



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS

**ANÁLISE CELULAR E MOLECULAR SOBRE A EFICÁCIA DA TERAPIA  
COMPLEXA DESCONGESTIVA EM PACIENTES COM LINFEDEMA DE MEMBRO  
INFERIOR**

Recife

2021

BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS

**ANÁLISE CELULAR E MOLECULAR SOBRE A EFICÁCIA DA TERAPIA  
COMPLEXA DESCONGESTIVA EM PACIENTES COM LINFEDEMA DE MEMBRO  
INFERIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biologia Química para a Saúde.

**Orientador:** Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Recife

2021

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Na scimento, CRB4/1743

Barros, Bárbara Rafaela da Silva

Análise celular e molecular sobre a eficácia da terapia complexa descongestiva em pacientes com linfedema de membro inferior./ Bárbara Rafaela da Silva Barros. – 2021.

56 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Imunologia 2. Linfedema 3. Microbiologia. 4. Terapia complexa descongestiva I. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de (orient.). II. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-238

BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS

**ANÁLISE CELULAR E MOLECULAR SOBRE A EFICÁCIA DA TERAPIA  
COMPLEXA DESCONGESTIVA EM PACIENTES COM LINFEDEMA DE MEMBRO  
INFERIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 06/08/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Antônio Carlos de Freitas (Suplente Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Anna Jéssica Duarte Silva (Suplente Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a todos os pacientes do ambulatório do Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF-FIOCRUZ/PE) acometidos com linfedema de membro inferior, por sua luta e persistência contra a doença.  
A eles, a minha solidariedade.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por cada sonho realizado.

A meus pais Washington e Eunice, pelo carinho, amor e credibilidade.

A você minha mãe, por suas orações, carinho e investimento.

Aos meus avós Louzinha e Zé Lopes (*in memoriam*). Pelo amor e conselhos, não sei como seria sem vocês em minha vida.

Ao meu amado esposo Heverson pelo cuidado, carinho, zelo, paciência, e toda ajuda a mim concedida. Obrigada pelo ombro amigo e por tua amizade. Amo você.

À minha sogra e amiga Juraci, por me encorajar sempre. Obrigada por acreditar tanto em mim e nos meus sonhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Cristiane Moutinho. Pela força, pelo investimento, por seus conselhos, sua orientação tão valiosa, suas horas de conversas, amizade, torcida, por suas aulas incríveis e por me inspirar tanto. Obrigada por tudo. Você é um exemplo para mim.

Ao Prof. Dr. Abraham Rocha, juntamente com toda a equipe do Ambulatório do Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF/FIOCRUZ-PE), nas pessoas de Rosângela, Paula, Lígia e todos os demais colaboradores, por seu apoio e confiança na realização desse projeto.

À Profa. Dra. Virgínia Lorena por seus conselhos, ideias e suporte, além do apoio de sua equipe no Laboratório de Imunoparasitologia (FIOCRUZ-PE) pela assistência técnica no laboratório, e ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães, pelo suporte no uso do citômetro de fluxo.

À Dra Juliana Gonçalves (LIKA/FIOCRUZ-PE) pelo suporte, ensinamentos, dúvidas e apoio durante a realização dos experimentos. Muito obrigada, Juh, por sua humanidade e amizade. Te devo muitos temakis!!!

Ao Prof Dr Reginaldo Gonçalves por todo o suporte na pesquisa e identificação de microrganismos das amostras coletadas dos membros inferiores dos pacientes atendidos pela equipe no Ambulatório do SRNF.

A todos os meus colegas e companheiros de bancada do Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais – LAIA/UFPE, nas pessoas de Rodrigo, Guilherme, Georon, Leo e Marília. Vocês são incríveis!

Gratidão a Geohh por tua ajuda em todas aquelas noites e dias inteiros me ajudando na Cultura de células e imunofenotipagem. Você foi um braço forte de muito apoio para mim durante o desenvolvimento desse trabalho, meu amigo. Muito, muito obrigada por tua companhia que foi extremamente valiosa para mim. Gratidão para sempre!

Minha gratidão a Gui por sua ajuda e disposição de sempre. Pelos momentos de risadas e descontração. Obrigada também por teus conselhos. Vc é fera demais, amigo!

Gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas na pessoa dos coordenadores e professores que participaram da minha formação. Gratidão à Adê por sua atenção conferida não apenas a mim, como também a todos os discentes que por ali passam.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco por seu suporte!

E agradeço à FACEPE pelo apoio financeiro investido nesse projeto.

Muito obrigada a todos!

*“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, um menino colocado à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratasse!”*

Marie Curie

## RESUMO

O linfedema de membro inferior é uma doença que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Seu estabelecimento nos indivíduos afetados consiste no mau funcionamento do sistema linfático no processo de regulação e homeostase do líquido intersticial, o que promove o seu extravasamento e acúmulo nos tecidos superficiais dos membros inferiores. As complicações clínicas compreendem alterações bioquímicas e físicas, que podem ser agravadas pelo desenvolvimento de doenças oportunistas e comorbidades graves como hipertensão, diabetes, obesidade e depressão, potencializando o agravamento da doença. Além disso, ocorre o comprometimento da deambulação, dificuldade para realizar atividades básicas do dia a dia e o isolamento social do portador do linfedema. A Terapia Complexa Descongestiva (TCD) é um tipo de tratamento considerado padrão ouro pela Sociedade Internacional de Linfologia, para o tratamento de membros afetados pelo linfedema, especialmente em mulheres pós mastectomizadas e acometidas pelo linfedema de membro superior. Pensando na necessidade de intervenções terapêuticas, economicamente acessíveis às pessoas afetadas pela doença, a Sociedade Internacional de Linfologia sugeriu em 2018, que a comunidade científica mundial investigasse os aspectos celulares e moleculares promovidos por diferentes terapias, em indivíduos afetados pelo linfedema. Diante disso, esse estudo visou investigar os efeitos gerados pela TCD a nível celular e molecular em pacientes atendidos pelo SRNF/FIOCRUZ-PE. Foram feitas análises microbiológicas das lesões e feridas dos membros inferiores afetados, bem como a coleta sanguínea e análises hematológica, bioquímica e imunológica (imunofenotipagem e dosagem de citocinas) antes, durante e após as 22 sessões da TCD em todos os pacientes incluídos no programa. Os resultados demonstraram que houve melhora na cicatrização das lesões ao longo da TCD e uma importante redução da contaminação microbiana. Houve também estimulação importante da população de células TCD4+ e TCD8+, acompanhados de resposta pró-inflamatórias, com o aumento de IFN-gama. Além da redução do edema nos membros inferiores, a Terapia Complexa Descongestiva demonstrou melhora significativa das lesões e estimulação imunológica nos pacientes tratados.

**Palavras-chave:** Imunologia; Linfedema; Microbiologia; Terapia Complexa Descongestiva.

## ABSTRACT

Lower limb lymphedema is a disease that affects thousands of people worldwide. Its establishment in affected individuals consists of the malfunction of the lymphatic system in the body regulation process and in homeostasis of interstitial fluid, promoting extravasation and accumulation in the superficial tissues of the lower limbs. The clinical complications are biochemical and physical, which can be aggravated by development of opportunistic diseases and comorbidities such as hypertension, diabetes, obesity and depression, increasing the worsening of the disease. Furthermore, occurs the walking impairment, difficulty in performing the basic daily activities and social isolation of lymphedema carrier. The Complex Decongestive Therapy (CDT) is a treatment considered the gold standard by the International Society of Lymphology, for the treatment of limbs affected by lymphedema, specially to postmastectomized women and carrier of upper limb lymphedema. Thinking about therapeutic interventions, affordable to people affected by the disease, the International Society of Lymphology suggested, in 2018, that world scientific society investigate the cellular and molecular aspects promoted by different therapies against human lymphedema. Thus, this study investigated the cellular and molecular effects promoted by CDT in patients treated in SRNF/FIOCRUZ-PE. Microbiological analyzes were be done in lesions and wounds of affected lower limbs. In addition, were performed blood collect; hematological, biochemical and immunological analyzes (immunophenotyping and cytokines dosage) before, during and in the end of the 22 sections of CDT by all patients included in program. The results demonstrated that occurred an improvement of lesions cicatrization during CDT and decreasing of microbiological contamination. Furthermore, occurred the important lymphocyte stimulation, with increase to T CD4+, TCD8+ and IFN-gama, showing proinflammatory response. In addition to reducing edema in the lower limbs, the Complex Decongestive Therapy demonstrated improvement of lesions and immunological stimulation in treated patients.

**Keywords:** Immunology; Lymphedema; Microbiology; Complex Decongestive Therapy.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Demonstração do enfaixamento compressivo realizado nas sessões da TCD. **A:** Aplicação do hidratante; **B:** Aplicação da espuma; **C:** Enfaixamento finalizado. Fonte: Acervo do SRNF-FIOCRUZ/PE.....31
- Figura 2 – Lesões de superfície dos membros inferiores dos pacientes **IM 04**, **IM 09** e **IM 15**, demonstrando evolução antes da TCD (**T<sub>0</sub>**) e após a TCD (**T<sub>2</sub>**).....38
- Figura 3 – Lesões profundas dos membros inferiores dos pacientes **IM 01**, **IM 03** e **IM 05**, demonstrando evolução antes da TCD (**T<sub>0</sub>**) e após a TCD (**T<sub>2</sub>**), com o auxílio da laser terapia para cicatrização dos tecidos lesionados.....39
- Figura 4 – Perfil de tendência das populações celulares (imunofenotipagem) e produção de citocinas intracitoplasmáticas nos momentos T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> da Terapia Complexa Descongestiva. Sendo as populações representadas pelos gráficos A (CD4+CD28+), B (CD4+CTLA4+), C (CD4+IFN+), D (CD4+IL-10+), E (CD4+IL-17+), F (CD8+CD28+), G (CD8+CTLA4+), H (CD8+IFN+), I (CD8+IL-10+), J (CD4+CD25+) e K (CD4+FOXP3+). Resultados não produziram estatístico significativo, com exceção do gráfico C ( $p < 0.05$ ).....40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Etiologia das coinfeções mais comuns em pacientes com linfedema.....25
- Tabela 2 – Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue periférico dos pacientes ao longo da TCD ( $T_0$  |  $T_1$  |  $T_2$ )..35
- Tabela 3 – Isolados microbiológicos das lesões nos membros inferiores de cada paciente nas três amostras coletadas ao longo da TCD.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS

Coord.	Coordenador, coordenação
Ed.	Editora
ed.	edição / editor
et al.	e outro
n.	Número
v.	Volume

## LISTA DE SIGLAS

AVC	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL
FOXP3	FORKHEAD BOX PROTEIN P3
IAM	INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
IFN- $\gamma$	INTERFERON GAMA
IL-4	INTERLEUCINA 4
IL-10	INTERLEUCINA 10
IL-13	INTERLEUCINA 13
IL-17A	INTERLEUCINA 17A
LIKA	LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
LYVE 1	RECEPTOR-1 DE HIALURONATO ENDOTELIAL DO VASO LINFÁTICO
SRNF	SERVIÇO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM FILARIOSE
PA	PRESSÃO ARTERIAL
PBMC	PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO)
SBACV	SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E CIRURGIA VASCULAR
TCD	TERAPIA COMPLEXA DESCONGESTIVA
TGF- $\beta$ 1	TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1
Treg	CÉLULAS T REGULATÓRIAS
TNF- $\alpha$	TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA
VEGF-C	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR C
VEGFR-3	RECEPTO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR C TIPO 3
WHO	WORLD HEALTH ORGANIZATION

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	20
3.1 SISTEMA LINFÁTICO	20
3.2 LINFEDEMA	21
3.3 INFECÇÕES OPORTUNISTAS ASSOCIADAS AO LINFEDEMA	24
3.4 A RESPOSTA CELULAR E HUMORAL DO LINFEDEMA	26
3.5 TERAPIA COMPLEXA DESCONGESTIVA – TCD	27
<b>4. METODOLOGIA</b>	29
4.1 LOCAL DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	29
4.2 PACIENTES E ANÁLISE AMOSTRAL	29
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	30
4.4 APLICAÇÃO DA TERAPIA COMPLEXA DESCONGESTIVA (TCD) EM PACIENTES COM LINFEDEMA DE MEMBRO INFERIOR	30
4.5 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA A ANÁLISE HUMORAL, MICROBIOLÓGICA E CELULAR	31
4.6 HEMOGRAMA E ANÁLISE BIOQUÍMICA	31
4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	32
4.8 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	33
4.9 FENOTIPAGEM CELULAR E DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACITOPLASMÁTICAS	33
4.10 AQUISIÇÃO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
<b>5. RESULTADOS</b>	35

5.1 HEMOGRAMA E ANÁLISE BIOQUÍMICA	35
5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	36
5.3 FENOTIPAGEM CELULAR E DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACITOPLASMÁTICAS	39
<b>6. DISCUSSÃO</b>	41
<b>7. CONCLUSÃO</b>	44
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	45
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b>	52

## 1. INTRODUÇÃO

O linfedema é um problema de grande importância clínica, pois afeta milhares de pessoas no mundo. Ele se desenvolve quando o sistema linfático, constituído por vasos finos e gânglios linfáticos, está danificado e obstruído, causando acúmulo e extravasamento de linfa nos tecidos moles do membro acometido. Comumente afeta o braço ou perna, mas também pode comprometer outras partes do corpo, como bolsa escrotal e o pescoço (GUPTA; MOORE, 2018).

Uma vez instalado e não tratado, o linfedema pode progredir e interferir de maneira negativa na qualidade de vida das pessoas afetadas, causando além de sequelas físicas, alterações psíquicas e sociais, principalmente quando acomete os membros inferiores, que estão diretamente relacionados com a mobilidade e as atividades de vida diária (ROCHA *et al.*, 2010; INTERNATIONAL SOCIETY OF LYMPHOLOGY, 2013).

Alguns linfedemas apresentam infecções microbiológicas oportunistas e de repetição. Essas infecções lesionam adicionalmente o sistema linfático, reduzindo ainda mais a capacidade de transporte e captação da linfa, bem como apresenta possibilidade de necrosar a pele, induzindo febre e levando a um status crônico (ADDISS *et al.*, 2010; GODOY *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2018). Existem ainda as comorbidades como obesidade, diabetes e hipertensão arterial, as quais ocasionam desordem vascular, onde um déficit no equilíbrio das trocas de líquidos a nível de interstício é observado. Além disso, a diminuição do condicionamento físico pode influenciar outros fatores que também interferem na qualidade de vida (TACANI *et al.*, 2013).

Na busca por métodos alternativos de tratamento da doença, potencialmente aplicáveis principalmente a sistema públicos de saúde de regiões em condições de extrema pobreza e escassez de recursos e insumos, o Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF-FIOCRUZ/PE), vem desenvolvendo estudos de pesquisa e atendimento ambulatorial para pacientes com linfedema provenientes de áreas endêmicas de filariose. Nesse sentido, o serviço de referência tem aplicado a Terapia Complexa Descongestiva (TCD) para estes pacientes com linfedema de membros inferiores, como proposta de aplicabilidade em diversos países e também no Brasil por meio do Sistema Único de Saúde (SUS).

Nesse sentido, este estudo se propôs a fazer uma análise em pacientes submetidos às intervenções fisioterapêuticas da TCD e avaliar se além da melhora física (redução de linfedema, retorno à deambulação normal do paciente e melhora na postura anatômica), existe uma diferenciação celular e bioquímica no organismo dos indivíduos, uma vez que esses dados ainda não foram investigados até o momento. Além disso, visamos contribuir com mais informações a respeito do perfil imunológico do linfedema de membro inferior, elucidar se a TCD pode ser uma ferramenta eficaz e de fácil aplicabilidade no âmbito do SUS e investigar possíveis marcadores celulares para o diagnóstico e tratamento da doença.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a eficácia celular e molecular da Terapia Complexa Descongestiva aplicada em pacientes com linfedema, atendidos pelo Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF-FIOCRUZ/PE).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.2.1 Realizar hemograma completo e análise bioquímica nos pacientes submetidos à Terapia Complexa Descongestiva;
- 2.2.2 Realizar a análise microbiológica da macrorregião das lesões dos membros inferiores dos pacientes afetados com o linfedema e submetidos à TCD;
- 2.2.3 Investigar o perfil de células (imunofenotipagem) e proteínas imunológicas (citocinas intracitoplasmáticas) produzidas antes, durante e após o tratamento dos linfedemas.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 SISTEMA LINFÁTICO

O sistema linfático é construído por uma vasta rede de vasos e órgãos, que estão diretamente associados ao sistema cardiovascular (MARGARIS; BRACK, 2012). Essa rede funciona principalmente com três principais funções: o equilíbrio de fluidos, com o transporte do excesso de líquido intersticial proveniente do filtrado do sangue; função nutricional, pois serve como rota entre o intestino delgado e o sangue, através da qual algumas vitaminas e gorduras em geral são absorvidas e transportadas; função imunológica, onde suas células residentes do tecido linfático, são essenciais na manutenção da defesa do organismo contra agentes patológicos (MORTIMER; ROCKSON, 2014; VAN DE GRAAFF, 2003).

A rede linfática se inicia com os capilares linfáticos, local de reabsorção dos líquidos intersticiais por onde a linfa composta por células da imunidade inata e adaptativa, proteínas e gorduras, acessa o sistema, sendo filtrada posteriormente nos linfonodos, e daí encaminhada para os ductos linfáticos para a devolução de parte desse líquido ao sistema cardiovascular (ASPELUND *et al.*, 2016; MORTIMER; ROCKSON, 2014).

A estrutura anatômica dos ductos, se assemelha às veias, contendo inclusive válvulas que impedem o refluxo da linfa, mantendo-a em uma só direção. O fluxo é mantido pelos movimentos provenientes da contração dos músculos esqueléticos, intestinais e da contração peristáltica de alguns vasos linfáticos (VAN DE GRAAFF, 2003). O processo de drenagem linfática adequada é essencial para a homeostase dos fluidos corporais, evitando assim o acúmulo de líquido intersticial, e conseqüentemente a formação de edemas (GUYTON; HALL, 2011; MARGARIS; BRACK, 2012).

Além disso, o sistema linfático também é composto por órgãos que podem ser divididos em órgãos linfoides centrais ou primários e órgãos linfoides periféricos ou secundários. Os órgãos linfoides primários são constituídos pelo timo e medula óssea, e são os locais de produção e amadurecimento dos linfócitos. Nos órgãos linfoides secundários – linfonodos, baço e os tecidos linfoides das mucosas – os linfócitos virgens maduros são mantidos, aguardando a iniciação da resposta imune adaptativa, quando necessário (MARGARIS; BRACK, 2012; MURPHY, 2014). Nas

centenas de linfonodos agrupados ao longo dos vasos linfáticos, a linfa é filtrada pelas células fagocíticas que habitam esses reservatórios, auxiliando na purificação a linfa (VAN DE GRAAFF, 2003).

A importância da correta fluidez da drenagem linfática está associada diretamente às funções até então descritas (ROCKSON, 2012). Uma vez que o sistema linfático possui um papel essencial para a defesa do organismo, com a ativação das respostas imunológicas adaptativas, sendo também a principal via de transporte na apresentação de antígenos para a devida ativação das células específicas.

Uma drenagem linfática prejudicada ou malsucedida pode resultar em edema linfático, também conhecido como linfedema (MORTIMER; ROCKSON, 2014), podendo causar efeitos associados a comorbidades, como hipertensão, outras cardiopatias e diversas doenças oportunistas associadas a patógenos, devido ao comprometimento da resposta imunológica nos indivíduos afetados pela doença (ASPELUND et al., 2016; MORTIMER; ROCKSON, 2014).

### 3.2 LINFEDEMA

O linfedema é uma doença crônica negligenciada que se desenvolve em decorrência da drenagem linfática comprometida e não eficaz, causando o acúmulo de líquido e conseqüente inchaço dos tecidos periféricos do membro afetado. Há diversos motivos que podem comprometer o bom andamento homeostático dos fluidos intersticiais, associados ao sistema linfático (ROCKSON, 2012; MOHAMMAD AZHAR *et al.*, 2020), e esses fatores estão intimamente ligados ao tipo de linfedema desenvolvido no paciente (GRADA; PHILLIPS, 2017).

Atualmente, o linfedema pode ser classificado como primário (congênito) ou secundário. Segundo dados da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculiar (SBACV) o linfedema primário ocorre na proporção de 1 a cada 6.000 indivíduos, considerando que apenas os linfedemas precoces acometidos em pessoas jovens, são responsáveis por cerca de 1,8% dos homens e 12,4% das mulheres. Ainda de acordo com a SBACV, cerca de 20% das mulheres pós-mastectomizadas desenvolvem linfedema secundário de membro superior, e 15% da população mundial possui distúrbios linfáticos secundários em outros membros.

As causas do linfedema podem ser diversas. O tipo primário é causado devido à má formação dos canais ou gânglios linfáticos, e está também associado às mutações genéticas importantes, ligadas a síndromes de diversos tipos. Sendo uma condição mais rara, a maioria dos casos de linfedema primário está associado à característica autossômica dominante, onde quase 30% dos pacientes acometidos possuem alguma mutação identificável, que muitas vezes é condicionada a genes da via de sinalização para o fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF-C), e seus receptores (GRADA; PHILLIPS, 2017), como o receptor VEGF tipo 3 (VEGFR-3) e o receptor-1 de hialuronato endotelial do vaso linfático (LYVE 1), bem como o homeobox (em especial o gene Prox 1) (HONG *et al.*, 2002; TRUONG *et al.*, 2014), que é um seguimento de genes responsáveis pela regulação do desenvolvimento embrionário (BÜRGLIN, 2013; JEONG *et al.*, 2006; RIDNER, 2013).

O desenvolvimento embrionário do sistema vascular linfático está intimamente relacionado com esses genes específicos, que estão especialmente envolvidos no desenvolvimento da vascularização sanguínea (Prox 1 / VEGF-C) para a construção linfática com posterior indução da vascularização (LYVE 1 / VEGFR-3), especialização e maturação do sistema linfático como um todo (RIDNER, 2013).

Na mutação do gene VEGFR-3, por exemplo, cuja complicação é conhecida por uma doença hereditária chamada Síndrome de Milroy, é comum observar quadros de hipoplasia linfática que apresenta complicações nas válvulas dos canais linfáticos, resultando na má absorção do líquido intersticial. Mas há diversos outros tipos de mutações genéticas importantes e conhecidas, associadas a hereditariedade ou não, que podem causar o linfedema de ordem primária (GRADA; PHILLIPS, 2017).

Já o linfedema secundário se desenvolve através de danos ou obstrução dos vasos linfáticos em decorrência de doenças infecciosas, métodos de tratamento de neoplasias, outras patologias associadas a comorbidades (doenças renais crônicas, síndromes metabólicas, obesidade e doenças cardiovasculares), além de lesões teciduais causadas por traumas (GREENE; MACLELLAN, 2013). Atualmente, é o tipo de linfedema mais comum no mundo, devido ao aumento do número de casos de câncer, atingindo uma em cada mil pessoas, com uma taxa média de 49% dos casos de pacientes que se submetem ao tratamento de tumores malignos (MOHAMMAD AZHAR *et al.*, 2020).

Entre as doenças infecciosas, uma das principais causas do linfedema secundário está associada à filariose linfática, uma doença tropical parasitária, causada pelo nematoide filarial *Wuchereria bancrofti* (o principal agente causador da doença no Brasil), *Brugia timori* e *Brugia malayi*. Esses agentes etiológicos habitam o sistema e gânglios linfático, podendo causar danos graves e permanentes ao tecido, sendo transmitidos ao homem através de mosquitos cujo principal vetor no Brasil, é o *Culex quinquefasciatus* (Lourens e Ferrell, 2019; Gyapong et al., 2018).

Embora o linfedema seja conhecido pela constituição do desequilíbrio hídrico do sistema circulatório que envolve o cardiovascular e o linfático, estudos recentes têm demonstrado uma forte contribuição do acúmulo de tecido adiposo no membro afetado pela doença (MOHAMMAD AZHAR *et al.*, 2020). Em 1997, Brorson e Svensson documentaram o estado clínico de pacientes pós mastectomizados com linfedema de membro superior, que possuíam um alto grau de lóbulos hipertróficos de gordura nos membros afetados, e demonstraram em seus estudos, que o excesso de tecido adiposo dos pacientes comprimia os vasos linfáticos, causando um colapso na circulação da linfa, e conseqüentemente, o acúmulo de mais gordura no local afetado, promovendo o agravamento da doença.

A remodelação patológica do tecido adiposo na obesidade, ocorre quando o excesso de nutrientes estimula os adipócitos a aumentarem de tamanho, caracterizando a hipertrofia, e aumentarem em número, caracterizando a hiperplasia, os levando a atingirem sua capacidade máxima de armazenamento de lipídios (DROLET *et al.*, 2008).

O mesmo ocorre nos membros afetados com linfedema. Os adipócitos em expansão passam a produzir proteínas como leptina e adiponectina, decorrentes do acúmulo e aumento do tecido na região, constituindo a obstrução e acúmulo de linfa e líquido intersticial ao redor dos tecidos moles (ZALESKA; OLSZEWSKI, 2017). Aschen e colaboradores (2012) dosaram os níveis séricos dessas proteínas em modelos de camundongos com linfedema de cauda, e confirmaram a presença da adiponectina em níveis elevados.

Outros achados demonstram também as diferenças morfológicas das células do tecido adiposo de pacientes com e sem linfedema, onde imagens de microscopia e ultrassonografia mostram que o tecido adiposo do linfedema tem lóbulos maiores, com adipócitos hipertróficos e com tamanhos variáveis, e em contrapartida os

tecidos saudáveis, apresentaram adipócitos menores, e com tamanho uniforme (TASHIRO *et al.*, 2017).

Além dessas complicações, o linfedema causa diversos outros problemas teciduais como fibrose e coinfeções provocadas por patógenos. A fibrose no linfedema aumenta as complicações decorrentes da estagnação do líquido intersticial, pois é caracterizada pela deposição excessiva da matriz extracelular no local afetado, aumentando o enrijecimento do tecido. Além disso, a fibrose no linfedema afeta não apenas a derme, mas também o tecido subcutâneo, e adiposo, apresentando nesse último, uma matriz fibrosa espessa entre os lóbulos, fazendo com que o tecido linfedematoso endureça ainda mais (GARDENIER *et al.*, 2016; TASHIRO *et al.*, 2017).

Nos estágios posteriores da progressão do linfedema, surgem várias alterações cutâneas como hiperqueratose, geralmente acompanhadas com fibrose da derme, tecido subcutâneo, adiposo e fáscia muscular (DOMASZEWSKA-SZISTEK *et al.*, 2016). E à medida que a doença evolui, a pele resseca e enrijece, se apresentando numa aparência semelhante a couro, ficando assim, mais exposta a infecções recorrentes, celulites, verrugas, ulceração, fissuras e, em alguns casos raros, angiossarcoma cutâneo (GRADA; PHILLIPS, 2017).

O linfedema de membro inferior, em especial, possui grande importância clínica, pois é uma doença grave e debilitante que também está associada a uma maior prevalência no desenvolvimento de distúrbios mentais como a ansiedade e a depressão, por exemplo. E isso ocorre por vários motivos de natureza social, uma vez que a doença submete as pessoas afetadas à desfiguração dos membros, a dor, além do desemprego, o isolamento social, a incapacidade e a dependência para a realização de tarefas básicas do dia a dia, principalmente nos indivíduos acometidos com o linfedema de membro inferior, cuja deambulação é comprometida. Esses problemas acabam potencializando a gravidade da doença (OBINDO *et al.*, 2017).

### 3.3 INFECÇÕES OPORTUNISTAS ASSOCIADAS AO LINFEDEMA

Há várias razões pelas quais os pacientes com linfedema estão sujeitos a infecções oportunistas. Uma delas é devido ao remodelamento do tecido epitelial, conjuntivo, muscular e adiposo do membro afetado pela doença (DOMASZEWSKA-SZISTEK *et al.*, 2016).

Outro grande problema está nas dobras cutâneas que alguns pacientes com linfedemas mais graves desenvolvem no membro afetado. Essas pregas de tecido produzem um ambiente úmido, o que o torna bastante propício para a instalação e o abrigo de agentes infecciosos clinicamente importantes, que podem causar infecções graves, como a perda de tecido ou mesmo a perda de parte do membro infectado (DENG *et al.*, 2015). Danos teciduais adquiridos ocasionalmente como arranhões, picadas, pequenos cortes, mordidas de animais e outras lesões, podem facilmente servir como porta de entrada para esses agentes infecciosos (OLSZEWSKI, 2011).

As coinfeções ligadas ao linfedema têm servido de alerta para a comunidade médica em todo o mundo, uma vez que a aquisição de infecções por agentes etiológicos resistentes pode se tornar um grande risco não apenas à qualidade de vida, mas também a complicações mais graves, como a sepse, podendo inclusive causar a morte de alguns pacientes (YOSHINO ROSINHA *et al.*, 2010; COLLAZOS *et al.*, 2020). Existe atualmente, várias infecções recorrentes associadas ao linfedema e relatadas na literatura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Etiologia das coinfeções mais comuns em pacientes com linfedema.

<b>Infecção</b>	<b>Etiologia</b>	<b>Referências</b>
Erisipela	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus</i> do grupo C e G	ARIAS-CUADRADO <i>et al.</i> , 2010   ROCHA <i>et al.</i> , 2010
Celulite	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	ARIKAN DÖNMEZ; KAPUCU, 2016   NEVES <i>et al.</i> , 2017   PARK <i>et al.</i> , 2016
Fasciite Necrosante	<i>Streptococcus</i> do grupo A; C e G; S. <i>Enterobacterias</i> ( <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> ) <i>Bacterioides</i> <i>Peptostreptococcus sp.</i> <i>Clostridium perfringens</i>	JUN <i>et al.</i> , 2013   OLSZEWSKI, 2012
Impetigo	<i>Streptococcus</i> do grupo A <i>Staphylococcus aureus</i>	GRADA; PHILLIPS, 2017   PARK <i>et al.</i> , 2020
Foliculite	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobactérias</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida sp.</i>	CHU <i>et al.</i> , 2016

---

	<i>Malassezia furfur</i>	
Furunculose	<i>Staphylococcus aureus</i>	NOWICKA e GRYWALSKA, 2019

---

### 3.4 A RESPOSTA CELULAR E HUMORAL DO LINFEDEMA

Os estudos sobre a imunologia do linfedema ainda são bastante escassos na literatura, e uma vez que o sistema linfático propriamente dito tem como uma de suas principais funções a constituição da resposta imunológica através do armazenamento de linfócitos e apresentação de antígenos para ativação da resposta adaptativa (MURPHY, 2014). Uma vez que os tecidos linfáticos estão comprometidos, e a reabsorção do líquido intersticial não ocorre da forma correta, a homeostase dos fluidos é comprometida juntamente com o fluxo das células efetoras da resposta imune, tornando a região linfedematosa imunologicamente vulnerável, e inclusive, propensa ao desenvolvimento de neoplasias (RUOCCO *et al.*, 2002).

Sabe-se hoje, que algumas células do sistema imunológico têm demonstrado papéis essenciais no processo de estabelecimento do linfedema. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> constituem um exemplo bastante discutido nos últimos anos, devido a alguns achados que relacionam a importância dessas células para o estabelecimento da doença em associação com citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Por isso, alguns estudos sugerem que o perfil regulador seja possivelmente a chave necessária para o controle da doença, uma vez que há fatores nela que podem ser agravados com uma modulação de perfil Th1 ou Th2 (MAHÍA VILAS, 2016; NORES *et al.*, 2018).

Um dos principais fatores que agravam a doença, é o comprometimento da linfangiogênese e o estabelecimento da fibrose no tecido linfedematoso, que são promovidas através da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias características do tecido afetado (NORES *et al.*, 2018). Essa contribuição negativa das citocinas é ainda mais estimulada devido à remodelação dos adipócitos durante o processo de hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo na região do linfedema (Domaszewska-Szistek *et al.*, 2016). Esse processo de remodelação leva à desregulação na produção de adipocinas, aumento do estresse metabólico e inflamação nas regiões afetadas, onde é possível identificar um aumento da

secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , tornando esse processo um ciclo vicioso (Drolet et al., 2008).

Evidências experimentais e clínicas sugerem que as células Th2 desempenham um importante papel na regulação da fibrose, aumentando a disfunção linfática do linfedema, e promovendo o comprometimento da linfangiogênese e a regulação positiva do TGF- $\beta$ 1 que é essencial para a constituição da fibrose tecidual (Ly et al., 2017). Avraham et al. (2013) e Zampell et al. (2012) descobriram que a lesão linfática resulta numa resposta Th2, acompanhada de células T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup>. Para ratificar seus achados, Avraham e colaboradores (2013), utilizaram anticorpos monoclonais IL-4 e IL-13, no intuito de inibir a ação Th2 em modelos de linfedema de cauda em camundongos, e descobriram que o bloqueio das citocinas desse perfil impedia o desenvolvimento do linfedema nos animais antes da lesão, e também nos animais com a doença já estabelecida.

O TGF- $\beta$ 1 é uma molécula bastante importante também na constituição do linfedema, pois assim como o IFN- $\gamma$ , uma citocina de perfil Th1 bastante conhecida (Shao e Liu, 2006; Kataru et al., 2011), possui um efeito linfangiogênico demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*, dificultando inclusive o reparo das lesões no tecido linfedematoso, mesmo em células com altas concentrações de VEGF-C. Além disso, a inibição da sinalização de TGF- $\beta$ 1, resultou na redução da fibrose e melhora da função linfática em modelo animal (Clavin et al., 2008; Oka et al., 2008).

Os linfócitos T reguladores (Treg) promovem uma função extremamente positiva contra o linfedema. Já foi demonstrado em estudos *in vitro* que a depleção das Tregs promove o aumento das respostas Th2 (Wammes et al., 2012). Esses achados foram baseados no papel essencial das Tregs na homeostase, regulando negativamente a inflamação mediada pelo sistema imunológico (Josefowicz et al., 2012). Também foi avaliada a expressão do fator de transcrição Foxp3 nos tecidos linfáticos de camundongos, o que também revelou uma regulação positiva importante dessas moléculas, no controle do linfedema (Gousopoulos et al., 2016). Por isso, não restam dúvidas sobre a eficácia da ação das Tregs no combate do estado clínico depreciativo da doença.

### 3.5 TERAPIA COMPLEXA DESCONGESTIVA – TCD

Atualmente as propostas de intervenção e tratamentos do linfedema vão desde procedimentos cirúrgicos até terapias menos convencionais, e cada procedimento possui seus pontos positivos e negativos. Recentemente, novos procedimentos microcirúrgicos foram relatados com resultados interessantes, apresentando mais uma alternativa no tratamento do linfedema de membro superior pós-mastectomia, o que possibilita esse tipo de tratamento como perspectiva futura promissora no tratamento da doença em membros inferiores (PAPPALARDO *et al.*, 2021).

Hoje o maior desafio na escolha do procedimento correto, está relacionado ao tipo de linfedema, quais os membros afetados, as comorbidades que o paciente possui, quais as doenças oportunistas adquiridas após o estabelecimento da doença, e as condições clínicas que cada paciente se enquadra, antes da escolha de intervenção. Por ser uma doença que envolve o sistema circulatório, um dos maiores desafios é o controle da hipertensão arterial, que precisa ser considerado com cuidado no momento da escolha do tratamento e controle desse tipo de doença (CHEN *et al.*, 2021).

A Sociedade Internacional de Linfologia reconhece hoje a Terapia Complexa Descongestiva (TCD) como o padrão ouro para o tratamento de linfedemas, independente da sua causa (ERYLMAZ *et al.*, 2009). Embora esta técnica tenha sido desenvolvida inicialmente para o tratamento de membros superiores de mulheres que desenvolviam linfedemas pós-mastectomia, atualmente, há diversos estudos confirmando a eficácia da TCD na maioria dos pacientes com linfedema de membro inferior, submetidos à técnica adaptada. Não obstante, existe um esforço global para o tratamento da doença no que concerne à promoção da redução das manifestações clínicas da doença, objetivando diminuir o sofrimento e limitações dos pacientes, promovendo uma melhora em sua qualidade de vida (WHO, 2010; ROCHA *et al.*, 2010; ICHIMORI *et al.*, 2014).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 LOCAL DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa foi realizada no Ambulatório do Serviço de Referência Nacional em Filarioses (SRNF) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) da Fundação Oswaldo Cruz de Pernambuco (Fiocruz/PE), localizado na Região Nordeste do Brasil, Estado de Pernambuco. O projeto desenvolvido foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães sob nº de registro 2.402.479/2017 e obteve recurso para sua execução através do edital PPSUS-FACEPE (APQ-0663-2.13/17) e as amostras biológicas foram coletadas somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de cada paciente.

### 4.2 PACIENTES E ANÁLISE AMOSTRAL

Na elaboração do projeto de pesquisa, o grupo amostral estava previsto para um número mínimo de 50 pacientes que seriam recebidos pelo SRNF e submetidos à TCD, para as análises propostas pelo mesmo.

O projeto recebeu um total de 21 (vinte e um) pacientes portadores de linfedema de membro inferior devidamente cadastrados no SRNF do IAM/Fiocruz-PE, para avaliação celular e molecular ao longo da TCD, no período entre Janeiro de 2019 a Fevereiro de 2020. Dos 21 pacientes recebidos, apenas 9 (nove) conseguiram concluir todas as sessões. Dos 12 (doze) pacientes que não concluíram a TCD, dois deles vieram a óbito por complicações clínicas associadas a comorbidades, como hipertensão, diabetes e obesidade; quatro deles se afastaram devido a problemas de saúde adquiridos posteriormente como câncer, AVC e cirurgias diversas; e os seis restantes não conseguiram concluir o tratamento devido a problemas socioeconômicos diversos e complicações na deambulação e deslocamento até o SRNF.

O diagnóstico de linfedema em todos os pacientes incluídos no programa, foi realizado por médicos e fisioterapeutas do referido serviço, com base na avaliação clínica e nos critérios da classificação de graduação do linfedema proposto por Dreyer (2010).

#### 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram inclusos nesse estudo pacientes cadastrados no SRNF, residentes em área endêmica de filariose, de ambos os sexos e idade entre 18 e 75 anos, que apresentaram linfedema localizado na perna, abaixo do joelho, uni ou bilateralmente, classificados a partir de estágio II até o estágio V, segundo Dreyer (2010).

Foram excluídos da pesquisa os pacientes com linfedema acima do joelho (coxa), pacientes que tinham realizado outro tipo de tratamento para a redução do linfedema ou fisioterapia para linfedema nos três meses anteriores à pesquisa. Também foram excluídos os pacientes que apresentaram tromboflebite, que tinham contraindicações para drenagem linfática manual – como os casos que apresentaram neoplasias ativas no local da drenagem, celulite, trombose venosa profunda na fase aguda, insuficiências cardíaca, hepática e renal descompensada e hipertensão arterial não controlada -, bem como os pacientes que apresentaram contraindicações para o enfaixamento compressivo – como os casos com arteriopatas significativas nos seus membros inferiores e degeneração neoplásica do linfedema -, e os que apresentaram patologias que podiam comprometer a sensibilidade e também o funcionamento do sistema muscular.

#### 4.4 APLICAÇÃO DA TERAPIA COMPLEXA DESCONGESTIVA (TCD) EM PACIENTES COM LINFEDEMA DE MEMBRO INFERIOR

A TCD foi aplicada pelos fisioterapeutas do Serviço de Referência Nacional em Filarioses (SRNF), seguindo o protocolo previamente estabelecido e adotado por Soares e colaboradores (2016). A terapia completa contém 22 sessões que foram aplicadas em cada paciente, num total de 12 semanas.

Apesar de já ser uma técnica reconhecida, este protocolo foi aperfeiçoado e elaborado pelos pesquisadores do estudo, com a proposta de uso de materiais de baixo custo, possibilitando a aplicação em locais com poucos recursos financeiros. A TCD é composta pela associação das técnicas: drenagem linfática manual, enfaixamento do membro com linfedema (Figura 1) e orientações de cuidados e higiene dos membros.

Antes da aplicação da técnica a pressão arterial (PA) do paciente foi aferida com esfigmomanômetro (Unitec) devidamente calibrado e estetoscópio (Premium).

Caso o paciente apresentasse PA maior do que 140 por 90 mmHg, o mesmo seria mantido em repouso por 40 min. Realizaríamos então uma nova aferição, e em normalização do quadro (redução da PA), era aplicada a TCD. Caso não houvesse redução da PA, o paciente não realizava a sessão e era então encaminhado a uma unidade de pronto atendimento local.



**Figura 1.** Demonstração do enfaixamento compressivo realizado nas sessões da TCD. **A:** Aplicação do hidratante; **B:** Aplicação da espuma; **C:** Enfaixamento finalizado. Fonte: Acervo do SRNF-FIOCRUZ/PE.

#### 4.5 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA A ANÁLISE HUMORAL, MICROBIOLÓGICA E CELULAR

Ao chegar no ambulatório, os pacientes passaram pela anamnese clínica e fisioterapêutica. Logo após, os pacientes foram conduzidos ao banco de coletas, onde foram coletadas amostras de sangue periférico para as análises humoral e celular, utilizando tubos de coleta à vácuo sem anticoagulantes para as análises bioquímicas e sorológicas, com EDTA para a realização do hemograma, com citrato de sódio para a análise da glicemia e com heparina para a análise celular. Ainda no banco de coletas, foi realizada a coleta microbiológica direto dos membros afetados com o linfedema, em cada paciente, com o auxílio de um swab de algodão.

Os pacientes foram submetidos às coletas em três momentos da Terapia Complexa Descongestiva: antes da primeira sessão ( $T_0$ ), na décima primeira sessão ( $T_1$ ) e na vigésima segunda sessão ( $T_2$ ) da TCD.

#### 4.6 HEMOGRAMA E ANÁLISE BIOQUÍMICA

As amostras foram enviadas a um laboratório especializado do próprio Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF) no Centro de Pesquisas

Aggeu Magalhães (CPqAM), para a realização do hemograma completo e parâmetros bioquímicos.

Para os testes hematológicos, foi utilizado o sangue total, no equipamento XN-1000S-Hematology-Analyzer. A análise bioquímica foi realizada através da plataforma Chemistry System Vitros® 4600. E a coagulação *in vitro* foi realizada pela plataforma ACL Elite Pro. Antes das aquisições para a análise bioquímica e de coagulação, as amostras de sangue periférico foram centrifugadas e o soro coletado, e injetado nos respectivos leitores para aquisição.

#### 4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os métodos utilizados para diagnóstico laboratorial microbiológico a partir das lesões aparentes em pacientes com linfedema foram realizados a partir de coletas preconizadas por Koneman e Allen (2008). As coletas realizadas em diversas áreas como: pododáctilo, interdigitais do pé, calcanhar e pernas. Imediatamente após a coleta, as amostras clínicas foram semeadas em ágar sangue e ágar McConkey, e incubadas a temperatura de 35 °C a 37 °C por 18 a 24 horas. Após o crescimento, as bactérias foram identificadas por testes fenotípicos e bioquímicos. Foi realizado teste da catalase, nos isolados de *Staphylococcus* spp., e tiveram crescimento avaliado em ágar DNase e resistência a novobiocina. Bactérias catalase negativas que foram alfa-hemolíticas foram semeadas em ágar bile-esculina e infusão, enquanto que bactérias catalase negativo e betahemolíticos passaram pelo teste de CAMP, bacitracina e PYR. Bactérias isoladas a partir do ágar McConkey, foram identificadas por testes laboratoriais definidos no protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Nos casos sugestivos de leveduroses e dermatofitoses (*tinea*), o material foi coletado por meio de escarificação das lesões e/ou swab sendo posteriormente analisado através do exame direto preparado com KOH a 20% e a fresco (sem clarificante, corante ou contrastante). A identificação dos dermatófitos foi baseada nos estudos macro e micro morfológicos. Para as leveduras, foi necessário a realização de testes bioquímicos e fisiológicos.

#### 4.8 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Para o isolamento de linfócitos e monócitos das células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) foram utilizadas as amostras de sangue (9 ml de cada paciente) coletadas em tubos de heparina à vácuo (Vacuette), dos 11 (onze) pacientes selecionados para a terapia complexa descongestiva, que se enquadravam no item critérios de inclusão do item 4.3.

O isolamento das PBMCs foi realizado por meio de uma técnica de gradiente de concentração (Fiscal- Paque <sup>TM</sup> Plus; GE Healthcare Life Science, Suécia), onde as amostras foram submetidas a uma centrifugação de 900 g, por 30 minutos, a 20° C. Após a separação do anel celular (PBMCs), as células foram lavadas uma vez com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS 1X) por meio de centrifugação (400 × g, 10 min, 20 ° C). Após a lavagem, as células foram contadas usando a câmara de Neubauer.

A viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan 0,4% em PBS 1X (Sigma - Aldrich, EUA), e as células foram utilizadas apenas quando a sua viabilidade foi superior a 98%. Após aferição da viabilidade, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro bovino fetal inativado a 10% (p / v) (Sigma- Aldrich) em tubos de cultura a 5% de CO<sub>2</sub> e 37° C, por 24 horas, e as culturas celulares (2.10<sup>6</sup> células / tubo) foram utilizadas para ensaios subsequentes. Na cultura celular, foi utilizado um grupo sem estímulo - SE (células + RPMI) e um grupo com estímulo - PHA (células + Meio + fitohemaglutinina a 10 µg/ml).

#### 4.9 FENOTIPAGEM CELULAR E DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACITOPLASMÁTICAS

Após as 20 horas de cultura, as células foram incubadas por mais 4 horas com BrefeldinA, para a devida retenção das citocinas intracitoplasmáticas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos tubos de cultura, foram homogeneizadas e posteriormente centrifugadas e lavadas com PBS-Wash gelado a 400 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem, as células foram devidamente homogeneizadas e distribuídas nos tubos de citometria de fluxo BD.

Para a detecção dos linfócitos, foram utilizados os anticorpos CD4 (PerCP), CD8 (FITC), CD25 (APC), CD28 (PE) e CTLA-4 (APC). E para a detecção das citocinas intracitoplasmáticas, os anticorpos foram o IFN- $\gamma$  (APC), IL-10 (PE), IL-17A (PE) e FoxP3 (PE). Para a marcação das intracitoplasmáticas, foi utilizado o tampão PermWah BD 10% (p/v), para a devida permeabilização da membrana celular.

Após as marcações e lavagens, as células foram fixadas com a solução fixadora BD Cytotfix, e incubadas na solução, com posterior lavagem e centrifugação, e armazenados em geladeira ao abrigo da luz, até o momento da aquisição de dados na plataforma de citometria de fluxo FACSCalibur.

#### 4.10 AQUISIÇÃO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre os resultados do grupo controle e tratado, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA). O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar diferenças significativas entre cada grupo teste. Os dados foram analisados com auxílio do Software Graphpad Prism para Windows, versão 5.0 de Graphpad Software, Inc. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) e intervalo de confiança de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 HEMOGRAMA E ANÁLISE BIOQUÍMICA

Nos resultados hematológicos foi possível observar redução na população de leucócitos totais e do hematócrito dos pacientes ao longo da terapia. No bioquímico foi observado importante decaimento na taxa de Triglicérideo total, da TGP e leve decaimento da  $\gamma$ -GT, com aumento da CPK (Tabela 2).

Todos os resultados antes, durante e após a TCD, estavam dentro dos limites indicados pelos valores de referência, com exceção do nível de glicose que começou um pouco mais alta do que o normal, a  $\gamma$ -GT que manteve-se um pouco acima dos padrões durante os três momentos ao longo da TCD, e o triglicérideo total e a DHL na primeira coleta também acima dos padrões, mas reduziram consideravelmente a partir da segunda coleta, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue periférico dos pacientes ao longo da TCD (T<sub>0</sub> | T<sub>1</sub> | T<sub>2</sub>).

Hematológico	Valores de Referência	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	P value
Hemácias (10 <sup>6</sup> /uL)	4,3 – 6,0	4,43 ± 0,48	4,33 ± 0,48	4,31 ± 0,52	-
Hb (g/dL)	12,5 – 17,0	12,28 ± 1,67	12,14 ± 1,74	12,05 ± 1,74	-
Hematócrito (%)	38 - 51	37,0 ± 3,97	36,36 ± 3,92	36,15 ± 4,14	-
RDW (%)	11 - 15	14,15 ± 2,61	13,9 ± 1,88	13,95 ± 2,02	-
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	140 - 500	257,45 ± 45,1	244,82 ± 51,3	259,64 ± 50,59	-
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	4 - 10	7,01 ± 2,04	6,27 ± 1,81	5,94 ± 1,44	-
<b>Bioquímico</b>					
Glicose (mg/dL)	70 - 110	111,4 ± 49	94,4 ± 38	103,5 ± 41	(T <sub>0</sub> X T <sub>1</sub> ) = 0,01
Ureia (mg/dL)	15 – 45,0	36,91 ± 16,84	33,64 ± 16,29	34,64 ± 16,63	-
Creatinina (mg/dL)	0,6 – 1,3	0,74 ± 0,33	0,71 ± 0,39	0,73 ± 0,35	-
Colesterol Total (mg/dL)	< 200,0	206,8 ± 39	187,8 ± 44	196,8 ± 38	(T <sub>0</sub> X T <sub>1</sub> ) = 0,009
VLDL (mg/dL)	< 30	32,5 ± 25	29,6 ± 28	28,5 ± 28	-
HDL (mg/dL)	> 45,0	50,7 ± 10	26,6 ± 14	48,9 ± 14	-
LDL (mg/dL)	< 130	119,7 ± 32	107,3 ± 33	114,1 ± 35	(T <sub>0</sub> X T <sub>1</sub> ) = 0,006
Triglicédeos (mg/dL)	< 150,0	127,9 ± 58	108,1 ± 59	94,0 ± 37	(T <sub>0</sub> X T <sub>2</sub> ) = 0,02

TGO (U/L)	< 42,0	25,82 ± 8,61	24,36 ± 5,2	24,36 ± 6,23	-
TGP (U/L)	< 41,0	32,4 ± 7	25,8 ± 7	24,4 ± 5	(T <sub>0</sub> X T <sub>1</sub> ) = 0,01 (T <sub>0</sub> X T <sub>2</sub> ) = 0,003
BT (mg/dL)	< 1,2	0,50 ± 0,18	0,51 ± 0,21	0,51 ± 0,17	-
BD (mg/dL)	< 0,3	0,16 ± 0,09	0,24 ± 0,15	0,14 ± 0,09	-
BI (mg/dL)	< 0,8	0,34 ± 0,14	0,26 ± 0,13	0,38 ± 0,17	-
Fosf. Alcalina (U/L)	34 - 104	82,45 ± 21,36	78,82 ± 20,94	92,0 ± 42,7	-
γ-GT (U/L)	5 - 27	37,9 ± 14	35,0 ± 12	35,6 ± 14	-
DHL (U/L)	120 - 246	319,2 ± 165	237,1 ± 115	186,0 ± 30	(T <sub>0</sub> X T <sub>2</sub> ) = 0,04
CPK (U/L)	33 - 211	84,1 ± 42	93,7 ± 36	88,9 ± 47	-
Sódio (mmol/L)	135 - 149	140,0 ± 2,79	135,55 ± 11,32	138,18 ± 4,69	-
Cálcio (mg/dL)	8,8 - 11,0	9,32 ± 0,45	9,86 ± 4	9,59 ± 2,91	-
Potássio (mmol/L)	3,5 - 5,1	4,58 ± 0,65	4,4 ± 0,58	4,26 ± 0,66	-
PCR (mg/L)	< 5,0	1,0 ± 0,7	0,71 ± 0,2	0,83 ± 0,5	-
TP (s)	10 - 14	13,75 ± 8,02	11,34 ± 1,26	10,64 ± 4,48	-
INR	0,8 - 1,0	1,16 ± 0,76	0,98 ± 0,074	1,05 ± 0,42	-

## 5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Na análise microbiológica, foi possível observar a presença de alguns microrganismos isolados das lesões dos membros inferiores afetados com o linfedema, que foram acometidos das infecções oportunistas durante o agravamento da doença. As lesões foram acompanhadas ao longo da TCD, onde foram feitas as três coletas, conforme descrito no item 4.5, e foi possível observar a ausência significativa de patógenos clinicamente importantes, ao longo do tratamento (Tabela 3).

É possível observar a tendência na redução de agentes etiológicos potencialmente patogênicos, que foram isolados das lesões nas primeiras coletas. Do total de pacientes tratados, apenas 18.2% deles não possuíam lesões nos membros inferiores. Dos 81.8% com lesões, em apenas 18.2% deles não detectamos a presença de nenhum patógeno clinicamente importante. Dentre as populações microbiológicas isoladas, foi possível encontrar gêneros comumente não-patogênicos, comuns à microbiota natural epitelial, tais como *Micrococcus sp.* e *Bacillus sp.*

**Tabela 3.** Isolados microbiológicos das lesões nos membros inferiores de cada paciente nas três amostras coletadas ao longo da TCD.

Paciente	Coleta	Infecções Bacterianas	Infecções Fúngicas	Região da Coleta
IM 1	T <sub>0</sub>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Fusarium sp.</i>	MIE; IPD
	T <sub>1</sub>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Fusarium sp.</i>	IPD; CPD
	T <sub>2</sub>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	CPD
IM 3	T <sub>0</sub>	<i>Escherichia coli</i>	-	MID
	T <sub>1</sub>	<i>Escherichia coli</i>	-	MID
	T <sub>2</sub>	-	-	MID / 2º PDE
IM 4	T <sub>0</sub>	<i>Bacillus cereus</i>	-	MID
	T <sub>1</sub>	<i>Bacillus cereus</i>	-	MID
	T <sub>2</sub>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	MID
IM 5	T <sub>0</sub>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida pararugosa</i>	MIE
	T <sub>1</sub>	<i>Micrococcus luteus</i>	-	MIE
	T <sub>2</sub>	<i>Micrococcus luteus</i>	-	MIE
IM 8	T <sub>0</sub>	-	-	IMIE / LUMIE
	T <sub>1</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	IMIE
	T <sub>2</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	IMIE
IM 9	T <sub>0</sub>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i>	4ª 5ª IPDD / LUMID
	T <sub>1</sub>	-	-	IMIE
	T <sub>2</sub>	-	-	IMIE
IM 13	T <sub>0</sub>	-	-	2ª 3ª IPDD
	T <sub>1</sub>	-	-	LUMID
	T <sub>2</sub>	-	-	2ª 3ª 4ª 5ª IPDD
IM 15	T <sub>0</sub>	<i>Acinetobacter schindleri</i>	-	LHMID
	T <sub>1</sub>	-	-	LHMID / 2ª 3ª 4ª IPDD
	T <sub>2</sub>	-	-	LHPD
IM 17	T <sub>0</sub>	-	-	CPE
	T <sub>1</sub>	-	-	CPE
	T <sub>2</sub>	-	-	CPE

**MID:** Membro Inferior Direito; **MIE:** Membro Inferior Esquerdo; **PDE:** Pododáctilo Esquerdo; **IPD:** Interdigital do Pé Direito; **IPDD:** Interdigital do Pododáctilo Direito; **LUMIE:** Lesão Ulcerada Membro Inferior Esquerdo; **LUMID:** Lesão Ulcerada Membro Inferior Direito; **LHMID:** Lesão Hiperceratótica do Membro Inferior Direito; **CPD:** Calcanhar do Pé Direito; **CPE:** Calcanhar do Pé Esquerdo; **IMIE:** Interdigital do Membro Inferior Esquerdo.

Entre os pacientes que apresentaram lesões no tecido linfedematoso, 66.7% deles, apresentaram as lesões não abertas (Figura 2) e em forma de ulcerações invasivas (Figura 3), e dentre estes, 100% dos pacientes apresentaram melhora significativa no processo de cicatrização das lesões quando comparadas ao início da TCD.



**Figura 2.** Lesões de superfície dos membros inferiores dos pacientes **IM 04**, **IM 09** e **IM 15**, demonstrando evolução antes da TCD (**T<sub>0</sub>**) e após a TCD (**T<sub>2</sub>**).



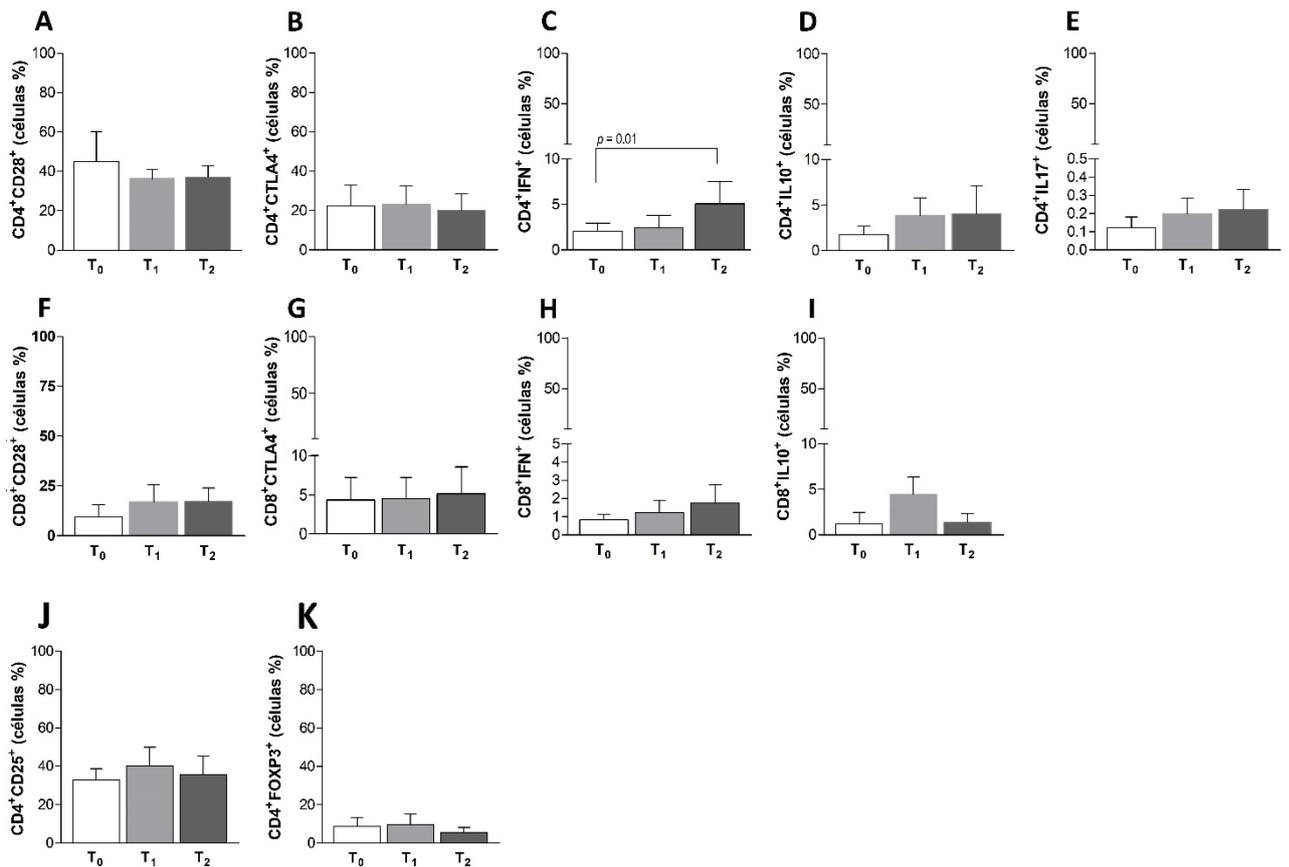
**Figura 3.** Lesões profundas dos membros inferiores dos pacientes **IM 01**, **IM 03** e **IM 05**, demonstrando evolução antes da TCD ( $T_0$ ) e após a TCD ( $T_2$ ), com o auxílio da laser terapia para cicatrização dos tecidos lesionados.

### 5.3 FENOTIPAGEM CELULAR E DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACITOPLASMÁTICAS

A análise celular dos pacientes ao longo da Terapia Complexa Descongestiva demonstrou resultados promissores associados à população de linfócitos auxiliares, citotóxicos e regulatórios. O número de linfócitos T  $CD4^+$  ativados ( $CD4^+CD28^+$ ), demonstra declínio nos tempos  $T_1$  e  $T_2$  da TCD, saindo de valores iniciais ( $T_0$ ) de  $44,95 \pm 15,25$ , para  $36,39 \pm 4,69$  ( $T_1$ ) e  $37,1 \pm 5,81$  ( $T_2$ ), porém sem valores estatísticos ( $T_0 \times T_1$ :  $p = 0,84$ ) / ( $T_0 \times T_2$ :  $p = 0,81$ ). Em contrapartida, a população de linfócitos T  $CD8^+$  ativados ( $CD8^+CD28^+$ ) e Treg ( $CD4^+CD25^+$ ) apresentaram aumento (Figura 4). Entretanto, o aumento não apresentou valores estatísticos.

Na figura 4 também é possível observar o perfil de produção das citocinas intracitoplasmáticas produzidas pelas populações de linfócitos estudadas. Os números indicam uma tendência de aumento para a  $IFN-\gamma$  e  $IL-10$  tanto para os linfócitos T  $CD4^+$  ( $CD4^+IFN-\gamma^+$ :  $T_0 = 2,02 \pm 0,94$ ;  $T_1 = 2,47 \pm 1,35$ ;  $T_2 = 5,07 \pm 2,465$  ( $p=0,01$ )|  $CD4^+IL-10^+$ :  $T_0 = 1,75 \pm 0,94$ ;  $T_1 = 3,88 \pm 1,92$ ;  $T_2 = 4,04 \pm 3,059$ ) quanto

para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: T0 = 0,82  $\pm$  0,31; T1 = 1,23  $\pm$  0,67; T2 = 1,75  $\pm$  1,01 | CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>: T0 = 1,20  $\pm$  1,27; T1 = 4,42  $\pm$  1,92; T2 = 1,41  $\pm$  0,93). Os valores de IL-17A do linfócito T CD8<sup>+</sup> não obteve valores detectáveis (Figura 4). Com exceção do IFN- $\gamma$  produzido pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 4C), os demais valores não apresentaram diferença estatística significativa.



**Figura 4** - Perfil de tendência das populações celulares (imunofenotipagem) e produção de citocinas intracitoplasmáticas nos momentos T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> da Terapia Complexa Descongestiva. Sendo as populações representadas pelos gráficos A (CD4+CD28+), B (CD4+CTLA4+), C (CD4+IFN+), D (CD4+IL-10+), E (CD4+IL-17+), F (CD8+CD28+), G (CD8+CTLA4+), H (CD8+IFN+), I (CD8+IL-10+), J (CD4+CD25+) e K (CD4+FOXP3+). Resultados não produziram estatístico significativo, com exceção do gráfico C ( $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Devido à sua importância clínica emergente, o linfedema de membro inferior carece de investigações que possam unir os diversos fatores que colaboram com o estabelecimento da doença, a fim de que propostas de intervenções clínicas possam ser confirmadas e aplicadas de forma acessível aos indivíduos acometidos pela doença (ROCHA *et al.*, 2010; INTERNATIONAL SOCIETY OF LYMPHOLOGY, 2013).

Poucos estudos abordam os aspectos hematológicos, bioquímicos e celulares envolvidos na formação e estabelecimento do linfedema de membro inferior. As investigações clínicas relacionados a esses parâmetros, não demonstraram associação direta que possa ser comprovada com a TCD, pois não há um padrão, marcador ou perfil clínico específico que seja patognomônico de linfedema, inclusive por conta dos diversos fatores que podem ocasionar a doença, além da possibilidade de exclusão de etiologias associadas a ela (SHINAWI, 2007).

Mesmo assim, nossos ensaios demonstram que houve decaimento de marcadores associados ao perfil lipídico, glicemia, e de dano e inflamação tecidual ao longo do tratamento com a TCD. De acordo com a Tabela 2, a contagem de leucócitos totais bem como todo o perfil lipídico (Colesterol Total, VLDL, LDL, HDL e Triglicerídeos) decaíram até o final da terapia (T<sub>2</sub>). Alguns marcadores de lesão como o TGP e DHL, relacionado com perfil de dano de tecidos e órgãos (JAFARY *et al.*, 2019), e processos inflamatórios diversos como a PCR (POGGIALI *et al.*, 2020) por exemplo, seguiram o mesmo padrão de decaimento. No caso da glicemia, mesmo sendo esses indivíduos hiperglicêmicos (portadores de Diabetes tipo I e II), nossos achados demonstram progressiva redução dos níveis séricos de glicose durante a evolução do tratamento com a TCD, especialmente no T<sub>1</sub>.

Sobre os achados microbiológicos, no T<sub>0</sub> cerca de 81,8% dos indivíduos apresentaram lesões nos membros inferiores. De acordo com nossos estudos, foram isolados microrganismos das lesões de 81,8% dos pacientes com lesões diversas. Cerca de 66,7% desses, possuíam ferimentos graves invasivos e todos demonstraram melhora no processo de cicatrização das lesões ao longo da terapia (Tabela 3), com significativa redução de microrganismos isolados no T<sub>2</sub> da TCD.

Embora não existam resultados de contagem diferencial dos leucócitos, sugere-se que a redução de marcadores inflamatórios se soma à possibilidade de inferência na redução de neutrófilos segmentados, combinados com o decaimento de leucócitos totais (Tabela 2), e redução de isolados microbiológicos (Tabela 3). Contudo, é de extrema importância a investigação da análise celular hematológica para confirmação de possíveis alterações morfológicas associadas ao dano tecidual e estabelecimento da fibrose, bastante comum em linfedemas de membros (TASHIRO *et al.*, 2017).

Segundo Godoy *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2018), as infecções oportunistas em pacientes portadores de linfedema, se tornam problemas graves na maioria dos casos avançados da doença, devido à suscetibilidade do tecido prejudicado pela doença, bem como as comorbidades portadas pela maioria desse indivíduos. Por isso, os dados demonstrados por esse estudo, corroboram com o aspecto macroscópico do processo de cicatrização das lesões (Figuras 2 e 3), que demonstram a evolução positiva em todos eles, resultantes da higienização e autocuidado realizados nas seções de TCD, associados às orientações recebidas pelos pacientes, para que os mesmos adquiram independência no autocuidado, com o enfaixamento dos membros e higienização das feridas, como medidas de tratamento e profilaxia contra infecções oportunistas.

De acordo com os gráficos do estudo imunológico, houve um padrão de redução importante na população de linfócitos T CD4+ ativados, que pode contribuir como resposta do estadiamento da doença. Em contrapartida, os linfócitos de perfil citotóxicos ativados (CD8+CD28+) aumentaram juntamente com a população de linfócitos Treg (CD4+CD25+). Esses achados, embora não estatísticos, podem ser associados à produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, sugerindo um perfil Th1 ativado, com regulação supressora de inflamação (CD4+CD25+ + IL-10) e de remissão necessária para quadros de linfedema. Os dados imunológicos são reforçados pela diminuição estatística dos marcadores bioquímicos inflamatórios discutidos anteriormente.

Esses resultados são promissores, pois de acordo com Tekola e colaboradores (2018) o linfedema é uma doença inflamatória mediada por linfócitos T. Em 2013, Avraham *et al.* confirmaram esses achados indicando que o aumento de linfócitos T CD4+ no infiltrado tecidual está correlacionado diretamente com a severidade da doença. Resultados recentes indicam ainda, que a depleção de linfócitos T CD4+

(em camundongos *Knockout* para CD4), mas não dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> ou macrófagos, associados à neutralização de alguns anticorpos, podem promover a reversão do linfedema (ZAMPELL et al., 2012; NORES et al., 2018). Além disso, conhecimentos imunológicos mais aprofundados a respeito de linfedema de membro superior, associado à mastectomia, demonstram que a terapia anti-Th2 parece ser eficaz para a reversão da sequela (NORES et al., 2018).

Embora os resultados desse estudo sobre a resposta bioquímica e celular sejam ainda preliminares, Foldi et al. (2000) e Nores et al. (2018) confirmam a importância do efeito anti-inflamatório promovido pela Terapia Complexa Descongestiva em seus estudos através da regulação da resposta imunológica durante a promoção da TCD, para a evolução clínica eficaz dos indivíduos.

Infelizmente, nosso “n amostral” que completou as 22 sessões da TCD foi de apenas 9 pacientes dos 21 que começaram o estudo. A redução do número de indivíduos ocorreu devido a pandemia da COVID-19, em que foi necessário cumprir medidas de isolamento social e restrição de atendimento ao público por unidades de saúde. Nesse sentido, o SRNF teve que interromper os atendimentos e tratamentos com esses e outros pacientes durante todo o ano de 2020 e o primeiro semestre de 2021. Até a defesa desta dissertação, não havia previsão de reabertura e continuação dos trabalhos por parte do SRNF/FIOCRUZ-PE.

Embora não tenha sido o alvo principal deste estudo, é necessário relatar a importância de associações terapêuticas no atendimento do paciente portador de linfedema. Além da aplicação da TCD, a qual promoveu a redução significativa do diâmetro do linfedema dos pacientes, os quais saíram de grau III segundo escala de Dreyer para grau I em muitos casos (dados não mostrados), houve a utilização da terapia com laser nas lesões ulcerativas de alguns indivíduos (Figura 3) possibilitando o processo cicatricial mais rápido e auxiliando na remoção da contaminação microbiológica (WAIBEL et al., 2018; PEREIRA et al., 2020).

Por se tratar de um atendimento simples, que utiliza um processo fisioterapêutico em seu tratamento e que ensina o portador do linfedema o autocuidado (como higienização do membro afetado, enfaixamento e compressão) ficou clara a importância da Terapia Complexa Descongestiva para aplicabilidade nos Sistemas de Saúde no Brasil e no mundo, e a importância do profissional de fisioterapia ao longo de todo o processo de tratamento. Também é de extrema

importância que sejam realizados novos estudos baseados em um “n” amostral mais robusto, incluindo a divisão de grupos que possam considerar as variações clínicas da doença e respectivas comorbidades, para que o padrão de resposta bioquímica e celular seja ainda mais concretizado.

## 7. CONCLUSÃO

A Terapia Complexa Descongestiva aplicada nos pacientes envolvidos nesse estudo, promoveu redução de leucócitos totais, aumento da cicatrização das lesões nos membros inferiores, bem como a redução dos mesmos, e consequente redução de isolados microbiológicos nas lesões. Além disso, promoveu o aumento de resposta imunológica importante, de perfil Th1, com aumento na produção de algumas citocinas intracitoplasmáticas, de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e Treg, bem como a redução de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Esses resultados reforçam a importância pela busca de mais respostas a respeito da eficácia da TCD, uma vez que ela também promove alterações importantes a nível celular e molecular, além dos resultados físicos já conhecidos.

## REFERÊNCIAS

- ADDISS D. G.; BRADY M. A. Morbidity management in the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: a review of the scientific literature. **Filaria journal.**, v. 6, n. 1, p. 2, 2010.
- ARIAS-CUADRADO, A.; ÁLVAREZ-VÁZQUEZ, M. J.; MARTÍN-MOURELLE, R.; JIMÉNEZ, C. V. D. Clínica, clasificación y estadiaje del linfedema. **Rehabilitación**, v. 44, p. 29-34, 2010.
- ARIKAN DÖNMEZ, A.; KAPUCU, S. Management of Breast Cancer-Related Lymphedema. **Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi**, v. 31, n. 4, 2016.
- ASCHEN, S.; ZAMPELL, J. C.; ELHADAD, S.; WEITMAN, E.; ANDRADE, M. D. B.; MEHRARA, B. J. Regulation of adipogenesis by lymphatic fluid stasis part II: expression of adipose differentiation genes. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 129, n. 4, p. 838, 2012.
- ASPELUND, A.; ROBCIUC, M. R.; KARAMAN, S.; MAKINEN, T.; ALITALO, K. Lymphatic system in cardiovascular medicine. **Circulation research**, v. 118, n. 3, p. 515-530, 2016.
- AVRAHAM, T. et al. Th2 differentiation is necessary for soft tissue fibrosis and lymphatic dysfunction resulting from lymphedema. **FASEB J.** 27, 1114–1126; 2013.
- BRORSON, H.; SVENSSON, H. Complete reduction of lymphoedema of the arm by liposuction after breast cancer. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery**, v. 31, n. 2, p. 137-143, 1997.
- BÜRGLIN T. R. **Enciclopédia de Genética de Brenner**. 2ª ed., 2013.
- CHEN, Kuo et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for postmastectomy lymphedema: a literature review. **Clinical and Translational Science**, v. 14, n. 1, p. 54-61, 2021.
- CHU, C. H.; CHENG, Y. P.; KAO, H. L.; LIANG, C. W.; CHAN, J. Y.; & YU, Y. Lymphedema-associated neutrophilic dermatosis: Two cases of localized Sweet syndrome on the lymphedematous lower limbs. **The Journal of dermatology**, v. 43, n. 9, p. 1062-1066, 2016.

CLAVIN, N.W.; AVRAHAM, T.; FERNANDEZ, J.; DALUVOY, S.V.; SOARES, M.A.; CHAUDHRY, A.; MEHRARA, B.J. TGF- $\beta$ 1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 295, p. 2113–2127, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement.** M100-S22, v. 32, n. 3, 2014.

COLLAZOS, J.; DE LA FUENTE, B.; DE LA FUENTE, J.; GARCÍA, A.; GÓMEZ, H.; MENÉNDEZ, C.; MARTÍN-REGIDOR, M. Factors associated with sepsis development in 606 Spanish adult patients with cellulitis. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.

DA SILVA F. L.; DE OLIVEIRA, V. S. E.; DOS SANTOS SOARES, H. P.; DE SIQUEIRA, R. S.; ROQUE, L. C. S. C.; AGUIAR-SANTOS, M.; DO AMPARO ANDRADE, M. Use of complex decongestive therapy with low cost material in a patient with lymphedema living in an endemic area for filariasis. **Rev Patol Trop.**, v. 47, n. 1, p. 55-66, 2018.

DENG, J.; RADINA, E.; FU, M. R.; ARMER, J. M.; CORMIER, J. N.; THIADENS, S. R.; RIDNER, S. H. Self-Care Status, Symptom Burden, and Reported Infections in Individuals With Lower-Extremity Primary Lymphedema. **Journal of Nursing Scholarship**, v. 47, n. 2, p. 126-134, 2015.

DING, A.H. C.F., NATHAN, D.J. Stuehr, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141:2407–2412, 1988.

DOMASZEWSKA-SZOSTEK, A.; ZALESKA, M.; OLSZEWSKI, W. L. Hyperkeratosis in human lower limb lymphedema: the effect of stagnant tissue fluid/lymph. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 6, p. 1002-1008, 2016.

DREYER G.; PIESSENS W. Lymphatic Filariasis. Nutman TB (ed). London: Imperial College Press. 2000 endemic for Bancroftian Filariasis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n. 4, p. e668, 2010.

DROLET, R.; RICHARD, C.; SNIDERMAN, A. D.; MAILLOUX, J.; FORTIER, M.; HUOT, C.; TCHERNOF, A. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. **International journal of obesity**, v. 32(2), p. 283-291. 2008.

ERYLMAZ T, *et al.* Suction-assisted lipectomy for treatment of lower-extremity lymphedema. **Aesth Plast Surg.**, v. 33, n. 4, p. 671-3, 2009.

FÖLDI E.; SAUERWALD A.; HENNIG B. Effect of complex decongestive physiotherapy on gene expression for the inflammatory response in peripheral lymphedema. **Lymphology**, v. 33, n. 1, p. 19-23, 2000.

GARDENIER, J. C., HESPE, G. E., KATARU, R. P., SAVETSKY, I. L., TORRISI, J. S., NORES, G. D. G.; ORTEGA, S. Diphtheria toxin-mediated ablation of lymphatic endothelial cells results in progressive lymphedema. **JCI insight**, v. 1, n.15, 2016.

GRADA, A. A.; PHILLIPS, T. J. Lymphedema: pathophysiology and clinical manifestations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 6, p. 1009-1020, 2017.

GREENE, A. K.; MACLELLAN, R. A. Obesity-induced upper extremity lymphedema. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 1, n. 7, 2013.

GODOY, H.J.P.; BUDTINGER F. R.; GODOY, M. D. F. G.; GODOY, J. M. P. D. Evolution of Skin during Rehabilitation for Elephantiasis Using Intensive Treatment. **Case Reports in Dermatological Medicine.**, v. 4, 2016.

GOUSOPOULOS, E.; PROULX, S.T.; BACHMANN, S.B.; SCHOLL, J.; DIONYSSIOU, D.; DEMIRI, E.; HALIN, C.; DIETERICH, L.C.; DETMAR, M. Regulatory T cell transfer ameliorates lymphedema and promotes lymphatic vessel function. **JCI Insight**, v. 1, p. e89081, 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia médica**. 12a edição. Edt. Elsevier, 2011.

GUPTA A.; MOORE J. A. Lymphedema. **JAMA Oncol.**, v. 1, n. 4(5), p. 755, 2018.

GYAPONG, John O. et al. Elimination of lymphatic filariasis: current perspectives on mass drug administration. **Research and reports in tropical medicine**, v. 9, p. 25, 2018.

HONG, Y. K.; HARVEY, N.; NOH, Y. H.; SCHACHT, V.; HIRAKAWA, S.; DETMAR, M.; OLIVER, G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 225, n. 3, p. 351-357, 2002.

ICHIMORI, K.; KING, J. D.; ENGELS, D.; YAJIMA, A.; MIKHAILOV, A.; LAMMIE, P.; OTTESEN, E. A. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: the processes underlying programme success. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

INTERNATIONAL SOCIETY OF LYMPHOLOGY. The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema. Consensus document of the International Society of Lymphology. **Lymphology, Stuttgart.**, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2013.

JAFARY, Farzaneh et al. Novel peptide Inhibitors for Lactate Dehydrogenase A (LDHA): A survey to Inhibit LDHA Activity via Disruption of protein-protein Interaction. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

JEONG, S.; ROKAS, A.; CARROLL, S. B. Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in Drosophila evolution. **Cell**, v. 125, n. 7, p. 1387-1399, 2006.

JOSEFOWICZ, S.Z.; LU, L.F.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 531–564, 2012.

JUN, Y. J.; KANG, I. S.; LEE, J. H.; KIM, S. M.; KIM, Y. J. A case of fatal necrotizing fasciitis arising from chronic lymphedema. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 12, n. 4, p. 293-296, 2013.

KATARU, R.P.; KIM, H.; JANG, C.; CHOI, D.K.; KOH, B.I.; KIM, M.; GOLLAMUDI, S.; KIM, Y.K.; LEE, S.H.; KOH, G.Y. T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation. **Immunity**, v. 34, p. 96–107, 2011.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S. **Diagnostico Microbiológico: Texto e Atlas**. Ed. Médica Panamericana, São Paulo, 1691p, 2008.

LY, C. L.; KATARU, R. P.; MEHRARA, B. J. Inflammatory manifestations of lymphedema. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 171, 2017.

LOURENS, Gayle B.; FERRELL, Denise K. Lymphatic filariasis. **Nursing Clinics**, v. 54, n. 2, p. 181-192, 2019.

MAHÍA VILAS, M. The immune system in lymphedema and lymphangitis of the lower limbs. **Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascul**, v. 17, n. 2, p. 150-160, 2016.

MARGARIS, K. N.; BLACK, R. A. Modelling the lymphatic system: challenges and opportunities. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, n. 69, p. 601-612, 2012.

MOHAMMAD AZHAR, S. H.; LIM, H. Y.; TAN, B. K.; ANGELI, V. The unresolved pathophysiology of lymphedema. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 137, 2020.

MORTIMER, P. S.; ROCKSON, S. G. New developments in clinical aspects of lymphatic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 3, p. 915-921, 2014.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiología de Janeway**. 8ª ed. Artmed Editora, 2014.

NEVES, C.; BRITO, N.; MOTA, L. Linfedema congénito. **Nascer e Crescer**, v. 26, n. 1, p. 68-70, 2017.

NOWICKA, Danuta; GRYWALSKA, Ewelina. Staphylococcus aureus and host immunity in recurrent furunculosis. **Dermatology**, v. 235, n. 4, p. 295-305, 2019.

NORES, G. D. G.; LY, C. L.; CUZZONE, D. A.; KATARU, R. P.; HESPE, G. E.; TORRISI, J. S.; JESSIE, Z. Y. CD4+ T cells are activated in regional lymph nodes and migrate to skin to initiate lymphedema. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

OBINDO J, et al. Prevalence of depression and associated clinical and socio-demographic factors in people living with lymphatic filariasis in Plateau State, Nigeria. **PLoS Negl Trop Dis**. 11(6): e0005567, 2017.

OLSZEWSKI, W. L. Infection. In: **Lymphedema**. Springer, London, p. 207-216, 2011.

OLSZEWSKI, W. L. The pathophysiology of lymphedema – 2012. **Handchirurgie- Mikrochirurgie- Plastische Chirurgie**, v. 44, n. 06, p. 322-328, 2012.

OKA, M.; IWATA, C.; SUZUKI, H.I.; KIYONO, K.; MORISHITA, Y.; WATABE, T.; KOMURO, A.; KANO, M.R.; MIYAZONO, K. Inhibition of endogenous TGF- $\beta$  signaling enhances lymphangiogenesis. **Blood**, v. 111, p. 4571–4579, 2008.

PAPPALARDO, Marco et al. Breast Cancer-Related Lymphedema: Recent Updates on Diagnosis, Severity and Available Treatments. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 5, p. 402, 2021.

PARK, S. I.; YANG, E. J.; KIM, D. K.; JEONG, H. J.; KIM, G. C.; SIM, Y. J. Prevalence and epidemiological factors involved in cellulitis in Korean patients with lymphedema. **Annals of rehabilitation medicine**, v. 40, n. 2, p. 326, 2016.

PARK, K. E.; ALLAM, O.; CHANDLER, L.; MOZZAFARI, M. A.; LY, C.; LU, X.; PERSING, J. A. Surgical management of lymphedema: a review of current literature. **Gland Surgery**, v. 9, n. 2, p. 503, 2020.

PEREIRA, F.L.C., FERREIRA, M.V.L., MENDES, P.S., ROSSI, F.M., ALVES, M.P., ALVES, B.L.P. Use of a High-Power Laser for Wound Healing: A Case Report. **J Lasers Med Sci** v.11, n.1, p.112-114, 2020.

POGGIALI, Erika et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients. **Clinica chimica acta**, v. 509, p. 135-138, 2020.

RIDNER, S. H. Pathophysiology of lymphedema. **Seminars in Oncology Nursing**. **WB Saunders**, p. 4-11, 2013.

ROCHA, A.; MARCONDES, M.; NUNES, J. R. V.; MIRANDA, T.; VEIGA, J.; ARAÚJO, P.; AGUIAR-SANTOS, A. Elimination and Control of Lymphatic Filariasis Program: a partnership between the Department of Health in Olinda, Pernambuco state, Brazil and the National Center of Lymphatic Filariasis. **Revista de Patologia Tropical**, 39(3), 233-249, 2010.

ROCHA, A. Acreditação reforça reconhecimento internacional do Centro de Pesquisas da Fiocruz no combate à filariose. **Revista Acreditação**, v. 4, p. 28-29, 2014.

ROCKSON, Stanley G. Update on the biology and treatment of lymphedema. **Current treatment options in cardiovascular medicine**, v. 14, n. 2, p. 184-192, 2012.

RUOCCO, V.; SCHWARTZ, R. A.; RUOCCO, E. Lymphedema: an immunologically vulnerable site for development of neoplasms. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 1, p. 124-127, 2002.

SHAO, X.; LIU, C. Influence of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  on lymphangiogenesis. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 26, p. 568–574, 2006.

SHINAWI, Marwan. Lymphedema of the lower extremity: is it genetic or nongenetic?. **Clinical Pediatrics**, v. 46, n. 9, p. 835-841, 2007.

SOARES, H. P. S.; ROCHA, A. C.; AGUIAR-SANTOS, A. M.; SILVA, B. S.; MELO, C. M. L.; ANDRADE, M. A. Complex decongestant therapy with use of alternative material to reduce and control lymphedema in patients with endemic area of filariasis: a clinical trial. **Fisioter Pesqui.**, v. 23, n. 3, p. 268-277, 2016.

TACANI, P. M.; TACANI, R. E.; MACHADO, A. F. P.; PERONI, A. E.; ACOSTA, M.; DE FREITAS, J. O. G. Clinical profile of patients treated in physical therapy care to plastic surgery: retrospective analysis. **ConScientiae Saúde**, v. 12, n. 2, p. 290, 2013.

TASHIRO, K.; FENG, J.; WU, S. H.; MASHIKO, T.; KANAYAMA, K.; NARUSHIMA, M.; YOSHIMURA, K. Pathological changes of adipose tissue in secondary lymphoedema. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 1, p. 158-167, 2017.

TEKOLA F. et al., Development and testing of a de novo clinical staging system for podoconiosis (endemic non-filarial elephantiasis). *Trop Med Int Health*. 13(10): 1277–1283, 2008.

TRUONG, T. N.; LI, H.; HONG, Y. K.; CHEN, L. Novel characterization and live imaging of Schlemm's canal expressing Prox-1. **PLoS. One.**, v. 9, n. 5, 2014.

VAILLANT, L.; MUELLER, C.; GOUSSE, P. Treatment of limbs lymphedema. **Presse medicale (Paris, France: 1983)**, v. 39, n. 12, p. 1315-1323, 2010.

VAN DE GRAAFF, K. M. **Anatomia humana**. Barueri, SP: Manole, 6 ed. 2003.

WAMMES, L.J.; HAMID, F.; WIRIA, A.E.; WIBOWO, H.; SARTONO, E.; MAIZELS, R.M.; SMITS, H.H.; SUPALI, T.; YAZDANBAKHS, M. Regulatory T cells in human lymphatic filariasis: Stronger functional activity in microfilaremics. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, p. e1655, 2012.

WAIBEL, J.S; GIANATASIO, C.; RUDNICK, A.; SIEGEL, A. Use of Lasers in Wound Healing: How to Best Utilize Laser Technology to Prevent Scar Formation. **Cur. Dermatol. Rep.** v.7, p. 303–310, 2018.

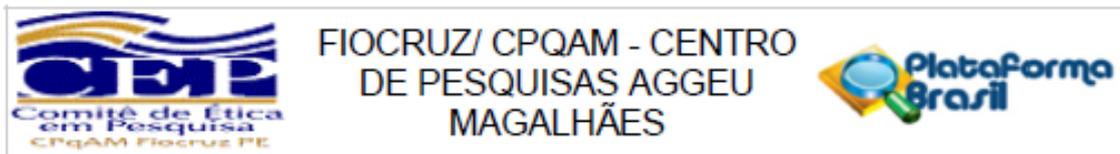
WHO. **The regional strategic plan for elimination of lymphatic filariasis 2010-2015**, SEA-CD-203, 2010.

YOSHINO ROSINHA, M.; GALACINI MASSA, P.; MARINELLI BRANDÃO, R.; FORONI, A. L. Prevalence of mortality in patients hospitalized due to erysipelas and related comorbidities. **Journal of Phlebology & Lymphology**, 3, 2010.

ZALESKA, M. T.; OLSZEWSKI, W. L. Serum immune proteins in limb lymphedema reflecting tissue processes caused by lymph stasis and chronic dermato-lymphangiadenitis (cellulitis). **Lymphatic research and biology**, v. 15, n. 3, p. 246-251, 2017.

ZAMPELL, J. C. et al. CD4(+) cells regulate fibrosis and lymphangiogenesis in response to lymphatic fluid stasis. **PLoS ONE**. 7: e49940, 2012.

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Utilização da terapia complexa descongestiva para o tratamento do linfedema de membro inferior: investigação bioquímica e imunológica da eficácia terapêutica em relação a morbidade.

**Pesquisador:** Abraham César de Brito Rocha

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 73435517.8.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.402.479

#### Apresentação do Projeto:

O projeto visa alinhar-se com os planos mais recentes da Organização Mundial de Saúde que visa investigar parâmetros moleculares, celulares e da microbiota infectante da morbidade filarial no intuito de fornecer subsídios de procedimentos padrão para o melhor tratamento do portador de linfedema, proporcionando uma melhoria da qualidade de vida.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### OBJETIVO GERAL

Investigar bioquímica e imunologicamente a eficácia da Terapia Complexa

Descongestiva aplicada em pacientes com linfedema atendidos pelo Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF- IAM-Fiocruz-PE).

##### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

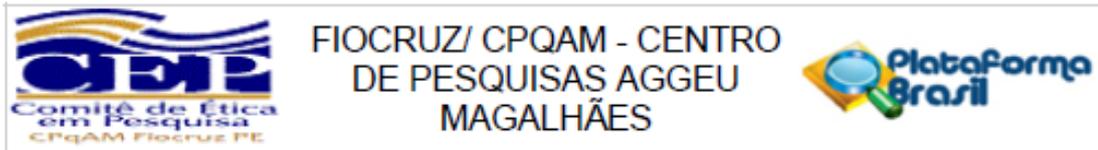
-Aplicar a TCD em pacientes atendidos no SRNF- IAM-Fiocruz-PE;

-Investigar o perfil de contaminação microbiológica dos linfedema/elefantíases que apresentarem infecções aparentes na pele;

-Realizar o Antibiograma de todos os microrganismos para o estudo da resistência microbiológica;

-Realizar hemograma completo e análise bioquímica de mediadores lipídicos da inflamação e hormônios relacionados ao estresse nos pacientes submetidos à TCD;

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.402.479

-Analisar o perfil de resposta imunológica celular e humoral dos pacientes submetidos à TCD.

Realizar o diagnóstico da infecção filarial através dos testes parasitológico, antigênicos e de anticorpo.

-Formar recursos humanos para o manejo da morbidade do linfedema/elefantíase no âmbito Nacional (profissionais do SUS) e internacional.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Risco: Todo paciente será orientado com relação a pesquisa. O presente estudo não apresenta riscos diretos a saúde do paciente, apenas durante ou após a coleta venosa poderá correr um hematoma auto-resolutivo.

Benefícios: As investigações servirão como estudos fundamentais para a possível transferência e inserção do protocolo da TCD, padronizado no SRNF, para o âmbito do Sistema Único de Saúde, uma vez que o SUS ainda não tem um protocolo padrão ouro para o tratamento da morbidade filarial.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É uma pesquisa relevante que poderá contribuir para o melhoramento da qualidade de vida das pessoas acometidas pela filariose linfática.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados todos as documentações e demais declarações exigidas pelo sistema CEP/CONEP.

**Recomendações:**

Não há.

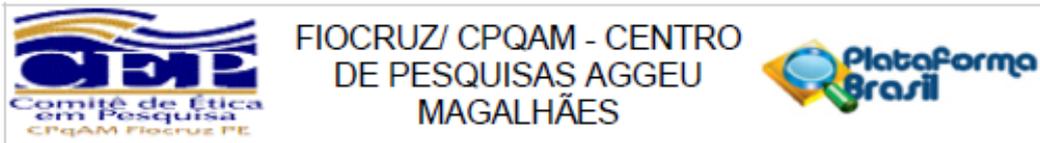
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O referido projeto apresenta todas as informações necessárias para compreensão do estudo, da mesma forma, estão apresentados os termos de compromisso e responsabilidade ética.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.402.479

dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio.pdf	28/11/2017 10:48:20	Janaina Campos de Miranda	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia.pdf	21/11/2017 15:23:19	Janaina Campos de Miranda	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_978863.pdf	15/08/2017 10:14:07		Aceito
Outros	Compromisso.pdf	15/08/2017 10:13:26	Abraham César de Brito Rocha	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participantes.pdf	15/08/2017 10:08:29	Abraham César de Brito Rocha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes.pdf	15/08/2017 10:05:33	Abraham César de Brito Rocha	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	15/08/2017 09:50:02	Abraham César de Brito Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_morbidade.pdf	15/08/2017 09:49:11	Abraham César de Brito Rocha	Aceito

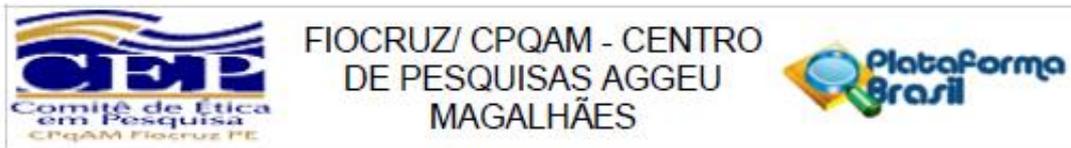
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n°  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.402.479

RECIFE, 28 de Novembro de 2017

---

**Assinado por:**  
**Janaina Campos de Miranda**  
**(Coordenador)**

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br