mm/1,9mm	2,0mm/2,0mm
EL	04/03/1960	MID	07/01/2016	5,4mm/6,5mm	5,0mm/4,6mm	2,0mm/1,4mm	1,4mm/1,3mm	2,7mm/1,7mm
SP	07/03/1957	MIE	12/01/2015	9,3mm/7,8mm	4,9mm/4,0mm	2,5mm/3,0mm	2,3mm/2,8mm	3,8mm/3,6mm
MM	16/06/1981	MIE	02/12/2014	5,9mm/5,8mm	4,4mm/5,0mm	2,1mm/3,2mm	2,1mm/2,0mm	3,9mm,3,6mm
SS	08/09/1955	MIE	10/08/2015	5,5mm/7,0mm	4,6mm/5,4mm	2,8mm/3,7mm	2,8mm/2,2mm	4,0mm/3,3mm
DD	09/10/1984	MID	13/11/2014	5,8mm/5,2mm	4,3mm/5,5mm	2,9mm/2,9mm	3,9mm/4,2mm	2,3mm/2,7mm
CO	22/09/1965	MIE	30/09/2015	7,6mm/7,6mm	5,2mm/6,0mm	2,0mm/2,7mm	2,7mm/3,8mm	3,8mm/3,6mm
MA	16/04/1958	MID	19/06/2015	7,6mm/8,6mm	6,6mm/5,9mm	3,4mm/3,6mm	3,2mm/2,6mm	3,6mm/3,3mm
WO	08/04/1979	MIE	16/06/2015	7,5mm/6,9mm	5,2mm/6,3mm	1,2mm/1,3mm	2,1mm/1,9mm	3,3mm/4,0mm
VS	11/12/1960	MIE	15/06/2015	7,7mm/7,4mm	10mm/ 7,6mm	4,1mm/4,9mm	3,3mm/4,2mm	4,1mm/ 5,2mm
MT	30/01/1973	MID	10/01/2015	4,6mm/ 5,7mm	4,6mm/ 6,4mm	2,9mm / 3,1mm	1,9mm/1,4mm	2,7mm /3,1mm
JO	30/10/1962	MID	17/05/2015	6,2mm/ 6,5mm	8,00mm/9,0mm	3,1mm/ 3,6mm	3,3mm/ 1,3mm	3.0mm/ 2,6mm

MID, membro inferior direito; MIE, membro inferior esquerdo, TVP, trombose venosa profunda. Os dados de diâmetro são mostrados como antes e depois do segundo ultrassom.