



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLÓGIA E FARMACOLOGIA

William Bruno Alves da Silva

Belo Horizonte – MG

2021

William Bruno Alves da Silva

Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS) na doença arterial coronariana humana: correlação com a formação da placa aterosclerótica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos

Belo Horizonte – MG

2021

043

Silva, William Bruno Alves da.

Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS) na doença arterial coronariana humana: correlação com a formação da placa aterosclerótica [manuscrito] / William Bruno Alves da Silva. - 2021.

44 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Farmacologia. 3. Doença da Artéria Coronariana. 4. Aterosclerose. 5. Óxido Nítrico Sintase Tipo I. 6. Macrófagos. I. Lemos, Virgínia Soares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 544 DE WILLIAM BRUNO ALVES DA SILVA

Às 14:00 horas do dia **10 do mês de setembro de 2021**, transmitida por webconferência da plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **William Bruno Alves da Silva**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Dr. Ednil Costa Aguilar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Óxido Nítrico Sintase Neuronal(nNOS) na Doença Arterial Coronariana Humana: Correlação com a Formação da Placa Aterosclerótica**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de setembro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 14/09/2021, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virginia Soares Lemos, Professora do Magistério Superior**, em 21/09/2021, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ednil Costa Aguilar, Usuário Externo**, em 26/10/2021, às 08:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0953923** e o código CRC **34D903D6**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Me deu forças, renovou minha mente e ânimo em momentos de desespero e me capacitou a realizar todo esse trabalho.

À minha esposa, Elisangela, que passou todas as dificuldades e alegrias deste período ao meu lado. Me apoiando e acreditando em mim, mesmo quando eu mesmo não conseguia acreditar. Suportou todas as fases desse processo ao meu lado.

À minha família, em especial a minha mãe, Edina, que foi a mulher que me inspirou a persistir e a estudar, acredito que sem o apoio dela não seria nada do que sou hoje.

À minha orientadora Profa. Virginia Soares Lemos, por todo apoio durante toda essa trajetória. Os ensinamentos teóricos e práticos, as discussões tão produtivas, a paciência, os conselhos, o incentivo e a compreensão, foram extremamente importantes e vitais para realização de todo trabalho.

Ao Ildernandes Vieira-Alves, amigo para todas as horas, que me apoiou, me deu suporte em todas as técnicas experimentais, me escutou repetir raciocínios e informações repetidas inúmeras vezes, até tudo se encaixar. Você contribuiu muito para o profissional que sou hoje.

Ao Wesley Fernandes-Braga, meu melhor amigo, irmão em Cristo. Agradeço a você pela paciência e por todos os questionamentos que me ajudaram a ser o profissional que me considero hoje. Sua persistência em entender a forma como eu pensava sobre os temas estudados foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

À Profa. Rafaela Fernandes por todo apoio que foi de muita importância para o delineamento do trabalho. As discussões e sugestões que ajudaram a nortear a nossa pesquisa.

Aos meus colegas de Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Leonardo Silva, Eduardo Damasceno, Lucas Silva, Joyce, Gabriella, Euler, Leda Maria, Antonielle, Natália, muito obrigado pelas risadas, incentivos e apoio, que com certeza contribuíram demais com tudo isso.

Aos colegas pesquisadores do ICB, Fernando Pedro, Melissa Olga Lúcia, Thaís Lemos, Enes Francisco, pela parceria, risadas e pelo café. Muito obrigado.

Às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

RESUMO

A doença arterial coronariana (DAC) é caracterizada pelo fornecimento inadequado de sangue ao músculo cardíaco, decorrente do estreitamento das artérias, majoritariamente, causado pela aterosclerose. A aterosclerose, processo inflamatório crônico que promove remodelamento vascular e formação de trombos, é o maior fator de risco para o infarto agudo do miocárdio. A disfunção endotelial é considerada o evento inicial de uma série de doenças de natureza inflamatória como a aterosclerose, sendo caracterizada pela redução da biodisponibilidade de fatores vasoativos, em especial o Óxido Nítrico (NO), aumentando a tendência à vasoconstrição, maior trombogenicidade e proliferação celular anormal. A óxido nítrico sintase (NOS) neuronal (nNOS) é uma isoforma da NOS que desempenha um papel importante na fisiopatologia vascular. Diversos estudos em modelos murinos e humanos mostraram que a expressão vascular da nNOS aumenta com a progressão da placa. No entanto, ainda não se sabe qual o papel da nNOS na fisiopatologia da aterosclerose. Um estudo em animais apoE^{-/-} mostrou que a deleção gênica da nNOS acelera a formação de placa, sugerindo um efeito anti-aterogênico. Ainda não existem estudos sobre o papel da nNOS na aterogênese em humanos. No presente estudo, a expressão da nNOS e sua correlação com macrófagos M1 e M2 e a progressão da placa, foi avaliada na DAC aterosclerótica humana. O estudo foi feito na artéria coronária direita de 34 pacientes (25 homens e 9 mulheres; com idade de 50 ± 15 anos), submetidos a transplante cardíaco. As amostras foram processadas para histologia e imunomarcção. Com base no estágio de desenvolvimento da aterosclerose, as lesões foram divididas em dois grupos: grupo lesão inicial e grupo lesão avançada. Os resultados do presente estudo mostraram que a nNOS estava expressa na artéria coronária humana e que a sua expressão aumentava com a progressão da placa aterosclerótica. A expressão da nNOS foi encontrada, basicamente, nos macrófagos. A medida que houve aumento no infiltrado de macrófagos, observou-se também o aumento na expressão da nNOS. Nas lesões avançadas, todas as células que marcaram positivo para nNOS eram macrófagos pró-inflamatórios M1, enquanto que nas lesões iniciais, menos de 3% das células que marcaram positivo para nNOS, eram macrófagos pró-inflamatórios M1. Estes dados mostram que em humanos, diferentemente do que foi mostrado em modelos animais, a nNOS aparenta ter um papel pró-inflamatório e pode contribuir com a progressão da placa, traçando uma nova perspectiva do papel da enzima nNOS no desenvolvimento da aterosclerose.

Palavras-chave: Doença Arterial Coronariana Humana. Aterosclerose. Oxido Nítrico Sintase Neuronal. Macrófagos.

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is characterized by inadequate blood supply to the heart muscle, resulting from the narrowing of the arteries, mostly caused by atherosclerosis. Atherosclerosis, a chronic inflammatory process that promotes vascular remodeling and thrombus formation, is the major risk factor for acute myocardial infarction. Endothelial dysfunction is considered the initial event of a series of inflammatory diseases, such as atherosclerosis, characterized by a reduction in the bioavailability of vasoactive factors, especially Nitric Oxide (NO), increasing the tendency to vasoconstriction, greater thrombogenicity and abnormal cell proliferation. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is an isoform of NOS that plays an important role in the vascular pathophysiology. Several studies in murine and human models have shown that the vascular expression of nNOS increases with plaque progression. However, the role of nNOS in the pathophysiology of atherosclerosis remains unclear. An apoE^{-/-} animal study showed that the nNOS gene deletion accelerates plaque formation, suggesting an anti-atherogenic effect. There are still no studies on the role of nNOS in atherogenesis in humans. A study in apoE^{-/-} animals showed that deletion of nNOS gene accelerates plaque formation, suggesting an anti-atherogenic effect. So far, there are no studies on the role of nNOS in human atherogenesis. In the present study, the expression of nNOS and its correlation with M1 and M2 macrophages and plaque progression was evaluated in human atherosclerotic CAD. The study was performed in the right coronary artery taken from 34 patients (25 men and 9 women; aged 50 ± 15 years) undergoing heart transplantation. The samples were processed for histology and immunostaining, and based on the stage of atherosclerosis development, they were divided into two groups: early and advanced lesion groups. The results of the present study showed that nNOS was expressed in human coronary artery and that its expression increased with the progression of the atherosclerotic plaque. The expression of nNOS was basically found in macrophages. As the macrophage infiltrate increased, the expression of nNOS also increased. In advanced lesions, all cells that scored positive for nNOS were M1 pro-inflammatory macrophages, whereas in early lesions, less than 3% of cells that scored positive for nNOS were M1 pro-inflammatory macrophages. These data show that in humans, unlike what has been shown in animal models, nNOS appears to have a pro-inflammatory role and may contribute to plaque progression, providing a new perspective on the role of the nNOS enzyme in the development of atherosclerosis.

Keywords: Human Coronary Artery Disease. Atherosclerosis. Neuronal Nitric Oxide Synthase. Macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do inicial da formação da placa aterosclerótica. Adaptado (MOORE; TABAS, 2011)	13.
Figura 2. Análise quantitativa de lipídeos e macrófagos e análise morfométricas da camada íntima vascular	24.
Figura 3. nNOS é expressa na Artéria Coronária Direita Humana por Imuno-histoquímica	26.
Figura 4. Expressão de nNOS na Artéria Coronária Direita Humana	26.
Figura 5. Expressão de nNOS na região de placa	27.
Figura 6. Imagem representativa do método de captura de imagens para análise de co-localização por IF	28.
Figura 7. Co-localização de macrófagos (CD68) e nNOS	29.
Figura 8. Co-localização de CD68 e CD86	30.
Figura 9. Co-localização de nNOS e iNOS	31.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Explicação da análise de co-imunofluorescência	22.
Tabela 2. Características dos pacientes estudados e fatores de risco nos grupos L. Inicial e L. Avançada	25.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD - Artéria coronária direita

AHA - *American Heart Association*

AIT - Espessamento intimal adaptativo

ApoE - Apolipoproteína E

CAPI - Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

DAC - Doença arterial coronariana

DCV - Doenças cardiovasculares

DKO - Duplo-nocaut

DM - Diabetes melito

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ERNS - Espécies reativas de nitrogênio

EROS - Espécies reativas de oxigênio

H&E - Hematoxilina & Eosina

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HIP - Hiperplasia intimal precoce

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular-1

IF - Imunofluorescência

IFN- γ - Interferão-gama

IHC - Imunohistoquímica

IL-1 α - Interleucina 1 alfa

IL-1 β - Interleucina 1 alfa

IL-6 - Interleucina 6

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

L-NAME - N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintases

NOS1 ou nNOS - Óxido nítrico sintases neuronal

NOS2 ou iNOS - Óxido nítrico sintases induzível

NOS3 ou eNOS - Óxido nítrico sintases endotelial

ORO - Oil-Red-O

oxLDL - Lipoproteína de baixa densidade oxidada

PAMPS - Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PIT - Espessamento intimal patológico

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

TNF- α - Fatores de necrose tumoral alfa

TRIM - 1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-imidazole

VCAM-1 - Molécula de adesão celular-vascular-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Doença Arterial Coronariana (DAC) e Aterosclerose	10
1.2 Óxido nítrico sintases (NOS) e função vascular	13
1.3 Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS), Sistema Cardiovascular e Aterosclerose	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Amostra Biológica.....	18
3.2 Estadiamento da aterosclerose.....	18
3.3 Dados Clínicos	19
3.4 Histologia Básica	19
3.5 Imunohistoquímica.....	20
3.5.1 Análise Imunohistoquímica.....	20
3.6 Imunofluorescência	20
3.6.1 Análise de co-imunofluorescência	21
3.7 Análises Estatísticas.....	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÕES	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS	36
8. ANEXO I:.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Arterial Coronariana (DAC) e Aterosclerose

A doença arterial coronariana (DAC), a insuficiência cardíaca, o infarto agudo do miocárdio, as endocardites e miocardites, doença das valvas cardíacas, arritmias e hipertensão arterial, são as principais Doenças Cardiovasculares (DCV) existentes (MASTOI et al., 2018). Entre os anos de 2015 a 2020, no Brasil morreram por ano, uma média de 314.811 pessoas por doenças relacionadas ao sistema cardiovascular (DATASUS, 2019) e estima-se que cerca de 17,9 milhões de pessoas morreram por DCV em 2016 no mundo, representando 31% das mortes globais (WHO, 2017).

A DAC é uma das doenças que mais provoca de mortes em todo o mundo (CASTRO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020). Ela é caracterizada pelo estreitamento dos vasos coronarianos, dificultando o transporte de sangue para o miocárdio. A aterosclerose com consequente remodelamento vascular e possível formação de trombos decorrentes da ruptura de placa, é a principal causa de DAC e maior fator de risco para o infarto agudo do miocárdio (DE PINHO et al., 2010; SANTOS; ISIDORO; CRUZ, 2012).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose e, conseqüentemente, da DAC são as dislipidemias, fatores genéticos, obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes melito (DM) e tabagismo (BODANESE, 2014; MALAKAR et al., 2019). A HAS pode provocar um remodelamento vascular com enrijecimento das artérias coronárias pela degradação das fibras elásticas e formação de fibras de colágeno (ALVIM et al., 2017). Devido à pressão sanguínea elevada dentro dos vasos, o tensão de cisalhamento (*shear stress*) pode provocar lesões na parede vascular e desencadear o processo de formação da placa de ateroma (MELO et al., 2007b). O diabetes tipo 2 quando associada a dislipidemia, promove elevados níveis de glicose, triglicerídeos e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue, fatores estes que contribuem para o agravamento do estresse oxidativo e da aterosclerose, devido ao aumento do dano endotelial (CENTEMERO et al., 2009; MARÇAL; MARTINS-OLIVEIRA, 2011). A obesidade acompanhada do sedentarismo e maus hábitos alimentares eleva os níveis de gordura no sangue, potencializando fatores que exacerbem a DAC (ROCHA; OLIVEIRA, 2017; SILVEIRA et al., 2018). O tabagismo, também é outro fator de risco que provoca efeitos deletérios no organismo,

como a peroxidação de partículas de LDL estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), ocasionando o estresse oxidativo, e corroborando para a formação de placa e a ocorrência de DAC (MESSNER; BERNHARD, 2014).

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico das artérias que culmina na oclusão parcial e/ou total do lúmen vascular, de acordo com o estágio aterosclerótico em que o vaso se encontra (LEGEIN et al., 2013). O endotélio vascular é responsável por diversas funções que mantêm o funcionamento dos vasos sanguíneos, dentre elas, a homeostase e o tônus vascular pela liberações de moléculas vasoativas, como o óxido nítrico (NO) que atuam de forma autócrina e/ou parácrina (STORCH et al., 2017). A disfunção endotelial com redução da biodisponibilidade do NO, contribui no processo da aterogênese. (ANDRADE; SANTOS; VILELA-MARTIN, 2014).

A aterosclerose comumente se desenvolve em regiões de desvio de fluxo sanguíneo, nas bifurcações, porque nestas regiões o *shear stress* e a velocidade do fluxo sanguíneo são reduzidos e/ou turbulentos, permitindo a adesão de moléculas como LDL e células leucocitárias (BARBALHO et al., 2015; SOUSA; RIBEIRO, 2019). O processo inflamatório inicial ocorre, em decorrência da entrada de partículas de LDL no espaço subendotelial nestas regiões, que pode ocorrer pelo processo de transcitose, onde a partícula é transportada para o espaço subendotelial por meio de endossomos (SOUSA; RIBEIRO, 2019), ou quando já existe uma lesão endotelial instalada na parede vascular (GIRIBELA et al., 2011). Na região subendotelial, a LDL sofre oxidação por produtos do metabolismo celular das células residentes na camada íntima vascular, como espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio e (ERNS) (BARBALHO et al., 2015; GIRIBELA et al., 2011; SOUSA; RIBEIRO, 2019). Uma vez na parede do vaso, a LDL oxidada (oxLDL) promove redução da biodisponibilidade de NO (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005), recrutamento de leucócitos para a região subendotelial, por meio de expressão de P-selectina e E-selectina na membrana da célula endotelial, além de estimular a produção das moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) (GIRIBELA et al., 2011; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; MCLAREN et al., 2011). Os monócitos estacionados na região de bifurcação, são transportados para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos, e iniciam a síntese e liberação moléculas inflamatórias, como citocinas (IL1- α , IL1- β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β), moléculas que atraem mais monócitos para o espaço abaixo do endotélio e, como a entrada de LDL se faz constante, a ativação do endotélio também

é contínua, e esse processo persiste, sendo modulado por estímulo anti- e pró-inflamatórios, que determinam o avanço da aterosclerose (**Figura 1**) (GIRIBELA et al., 2011; KURAKULA et al., 2013; OISHI et al., 2018).

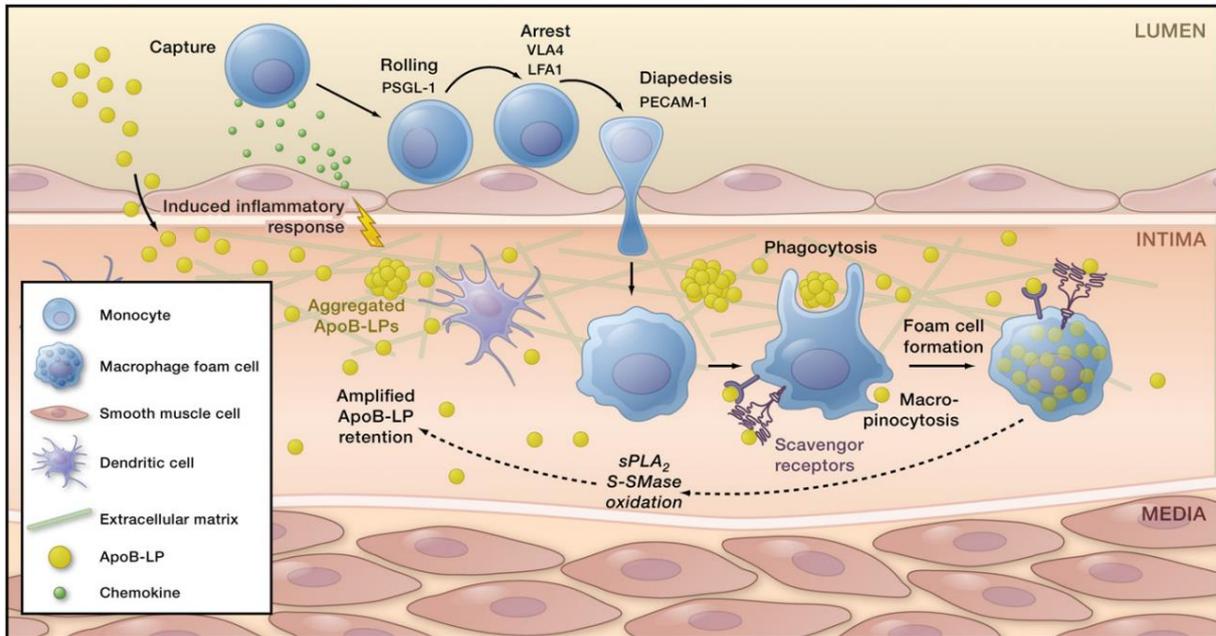


Figura 1. Esquema representativo do inicial da formação da placa aterosclerótica. Adaptado (MOORE; TABAS, 2011).

O processo aterosclerótico passa por diversos estágios de alterações morfofisiológicas vasculares que evoluem do estágio inicial, até os mais avançados. A hiperplasia intimal precoce (HIP) é o processo inicial para a formação da placa aterosclerótica, que em seguida passa por vários estágios até atingir sua fase mais avançada, que pode provocar um evento de erosão ou ruptura de placa e a formação de um trombo (BENTZON et al., 2014). A HIP é caracterizada por um espessamento intimal adaptativo (AIT) que ocorre desde a infância, provocada por fatores fisiológicos e hemodinâmicos, podendo progredir, na fase adulta, e se desenvolver para um espessamento intimal patológico (PIT), iniciando a progressão para as fases mais graves da doença (OTSUKA et al., 2016).

1.2 Óxido nítrico sintases (NOS) e função vascular

A diminuição da biodisponibilidade do NO, é um fator importante para a ocorrência de todos os eventos relacionados a aterosclerose. Essa baixa biodisponibilidade pode ser provocada pela reduzida atividade das enzimas responsáveis pela síntese e liberação do NO, as óxido nítrico sintases (NOS) (YUGAR-TOLEDO et al., 2015).

O NO é um gás produzido por três isoformas diferentes de NOS (FLEMING, 2003). As isoformas constitutivas são a NOS neuronal (NOS1 ou nNOS) e a NOS endotelial (NOS3 ou eNOS). A terceira isoforma, ao contrário das constitutivas, é induzidas em situações como processo inflamatórios e, portanto, é conhecida como NOS induzida (NOS2 ou iNOS) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

As NOS produzem NO em diferentes situações e para diferentes funções (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). A iNOS é uma enzima comumente encontrada em macrófagos e em outras células do sistema imune, e sua expressão pode ser estimulada por lipopolissacarídeos de microrganismos bacterianos e por outros Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs). A iNOS também pode ser encontrada em outros tipos celulares, como as células endoteliais, que se estimuladas por citocinas inflamatórias (como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ), podem produzir NO via iNOS, liberando-o em células vizinhas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; VIARO; NOBRE; EVORA, 2000).

A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é uma enzima comumente encontrada em células do endotélio vascular, mas pode também ser encontrada em outros tipos celulares (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Seu principal local de atuação é na camada de musculatura lisa vascular, onde o NO participa do controle do tônus vascular (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). O NO também tem papel importante como anti-agregante plaquetário, na adesão de leucócitos, bem como, inibe a síntese de DNA e a liberação de fatores que estimulam a proliferação de células da musculatura lisa vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

A óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) é uma enzima encontrada em neurônios centrais e periféricos, bem como em diversas células do sistema cardiovascular, e suas diferentes localizações subcelulares podem proporcionar a ela diferentes funções (COSTA et al., 2016). A nNOS em alguns tecidos se encontra

acoplada à diferentes estruturas, como a calmodulina, porém, em células musculares lisas, a nNOS se encontra também ancorada a calveolina-3, que é uma proteína estrutural que fica dentro das calvéolas, invaginações na membrana plasmática que abrigam proteínas âncoras (COSTA et al., 2016).

Estudos do nosso grupo e de outros grupos mostraram a presença da nNOS em células endoteliais e músculo liso vascular, tanto em animais (Capettini et al., 2008, CASTANIA et al., 2017; COSTA et al., 2016; SASTRE et al., 2016), como também em humanos (BUCHWALLOW et al., 2002; COSTA et al., 2018; ENDLICH et al., 2017), onde é possível observar a presença da nNOS em variados leitos vasculares (KUHLENCORDT et al., 2006; MORISHITA et al., 2002; QIAN et al., 1999; TSUTSUI, 2004),

Dados da literatura mostram que além da participação das NOS na manutenção da homeostase vascular, elas também participam no desenvolvimento da aterosclerose (ANDERSON, 2007; COSTA et al., 2016; WANG et al., 2018). Porém, se ela desempenha um papel anti-ateroscleróticos ou pró-aterosclerótico, ainda é um assunto controverso e em debate. Enquanto alguns trabalhos mostram um efeito anti-inflamatório da nNOS (ANDERSON, 2007; COSTA et al., 2016; KUHLENCORDT et al., 2006; WANG et al., 2018), estudos recentes, realizados em macrófagos oriundos de medula óssea de camundongos, mostram que o NO derivado de nNOS, regula a captação de oxLDL e a liberação de citocinas pró-inflamatórias na resposta rápida ao estímulo por oxLDL (ROY et al., 2019).

1.3 Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS), Sistema Cardiovascular e Aterosclerose

Estudos do nosso grupo mostraram a participação da nNOS no relaxamento vascular em camundongos e artéria mamária e mesentérica humana (CAPETTINI et al., 2008; CAPETTINI; CORTES; LEMOS, 2010). A literatura descreve um papel fisiologicamente relevante para a nNOS na modulação do fluxo sanguíneo cerebral (HAGIOKA et al., 2005), do tônus miogênico (FLEMING, 2003) e da pressão arterial sistêmica (KURIHARA et al., 1998) em modelos animais. Ainda a nNOS mostrou um papel relevante na regulação do fluxo sanguíneo da artéria braquial (SEDDON et al.,

2008) e do diâmetro e fluxo sanguíneo da artéria coronária humana (SEDDON et al., 2009).

WILCOX et al., (1997), mostraram pela primeira vez que na aorta e carótida humana, enquanto a expressão de eNOS diminui com a evolução da aterosclerose, a expressão de nNOS e iNOS aumentam, especialmente em macrófagos e células endoteliais da região da placa. Baseados nestes dados eles propuseram um papel pró-inflamatório para nNOS e iNOS e que o excesso de NO produzido pelo aumento de expressão destas enzimas, seria deletério para a função do vaso. Também, em um modelo de aterosclerose animal ApoE^{-/-}, nNOS foi co-localizada com macrófagos, encontrados na camada neointima, na placa aterosclerótica (SCHÖDEL et al., 2009). Corroborando estes dados, estudos mais recentes, mostraram em cultura de macrófagos de medula óssea de camundongo, que a inibição da nNOS diminui a captação de oxLDL, sugerindo que a nNOS participa do progressão da placa aterosclerótica promovendo a captação exacerbada de oxLDL e consequente formação de células espumosas (ROY et al., 2019, 2020). Por outro lado, estudos *in vivo* em modelo animal mostraram de forma mais direta que a nNOS tem um alto potencial antiaterogênico, uma vez que camundongos machos duplo-nocaut (DKO) para apolipoproteína E (ApoE) e para nNOS, alimentados com dieta ocidental por 14 semanas, apresentavam área de lesão aterosclerótica na aorta 66% maior que a área de lesão de camundongos machos ApoE^{-/-}. No mesmo sentido, camundongos fêmeas DKO, após 24 semanas de dieta, apresentaram uma área de lesão 31% maior, em comparação com a área de lesão de camundongos fêmeas ApoE^{-/-} (KUHLENCORDT et al., 2006; SCHÖDEL et al., 2009). Corroborando os dados acima, um estudo em modelo de remodelamento vascular de oclusão de carótida, mostrou que a deleção de nNOS (nNOS^{-/-}) acelerava a formação neointimal e remodelação vascular constritiva em decorrência da alteração do fluxo (COSTA et al., 2016; MORISHITA et al., 2002), sugerindo que em uma possível obstrução do fluxo, a ausência da nNOS aumentaria o potencial aterosclerótico da lesão.

Com relação aos resultados contraditórios acima, é importante considerar que certos dados têm que ser interpretados com precaução. Dados *in vitro* de aumento ou diminuição de expressão, não necessariamente refletem um papel pró- ou anti-ateroscleróticos da nNOS. Também, estudos com inibidores farmacológicos não seletivos como no caso dos dois trabalhos com macrófagos *in vitro* (ROY et al., 2019,

2020) não permitem distinguir qual isoforma de NOS está envolvida nos efeitos encontrados. L-NAME é totalmente não seletiva para as 3 isoformas e TRIM não têm nenhuma seletividade entre iNOS e nNOS que são as isoformas presentes nos macrófagos ($IC_{50} = 28.2$ e $27.0 \mu M$ para nNOS e iNOS, respectivamente). Finalmente, é necessário a determinação do fenótipo de macrófago no qual a nNOS é expressa para melhor inferir se o aumento da expressão nNOS, eventualmente pode ser pró ou anti-inflamatório.

Baseado no exposto fica evidente que o papel da nNOS na fisiopatologia da aterosclerose está longe de ser bem entendido e que estudos adicionais são imprescindíveis. Por outro lado, está claro que a expressão da nNOS muda desde estágios precoces do desenvolvimento da placa, sendo, portanto, um possível ponto para intervenções prognósticas e terapêuticas. Uma vez que as lesões ateroscleróticas de modelos murinos não reproduzem as lesões observadas em humanos, torna-se essencial a compreensão da fisiopatologia da aterosclerose em humanos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a expressão, correlação e papel da nNOS na progressão da placa aterosclerótica na doença arterial coronariana humana.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o estadiamento da aterosclerose na artéria coronária humana;
- Avaliar se a nNOS é expressa na artéria coronária humana e se existe diferença na expressão da nNOS com a progressão da placa;
- Investigar o perfil inflamatório dos macrófagos presentes nas placas ateroscleróticas;
- Investigar se a nNOS co-localiza com macrófagos nas placas ateroscleróticas e os fenótipos destes macrófagos (M1 ou M2).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra Biológica

Amostras de artéria coronária direita (ACD), foram coletadas de corações descartados de 34 pacientes submetidos a transplante cardíaco, no Hospital das Clínicas da UFMG. Elas foram acondicionadas em um recipiente contendo solução de Ringer/lactato de sódio (NaCl: 6mg; KCl: 0,3m; CaCl₂.2H₂O: 0,2mg; C₃H₅O₃Na: 3,2mg; Água para injetáveis q.s.p.: 1mL), mantida refrigerada e imediatamente transportadas até o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. O tecido adiposo perivascular foi, então, retirado e os vasos foram embebidos em OCT e armazenados em freezer a -80 °C até o momento dos cortes.

As amostras congeladas em OCT foram cortadas no criostato do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB/UFMG. Cortes de espessura de 10 µm foram feitos e fixados em 15 lâminas histológicas diferentes (4 cortes de 10 µm por lâmina). Nas 15 lâminas foram fixados ao todo 60 cortes com um intervalo de 100 µm entre o primeiro e o segundo corte de cada lâmina. Os cortes foram feitos dessa forma, para uma maior representatividade da extensão do vaso. As lâminas foram armazenadas em freezer -80 °C.

O presente estudo foi realizado em colaboração com o grupo do médico cirurgião cardiovascular do Hospital das Clínicas da UFMG, professor Dr. Cláudio Leo Gelape. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa – COEP (**CAAE 82255517.4.0000.5149**). Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**). Os dados dos pacientes foram preservados de forma a manter a ética e o sigilo.

3.2 Estadiamento da aterosclerose

O estadiamento da aterosclerose nas artérias coronárias foi adaptado utilizando-se as características estabelecidas pela *American Heart Association* (AHA) (KOLODZIE et al., 2001, 2003; VIRMANI et al., 2000). Para o estadiamento da

aterosclerose foram feitos os seguintes protocolos experimentais: Hematoxilina & Eosina (H&E) para determinação das camadas vasculares, Oil-Red-O (ORO) para marcação de lipídeo e Imunohistoquímica (IHC) para marcação de macrófagos. A análise visual e quantitativa das imagens obtidas destes experimentos descritos, permitiu a divisão dos grupos estudados no presente trabalho. Os vasos foram divididos em dois grupos: 1. Lesão Inicial (L. Inicial) - vasos sem lesão ou que apresentavam lesão com presença de estria gordurosa com ausência ou presença de alguns macrófagos, com características de lesões nos estágios iniciais da aterosclerose; 2. Lesão Avançada (L. Avançada) - presença do espessamento intimal patológico (PIT) com acúmulo de lipídios extracelulares sob uma camada de macrófagos carregados de lipídios, com características de lesões nos estágios avançados da aterosclerose. Os vasos dos pacientes sem lesão foram agrupados aos dos vasos com L. Inicial porque, em uma primeira análise, não houve diferença estatística entre eles, nos parâmetros de interesse para este estudo.

3.3 Dados Clínicos

Os dados clínicos dos 34 pacientes transplantados foram extraídos do prontuário virtual do banco de dados do departamento de cirurgia cardiovascular do Hospital das Clínicas da UFMG. Os dados como sexo, idade, hipertensão, tabagismo, etilismo, cardiomiopatia, dentre outros, foram processados pelo software IBM SPSS Statistics 22. Igualmente, os dados extraídos da análise dos experimentos de histologia básica também foram planilhados neste software.

3.4 Histologia Básica

Os parâmetros morfométricos foram analisados a partir da coloração Hematoxilina e Eosina (H&E), seguindo o protocolo padrão da técnica (NUNES; CINSA, 2016). As lâminas foram escaneadas no Scanner de Lâminas 3D Histech do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI do ICB/UFMG e visualizadas no software CaseViewer 1.4. Isso permitiu avaliar a área de cada uma das 3 camadas dos vasos coronários. O software permitiu o cálculo da área de cada camada do vaso.

Os dados de acúmulo de lipídio foram observados por meio do protocolo experimental Oil-Red-O (OLIVEIRA et al., 2015). As lâminas dos dois protocolos experimentais foram escaneadas no Scanner de Lâminas 3D Histech do CAPI e visualizadas e fotografadas no software CaseViewer 1.4. O ImageJ ProPlus foi utilizado para a análise dos dados de acúmulo de lipídio.

3.5 Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica (IHC) foi usado o Kit Novolink™ Max Polymer DS (1250) (RE7280-CE), da *Leica Biosystems*, foi seguido o protocolo sugerido pelo fabricante. Foram feitas marcações para macrófago (1:100) – [Anti-CD68 Monoclonal (KP1) Thermo] e óxido nítrico sintase neuronal (1:200) - (anti-nNOS (C7D7) Monoclonal – *Cell Signaling*).

3.5.1 Análise Imunohistoquímica

As análises de IHC se deram da seguinte forma: as lâminas foram escaneadas no equipamento de scanner do CAPI e as imagens foram capturadas pelo software CaseViewer 1.4. Após captura. As imagens foram analisadas no software ImageJ ProPlus, onde a ferramenta de seleção de área foi utilizada para delimitar os limites do perímetro de cada camada. As regiões de coloração marcadas pelo cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB - em marrom) foram selecionadas no software e os dados inseridos em planilha do Excel. Em seguida, toda região de tecido foi selecionada e os dados inseridos na mesma planilha. As análises foram normalizadas pela área total analisada. Os dados foram expressos em porcentagem. As análises de imunohistoquímica foram expressas em porcentagem de expressão. As análises de área vascular foram expressas em milímetros quadrados (mm²).

3.6 Imunofluorescência

Para a realização da imunofluorescência (IF), as lâminas foram inicialmente fixadas com paraformoldeído à 4%, durante 15 min. Após isto, as mesmas foram lavadas com solução de BSA 1%. Em seguida, foi realizado o bloqueio com a solução de BSA 3% diluído em PBS 1x com 0,1% de Triton-X durante 30 min. Após nova lavagem com BSA 1%, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário na

solução de bloqueio, em câmara úmida à 4°C, durante 16 h (overnight). Após lavagem no dia seguinte, o anticorpo secundário foi adicionado por 1 h em temperatura ambiente. Após esse tempo, foi utilizado o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI - *Vector Laboratories*) para coloração dos núcleos. As lâminas foram seladas com meio de montagem *Fluoromount-G™ Mounting Medium (Invitrogen™)*. As imagens foram capturadas com o uso do microscópio APOTOME (Microscópio Axio Imager/CAPI), usando a objetiva de 40x. Para as marcações foram utilizados anticorpos primários: óxido nítrico sintase neuronal (1:200) - (Anti-nNOS (C7D7) Monoclonal – *Cell Signaling*); macrófagos (1:300) – [Anti-CD68 Monoclonal (KP1)]; macrófagos M1 (1:400) - (Anti-CD86 Policlonal); óxido nítrico sintase induzida (1:50) – [Anti-iNOS Monoclonal (C-11)]. E anticorpos secundários: Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 555 (1:300) e Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488 (1:300).

3.6.1 Análise de co-imunofluorescência

As análises de IF se deram da seguinte forma: imagens de 5 quadrantes da região de placa foram capturadas (conforme Figura 5) no microscópio de fluorescência Apotome no CAPI. As análises de imunofluorescência foram expressas em células positivas por milímetros quadrados (mm²). Cada imagem possui 0,04 mm² de área em tamanho real e foram capturadas utilizando objetiva de 40x de aumento. As imagens foram capturadas nos comprimentos de onda 488 (para CD68, iNOS), 555 (para nNOS, CD86) e DAPI (Núcleo). Em cada imagem foi considerada o número de células positivas para a marcação do núcleo, para que fosse considerada as marcações nos canais 488 e 555 para os respectivos marcadores utilizados. Após apuração do número de células positivas para os marcadores alvo e os marcadores base, um cálculo de porcentagem foi realizado para mostrar qual a % de células positivas para o marcador base, eram positivas para o marcador alvo. Ex: 80% das células positivas para CD68, foram positivas para nNOS na L. Avançada.

Tabela 1 – Explicação da análise de co-imunofluorescência.

Co-localização	Marcadores Base	Marcadores Alvo
CD68 x nNOS	CD68	nNOS
CD68 x CD86	CD68	CD86
nNOS x iNOS	nNOS	iNOS

3.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 7.0. Os testes estatísticos utilizados foram teste T *Welch's* para dados paramétricos e teste *Mann-Whitney* para os dados não paramétricos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM e as diferenças estatísticas foram consideradas individualmente para cada teste, quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Fragmentos de artéria coronária direita de 34 pacientes submetidos a transplante cardíaco foram utilizados no presente estudo. Dados extraídos dos prontuários médicos, permitiram estabelecer o perfil dos pacientes, como mostrado na Tabela 2.

As características morfológicas, presença de macrófagos e de gordura, foram usadas para separar a amostra em dois grupos, formados com base nas características do estadiamento da aterosclerose estabelecido pela *American Heart Association* (AHA) (KOLODGIE et al., 2001, 2003; VIRMANI et al., 2000). Esta divisão foi estabelecida por meio da análise visual e confirmada pela análise quantitativa dos parâmetros utilizados para o estadiamento da aterosclerose. Conforme mostra a Figura 1 A, B e C, deposição lipídica foi significativamente maior na lesão avançada comparada a inicial. De forma semelhante, nota-se uma maior marcação para CD68, na L. Avançada em relação à inicial (Figura 1, D, E, F). Percebe-se também um espessamento pronunciado da camada íntima na L. Avançada em relação a inicial.

Tabela 2 – Características dos pacientes estudados e fatores de risco.		
Variáveis	N	%
Total	34	100
Sexo		
Masculino	25	73,5
Feminino	9	26,5
Faixa Etária		
Mediana (intervalo)	48 (36-69)	-
Hipertensão		
Controlada	7	20,6
Não tem	27	79,4
Dislipidemia		
Controlada	7	20,6
Não tem	27	79,4
Tabagismo		
Ex-tabagistas	8	23,5
Não	26	76,5
Etilismo		
Ex-Etilistas	6	17,6
Não	28	82,4
Diabetes		
Controlada	3	8,8
Não tem	31	91,2
Cardiomiopatia		
Chagásica	14	41,2
Dilatada Idiopática	12	35,3
Isquêmica	4	11,8
Outras	4	11,8

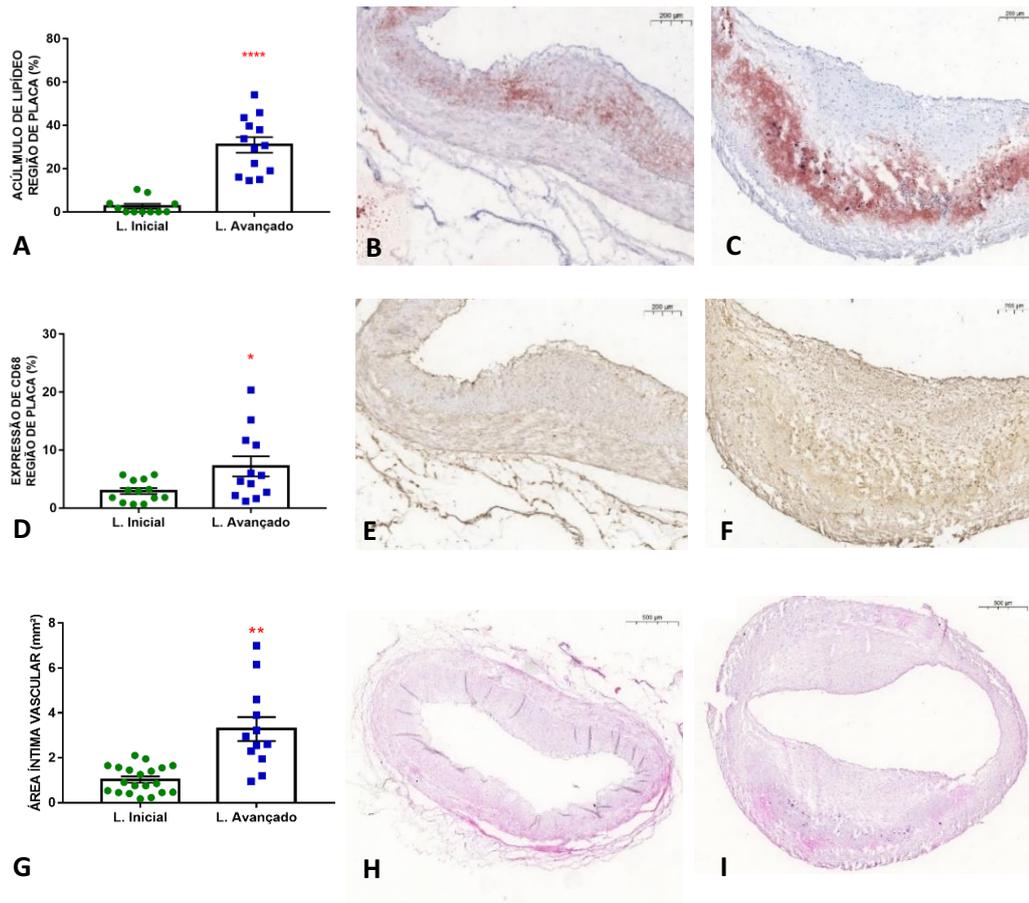


Figura 2. Análise quantitativa de lipídeos e macrófagos e análise morfométricas da camada íntima vascular. Gráfico de porcentagem de marcação de acúmulo de lipídeo na região de placa (A). Imagens representativas de acúmulo de lipídeos na região de placa no grupo L. Inicial (B) e L. Avançada (C). Gráfico de porcentagem de expressão de macrófago (CD68) (D). Imagens representativas de expressão de macrófagos na região de placa no grupo L. Inicial (E) e L. Avançada (F). Gráfico tamanho da área da camada íntima vascular (G). Imagens representativas das camadas vasculares no grupo L. Inicial (H) e L. Avançada (I). Os gráficos de barra são apresentados como a média dos valores \pm EPM. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.); teste *Mann-Whitney* (A); teste *T Welch's* (D e G).

Com o objetivo de avaliar se a nNOS era expressa na artéria coronária humana, uma imunofluorescência foi realizada e a expressão da enzima é mostrada na Figura 2. Esse resultado evidencia a presença de óxido nítrico sintase neuronal na artéria coronária humana.

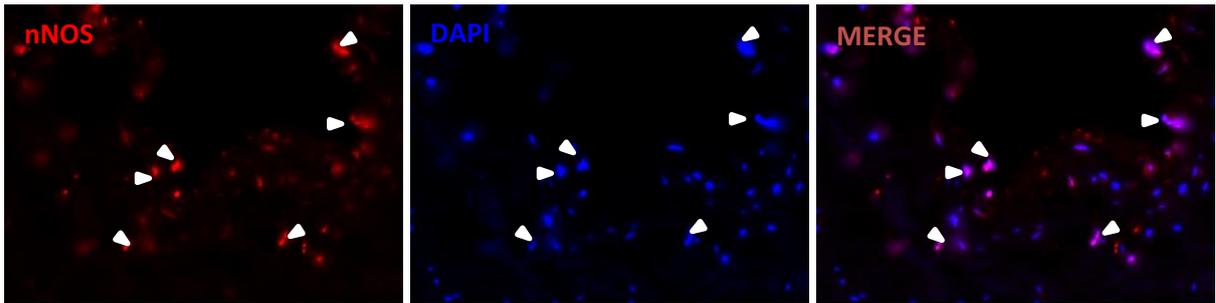
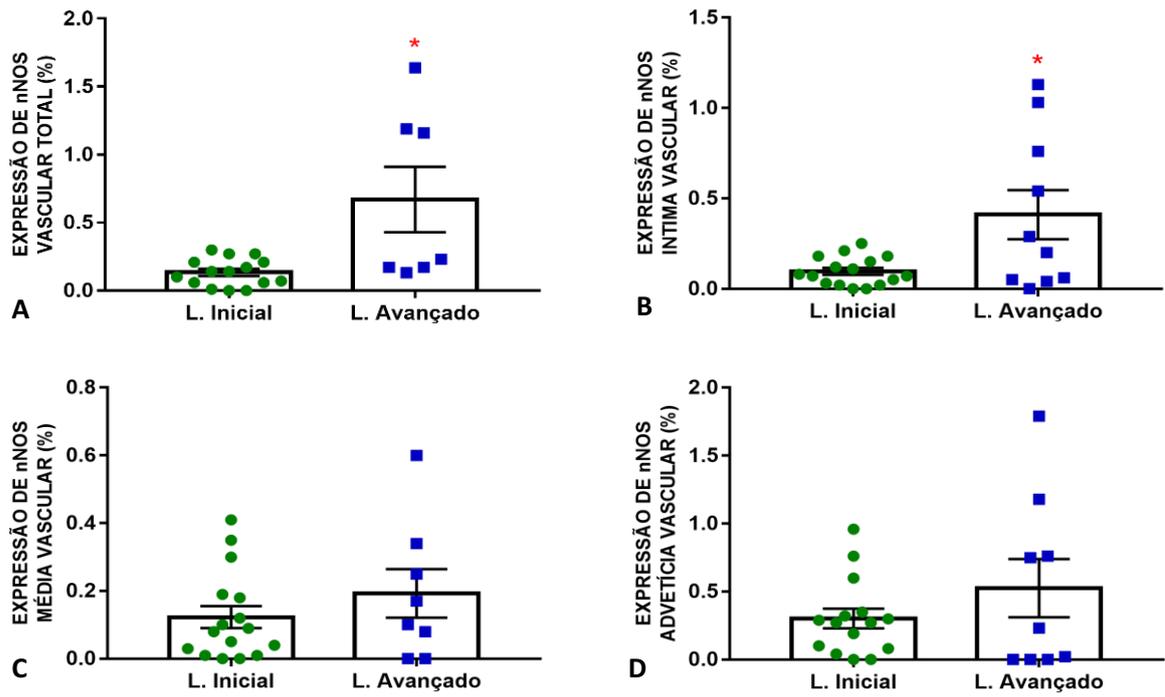
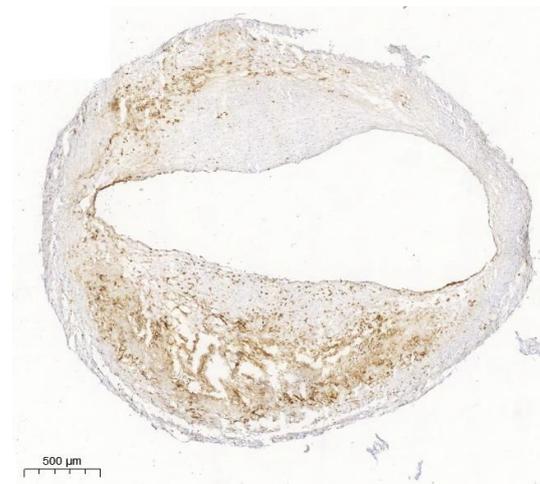


Figura 3. nNOS é expressa na Artéria Coronária Direita Humana. Imagens representativas.



E Lesão Inicial



F Lesão Avançada

Figura 4. Expressão de nNOS na Artéria Coronária Direita Humana por Imuno-histoquímica. Expressão de oxido nítrico sintase neuronal vascular total (A). Expressão de nNOS na camada íntima (B), média (C) e adventícia (D) vascular. Imagens de IHC para marcação de expressão de nNOS em paciente do grupo lesão inicial (E) e lesão avançada (F). * $p < 0,05$; teste *Mann-Whitney* (A e D); teste T *Welch's* (B e C).

Decidimos, então, avaliar se existia diferença na expressão de nNOS entre os grupos L. Inicial e L. Avançada. Observamos que a expressão de nNOS estava maior em pacientes com lesões mais avançadas, em comparação com pacientes que apresentavam lesões iniciais (Figura 3A), assim como também na camada íntima vascular, os pacientes do grupo L. Avançada expressavam mais nNOS do que os pacientes do grupo L. Inicial (Figura 3B).

Avaliamos na sequência a expressão de nNOS na região de placa, onde foi selecionada a região de maior acúmulo de macrófagos e lipídeos, em que apenas as camadas íntima e média vascular foram consideradas para análise de expressão. As marcações foram normalizadas pela área total delimitada como região de placa. É possível observar que a expressão de nNOS na região de placa está maior no grupo L. Avançada, em comparação com o grupo L. Inicial (Figura 4).

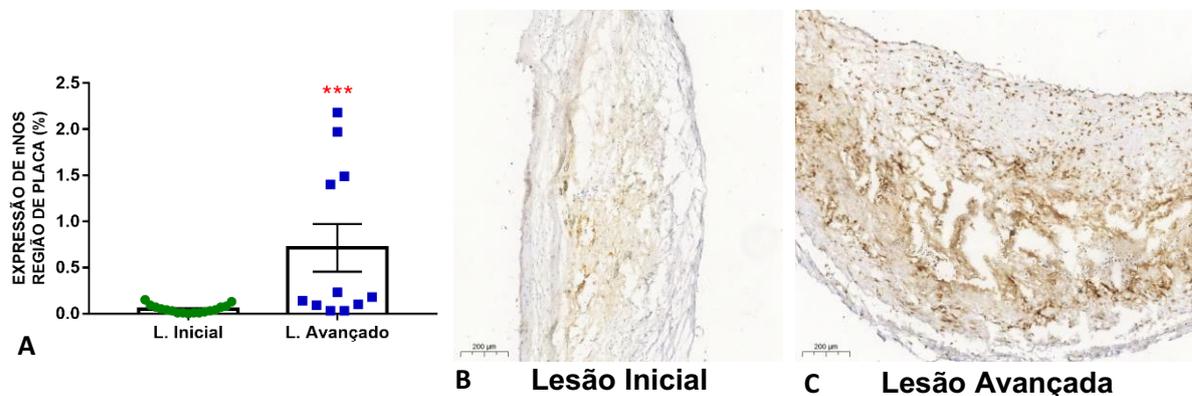


Figura 5. Expressão de nNOS na região de placa. Expressão de oxido nítrico sintase neuronal na região de placa (A). Imagens de IHC para marcação de expressão de nNOS na região de placa em paciente do grupo L. Inicial (B) e L. Avançada (C). *** $p < 0,001$; teste *Mann-Whitney*.

Com o objetivo de avaliar se a nNOS estaria co-localizada com macrófagos na artéria coronária direita humana e, se havia diferença em lesões inicial e avançada, o protocolo de IF foi realizado, onde anticorpos anti- CD68 e anti- nNOS foram utilizados.

Imagens de 5 quadrantes ($0,04\text{mm}^2$) da região de placa (Figura 5) foram capturadas e analisadas no software *Zen 3.2 Blue Edition* da *Carl Zeiss*. A análise consistiu em determinar o número de células (%) que marcaram positivo inicialmente para a sonda fluorescente DAPI (marcador nuclear) e em sequência para os marcadores (anti-CD68 e anti-nNOS).

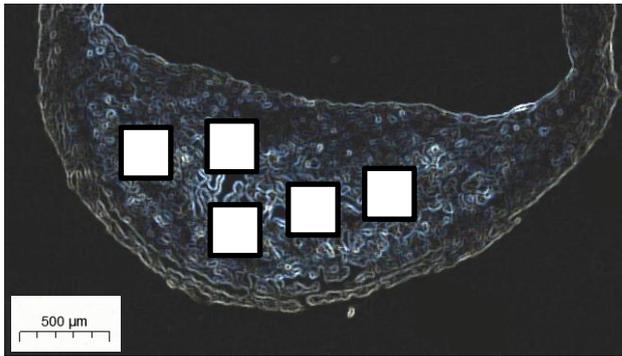


Figura 6. Imagem representativa do método de captura de imagens para análise de co-localização por IF.

Os resultados da Figura 6 mostram a % de macrófagos (CD68) que marcaram positivamente para nNOS. É interessante notar que 80% das células que marcaram positivamente para CD68 na região de placa em pacientes do grupo L. Avançada, marcaram também positivamente para a enzima nNOS (Figura 6B), enquanto que menos de 10% delas marcaram positivamente para nNOS, em pacientes do grupo L. Inicial (Figura 6B).

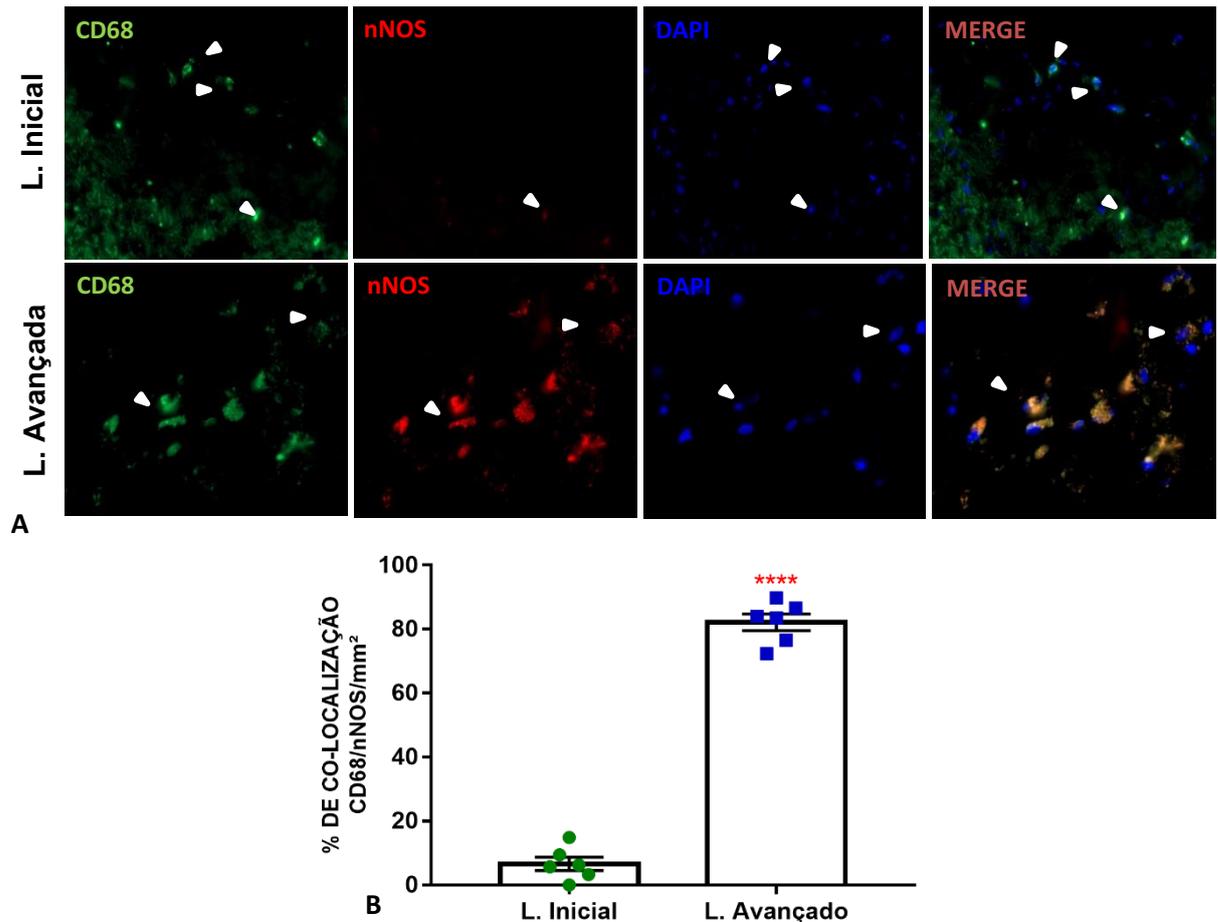


Figura 7. Co-localização de macrófagos (CD68) e nNOS. Imagens representativas da marcação positiva de nNOS com CD68 na artéria coronária direita do grupo L. Inicial e L. Avançada (**A**). Análise quantitativa da % de células CD68 que marcaram positivamente para nNOS (**B**). *** $p < 0,0001$; teste T Welch's.

Com o objetivo de investigar o perfil inflamatório dos macrófagos presentes nas regiões de placa, foi executada uma imunofluorescência, utilizando-se os anticorpos Anti-CD68 e Anti-CD86 (marcador presente em macrófagos M1 – pró-inflamatório). Os resultados mostram que 80% das células que marcaram positivamente para CD68, marcaram positivo para CD86 em pacientes com lesões avançadas (Figura 7B). Porém, no grupo de pacientes com lesões iniciais, apenas 10% das células positivas para CD68 se mostraram também positivas para CD86 (Figura 7B).

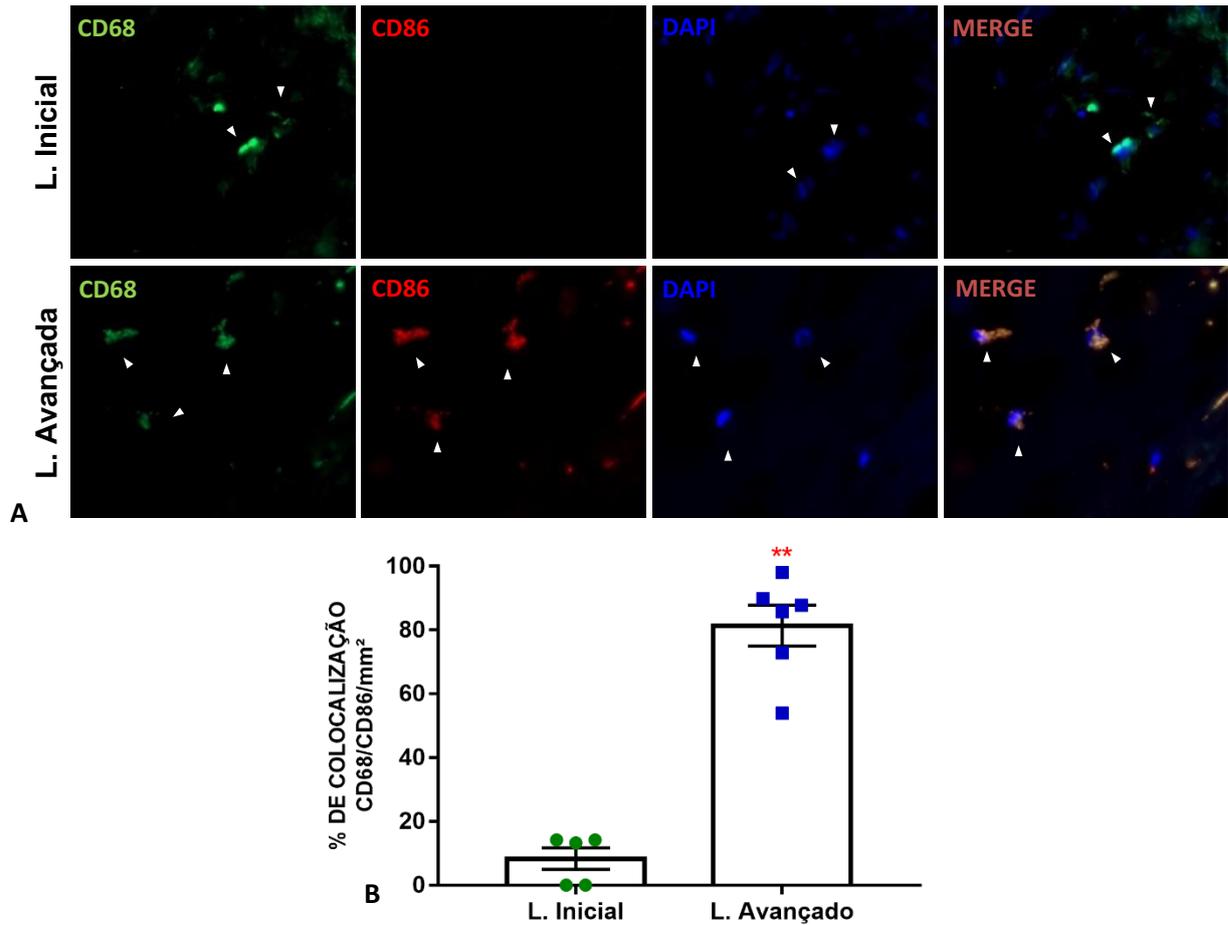


Figura 8. Co-localização de CD68 e CD86. Imagens representativas da marcação positiva de CD86 com CD68 na artéria coronária direita do grupo L. Inicial e L. Avançada (**A**). Análise quantitativa da % de células CD68 que marcaram positivo para CD86 (**B**). ** $p < 0,005$; teste *Mann-Whitney*.

Para investigar se a nNOS co-localiza com marcador pró-inflamatório nas placas ateroscleróticas na artéria coronária humana, uma imunofluorescência foi executada utilizando-se os anticorpos anti-nNOS e anti-iNOS (marcador presente em macrófagos M1 – pró-inflamatório). Os resultados mostram que quase 100% das células que marcaram positivamente para nNOS, também marcaram positivo para iNOS no grupo L. Avançada (Figura 8B). Já o grupo L. Inicial, menos de 3% apresentaram marcação positiva para iNOS, nas células positivas para nNOS (Figura 8B).

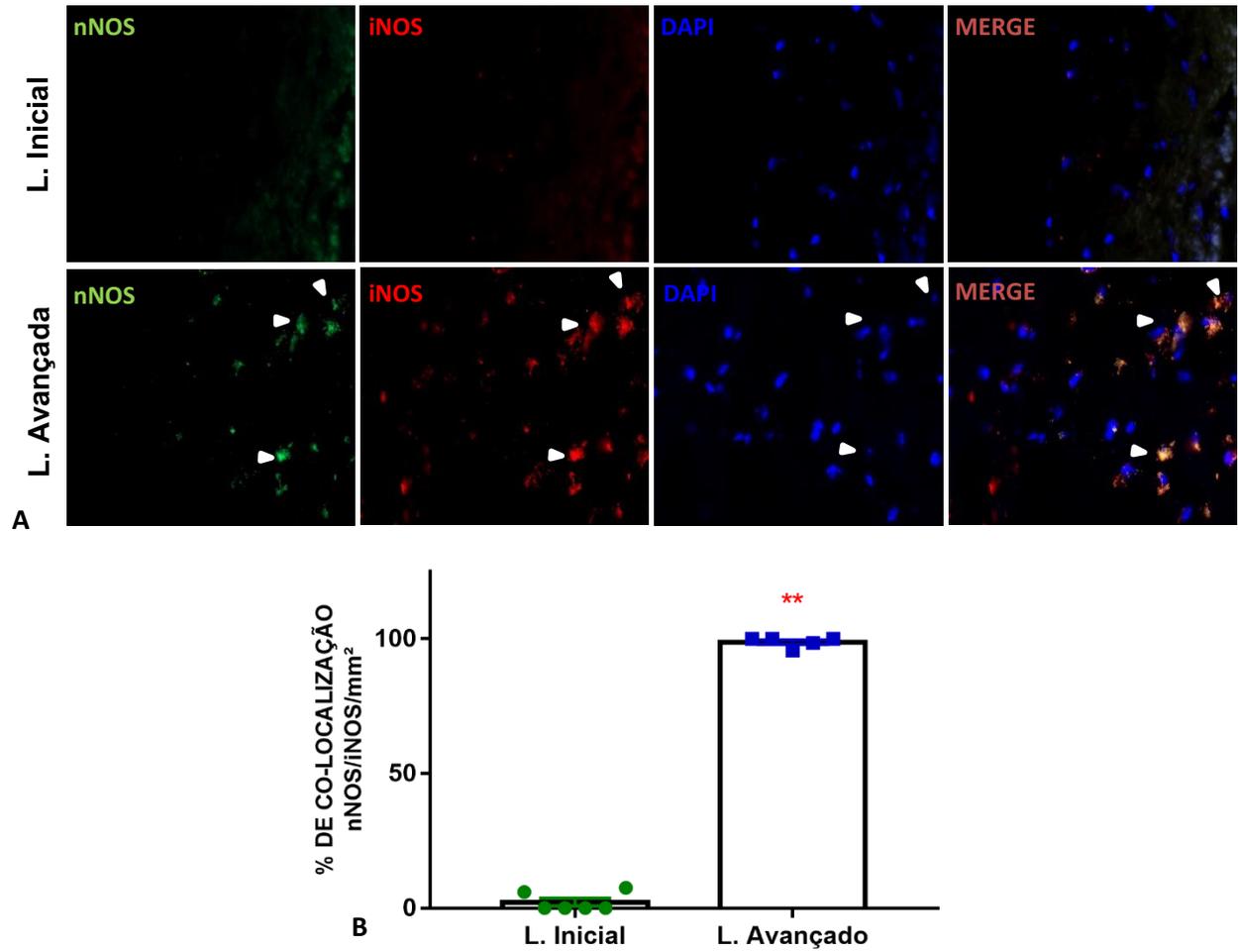


Figura 8. Co-localização de nNOS e iNOS. Imagens representativas da marcação positiva de nNOS com iNOS na artéria coronária direita do grupo L. Inicial e L. Avançada **(A)**. Análise quantitativa da % de células positivas para nNOS que marcaram positivo para iNOS **(B)**. ** $p < 0,005$; teste *Mann-Whitney*.

5. DISCUSSÃO

O principal achado deste trabalho foi a de que a expressão da nNOS aumenta com a progressão da aterosclerose. Esse aumento de expressão parece ocorrer principalmente em macrófagos pró-inflamatórios (M1), o que sugere um papel pró-aterosclerótico da nNOS na doença arterial coronariana humana.

A aterosclerose promove um remodelamento vascular caracterizado por alterações fisiológicas e estruturais na parede arterial (MELO et al., 2007a; RENNA; DE LAS HERAS; MIATELLO, 2013; VAN VARIK et al., 2012). O espessamento da parede arterial é um processo comum durante o desenvolvimento da aterosclerose, onde células das camadas íntima e média proliferam aumentando a área das camadas e, conseqüentemente, a área vascular total (HONG; GU, 2019; VAN VARIK et al., 2012). Corroborando os achados da literatura, as análises morfométricas realizadas nos cortes histológicos da artéria coronária no presente trabalho mostraram que a área da camada íntima e a área vascular total estavam aumentadas no grupo L. Avançada em comparação ao grupo L. Inicial.

A nNOS foi descrita por Seddon et al. (2009), com um possível papel chave na modulação do fluxo e do diâmetro de artérias coronárias humanas. Corroborando com o estudo acima, dados não publicados do nosso grupo mostraram que a inibição farmacológica com um bloqueador seletivo da nNOS (inibidor-1) diminui o relaxamento vascular induzido pela histamina na artéria coronária humana. No presente trabalho mostramos que a nNOS está expressa na artéria coronária humana.

A literatura mostra em um modelo de animal duplo KO para nNOS e ApoE (DKO), que a ausência da nNOS aumenta a lesão aterosclerótica em camundongos, sugerindo assim um papel ateroprotetor para nNOS (KUHLENCORDT et al., 2006). Neste estudo foi possível observar que o aumento da expressão de nNOS na artéria coronária direita humana acompanha a progressão da aterosclerose, uma vez que em lesões mais avançadas ela está mais expressa, em comparação com sua expressão em lesões iniciais. Esse aumento sugere uma participação da nNOS na progressão da aterosclerose, mas não esclarece se esse papel é pró- ou anti-aterogênico. Embora Kuhlencordt et al. (2006) mostraram uma atuação protetora da nNOS na aterosclerose em modelo animal, animais KO para uma isoforma da NOS, apresenta um aumento de expressão compensatório para as outras duas isoformas de NOS que não estão

geneticamente deletadas (TSUTSUI et al., 2010), tornando difícil a interpretação dos dados. Para contornar este problema, Yatera et al. (2010) estudaram o desenvolvimento da placa aterosclerótica em um modelo triplo KO para as 3 isoformas de NOS. Os resultados mostraram que, definitivamente, as NOS têm um papel ateroprotetor altamente relevante, em camundongos, no entanto, este estudo não permite definir o papel de cada isoforma.

Em oposição aos estudos acima, Roy et al. (2019, 2020) mostraram que em macrófagos extraídos de medula óssea de murinos, a nNOS participa ativamente da captação rápida de oxLDL, uma vez que a inibição de nNOS (com TRIM e L-NAME) reduziu a captação de oxLDL. Baseados nestes resultados os autores propuseram um papel pró-aterosclerótico da nNOS. No entanto, nos dois estudos acima, foram utilizados inibidores farmacológicos não seletivos para as isoformas que foram descritas em macrófagos nas placas de aterosclerose: iNOS e nNOS. L-NAME é totalmente não seletiva para as 3 isoformas e TRIM não têm nenhuma seletividade entre iNOS e nNOS com $IC_{50} = 28.2$ e $27.0 \mu M$ para nNOS e iNOS, respectivamente. Esta limitação metodológica põe em cheque a conclusão dos autores de que a inibição de nNOS diminui a captação de oxLDL.

A expressão de nNOS nos macrófagos e sua correlação positiva com a progressão da placa, evidenciam que a nNOS, além de ser uma isoforma constitutiva, pode ser também induzida. Neste sentido, os dados apresentados por Mattila e Thomas (2014), mostram que a nNOS também pode ser regulada pós-transcricionalmente, participando assim da ativação e função de macrófagos. Huang et al. (2012) mostraram que NO produzido por nNOS em macrófagos murinos está envolvida com o processo de fagocitose. No entanto, Schödel et al. (2009) mostraram uma fraca expressão de nNOS em macrófagos de placa aterosclerótica, no camundongo ApoE KO.

Os dados do presente estudo, mostraram uma forte expressão de nNOS em macrófagos na região de placa da artéria coronária humana. A população de macrófagos residentes em lesões ateroscleróticas é heterogênea (CHINETTI-GBAGUIDI; COLIN; STAELS, 2015). Os macrófagos possuem uma alta plasticidade e capacidade de alteração de fenótipo em decorrência do microambiente em que se encontram, baseados no perfil local de citocinas (LEE et al., 2011; PORCHERAY et

al., 2005), onde a composição da placa aterosclerótica e o subtipo de macrófago influenciam a determinação do fenótipo destes macrófagos dentro da placa aterosclerótica (CHINETTI-GBAGUIDI; COLIN; STAELS, 2015).

Macrófagos pró-inflamatórios, de fenótipo M1, são classicamente ativados por estímulos patogênicos (PAMP's) ou por citocinas como IFN γ , TNF, produzem altos níveis de IL-12 e IL-23, e secretam citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1 β . Macrófagos M1 interagem com regiões de lesão removendo patógenos por meio da fagocitose, e sua ativação crônica pode mediar o dano ao tecido induzido por ROS e prejudicar a cicatrização (CHINETTI-GBAGUIDI; COLIN; STAELS, 2015). Macrófagos M2 são caracterizados por uma baixa produção de IL-12 e alta produção de IL-10 e TGF- β e são alternativamente ativados principalmente por IL-4 (CHINETTI-GBAGUIDI; COLIN; STAELS, 2015). São células responsáveis pela regulação do reparo tecidual (MURRAY; WYNN, 2011) e carregam uma resposta anti-inflamatória, com capacidade de promover a eliminação de detritos, angiogênese e remodelamento do tecido (BOUHLEL et al., 2007; CHINETTI-GBAGUIDI; COLIN; STAELS, 2015).

Um dado bastante interessante do presente estudo é que 80% dos macrófagos na L. Avançada expressam nNOS e que menos de 10% dos macrófagos na L. Inicial expressam nNOS. Para entender melhor os fenótipos de macrófagos presentes na região da placa e como eles poderiam estar atuando na artéria coronária, experimentos de co-localização de CD68 e CD86 (marcador de macrófagos M1 - pró-inflamatórios) foram realizados. Os nossos resultados mostraram que 80% dos macrófagos no grupo L. Avançada marcaram positivamente para CD86, um indicador de que os macrófagos residentes na lesão, majoritariamente, expressam um fenótipo pró-inflamatório. Apesar das limitações técnicas do modelo experimental do presente trabalho, é possível inferir um possível papel pró-inflamatório da nNOS expressa nos macrófagos na artéria coronária humana, uma vez que experimentos de IF para co-localização de nNOS e iNOS (outro marcador pró-inflamatório encontrado em macrófagos de fenótipo M1) mostraram que 100% das células que marcaram positivo para nNOS, também marcaram positivamente para iNOS, no grupo L. Avançada. Esses dados reforçam a hipótese de que a nNOS estaria expressa em macrófagos de fenótipo M1, dado que 100% das células positivas para nNOS, também são positivas para iNOS (marcador de macrófagos M1).

Em síntese, os dados apresentados no presente trabalho, mostraram que a expressão da nNOS aumenta com a progressão da placa. Em lesões avançadas, todas as células que marcaram positivo para nNOS eram macrófagos pró-inflamatórios M1, enquanto que em lesões iniciais, menos de 3% das células que marcaram positivo para nNOS, eram macrófagos pró-inflamatórios M1.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram apresentadas evidências que traçam uma nova perspectiva de entendimento do papel da enzima nNOS na progressão da aterosclerose. Em humanos, ao contrário do que foi mostrado em modelos animais, a nNOS parece ter um papel pró-inflamatório, embora sejam necessários mais experimentos para esclarecer essa inferência, podendo contribuir com a progressão da placa, sendo assim, um possível alvo para intervenções farmacológicas. Este estudo ainda coloca em evidência a relevância do estudo da fisiopatologia da aterosclerose em modelos humanos.

7. REFERÊNCIAS

- ALVIM, R. D. O. et al. Rigidez Arterial : Aspectos Fisiopatológicos e Genéticos. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 5, p. 433–441, 2017.
- ANDERSON, T. J. Prognostic Significance of Brachial Flow-Mediated Vasodilation. **Circulation**, v. 115, n. 18, p. 2373–2375, 8 maio 2007.
- ANDRADE, D. O. DE; SANTOS, S. P. DE O.; VILELA-MARTIN, J. F. Inflamação, disfunção endotelial e eventos agudos na hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertensão**, v. 21, n. 3, p. 129–133, 2014.
- BARBALHO, S. M. et al. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: Tríade indissociável? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 319–327, 2015.
- BENTZON, J. F. et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. **Circulation Research**, v. 114, n. 12, p. 1852–1866, 2014.
- BODANESE, L. C. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia - Pocket Book 2009-2014. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, n. 6, p. 728, 2014.
- BOUHLEL, M. A. et al. PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137–143, 2007.
- BUCHWALOW, I. B. et al. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 6, p. 500–508, abr. 2002.
- CAPETTINI, L. S. A. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 6, p. 2503–2511, 2008.
- CAPETTINI, L. S. A.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2–3, p. 260–266, 2010.
- CASTANIA, V. et al. The Presence of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Isoform in the Intervertebral Disk. **Neurotoxicity Research**, v. 31, n. 1, p. 148–161, 2017.

- CASTRO, M. C. et al. Brazil's unified health system: the first 30 years and prospects for the future. **The Lancet**, v. 394, n. 10195, p. 345–356, 2019.
- CENTEMERO, M. P. et al. Doença Arterial Coronária e Diabetes: do Tratamento Farmacológico aos Procedimentos de Revascularização. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 17, n. 3, p. 398–413, 2009.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.
- CHINETTI-GBAGUIDI, G.; COLIN, S.; STAELS, B. Macrophage subsets in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 1, p. 10–17, 2015.
- COSTA, E. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase in vascular physiology and diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. JUN, p. 1–8, 2016.
- COSTA, E. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to the normalization of blood pressure in medicated hypertensive patients. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 80, n. September, p. 98–107, 2018.
- DATASUS. **Painel de Monitoramento da Mortalidade CID-10**. Disponível em: <<http://svs.aids.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/cid10/?s=MSQyMDE5JDlkMSQzNSQ3NiQxJDEkMCQyMDAwJDAkMCQ2JDlkMjAzNzYyJDA=>>. Acesso em: 18 ago. 2020.
- DE PINHO, R. A. et al. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 549–555, 2010.
- ENDLICH, P. W. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide effect in grafts used in human coronary bypass surgery. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 131, n. 10, p. 1015–1026, 2017.
- FLEMING, I. Brain in the brawn: The neuronal nitric oxide synthase as a regulator of myogenic tone. **Circulation Research**, v. 93, n. 7, p. 586–588, 2003.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

GIRIBELA, C. R. G. et al. Endothelial function and dysfunction: pathophysiology and perspectives for use in research and clinical practice. **Rev Bras Hipertens**, v. 18, n. 1, p. 27–32, 2011.

GOTTLIEB, M. G.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 203–207, 2005.

HAGIOKA, S. et al. Effects of 7-nitroindazole and N-nitro-L-arginine methyl ester on changes in cerebral blood flow and nitric oxide production preceding development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats. **Neuroscience Letters**, v. 382, n. 3, p. 206–210, 2005.

HONG, X.; GU, W. Plasticity of vascular resident mesenchymal stromal cells during vascular remodeling. **Vascular Biology**, v. 1, n. 1, p. H67–H73, 2019.

HUANG, Z. et al. Stimulation of unprimed macrophages with immune complexes triggers a low output of nitric oxide by calcium-dependent neuronal nitric-oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4492–4502, 2012.

KOLODGIE, F. D. et al. The thin-cap fibroatheroma: A type of vulnerable plaque the major precursor lesion to acute coronary syndromes. **Current Opinion in Cardiology**, v. 16, n. 5, p. 285–292, 2001.

KOLODGIE, F. D. et al. Intraplaque Hemorrhage and Progression of Coronary Atheroma. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 24, p. 2316–2325, 2003.

KUHLENCORDT, P. J. et al. Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein E knockout mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 7, p. 1539–1544, jul. 2006.

KURAKULA, K. et al. Nuclear Receptors in atherosclerosis: A superfamily with many “Goodfellas”. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 368, n. 1–2, p. 71–84, 2013.

KURIHARA, N. et al. Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. **Hypertension**, v. 32, n. 5, p. 856–861, 1998.

LEE, S. et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair.

Journal of the American Society of Nephrology, v. 22, n. 2, p. 317–326, 2011.

LEGEIN, B. et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 20, p. 3847–3869, 2013.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135–1143, 2002.

MALAKAR, A. K. et al. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 16812–16823, 20 out. 2019.

MARÇAL, D. M. O.; MARTINS-OLIVEIRA, A. Hipertensão e disfunção endotelial: papel do estresse oxidativo. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 23, n. 3–4, p. 8–13, 2011.

MASTOI, Q. et al. Automated Diagnosis of Coronary Artery Disease: A Review and Workflow. **Cardiology Research and Practice**, p. 1–9, 2018.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: Non-canonical expression patterns. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–6, 2014.

MCLAREN, J. E. et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 4, p. 331–347, 2011.

MELO, L. G. et al. Vascular Remodeling in Health and Disease. In: **Cardiovascular Medicine**. London: Springer London, 2007a. v. 42p. 1541–1565.

MELO, S. E. S. F. C. et al. Hipertensão arterial , aterosclerose e inflamação : o endotélio como órgão-alvo. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14, n. 4, p. 234–238, 2007b.

MESSNER, B.; BERNHARD, D. Smoking and cardiovascular disease: Mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 3, p. 509–515, 2014.

MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**,

v. 145, n. 3, p. 341–355, 2011.

MORISHITA, T. et al. Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 14, p. 1994–1996, 2002.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.

NUNES, C. DE S.; CINSA, L. A. PRINCÍPIOS DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DE ROTINA. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 8, n. Unico, p. 31–40, 2016.

OISHI, J. C. et al. Endothelial dysfunction and inflammation precedes elevations in blood pressure induced by a high-fat diet. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 6, p. 558–567, 2018.

OLIVEIRA, G. M. M. DE et al. Artigo Especial - Estatística Cardiovascular – Brasil 2020. **Arq Bras Cardiol.**, v. 115, n. 3, p. 308–439, 2020.

OLIVEIRA, M. DE et al. Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 1, p. 72–78, 2015.

OTSUKA, F. et al. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, v. 6, n. 4, p. 396–408, 2016.

PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, n. 3, p. 481–489, 2005.

QIAN, H. S. et al. Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. **Circulation**, v. 99, n. 23, p. 2979–2982, 1999.

RENNA, N. F.; DE LAS HERAS, N.; MIATELLO, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2013, 2013.

ROCHA, C. P. DA; OLIVEIRA, L. C. DE. IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO EM FAMÍLIA COM PREVALÊNCIA DE DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.

Cadernos da Escola de Saúde, v. 1, n. 7, p. 170–184, 2017.

ROY, A. et al. NOS1-derived nitric oxide facilitates macrophage uptake of low-density lipoprotein. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 7, p. 11593–11603, 2019.

ROY, A. et al. Macrophage neuronal nitric oxide synthase (NOS1) controls the inflammatory response and foam cell formation in atherosclerosis. **International Immunopharmacology**, v. 83, n. December 2019, p. 106382, 2020.

SANTOS, C. DA S.; ISIDORO, L. C. DE R.; CRUZ, G. E. C. P. FATORES DE RISCO PARA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA EM JOVENS: REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA BRASILEIRA. **Revista de Enfermagem do Centro-oeste Mineiro**, v. 2, n. 2, p. 264–278, 2012.

SASTRE, E. et al. Biphasic effect of diabetes on neuronal nitric oxide release in rat mesenteric arteries. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2016.

SCHÖDEL, J. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase splice variants in atherosclerotic plaques of apoE knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 2, p. 383–389, 2009.

SEDDON, M. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo. **Circulation**, v. 117, n. 15, p. 1991–1996, 2008.

SEDDON, M. D. et al. Effects of neuronal nitric oxide synthase on human coronary artery diameter and blood flow in vivo. **Circulation**, v. 119, n. 20, p. 2656–2662, 2009.

SILVEIRA, E. L. et al. Prevalência e distribuição de fatores de risco cardiovascular em portadores de doença arterial coronariana no Norte do Brasil. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 20, n. 3, p. 167–173, 2018.

SOUSA, J.; RIBEIRO, J. Atherosclerosis, its Causes and the Importance of Adiponectin. **Revista de saúde e desenvolvimento humano**, v. 7, n. Ldl, p. 7, 2019.

STORCH, A. S. et al. Métodos de Investigação da Função Endotelial : Descrição e suas Aplicações. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262–273, 2017.

TSUTSUI, M. Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 11, n. 2, p. 41–48, 2004.

TSUTSUI, M. et al. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: Novel insight from mice lacking all NO synthases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 499–508, 2010.

VAN VARIK, B. J. et al. Mechanisms of arterial remodeling: Lessons from genetic diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. DEC, p. 1–10, 2012.

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P. R. B. Expressão das Óxido Nítrico Sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 74, n. 4, p. 365–379, 2000.

VIRMANI, R. et al. Lessons From Sudden Coronary Death. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 5, p. 1262–1275, 2000.

WANG, X.-F. et al. Roles of Nitric Oxide Signaling Pathway in Atherosclerosis. **Atherosclerosis: Open Access**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2018.

WHO, W. H. O. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>.

WILCOX, J. N. et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 11, p. 2479–2488, 1997.

YATERA, Y. et al. Severe dyslipidaemia, atherosclerosis, and sudden cardiac death in mice lacking all NO synthases fed a high-fat diet. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 4, p. 675–682, 2010.

YUGAR-TOLEDO, J. C. et al. Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 22, n. 3, p. 84–92, 2015.

8. ANEXO I:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa tem o objetivo de estudar a presença e participação de uma enzima chamada óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) presente nas células que formam a parede dos vasos sanguíneos. Os resultados obtidos nos permitirão dar uma noção de que maneira podemos interferir farmacologicamente para auxiliar preventivamente na doença arterial coronariana (DAC). Estes conhecimentos serão de suma importância para realização de intervenções farmacológicas, para reduzir os riscos cardiovasculares que colaboram para agravamento da DAC e consequente necessidade de transplante cardíaco. Para coletar estes vasos precisamos utilizar as sobras da cirurgia que você irá se submeter. Deixamos claro que o material que utilizaremos é de descarte, ou seja, vasos sanguíneos que serão retirados do coração que foi removido pelo cirurgião. Desta forma você irá contribuir para este estudo concordando em doar este material para que a pesquisa seja feita.

II SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

III BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará inúmeros benefícios importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O conhecimento do funcionamento dos vasos retirados de material de descarte da cirurgia poderá ajudar no desenvolvimento de medicamentos utilizados no combate a hipertensão arterial, infarto ou doenças vasculares cardíacas. Os estudos realizados com este material permitirão que novas metodologias de estudo sejam desenvolvidas, além de novas intervenções clínicas que permitirão ao médico atuar de forma mais eficaz, desde o início precoce do tratamento adequado e o acompanhamento da evolução do paciente.

IV RISCOS

Uma vez que serão utilizados somente material de descarte, ou seja, as sobras do coração removido nas cirurgias, a coleta deste material não oferecerá riscos ao paciente.

V RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está previsto qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos através de incentivos a pesquisas provenientes de instituições de fomento.

VI DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. Nesta pesquisa utilizaremos somente material de descarte, ou seja, as sobras do intestino coração removido na cirurgia, não sendo realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

Você assinará duas vias iguais deste termo de consentimento: uma via ficará com você e a outra com a pesquisadora responsável.

VII TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, voluntariamente, concordo com os propósitos de coletar uma amostra de descarte do material biológico proveniente da minha cirurgia de transplante cardíaco, para que seja utilizado para fins de pesquisa científica. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo a minha saúde. Declaro também que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para participação neste estudo.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário:

Virginia Soares Lemos
(Pesquisadora responsável)

Telefones e endereço para contato:

William Bruno Alves da Silva
Celular: 97302-0980
E-mail: williambrass09@ufmg.br

Bruno Almeida de Rezende
Tel: 3383-8409
Celular: 99801-9692
E-mail: brunorezende01@yahoo.com.br

Prof^a Virgínia Soares Lemos
Tel.: 3409-2950,
Celular: 8782-6096
E-mail: vslemos@icb.ufmg.br

COEP (Comitê de Ética em Pesquisa): Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG- Brasil 31270-901 Telefone: 3409-4592.