Bianca Kiers

**Caracterização de placa ateroscleróticas em relação à
morfologia, inflamação e proteínas nitradas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kiers, Bianca

Caracterização de placas ateroscleróticas em relação à morfologia, inflamação e proteínas nitradas / Bianca Kiers. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Infarto do miocárdio 2.Doença da artéria coronariana
3.Aterosclerose 4.Estresse oxidativo 5.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-267/16

*Dedico este Mestrado aos meus pais, Roelof e Mini,
pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por ter tido esta oportunidade. E este trabalho não teria sido possível sem a colaboração e boa vontade daqueles a quem agora me refiro. À todos os meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Alexandre da Costa Pereira, orientador e idealizador deste estudo pela competência, paciência e dedicação.

Ao Dr. Paulo Sampaio Gutierrez pela disponibilidade e prestabilidade com que me ajudou. À toda a equipe do Laboratório de Anatomia Patológica – InCor pela paciência e pelo excelente auxílio técnico.

À minha família que amo muito Roelof, Mini, Hester, Luciano, João Cristiano, Mary, Renata, Ricardo, Enzo, Paola, Raul, Yasmim, Micaela, Olívia e Victória pelo incentivo, pela torcida, pelo carinho e pelo simples fato de estarem ao meu lado sempre.

Às minhas grandes amigas que eu conheci no Paraná, Kallyandra Padilha e Hadassa Campos Santos. E que fizeram com que eu conseguisse concluir essa jornada em São Paulo. Passamos por muitos momentos juntas e amadurecemos neste período. Aprendi muito com vocês.

E principalmente à todos os meus amigos que me ajudaram na realização deste estudo e ajudaram a tornar o dia-a-dia no laboratório mais leve, novamente Kallyandra e Hadassa, Gabriela Venturini, Pamella Malagrino, Tamiris Gois, Luz Marina Gómez Gómez, Juliana Alvim, Thais Carrascal, Julliana Carvalho, Márcio Figueira Chaves, Patrícia Yogi e Ana Paula Carneiro. Agradeço pela dedicação, carinho, preocupação, pelo auxílio na realização dos experimentos, na discussão dos resultados e pelo auxílio na escrita desta dissertação. E à tantos outros amigos que fiz em São Paulo, por estarem ao meu lado em momentos alegres, mas também nos momentos difíceis.

Esse trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com
Listo of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Doenças Cardiovasculares.....	2
1.2	Aterosclerose.....	2
1.3	Inflamação na aterosclerose.....	5
1.4	Proteínas nitradas na aterosclerose.....	7
1.5	Características histopatológicas das placas ateroscleróticas	9
1.5.1	<i>Placa não vulnerável e vulnerável.....</i>	<i>9</i>
1.5.2	<i>Ruptura e erosão de placa.....</i>	<i>10</i>
1.6	Detecção do paciente vulnerável.....	12
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.1.1	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>16</i>
3	MÉTODOS.....	17
3.1	Amostragem.....	18
3.2	Segmentos de Artérias Coronárias	19
3.3	Preparo das amostras	20
3.4	Histoquímica.....	21
3.4.1	<i>Coloração com Hematoxilina e Eosina:.....</i>	<i>21</i>
3.4.2	<i>Coloração com Verhoeff:.....</i>	<i>21</i>
3.4.3	<i>- Coloração com Picrosírius.....</i>	<i>22</i>
3.5	Morfometria.....	22
3.6	Imuno-histoquímica.....	22
3.7	Caracterização e Quantificação	24
3.8	Análises Estatísticas.....	25
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Caracterização dos indivíduos com placa aterosclerótica.....	32
4.2	Caracterização morfométrica dos segmentos coronarianos.....	32
4.3	Caracterização dos parâmetros bioquímicos e inflamatórios dos segmentos coronarianos.....	33
4.4	Correlações de Spearman.....	36
4.4.1	<i>Correlações entre os parâmetros morfométricos.....</i>	<i>37</i>
4.4.2	<i>Correlações entre os parâmetros morfométricos, inflamatórios e bioquímicos.....</i>	<i>40</i>
4.5	Comparação Grupo I e II.....	44
4.6	Comparação dentro do Grupo III (com presença de trombo).....	45
4.7	Comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II.....	46
4.7.1	<i>Análise comparativa entre segmentos dos indivíduos que apresentaram ruptura como causa do trombo.....</i>	<i>47</i>
4.7.2	<i>Análise comparativa entre segmentos dos indivíduos que apresentaram erosão como causa do trombo.....</i>	<i>51</i>
4.8	Análise comparativo de placas não vulneráveis e vulneráveis.....	58
5	DISCUSSÃO	63

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
6.1	Considerações finais.....	72
7	REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE 1		1

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
+	Adição
*	Multiplicação
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
mm ²	Milímetros quadrados

LISTA DE ABREVIações

AHA	<i>American Heart Association</i>
angio-TC	Angiotomografia computadorizada das artérias coronárias
AP	Área da placa
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD3	do inglês <i>Cluster of differentiation 3</i>
CD68	do inglês <i>Cluster of differentiation 68</i>
CL	Core lipídico
COX	Enzima ciclooxygenase
DAB	Diaminobenzidina
DAC	Doença arterial coronária
DACC	Doença arterial coronária crônica
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DCV	Doença cardiovascular
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
HRP	do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IF δ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina beta 1
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6

InCor	Instituto do Coração
LDL	do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
LEE	Lâmina elástica externa
LEI	Lâmina elástica interna
LU	Lúmen
NADPH	do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Proteína C reativa
RMC	Ressonância magnética computadorizada
TEP	Tomografia por emissão de pósitrons
Th1	T <i>helper</i> 1
TNF	do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>
Tyr	Tirosina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito aleatório do indivíduo para os parâmetros morfológicos, bioquímicos e inflamatórios.....	27
Tabela 2. Parâmetros clínicos da população em estudo.	32
Tabela 3. Dados morfométricos dos segmentos coronarianos de todos os indivíduos.....	34
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos e inflamatórios dos segmentos coronarianos de todos os indivíduos.	35
Tabela 5. Resultados da análises de correlações entre os aspectos morfológicos, bioquímicos e inflamatórios	36
Tabela 6. Estudo comparativo do comportamento das medidas entre os Grupos I e II.....	45
Tabela 7. Estudo comparativo do comportamento das medidas entre os subgrupos ruptura e erosão.....	46
Tabela 8. Análise dos segmentos dos indivíduos que apresentaram ruptura como causa do trombo.	48
Tabela 9. Análise comparativa entre segmentos dos indivíduos que apresentaram erosão como causa do trombo.....	52
Tabela 10. Análise comparativa entre placas vulneráveis e não vulneráveis.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura histológica da artéria coronária humana sem placa em corte transversal (objetiva 2,5x). Seta 1: endotélio; seta 2: camada média; seta 3: camada adventícia (Acervo Laboratório de Anatomia Patológica –InCor).	3
Figura 2. Estrutura histopatológica da artéria coronária humana com placa aterosclerótica e trombo em corte transversal (objetiva 1x). Seta 1: endotélio; Seta 2: camada média; Seta 3: camada adventícia; Seta 4: core lipídico; Seta 5: trombo intraluminal (Acervo Laboratório de Anatomia Patológica –InCor).	4
Figura 3. A artéria normal e as alterações celulares que ocorrem durante a progressão da aterosclerose, até a formação do trombo (Libby et al. 2011).	5
Figura 4. Características de placa não vulnerável, vulnerável e de placa com trombo luminal. (Adaptado JASHARI, 2012).	10
Figura 5. Artérias coronárias humanas com ruptura de placa (A) e erosão de placa (B) em corte transversal (objetiva 1x) (Acervo Laboratório de Anatomia Patológica – InCor).	12
Figura 6. Modelo do esquema de dissecação de artérias coronárias com as porcentagens de obstrução por placas de aterosclerose. (CD= coronária direita; DP= descendente posterior; VPD=ventricular posterior direita; MD= marginal direita; VAD= ventricular anterior direita; CE= coronária esquerda; CX=circunflexa; VPE= ventricular posterior esquerda; ME= marginal esquerda; VAE= ventricular anterior esquerda; D= diagonalis; DA= descendente anterior; D1= 1º diagonal; D2= 2º diagonal e D3= 3º diagonal).....	19
Figura 7. Correlação de Spearman entre as variáveis morfométricas: porcentagem de área ocupada pelo core lipídico na placa, área da LEE, área da placa. r= coeficiente de correlação de Spearman e p= significância.	38
Figura 8. Correlação de Spearman entre as variáveis morfométricas: área ocupada pelo core lipídico na placa, espessura da capa fibrosa. r= coeficiente de correlação de Spearman e p= significância.	39
Figura 9. Correlação de Spearman entre as variáveis inflamatórias: número de linfócitos na camada íntima e na camada adventícia r= coeficiente de correlação de Spearman e p= significância.	41
Figura 10. Correlação de Spearman entre as variáveis inflamatórias: número de macrófagos na camada íntima e na camada adventícia r= coeficiente de correlação de Spearman e p= significância.	42
Figura 11. Correlação de Spearman entre a área da placa e número de linfócitos). r= coeficiente de correlação de Spearman e p= significância.	43
Figura 12. Correlação de Spearman entre e área da placa, área do vaso e número número de macrófagos. r= coeficiente de correlação de Spearman e p= significância.	43
Figura 13. Figura. Correlação de Spearman entre e a nitração na camada média e a nitração na camada íntima. r= coeficiente de correlação de Spearman e p= significância.....	43

Figura 14. Figura demonstrando a marcação de linfócitos na camada íntima (A), na camada adventícia (B) e macrófagos na camada íntima (C) e camada adventícia (D).	49
Figura 15. Figura demonstrando marcação positiva para proteínas nitradas em um segmento do Grupo III e com ruptura de placa (acima) e em um segmento do Grupo II. (objetiva de 20x).	50
Figura 16. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis área do lúmen e área da placa, nos subgrupos erosão e ruptura.	53
Figura 17. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis área do vaso (área da LEE) e colágeno, nos subgrupos erosão e ruptura.	54
Figura 18. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis linfócitos na camada adventícia e na camada íntima, nos subgrupos erosão e ruptura.	55
Figura 19. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis macrófagos na camada adventícia e na camada íntima, nos subgrupos erosão e ruptura.	56
Figura 20. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis nitração proteica na camada média e na camada íntima, nos subgrupos erosão e ruptura.	57
Figura 21. Box plot: comparação das placas não vulneráveis, placas com trombo e placas vulneráveis em relação às variáveis área do lúmen, área da placa, área do vaso (área da LEE) e porcentagem da área ocupada pelo <i>core</i> lipídico na placa.	60
Figura 22. Box plot: comparação das placas não vulneráveis, placas com trombo e placas vulneráveis em relação às variáveis área do <i>core</i> , porcentagem de colágeno na camada íntima, linfócitos na camada adventícia e na camada íntima.	61
Figura 23. Box plot: comparação das placas não vulneráveis, placas com trombo e placas vulneráveis em relação às variáveis macrófagos na camada adventícia e na camada íntima e nitração proteica na camada média e íntima.	62

RESUMO

Kiers B. *Caracterização de placas ateroscleróticas em relação à morfologia, inflamação e proteínas nitradas* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Placas ateroscleróticas podem ser estáveis ou vulneráveis à formação de trombo, e os dois processos mais comumente envolvidos a este grave desfecho de trombose luminal são ruptura e erosão de placa. O conhecimento deste estado de vulnerabilidade pode ser importante na prática clínica. A parede arterial é um importante local de modificação proteica em resposta ao estresse. Proteínas em placas ateroscleróticas podem ser nitradas e seu acúmulo durante a aterogênese pode estar relacionado à captação de lipídios. Entre as consequências da nitração proteica, um importante marcador de estresse oxidativo, estão alterações na estrutura, atividade e susceptibilidade a proteólise e estas mudanças podem estar relacionadas a estabilidade da placa. Assim, este estudo teve como objetivo a quantificação e a verificação da distribuição tecidual de proteínas nitradas em segmentos de diferentes graus de vulnerabilidade de um mesmo indivíduo, e a correlação destes marcadores com o perfil histopatológico da placa. Segmentos de diferentes ramos coronários de 30 indivíduos, após infarto agudo do miocárdio fatal, foram estudados. Cinco tipos de placas ateroscleróticas de cada indivíduo foram selecionados, considerando o percentual de estenose e a presença ou não de trombo. Proteínas nitradas totais, linfócitos e macrófagos foram avaliados pela técnica de imuno-histoquímica. Os segmentos apresentando ruptura de placa demonstraram maior número de linfócitos e macrófagos nas camadas adventícia e íntima quando comparados a outros segmentos. A nitração estava relacionada com marcadores histológicos de vulnerabilidade da placa. Além disso, proteínas nitradas estavam diferentemente distribuídas nas camadas do vaso e altos níveis destas proteínas não foram implicados em todos os casos de formação de trombo, já que foi detectado em maior quantidade somente em rupturas de placa e não em casos de erosão de placa. Estes resultados mostram que estresse oxidativo é um importante atributo na diferenciação destes estados patológicos.

Descritores: infarto do miocárdio, doença da artéria coronariana, aterosclerose, estresse oxidativo, imuno-histoquímica

ABSTRACT

Kiers B. *Characterization of atherosclerotic plaques with regard to morphology, inflammation and nitrated proteins* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Atherosclerotic plaques may be stable or vulnerable to thrombus formation. The two processes most commonly involved in this serious outcome of luminal thrombosis are rupture and erosion of the plaque. The knowledge of this vulnerable state of the plaque could be important in clinical practice. The artery wall is an important site of protein modification in response to stress. Proteins in atherosclerotic plaques may be nitrated, and its accumulation during atherogenesis may be related to lipid uptake. The consequences of protein nitration, an important marker of oxidative stress, are changes in its structure, activity and susceptibility to proteolysis and these changes may be related to plaque stability. Thus, this study aimed to quantify and investigate tissue distribution of nitrated proteins in coronary segments of different degrees of vulnerability from the same individual, and correlate these markers with plaque histopathological profile. Segments of coronary branches from 30 patients (after fatal acute myocardial infarct) were studied. Five different types of coronary atherosclerosis plaques from each subject were selected, considering the stenosis percentage and the presence or not of thrombus. Total nitrated protein, lymphocytes and macrophages were assessed by immunohistochemistry. The group presenting disrupted plaque exhibits higher macrophages and lymphocytes content in adventitia and intima layer when compared with other segments. Nitration was related with histological markers of plaque vulnerability. Furthermore, protein nitration was differently distributed in arteries layers and high levels of nitrated proteins were not implicated in all cases of thrombus formation, since it was detected in higher amounts only in ruptured and not in eroded plaques. These findings demonstrate that oxidative stress is an important characteristic in the differentiation of these pathophysiologic states.

Descriptors: myocardial infarction, coronary artery disease, atherosclerosis, immunohistochemistry, oxidative stress

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

A doença cardiovascular (DCV) está entre as principais de morbimortalidade em diferentes países (MURAY, LOPEZ, 1996; GO et al, 2013).

No Brasil, dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) mostraram que as doenças circulatórias foram as principais causas de óbito, totalizando 340.284 em 2014, sendo que a prevalência foi observada na região Sudeste (159.962). Doenças circulatórias foram responsáveis pelo equivalente a 31,8% das mortes, e 87.234 dos óbitos foram decorrentes do infarto agudo do miocárdio (IAM). Além disso, 78,76% dos indivíduos com morte decorrente de doenças circulatórias apresentaram idade maior ou igual que 60 anos no momento do óbito (DATASUS, 2014).

Segundo levantamento da *American Heart Association* (AHA), a taxa de óbitos devido a doenças cardiovasculares está em declínio, entretanto permanece alta (GO et al, 2013)

A redução dos óbitos pode ser explicada por aumentos nas intervenções cirúrgicas, tratamento e também melhor controle dos fatores de risco tradicionais, uso de medicamentos, além de mudanças no estilo de vida.

Dentre as doenças cardiovasculares, o envolvimento dos vasos sanguíneos arteriais pela aterosclerose é a mais comum.

1.2 Aterosclerose

Aterosclerose caracteriza-se pela formação de placas fibrolipídicas na camada íntima, as quais resultam no acúmulo de células inflamatórias, lipoproteínas e tecido fibroso e geralmente apresentam um *core* rico em lipídios. Acomete mais comumente a aorta, artérias cerebrais e artérias coronárias (Lusis 2000). É um processo complexo com várias formas de

apresentação clínica, não sendo considerada apenas uma patologia degenerativa resultante de envelhecimento, mas sim representando fundamentalmente um processo inflamatório crônico com risco de agudização por trombose (Ramsey et al. 2010).

A doença aterosclerótica altera e compromete a anatomia e fisiologia da artéria afetada. As figuras 1 e 2 mostram estruturas de segmentos de artérias coronárias humanas sem placa e acometida pela doença.

Figura 1. Estrutura histológica da artéria coronária humana sem placa em corte transversal (objetiva 2,5x). Seta 1: endotélio; seta 2: camada média; seta 3: camada adventícia (Acervo Laboratório de Anatomia Patológica –InCor).

Figura 2. Estrutura histopatológica da artéria coronária humana com placa aterosclerótica e trombo em corte transversal (objetiva 1x). Seta 1: endotélio; Seta 2: camada média; Seta 3: camada adventícia; Seta 4: core lipídico; Seta 5: trombo intraluminal (Acervo Laboratório de Anatomia Patológica –InCor).

Alterações na permeabilidade do endotélio são reconhecidas como eventos precoces na aterogênese (LUSIS, 2000). Este processo é acompanhado também pelo enrijecimento da matriz extracelular. O aumento na permeabilidade é resultante da contração celular maximizada, que rompe mecanicamente as junções intercelulares (Huynh et al. 2011). Como consequência, ocorre a penetração de LDL (do inglês *low density lipoprotein*), que sofre oxidação, linfócitos T e monócitos na região subendotelial, resultando na formação de células espumosas. As células espumosas são derivadas primariamente dos macrófagos, e, ocasionalmente das células musculares lisas que captam lipídios e debris celulares. Microscopicamente, a íntima é substituída pela capa fibrosa caracterizada pelo rompimento da estrutura normal da matriz intimal (Virmani et al. 2000). O core lipídico, formado pelo acúmulo de células espumosas, pode expandir (Sary et al. 1995) levando a

uma lesão estrutural do endotélio. Isso resulta na ativação e agregação das plaquetas e formação de trombo, que impede o suprimento sanguíneo normal ao miocárdio (Ross 1993; Buchanan et al. 2003). Além disso, há casos em que a barreira macromolecular endotelial não está intacta, ou seja, em que uma erosão ocorreu, levando ao desfecho igualmente grave, o trombo.

Figura 3. A artéria normal e as alterações celulares que ocorrem durante a progressão da aterosclerose, até a formação do trombo (Libby et al. 2011).

1.3 Inflamação na aterosclerose

No processo aterosclerótico está implicado o acúmulo de lipídios dentro da parede arterial, contudo, o processo aterosclerótico não é somente isso, pois corresponde a interação complexa entre fatores de risco, células da

parede arterial e trocas moleculares. Neste cenário emergiu o papel da inflamação em todos os estágios da aterogênese (Libby and Theroux 2005).

O processo aterogênico pode ser desencadeado por alterações pró-inflamatórias, mediadas pelo fluxo, nas células endoteliais (Libby et al. 2011). Pela sua posição anatômica estratégica entre as células musculares lisas e o fluxo sanguíneo, as células endoteliais constituem mediadores da doença vascular. O endotélio existente em locais predispostos à promoção da aterosclerose parece ser funcionalmente diferente dos demais locais (Ross 1993) apresentando menor capacidade de proteção podendo estar envolvido ativamente no desenvolvimento da aterosclerose (Yamamoto et al. 2011). Células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos, são recrutadas para a camada íntima através do lúmen arterial (Falk 2006), no entanto, também atingem a íntima pelo lado da camada adventícia (Maiellaro and Taylor 2007). Espessamento intimal está envolvido no crescimento de neo-vasos, através dos quais as células inflamatórias da camada adventícia alcançam a íntima (Sacks and Fain 2007).

Células de lesões ateroscleróticas exibem características de inflamação contínua, com linfócitos e macrófagos produzindo uma série de mediadores, como citocinas pró-inflamatórias, fatores co-estimuladores para a ativação imune e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (Hansson and Hermansson 2011). Muitos macrófagos internalizam colesterol através de seus receptores e alguns produzem citocinas anti-inflamatórias. Além disso, alguns linfócitos exibem características anti-inflamatórias. Este delicado equilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios resulta em uma inflamação crônica com progressão lenta (Libby 2014). Receptores envolvidos no controle de patógenos microbianos também medeiam a internalização de lipoproteínas modificadas (Hansson and Hermansson 2011; Libby et al. 2013), e estes receptores não são suprimidos, devido ao aumento da concentração intracelular de colesterol e, podem desta forma, mediar captação contínua de lipoproteínas levando a uma sobrecarga da célula com lipídios. Em certo ponto, o colesterol intracelular precipita em micro cristais, resultando na secreção da interleucina 1 β (IL-1 β). Quando liberada na camada íntima, a IL-1 β induz a

produção de um conjunto de moléculas pró-inflamatórias, entre elas pode-se destacar a interleucina 6 (IL-6) (Loppnow and Libby 1990).

A apresentação pelas células dendríticas de fragmentos de LDL às células T nos nodos linfáticos que drenam a lesão aterosclerótica representa a resposta imune inata em ação. Clones de células T que reconhecem peptídeos da principal apolipoproteína do LDL (apoproteína B), tendem a se diferenciar em células efectoras Th1 (do inglês *T helper 1*), pró-inflamatórias, sob a influência de mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 12 (IL-12), encontrada em placas (Hermansson et al. 2010). Células T efectoras entram em locais como a placa aterosclerótica onde células endoteliais expressam moléculas de adesão leucocitárias. Estas células podem sofrer reativação por fragmentos de LDL, que faz com que as mesmas produzam grandes quantidades de TNF (do inglês *tumor necrosis factor*) e outras citocinas pró-inflamatórias, como o interferon-gama (IF γ) (Fields et al. 1999). Este último estimula os macrófagos e afeta profundamente o endotélio vascular e as células musculares lisas, causando a expressão de moléculas de adesão leucocitárias, modulando as propriedades fibrinolíticas e reduzindo a proliferação (Hansson et al. 1989).

É evidente que a ativação da placa, que a deixa sujeita à ruptura, repercute na gênese de eventos cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio. Por outro lado, a placa não vulnerável também apresenta atividade inflamatória. Assim, é importante esclarecer a contribuição dessas moléculas como marcadores de risco e como parte da cadeia que leva à progressão da doença.

Entre os intervenientes no risco cardiovascular que possuem um componente pró-inflamatório, está o stress oxidativo (Osiecki 2004).

1.4 Proteínas nitradas na aterosclerose

A formação de oxidantes é inevitável, mas o acúmulo intracelular de espécies reativas, ou seja, quando a sua produção se sobrepõe às defesas antioxidantes, tem sido envolvido em muitos processos patológicos, entre eles a aterosclerose (Megnien et al. 1998).

As espécies reativas podem ser divididas em espécies radicalares e não radicalares. Uma vez que os radicais livres apresentam um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, estas moléculas reagem facilmente com estruturas biológicas, particularmente lipídios das membranas, DNA e aminoácidos (Steinberg and Witztum 2010). Entre as espécies de radicais livres produzidas no vaso, estão incluídos o óxido nítrico (NO) e o ânion superóxido (O_2^-). NO é liberado em pequenas quantidades para regular o fluxo sanguíneo local e inibe interações entre plaquetas, leucócitos e a parede do vaso (Moncada and Higgs 1991). Em casos de doença, durante episódios inflamatórios, a óxido nítrico sintase (NOS) é amplamente expressa através da parede do vaso, resultando em aumento na produção de NO (Bogle et al. 1996). Potenciais sistemas geradores de O_2^- incluem as NADH/ NADPH oxidases (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), a NO sintase na ausência de L-arginina e a xantina oxidase (Xia et al. 1996). NO e O_2^- reagem rapidamente (HUIE, 1993) formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante. Este reage com proteínas resultando na nitração de resíduos de tirosina formando 3-nitrotirosina (OURY, 1995), um produto final estável (Pacher et al. 2007). 3-Nitrotirosina é um marcador altamente específico de danos em proteínas causados por espécies reativas de nitrogênio (Leeuwenburgh et al. 1997) .

Estudos de imuno-histoquímica em tecidos ateroscleróticos indicaram a presença de nitrotirosina (Beckman and Koppenol 1996). De fato, o interior de uma lesão aterosclerótica humana possui um ambiente pró-oxidante (SMITH, 1992). Linfócitos e macrófagos são fontes de EROs, células endoteliais e musculares lisas também são capazes de produzir ânion superóxido, assim como NO (MONCADA, 1993).

Beckman *et al* detectaram pela primeira vez a formação de nitrotirosina nas estrias gordurosas iniciais da região subintimal e em células espumosas de

lesões de artérias coronárias em 1994. Os autores concluíram que a presença de nitrotirosina proteica indica que oxidantes derivados do NO são gerados na aterosclerose humana e podem estar envolvidos na sua patogênese.

Entre os alvos de nitração, está a enzima ciclooxigenase (COX) que inicia o metabolismo do ácido araquidônico na biossíntese de prostaglandinas, porém, quando um resíduo específico da tirosina (Tyr 385 - fundamental para a catálise) é nitrado, ocorre a inativação da COX (Deeb et al. 2006). Outros exemplos têm sido descritos na lesão aterosclerótica. Notavelmente, a nitração de LDL em lesões de aortas torácicas de humanos apresentava-se significativamente mais elevada que no plasma de indivíduos saudáveis (Leeuwenburgh et al. 1997). A prostaciclina sintase, uma enzima com função antitrombótica, antiproliferativa e vasodilatadora, também sofre nitração e inativação nos estágios iniciais de lesões (Schmidt et al. 2003).

1.5 Características histopatológicas das placas ateroscleróticas

1.5.1 Placa não vulnerável e vulnerável

Placas ateroscleróticas são heterogêneas e podem ou não levar à formação de trombo, assim, destacamos a importância da caracterização da placa.

Sabendo o perfil das placas causadoras de oclusão trombótica através da análise microscópica, torna-se possível inferir como a placa se apresenta pouco antes da formação do trombo. O termo vulnerável é utilizado para este tipo de placa, que supostamente apresenta maior propensão à trombose.

Placas com extensa área de tecido fibrótico cobrindo regiões com *core* lipídico pequeno, ou mesmo não apresentando *core* lipídico, são comuns e são classificadas como placas não vulneráveis. Estas lesões, apesar de causarem grande estreitamento luminal, apresentam baixa propensão a causarem trombos (Ettenson and Gotlieb 1995).

Uma placa presumidamente vulnerável à ruptura contém um amplo *core* necrótico rico em lipídios, coberto por uma fina e extensivamente inflamada capa fibrosa. (Kolodgie et al. 2001; Falk 2006). Outras características estão associadas, como o alargamento ou remodelamento positivo do vaso, inflamação na camada adventícia e o tamanho da placa (Falk et al. 2013). Diferentemente, as placas vulneráveis à erosão têm perfil heterogêneo e são definidas apenas pelo desfecho, o trombo (Virmani et al. 2000).

Figura 4. Características de placa não vulnerável, vulnerável e de placa com trombo luminal. (Adaptado JASHARI, 2012).

1.5.2 Ruptura e erosão de placa

A erosão e a ruptura de placas vulneráveis são os dois processos mais comumente envolvidos na trombose luminal de coronárias. A ruptura de placa é definida como uma falha (lacuna) na capa fibrosa que separa o *core* lipídico do lúmen da artéria (Figura 4) (Schaar et al. 2003). A oclusão trombótica da

coronária por ruptura de placa é a principal causa de IAM (VIRMANI 2006). Uma vez que a placa se rompe, o contato do *core* lipídico e/ou a exposição do colágeno e da matriz promove trombose com um grande potencial para a formação de trombo oclusivo (DAVIES, 1996). Ruptura da placa pode ser espontânea ou pode ser a extensão de uma fissura.

Tipicamente em uma erosão de placa há desnudamento do endotélio no local e a camada íntima exposta consiste predominantemente de células musculares lisas e proteoglicanos (Figura 4). A placa subjacente apresenta espessamento intimal patológico ou fibroateroma com a camada média intacta (Falk et al. 2013), ambos ocorrendo em igual frequência (Farb et al. 1996). Fibroateroma apresenta *core* necrótico composto por debris celulares, coberto por uma capa fibrosa espessa de células musculares lisas em uma matriz de proteoglicanos e colágeno (Virmani et al. 2000). Não foram identificadas características exclusivas a estas placas, mas placas erodidas raramente estão associadas ao remodelamento positivo do vaso, e células inflamatórias normalmente são escassas (Virmani et al. 2000), mas há estudos que discordam, relatando uma intensa inflamação (van der Wal et al. 1994). Ou seja, a identificação de quais características especificamente distinguem placas propensas à erosão de placas não vulneráveis continua sendo um desafio.

Figura 5. Artérias coronárias humanas com ruptura de placa (A) e erosão de placa (B) em corte transversal (objetiva 1x) (Acervo Laboratório de Anatomia Patológica – InCor).

1.6 Detecção do paciente vulnerável

Tomando o conceito de placa vulnerável descrito anteriormente como ponto de partida, uma abordagem mais sistêmica foi considerada para identificar pacientes com risco de morte por problemas cardiovasculares. Isto resultou em diversos estudos em busca de biomarcadores.

Um biomarcador é uma característica que é mensurada e avaliada como um indicador de processos biológicos normais e patogênicos ou ainda de respostas farmacológicas em uma intervenção terapêutica (Lesko and Atkinson Jr 2001). Devido ao papel fundamental dos lipídios e inflamação no desenvolvimento da aterosclerose, marcadores inflamatórios e de colesterol foram estudados minuciosamente (Van Lammeren et al. 2011).

Por exemplo, o biomarcador inflamatório proteína C reativa (PCR) foi descrito como um marcador preditivo de eventos cardiovasculares (Ridker et al. 2009). Em vários estudos, investigadores concluíram que níveis elevados de PCR e LDL em indivíduos saudáveis podem ser reduzidos através de tratamento profilático com estatinas, o que também resulta em um decréscimo na ocorrência de eventos cardiovasculares, mesmo na ausência de hiperlipidemia (Ridker et al. 2009). Isso indica que a PCR pode ser utilizada na identificação de pacientes de risco, e que PCR e LDL podem ser utilizados como marcadores da eficiência do tratamento.

Além de estudos de marcadores séricos, modalidades não invasivas de imagem foram estudadas extensivamente. Imageamento pode ser considerado útil na triagem de placas e, assim, na identificação de pacientes de alto risco e também na monitoração do efeito estabilizador do tratamento na composição da placa.

A ressonância magnética computadorizada (RMC) tornou-se, nos últimos anos, uma relevante modalidade diagnóstica na avaliação de uma grande variedade de doenças cardiovasculares. É um excelente método diagnóstico, pois permite a avaliação da anatomia cardíaca e vascular, da função ventricular, da perfusão miocárdica e a caracterização tecidual de forma acurada, reprodutível, sendo capaz de fornecer todas essas informações juntas, em um único exame (Underwood et al. 2004). Além disso, apresenta como grandes vantagens a não utilização de radiação ionizante e nem de meio de contraste, com maior potencial de nefro toxicidade.

A angiotomografia computadorizada das artérias coronárias (angio-TC) permite a avaliação da luz das artérias coronárias de maneira não invasiva. Os aparelhos são capazes de adquirir imagens com alta qualidade, permitindo a visualização detalhada da luz das artérias coronárias com alta acurácia diagnóstica quando comparada ao cateterismo cardíaco (o padrão-ouro), porém de maneira não invasiva, rápida e segura (MJ et al. 2008).

A ecocardiografia constitui importante subsídio, tanto para a elucidação diagnóstica como para a avaliação do prognóstico, em pacientes com doença arterial coronária crônica (DACC) (Barbosa 2009). O ecocardiograma pode fornecer auxílio diagnóstico importante ao demonstrar anormalidades, reversíveis ou não, da motilidade segmentar em pacientes com quadro clínico de doença arterial coronária (DAC). Exames ultrassonográficos intracoronarianos documentam que mesmo lesões angiograficamente “não significativas” causam importantes alterações na capacidade de vasodilatação da circulação coronariana, sendo capazes de provocar isquemia e miocárdio em risco.

Melhorias contínuas são observadas na geração de imagens da placa. O imageamento por ressonância magnética permitiu a diferenciação de tecidos, a detecção de células inflamatórias, possíveis regiões de hipóxia, angiogênese, além de trombo (Mulder et al. 2006; Lukanova et al. 2014; Nie et al. 2016). A angiotomografia foi envolvida na verificação de alterações na parede arterial (Pessotti et al. 2014). Processos inflamatórios na placa foram estudados através do exame imagiológico de tomografia por emissão de pósitrons (TEP),

outra importante modalidade de imagem, que demonstrou ser muito eficaz (Rudd et al. 2002). Ultrassom intravascular foi utilizado na detecção de neovascularização (Martin et al. 2016), envolvida na vulnerabilidade da placa (Naghavi et al. 2003), e na caracterização da placa em relação ao *core* lipídico (Kang et al. 2015).

Pelo fato de que nem todas as placas vulneráveis, ditas ateromas de capa fibrosa fina, evoluem para uma ruptura e causam eventos cardiovasculares (Kolodgie et al. 2001), é importante a busca contínua por outros marcadores de vulnerabilidade, para que sejam um complemento na caracterização deste tipo de placas.

Vale ressaltar que testes diagnósticos bioquímicos e/ou de imagem para detecção da aterosclerose subclínica podem ser incorporados de forma individualizada em pacientes que apresentam história familiar de doença aterosclerótica precoce ou que sejam considerados como de risco intermediário, não sendo preconizados como ferramentas de rotina na estratificação de risco.

A predição de risco cardiovascular com fatores de risco tradicionais tem tido um desempenho menos satisfatório em indivíduos idosos (Greenland et al. 2004). Estudos clínicos e epidemiológicos mostraram relação consistente entre marcadores de estresse oxidativo e risco de doença cardiovascular. A utilização de biomarcadores, entre eles os relacionados ao estresse oxidativo, poderá acrescentar um poder preditivo adicional aos fatores de risco tradicionais neste grupo específico de indivíduos.

O fato de a nitração proteica poder ser quantificada em cortes histológicos de placas ateroscleróticas contribui para a elucidação do perfil de expressão destas proteínas em segmentos de coronárias com placas ateroscleróticas de diferentes graus de gravidade da doença. Na literatura não existem estudos histopatológicos que comparem placas ateroscleróticas de diferentes perfis histopatológicos de um mesmo indivíduo e que correlacionem estas placas com marcadores envolvidos no agravamento da vulnerabilidade. Deste modo, propusemos o estudo que se segue.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo principal quantificar proteínas nitradas em placas ateroscleróticas de segmentos de artérias coronárias de humanos em lâminas de secções e correlacionar com os diferentes graus de vulnerabilidade / gravidade destas placas.

2.1.1 *Objetivos específicos*

- a) Categorizar as placas em obstruções leve, moderada e severa a partir do estudo morfométricos das mesmas, e também em placa com presença de trombo para cada indivíduo, construindo assim um banco de placas ateroscleróticas;
- b) Verificar se há diferença no perfil de expressão das proteínas nitradas e de outros marcadores histológicos entre segmentos coronarianos com placas ateroscleróticas de diferentes graus de estenose e vulnerabilidade dos indivíduos;
- c) Classificar as placas em relação a propensão à formação de trombo em vulneráveis e não vulneráveis, além de instáveis, e assim analisa-las quanto aos níveis de proteínas nitradas e a presença de marcadores histológicos.

3 MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido em conjunto entre o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular e o Serviço de Patologia do Instituto do Coração (InCor), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP processo número CEP 482/11.

3.1 Amostragem

Foram selecionados segmentos de artérias coronárias de 30 indivíduos cujo óbito foi decorrente de doença cardíaca isquêmica causada por aterosclerose. As amostras foram adquiridas durante os processos de necropsia dos indivíduos, os quais foram realizados no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre os anos de 1998 e 2010. Durante os processos de necropsia, com o intuito de evitar o colapso das artérias, que interferiria na morfologia das mesmas, cada uma das artérias coronárias dissecadas foi submetida no momento da coleta ao processo de fixação com uma solução de formalina, em perfusão constante, à uma pressão pré-estabelecida próxima a pressão normal. Este procedimento foi realizado pelo patologista responsável pela necropsia e sua equipe técnica. Em seguida, as artérias foram seccionadas em segmentos de 1 em 1 centímetro, a partir da origem do vaso, e acondicionadas em recipientes próprios, cassetes plásticos para o preparo da peça. Após isso, foram identificadas com letras maiúsculas indicativas das iniciais de cada vaso e com algarismos arábicos correspondentes ao centímetro avaliado. Os segmentos foram, então, desidratados, clarificados ou diafanizados, impregnados e incluídos em parafina. As amostras então, devidamente armazenadas em blocos de parafina, fazem parte do acervo do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor. Incluem segmentos de coronárias sem e com placas ateroscleróticas de diferentes graus de gravidade e vulnerabilidade.

Os segmentos estudados foram selecionados a partir dos esquemas de dissecação das artérias coronárias, arquivados nas pastas dos laudos de autópsias. Nestes esquemas estão apresentadas as porcentagens das

obstruções, causadas por placas de aterosclerose, além de possíveis trombos parciais e oclusivos. Apenas os indivíduos em que foi possível as identificações de todos os segmentos de interesse no esquema de dissecação de artérias coronárias, em uma pré-seleção, foram incluídos. Além disso, foi estabelecido que as necropsias tivessem sido realizadas pelo mesmo patologista, especialista em vasos coronários e aterosclerose.

Figura 6. Modelo do esquema de dissecação de artérias coronárias com as porcentagens de obstrução por placas de aterosclerose. (CD= coronária direita; DP= descendente posterior; VPD=ventricular posterior direita; MD= marginal direita; VAD= ventricular anterior direita; CE= coronária esquerda; CX=circunflexa; VPE= ventricular posterior esquerda; ME= marginal esquerda; VAE= ventricular anterior esquerda; D= diagonalis; DA= descendente anterior; D1= 1º diagonal; D2= 2º diagonal e D3= 3º diagonal).

3.2 Segmentos de Artérias Coronárias

Independentemente do fato de a análise do grau de obstrução se mostrar limitada na determinação da instabilidade das placas, algumas

características envolvidas no agravamento da vulnerabilidade da placa se correlacionam positivamente com o aumento do grau de aterosclerose (Hassan et al. 2015).

Diante disso, separamos as placas de forma objetiva em cinco grupos com graus de estenose de interesse, para caracterização e verificação das diferenças entre placas de obstrução leve, moderada e severa. E ainda, selecionamos placas com trombo e segmentos com grau de obstrução semelhante a estes. Isso permitiu a delineação das características predominantes nos segmentos, em relação à morfometria e ao conteúdo da placa, em cada classe.

Para cada indivíduo selecionamos cinco segmentos de coronárias, totalizando 150 segmentos, que inicialmente foram classificados e analisados da seguinte forma: Grupo 1 – segmento de menor obstrução da árvore coronariana; Grupo 2 - segmento de obstrução moderada (entre 50 e 70%); Grupo 3 – segmento com a presença de trombo recente parcial ou oclusivo e/ou ruptura; Grupo 4 – segmento com a mesma porcentagem de obstrução (ou a porcentagem de obstrução mais próxima) do segmento anterior, não apresentando trombo e/ou ruptura e Grupo 5 – segmento de maior obstrução da árvore coronariana.

Através da análise microscópica, estes segmentos foram selecionados pela pesquisadora em conjunto com um profissional da área, do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor. Os critérios de exclusão foram: presença de trombo antigo recanalizado e de dissecação arterial.

3.3 Preparo das amostras

A partir do bloco de parafina de cada segmento de interesse, foram confeccionadas 20 lâminas, processadas em micrótomo regulado a 3µm de espessura. Os cortes foram desparafinizados e mergulhados em xilol para em seguida serem hidratadas em soluções decrescentes de álcoois, 90%, 80%, 70%, 50% e água. E nestas condições os cortes foram submetidos a

colorações específicas e a reações imuno-histoquímicas. Destas 20 lâminas de cada segmento, 1 foi utilizada para a coloração hematoxilina e eosina (HE), 1 para a coloração Verhoeff e 1 para a coloração de Picrosírius. Além disso, foram utilizadas três lâminas para reações imuno-histoquímicas, 1 para identificação de macrófagos (CD68), 1 para linfócitos (CD3) e 1 para a quantificação de proteínas nitradas. Sendo que o restante das lâminas poderá ser utilizado para estudos futuros com outros marcadores.

3.4 Histoquímica

3.4.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina:

Para obtermos uma visão geral do tecido de modo a permitir a identificação dos elementos teciduais, os segmentos foram corados com hematoxilina e eosina. Após a desparafinização, os cortes permaneceram por 20 minutos em hematoxilina, seguido por lavagens com água, 1 minuto em água amoniacal, e 5 minutos em eosina. Foram desidratados e montados com lamínula.

3.4.2 Coloração com Verhoeff:

Para a visualização das fibras elásticas, estrutura de grande utilidade quando se deseja diferenciar as camadas íntima, média e adventícia, foi utilizada a coloração do tipo Verhoeff. As lâminas foram desparafinizadas, embebidas na solução para fibras elásticas de Verhoeff por 15 minutos, após a lavagem foram diferenciadas em cloreto férrico a 2%, colocado em tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto, novamente lavadas, desidratadas e montadas com lamínula.

3.4.3 - Coloração com Picrosírius

A quantificação das fibras de colágeno foi realizada na túnica íntima, auxiliando através da coloração com Picrosírius. Após a desparafinização, as lâminas foram embebidas em solução saturada de ácido Pícrico e *Sirus Red* (F3Ba) por 60 minutos, lavadas, desidratadas e montadas com lamínula.

3.5 Morfometria

A análise morfológica, utilizando-se os cortes submetidos à coloração de Verhoeff, foi realizada utilizando o microscópio de luz, na objetiva de 1x, associado a um analisador de imagem AxioVision Release 4.7.1 (Zeiss). As áreas foram delimitadas manualmente por ferramentas específicas do software, e os valores (em μm^2) foram importados para o Excel. Foram realizadas medidas das áreas do lúmen (LU), lâmina elástica interna (LEI) e lâmina elástica externa (LEE). Quando existentes, foram realizadas as medidas da área do *core* lipídico (CL) e da espessura da capa fibrosa. Somente a medida da espessura da capa fibrosa foi realizada com a objetiva de 20x, permitindo assim uma aferição mais precisa. A área da placa (AP) foi determinada a partir do cálculo: $AP = LEI - LU$. Para determinar a porcentagem de obstrução do segmento, foi usada a fórmula: $\%obstrução = AP \cdot 100 / LEI$. Com a finalidade de estabelecer a porcentagem da área ocupada pelo *core* lipídico, foi usada a seguinte fórmula: $\%core = CL \cdot 100 / AP$. O tamanho do vaso foi representado pela área da lâmina elástica externa.

3.6 Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi usada para a determinação da porcentagem da área ocupada por proteínas nitradas nas camadas íntima e média de todos os segmentos de coronária envolvidos no estudo e também para a detecção de linfócitos e macrófagos nas camadas íntima e adventícia

dos mesmos. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas com os seguintes anticorpos primários, para a detecção de nitração total de proteínas, linfócitos e macrófagos, respectivamente:

- anticorpo anti-nitrotirosina policlonal da MILLIPORE #06-284 titulação de 5µL/mL;
- anticorpo anti-CD3 policlonal da ABCAM #5690 na titulação de 5µL/mL;
- anticorpo anti-CD68 monoclonal ABCAM #955 na titulação de 10µL/mL.

Após desparafinização dos cortes foi utilizado para a recuperação antigênica, o reagente *Dewaxing & Antigen Retrieval Buffer* 1 (Referência: PMB1 -250, SPRING), um tampão de Citrato de Sódio (10mM - pH 6,0), em panela de pressão a 110°C. Deixamos esfriar as lâminas por 30 minutos na bancada. Após lavagem dos cortes com tampão fosfato salino 1x, estes passaram pelo bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes ou 3%. Em seguida, foram feitas lavagens com água corrente, já que o cloro retira o excesso de H₂O₂. Lavamos com tampão fosfato salino por 5 minutos. Para o bloqueio de ligações inespecíficas foi utilizada solução de caseína a 2% por 1 hora. O anticorpo primário de interesse foi diluído em tampão fosfato salino e incubado *overnight*, a 4°C. Para o controle negativo, substituímos o anticorpo primário pelo diluente do anticorpo na própria secção a ser testada. Após a retirada do anticorpo primário, foi realizada a lavagem com o tampão fosfato salino duas vezes por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com um kit de detecção – *Invitrogen Polymer Detection Kit, horseradish peroxidase* (HRP) (Invitrogen #878983). Posteriormente à lavagem com tampão fosfato salino, a revelação dos cortes se deu pela utilização da diaminobenzidina – DAB, por 5 minutos, observando-se sempre se a marcação em marrom não estava muito forte. Os cortes foram lavados com água, descartando-se a água utilizada no hipoclorito. Passaram por contra coloração com hematoxilina por 45 segundos, seguido de lavagem

com água corrente. Após a desidratação foram realizadas as montagens com resina permanente.

3.7 Caracterização e Quantificação

A quantificação da área ocupada pelas proteínas nitradas foi feita separadamente, nas túnicas íntima e média.

As imagens foram analisadas em microscópio de luz comum, utilizando a objetiva de 20x, associado a um analisador de imagens Axiovision Release 4.7.1 (Zeiss). Em cada fotografia foi delimitada a túnica média e/ ou a túnica íntima como área de interesse e aplicado um espectro predeterminado da cor marrom, permitindo assim a detecção automática. As áreas ocupadas por proteínas nitradas foi determinada em ambas as camadas pela média aritmética das porcentagens de marcação positiva em marrom, dos campos cobrindo toda a extensão vaso em cada uma das camadas dos segmentos.

Para a contagem de células inflamatórias, utilizamos um microscópio de luz comum na objetiva de 40x, associado ao analisador de imagens AxioVision Release 4.7.1 (Zeiss). Tanto os linfócitos como os macrófagos foram identificados pela marcação positiva em marrom. Na adventícia o número em /mm² foi determinado dividindo-se o número total de células coradas em marrom pelo número de campos analisados e, finalmente, o valor foi dividido pela área do campo, 0,6mm². Para chegarmos ao número de células na íntima com marcação positiva, realizamos a contagem e dividimos pela área de tecido, obtendo assim o número em /mm². Nas duas camadas as contagens foram feitas em campos em uma faixa na vertical e outra na horizontal, ou seja, de modo que as contagens cobrissem uma área do vaso em forma de cruz.

A quantificação de fibras de colágeno, com marcação positiva em vermelho, foi realizada na camada íntima e em campos selecionados em uma faixa vertical e outra horizontal no vaso, ou seja, novamente em cruz. Foi utilizada a objetiva de 20x, associado ao mesmo analisador de imagens anteriormente citado.

As placas foram classificadas em dois grupos: vulneráveis e não vulneráveis, e assim analisadas. A classificação de placas vulneráveis foi baseada nos seguintes critérios: *core* lipídico maior ou igual a 35% da área da placa, espessura da capa fibrosa menor ou igual a 65 μ m (Kolodgie et al. 2001) e, como critério secundário, apresentar alto número de células inflamatórias na túnica íntima ou adventícia. Ou ainda demonstrar ruptura de placa. Sendo as demais placas consideradas não vulneráveis.

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, sendo a leitura das lâminas realizada por uma única examinadora.

3.8 Análises Estatísticas

Foi construído um banco de dados com os valores obtidos com o estudo morfométrico dos segmentos e outras mensurações. Os segmentos foram divididos e organizados em 5 grupos, e as medidas incluíram porcentagem de obstrução, área do lúmen (mm²), área da placa (mm²), área do vaso (mm²), área do *core* lipídico (mm²), porcentagem da área ocupada pelo *core* lipídico na placa, espessura da capa fibrosa (μ m), além dos valores obtidos com a quantificação da porcentagem das proteínas nitradas, do número células inflamatórias (linfócitos e macrófagos) e porcentagem de colágeno igualmente realizada em cada um dos Grupos (I, II, III, IV e V). Os indivíduos foram categorizados em relação ao sexo e também quanto à presença ou não de fatores de risco: hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo e dislipidemia, e estas informações foram incluídas no mesmo banco de dados.

Para verificar se a presença de determinado fator de risco no indivíduo influenciou os níveis de proteínas nitradas nas camadas média e íntima no vaso, ajustamos um modelo hierárquico, um modelo caracterizado pela presença de unidades experimentais agrupadas em unidades maiores. Ou

seja, nos permitiu considerar o conjunto das observações do segmento de cada grupo dentro de cada indivíduo.

Análises comparativas por teste de Friedman foram feitas para as variáveis morfométricas. Um teste utilizado quando os indivíduos são distribuídos por mais de três situações experimentais, aplicado então nos indivíduos deste estudo, pois analisamos cinco segmentos de um mesmo indivíduo.

As medidas morfométricas, e as relacionadas à composição da placa (nitração proteica, inflamação e colágeno), obtidas em cada um dos grupos aos quais os segmentos foram divididos, foram comparadas entre si através do teste de correlação de Spearman, uma alternativa comum aplicada para se medir a associação entre duas variáveis dentro de um mesmo grupo.

Os dados obtidos neste estudo possuem uma estrutura de agrupamento, e os modelos hierárquicos permitem especificar dados com estas características. A estrutura de agrupamento é o sujeito, pois foram utilizadas coleções de cinco segmentos coronarianos, tanto com quanto sem placas ateroscleróticas, de cada sujeito. Considerando que as artérias coronárias de um mesmo indivíduo foram submetidas às mesmas condições de ambiente vascular, mas a condições diferentes em relação aos outros indivíduos, estas diferenças entre os sujeitos poderiam mascarar possíveis discrepâncias entre os segmentos dos Grupos com placa aterosclerótica (II, III, IV e V).

Para saber se estatisticamente o agrupamento faz sentido, ou seja, se o fato de considerarmos o indivíduo levar a diferenças na análise, realizamos o teste de razão de verossimilhança. Este teste foi executado entre um modelo hierárquico generalizado (quando se leva em consideração o indivíduo no ajuste do modelo) e um modelo linear generalizado (quando não se leva em consideração o indivíduo no ajuste do modelo), para testar a significância dos conjuntos de observações dentro de cada indivíduo. Com a significância do teste, concluiu-se que se considerando o indivíduo, este exerce influência sobre o resultado.

Tabela 1. Efeito aleatório do indivíduo para os parâmetros morfológicos, bioquímicos e inflamatórios.

Teste da razão de verossimilhança		
	Correlação intra-classe	p-valor
Área do lúmen (mm²)	0,259	<0,01
Área da placa	0,225	0,000107
Área do vaso	0,217	0,000198
Área core lipídico (mm²)	0,403	<0,01
Core lipídico (%)	0,217	0,0347
O Colágeno	0,644	<0,01
Linfócitos camada adventícia	0,349	<0,01
Linfócitos camada íntima	0,210	1,00E+00
Macrófagos camada adventícia	0,227	0,000606
Macrófagos camada íntima	0,003	1,00E+00
Nitração camada média	0,388	<0,01
Nitração camada íntima	0,323	<0,01

Diante da significância do teste, a variância residual foi dividida em um componente de variância residual entre os indivíduos, e o componente de variância residual interna, ou seja, dentro do indivíduo. Causas externas, como por exemplo os fatores de risco para eventos cardíacos, representam características do indivíduo que muitas vezes não podem ser estimadas ou mensuradas e, devido a esse fato, há uma indução à utilização de uma correlação entre os segmentos do mesmo sujeito (correlação intra-classe). Apesar de que o mecanismo patofisiológico central é assumidamente o mesmo independentemente do conjunto de fatores de risco apresentado, a presença de algum destes fatores de risco em particular e sua intensidade adicionam particularidades na apresentação da aterosclerose em cada indivíduo. Assim, como já mencionado, quando não se leva isto em consideração podemos estar mascarando o comportamento das variáveis nos segmentos dos diferentes Grupos pelas diferenças entre os sujeitos.

Comparamos aspectos morfométricos e de vulnerabilidade entre segmentos de artérias coronárias sem placa (Grupo I), e placas ateroscleróticas que apresentaram obstrução intermediária (Grupo II), realizado, novamente, através do modelo hierárquico.

Observamos que dentro do Grupo III, o grupo com o desfecho mais grave, os segmentos apresentaram diferentes causas do trombo: ruptura e erosão de placa. Diante disto, e com base de descrições sobre ambos os tipos de placas na literatura, tornou-se interessante verificar possíveis diferenças em relação às variáveis que estamos medindo nos dois perfis de placas. Neste caso, levamos somente o grupo de placa aterosclerótica com trombo, e não o indivíduo, em consideração no ajuste do modelo. Utilizamos, então, um modelo linear generalizado. Assim, ajustamos este com distribuição gama, em que levamos em consideração os segmentos do Grupo III e sua classificação:

$$Y_i = \alpha + \beta X_i + \varepsilon_i, \quad \text{para } i = 1, 2, \dots, 30$$

Com

$$X_i = \begin{cases} 1, & \text{se segmento III apresenta ruptura no indivíduo } i, \\ 0, & \text{se segmento III apresenta erosão no indivíduos } i. \end{cases}$$

Sendo Y_i , a variável resposta para o segmento do Grupo III.

Tomando como base as diferenças em vários aspectos observados entre os segmentos do Grupo III, ruptura e erosão de placa, tornou-se interessante a divisão dos indivíduos em duas categorias: os indivíduos que apresentaram ruptura de placa (n=19) como causa do trombo e os indivíduos que apresentaram erosão (n=11) como causa de trombo. Diante deste cenário, uma análise adicional foi realizada somente com os grupos dos segmentos com placa aterosclerótica (II, III, IV e V) de cada indivíduo. Para isto, foi necessária a utilização de segmento de um grupo de referência, o qual pudesse ser utilizado como parâmetro ao ser comparado com os segmentos dos outros grupos com placas ateroscleróticas. O segmento do grupo II foi selecionado, pois apresentava o perfil menos aterogênico. Foi realizado um estudo comparativo do segmento de referência com os segmentos dos Grupos

III, IV e V, separadamente em cada uma das categorias. Ou seja, os indivíduos que apresentaram ruptura de placa (n=19) como causa do trombo, tiveram os seus segmentos dos Grupos III, IV e V comparados em relação ao Grupo II desta categoria e, da mesma forma, para os indivíduos que apresentaram erosão (n=11) como causa de trombo estas mesmas análises foram feitas com os Grupos III, IV e V em relação ao Grupo II destes indivíduos. Então:

INDIVÍDUOS QUE APRESENTARAM **RUPTURA** DE PLACA NO GRUPO III

INDIVÍDUOS QUE APRESENTARAM **EROSÃO** DE PLACA NO GRUPO III

Com a utilização dos segmentos do Grupo II, comparando-os com segmentos de lesões avançadas que não causaram um evento agudo mostra se há aumento ou não nos valores de determinadas características em placas que refletem o progresso da aterosclerose (IV e V), ou se a intensificação destas características se dá somente quando há o desfecho mais grave (trombo). Os segmentos do grupo I não foram incluídos nesta análise, pois o interesse era avaliar o comportamento das variáveis em segmentos apresentando a doença, além disso, diferenças entre segmentos sem placa e segmentos acometidos por placa são esperadas e já amplamente estudadas.

A separação dos indivíduos em duas categorias (apresentando ruptura ou erosão como causa de trombo nos segmentos do Grupo III) é justificável, pois apesar de haver estudos que descrevam um caráter sistêmico de alguns marcadores no desenvolvimento da erosão da placa, o contrário também foi relatado. Apesar de apresentar características que se assemelham a de placas estáveis, o perfil não vulnerável de segmentos com erosão de placa é controverso. Além disso, é interessante verificar se as diferenças entre um segmento com ruptura de placa e um segmento com uma placa de perfil menos aterogênico são as mesmas quando se compara este com um segmento com erosão de placa.

Assim, utilizamos o seguinte modelo, considerando o indivíduo e não somente os grupos:

$$Y_i = \alpha + \beta_1 X_i + (1|DII) + \varepsilon_i, \quad \text{para } i = 1, 2, 3, \dots, 30.$$

Onde

$$X_i = \begin{cases} 0, & \text{para a observação do segmento do Grupo II, do indivíduo } i, \\ 1, & \text{para a observação do segmento do Grupo III, do indivíduo } i, \\ 2, & \text{para a observação do segmento do Grupo IV, do indivíduo } i, \\ 3, & \text{para a observação do segmento do Grupo V, do indivíduo } i, \end{cases}$$

e $(1|DII)$ é o termo que considera o agrupamento dos segmentos por indivíduo.

Em outra análise, para verificar se houve variação nos parâmetros morfométricos, no colágeno e nos níveis de marcadores inflamatórios e de stress oxidativo em placas vulneráveis ou não, adicionamos ao modelo hierárquico o fator vulnerável e não vulnerável no efeito fixo.

Para todas as análises foi adotado como significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos indivíduos com placa aterosclerótica

Na tabela (2) encontram-se as informações da amostra estudada (n=30), na qual 53,3% são do sexo masculino, e a média de idade foi de 65,13 anos. O principal fator de risco associado observado foi hipertensão arterial sistêmica, presente em 87% dos casos, seguido de diabetes mellitus, observado em quase 60% dos indivíduos. A baixa porcentagem de indivíduos apresentando dislipidemia foi decorrente, muito provavelmente, da falta de dados pelo não acompanhamento de alguns indivíduos pelo hospital. Nenhum dos fatores de risco apresentou associação com a porcentagem de nitração nas camadas média e íntima.

Tabela 2. Parâmetros clínicos da população em estudo.

	Masculino (n=16)	Feminino (n=14)	Total
Idade (Anos)	64,8 ± 10,11	65,42 ± 11,02	65,13
Fatores de Risco (%)			
Hipertensão	81,25	92,85	87
Diabetes	62,5	57,14	59,8
Tabagismo	71,42	28,57	50
Dislipidemia	43,75	21,42	32,6

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão e porcentagem

4.2 Caracterização morfométrica dos segmentos coronarianos

Na tabela (3) estão os dados morfométricos dos segmentos coronarianos de todos os indivíduos, separados em cinco grupos, de acordo com a porcentagem de obstrução como descrito anteriormente.

As diferenças estatísticas observadas foram previsíveis. O Grupo I apresentou diferença em relação aos Grupo II, III, IV e V no que diz respeito à área do vaso. A área da placa no Grupo II foi significativamente menor apenas em relação ao Grupo III.

4.3 Caracterização dos parâmetros bioquímicos e inflamatórios dos segmentos coronarianos.

As informações, que caracterizam os segmentos dos grupos I, II, III, IV e V de todos os indivíduos em relação aos parâmetros bioquímicos e inflamatórios, estão dispostos na tabela (4).

Na camada íntima, de forma inesperada o Grupo I apresentou altos níveis de nitração proteica. Nestes segmentos não consideramos a marcação positiva do endotélio para evitar valores superestimados da porcentagem da nitração proteica na camada íntima. No entanto, os valores continuaram altos. Considerando a detecção de proteínas nitradas no endotélio deste grupo, a média foi de $12,4\% \pm 7,38$ (não demonstrado na tabela), valor significativamente mais alto em relação a todos os outros grupos.

Como esperado, o número de células inflamatórias apresentou diferença significativa quando comparamos os segmentos dos grupos II, III, IV e V com os segmentos do Grupo I sem placa, sabidamente minimamente inflamados.

Tabela 3. Dados morfométricos dos segmentos coronarianos de todos os indivíduos.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
Obstrução (%)	24,3 ± 14,84	56,57 ± 9,99	75,9 ± 10,79	74,54 ± 9,21	88,59 ± 6,77
Área do Lúmen (mm²)	1,82 ± 0,59	2,17 ± 1,74	1,61 ± 0,97	1,28 ± 0,85	0,52 ± 0,45
Área Placa (mm²)		2,70 ± 2,08 [*]	6,04 ± 4,23	3,93 ± 2,65	3,70 ± 2,05
Core Lipídico (%)		32,74 ± 10,51	33,4 ± 10,71	29,48 ± 10,34	33,25 ± 15,23
Área do core lipídico (mm²)		0,93 ± 0,48	2,62 ± 1,84	1,24 ± 0,74	1,41 ± 1,43
Espessura capa fibrosa (µm)		167,39 ± 101,85	83,05 ± 95,50	193,25 ± 132,41	175,69 ± 101,28
Área do vaso (mm²)	3,23 ± 4,50 [*]	6,08 ± 4,14	9,14 ± 5,51	6,36 ± 3,88	5,15 ± 2,76

p< 0,05 comparando com os grupos II, III, IV e V. ^{} p< 0,05 comparando com o grupo III Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão ou porcentagem.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos e inflamatórios dos segmentos coronarianos de todos os indivíduos.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
Colágeno (%)		30,29 ± 27,18	32,36 ± 23,29	33,24 ± 26,75	28,43 ± 23,57
Linfócitos camada adventícia (céls/mm²)	15,95 ± 16,98 [‡]	42,42 ± 49,77	94,93 ± 104,92	35,46 ± 42,98	37,1 ± 29,37
Linfócitos camada íntima (céls/mm²)	0,75 ± 2,57*	15,07 ± 14,46	25,5 ± 26,55	12,19 ± 10,87	22,7 ± 17,97
Macrófagos camada adventícia (céls/mm²)	19,94 ± 29,07 ^x	22,09 ± 15,71	42,66 ± 42,90	29,17 ± 29,96	29,35 ± 27,36
Macrófagos camada íntima (céls/mm²)	1,2 ± 3,1*	8,74 ± 7,62	16,72 ± 14,03	9,77 ± 6,39	10,6 ± 7,85
Nitração camada média (%)	11,20 ± 7,43	11,64 ± 6,12	12,41 ± 6,95	11,34 ± 5,31	12,11 ± 5,7
Nitração camada íntima (%)	7,96 ± 3,39 [§]	6,29 ± 2,98	7,76 ± 3,79	5,47 ± 2,51	5,27 ± 3,19

[‡]p < 0,05 comparando os grupos II, III e V. ^xp < 0,05 comparando com o grupo III. *p < 0,05 comparando com os grupos II, III, IV e V. [§] p < 0,05 comparando os grupos IV e V. Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.4 Correlações de Spearman

Para medir o grau de relação positiva ou negativa entre duas variáveis dentro de um mesmo grupo (I, II, III, IV ou V), as medidas obtidas em cada um dos cinco segmentos foram correlacionadas, e os resultados estão demonstrados na tabela (5). Foram apresentados apenas os resultados de relevância para a pesquisa ou aqueles em que havia correlação significativa em pelo menos um dos Grupos.

Tabela 5. Resultados das análises de correlações entre os aspectos morfológicos, bioquímicos e inflamatórios

		GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V
Obstrução (%)						
LEE (mm ²)	r	0,251	-0,227	0,403	0,328	-0,316
	p	0,181	0,227	0,027	0,077	0,089
	n	30	30	30	30	30
Core lipídico (%)						
LEE (mm ²)	r	---	0,33	0,665	0,179	-0,05
	p	---	0,42	0,001	0,478	0,854
	n	---	8	21	18	16
Área da placa (mm ²)	r	---	0	0,727	0,195	0,032
	p	---	1	0	0,438	0,905
	n	---	8	21	18	16
espessura da capa fibrosa (µm)	r	---	-0,786	-0,412	-0,591	-0,088
	p	---	0,021	0,064	0,01	0,745
	n	---	8	21	18	16
obstrução (%)	r	---	-0,31	0,301	0,358	0,376
	p	---	0,456	0,184	0,145	0,151
	n	---	8	21	18	16
Linfócitos camada íntima (cél/s/mm ²)						
Linfócitos camada adventícia (cél/s/mm ²)	r	-0,067	0,439	0,592	0,258	0,442
	p	0,737	0,019	0,001	0,185	0,019
	n	28	28	28	28	28
Área da placa (mm ²)	r	---	0,01	0,57	0,021	0,522
	p	---	0,961	0,002	0,915	0,004
	n	---	28	28	28	28

		Macrófagos camada íntima (céls/mm ²)				
Macrófagos camada adventícia (céls/mm²)	r	0,177	0,297	0,441	0,307	0,613
	p	0,408	0,159	0,031	0,145	0,001
	n	24	24	24	24	24
Área da placa (mm²)	r	---	0,17	0,251	0,499	0,015
	p	---	0,427	0,237	0,013	0,945
	n	---	24	24	24	24
LEE (mm²)	r	0,505	0,129	0,199	0,488	-0,122
	p	0,012	0,547	0,35	0,016	0,569
	n	24	24	24	24	24
		Nitração proteica camada íntima (%)				
Nitração proteica camada média (%)	r	0,379	0,568	0,508	0,377	0,196
	p	0,039	0,001	0,004	0,04	0,298
	n	30	30	30	30	30
Linfócitos camada íntima (céls/mm²)	r	-0,401	0,031	0,287	0,001	0,221
	p	0,035	0,877	0,139	0,994	0,259
	n	28	28	28	28	28
Macrófagos camada adventícia (céls/mm²)	r	-0,311	-0,279	-0,289	0,22	-0,429
	p	0,139	0,187	0,171	0,302	0,036
	n	24	24	24	24	24
		Nitração proteica camada média (%)				
LEE (mm²)	r	-0,202	-0,007	0,156	-0,366	-0,259
	p	0,284	0,969	0,411	0,047	0,167
	n	30	30	30	30	30

r= coeficiente de correlação de Spearman p= significância n= tamanho da amostra

4.4.1 Correlações entre os parâmetros morfométricos

Dentre as variáveis medidas, destacamos a boa correlação somente no Grupo III entre a porcentagem de área ocupada pelo *core* lipídico na placa e a área da lâmina elástica externa (LEE) ($r=0,665$, $p=0,001$) e também entre a porcentagem da área ocupada pelo *core* lipídico na placa e a área da placa ($r=0,727$, $p<0,001$), evidenciando a contribuição destas características no agravamento da vulnerabilidade da placa (Figura 7).

Figura 7. Correlação de Spearman entre as variáveis morfométricas: porcentagem de área ocupada pelo core lipídico na placa, área da LEE, área da placa. r = coeficiente de correlação de Spearman e p = significância.

Como esperado a porcentagem da área ocupada pelo core lipídico na placa se correlacionou de forma negativa com a espessura da capa fibrosa, que foi observado nos Grupos II, III e IV ($r = -0,786$, $p=0,021$, $r=-0,729$, $p=0,044$ e $r = -0,591$, $p=0,01$, respectivamente), demonstrado na figura 8.

Figura 8. Correlação de Spearman entre as variáveis morfométricas: área ocupada pelo *core* lipídico na placa, espessura da capa fibrosa. r = coeficiente de correlação de Spearman e p = significância.

4.4.2 *Correlações entre os parâmetros morfométricos, inflamatórios e bioquímicos*

O número de linfócitos na camada adventícia se correlacionou positivamente de forma significativa com o número destas células na camada íntima, nos Grupos II, III e V ($r=0,439$, $p=0,19$, $r=0,592$, $p=0,001$ e $r=0,442$, $p=0,019$ respectivamente) (Figura 9). Em relação aos macrófagos a correlação entre as duas camadas do vaso se deu apenas nos segmentos dos Grupos III e V ($r=0,441$, $p=0,031$ e $r=0,613$, $p=0,001$), como pode ser observado na figura 10.

Figura 9. Correlação de Spearman entre as variáveis inflamatórias: número de linfócitos na camada íntima e na camada adventícia r = coeficiente de correlação de Spearman e p = significância.

Figura 10. Correlação de Spearman entre as variáveis inflamatórias: número de macrófagos na camada íntima e na camada adventícia r = coeficiente de correlação de Spearman e p = significância.

Foi observada uma alta correlação entre os linfócitos localizados na camada íntima nos Grupos III e V em relação à variável área da placa ($r=0,522$, $p=0,004$ e $r=0,57$, $p=0,002$) (Figura 11). Somente quando analisamos o Grupo IV, que apresenta grau de obstrução similar ao Grupo III, mas ausência de trombo, uma associação foi encontrada entre o número de macrófagos na camada íntima e a área da placa ($r=0,499$, $p=0,013$). Uma associação entre estas células inflamatórias na camada íntima e a área da LEE também foi verificada apenas no Grupo IV ($r=0,488$, $p=0,016$) (Figura 12).

Figura 11. Correlação de Spearman entre a área da placa e número de linfócitos). r = coeficiente de correlação de Spearman e p = significância.

Figura 12. Correlação de Spearman entre e área da placa, área do vaso e número número de macrófagos. r = coeficiente de correlação de Spearman e p = significância.

Há uma forte correlação entre a porcentagem de área ocupada por proteínas nitradas na camada média e na camada íntima nos Grupo II e III ($r=0,568$, $p=0,001$ e $r=0,508$, $p=0,004$ respectivamente).

Figura 13. Figura. Correlação de Spearman entre e a nitração na camada

média e a nitração na camada íntima. r = coeficiente de correlação de Spearman e p = significância.

4.5 Comparação Grupo I e II

A partir da comprovação de que o comportamento das medidas das variáveis é diferente de acordo com o indivíduo, optamos por fazer as análises através do modelo hierárquico. Apesar de estudos feitos a partir de autópsias descreverem detalhadamente lesões de diferentes perfis morfológicos, pouco se sabe sobre as alterações morfométricas e de marcadores de vulnerabilidade entre segmentos de artérias coronárias humanas sem placa e placas ateroscleróticas que apresentaram obstrução moderada dentro de um mesmo indivíduo.

Nesta análise utilizamos o Grupo I como referência e com o valor da estimativa tivemos a dimensão da diferença nas variáveis do Grupo II em relação ao Grupo I. Os dados morfométricos estudados, ou seja, as áreas do lúmen, da placa e do vaso foram significativamente maiores no Grupo II quando comparados ao grupo I, de menor obstrução. Observamos maior número de linfócitos e macrófagos por milímetro quadrado no Grupo II, na camada adventícia e íntima, respectivamente. De forma inesperada, a porcentagem de proteínas nitradas na camada íntima do Grupo II foi menor, sendo que esta variável não apresentou diferença quando medida na camada média. Estes resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Estudo comparativo do comportamento das medidas entre os Grupos I e II

	Estimativa (β)	p - valor
Área do lúmen (mm²)	0,3535	0,01947
Área da placa (mm²)	1,06837	<0,001
Área do vaso (mm²)	0,8268	<0,001
Linfócitos camada íntima céls / (mm²)	---	---
Linfócitos camada adventícia	0,9589	0,00109
Macrófagos camada íntima céls / (mm²)	2,06483	<0,001
Macrófagos camada adventícia	---	---
Nitração camada íntima (%)	-0,2279	0,0088
Nitração camada média (%)	0,10628	0,228

4.6 Comparação dentro do Grupo III (com presença de trombo)

O Grupo III, embora com trombos, pode ser dividido em dois subgrupos devido suas causas: ruptura e com erosão de placa. Assim, foi realizada uma comparação entre esses dois subgrupos. Os segmentos com erosão de placa foram usados como referência. A estimativa nos deu a dimensão da diferença das variáveis do subgrupo da ruptura de placa em relação ao subgrupo da erosão de placa.

Entre os aspectos morfométricos, somente a área do lúmen não variou entre os subgrupos. Medidas de determinadas variáveis implicadas na vulnerabilidade da placa como as áreas da placa, do vaso e do *core* lipídico, além da porcentagem da área ocupada pelo *core* lipídico na placa, foram significativamente maiores no subgrupo com ruptura de placa. Inesperadamente, a porcentagem de colágeno na camada íntima, importante característica envolvida na instabilidade da placa, não variou entre os subgrupos. O número de linfócitos na camada íntima e na camada adventícia foi mais alto no subgrupo com ruptura de placa, mas o mesmo resultado não foi observado em relação ao número de macrófagos em ambas as camadas. Pudemos observar aumento na porcentagem da área ocupada por marcadores

de estresse oxidativo, as proteínas nitradas, na camada íntima dos segmentos com ruptura em relação aos que apresentaram erosão de placa. Na camada média não foi observada diferença entre os subgrupos em relação a esta variável (Tabela 7).

Tabela 7. Estudo comparativo do comportamento das medidas entre os subgrupos ruptura e erosão.

	Estimativa (β)	p – valor
Área do lúmen (mm²)	0,1905	0,29379
Área da placa	0,7323	0,00158
Área do vaso	0,628	0,00422
Área core lipídico (mm²)	0,8646	0,00122
Core lipídico (%)	0,5299	0,00023
Colágeno	-0,373	0,211
Linfócitos camada adventícia	1,0785	0,0119
Linfócitos camada íntima	1,2566	0,00036
Macrófagos camada adventícia	0,2358	0,584
Macrófagos camada íntima	0,1888	0,606
Nitração camada média	0,3325	0,12
Nitração camada íntima	0,3586	0,0385

4.7 Comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II

Quando analisamos todos os grupos apresentando placa aterosclerótica, levando-se em consideração o fato de serem do mesmo indivíduo, utilizamos o Grupo II como referência para a comparação com os segmentos dos demais grupos: III, IV e V. Optamos por este grupo como referência, pois é o grupo que apresenta obstrução moderada e é predominantemente composto por placas com o fenótipo menos aterogênico. Deste modo, pudemos observar em relação a lesões com este fenótipo de cada indivíduo, se houveram características determinantes da vulnerabilidade com valores significativamente diferentes nas lesões dos Grupos IV e V. Estes grupos refletiram o progresso da aterosclerose e apresentam um grau crítico de estenose. Ou ainda, se estas diferenças foram

observadas somente quando a placa apresentou o fenótipo mais grave, ruptura de placa e/ou formação de trombo (Grupo III).

Nesta análise, trabalhamos com uma distribuição com a função de ligação inversa, onde os valores de β tem sinal contrário obtido com a função de ligação canônica, isso devido a parametrização da distribuição gama. Ou seja, o sinal negativo (-) indica que há aumento nos valores daquela variável em relação ao segmento de referência.

Analizamos os indivíduos separadamente, em duas categorias, de acordo com a causa do trombo no Grupo III. Os indivíduos apresentando ruptura de placa como causa do trombo tiveram os segmentos do Grupo II comparados aos segmentos dos demais grupos com placas ateroscleróticas (Grupos III, IV e V) correspondentes a estes indivíduos, sendo este chamado de subgrupo ruptura. Em outro subgrupo, em que a causa do trombo foi a erosão da placa, o Grupo II dos indivíduos pertencentes a esta classificação foi comparado com os respectivos Grupos III, IV e V, sendo este chamado de subgrupo erosão.

4.7.1 Análise comparativa entre segmentos dos indivíduos que apresentaram ruptura como causa do trombo.

Foi observado que a área do lúmen estava mais preservada nos Grupos III, IV e V em relação ao Grupo II, nos indivíduos deste subgrupo. Além disso, verificamos que no Grupo III o valor da área da placa foi significativamente mais alto em relação ao grupo de referência. Interessantemente o Grupo V, ou de maior obstrução, apresentou área do vaso significativamente menor em relação ao grupo de obstrução moderada.

Tabela 8. Análise dos segmentos dos indivíduos que apresentaram ruptura como causa do trombo.

	Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
	Estimativa (β)	p valor	Estimativa (β)	p valor	Estimativa (β)	p valor
Área do lúmen (mm²)	-0,271	0,023	-0,577	<0,01	-1,075	<0,01
Área da placa (mm²)	-0,160	<0,01	-0,050	0,11	-0,033	0,37
Área do vaso (mm²)	-0,048	<0,01	0,019	0,227	0,052	0,01
Área core lipídico (mm²)	---	---	---	---	---	---
Core lipídico (%)	---	---	---	---	---	---
Colágeno (%)	0,003	0,462	0,007	0,107	0,009	0,07
Linfócitos camada adventícia (mm²)	-0,026	<0,01	-0,007	0,56	-0,016	0,11
Linfócitos camada íntima céls / (mm²)	-0,041	<0,01	-0,003	0,814	-0,028	0,002
Macrófagos camada adventícia (mm²)	-0,023	<0,01	-0,015	<0,01	-0,013	0,007
Macrófagos camada íntima céls / (mm²)	-0,044	<0,01	-0,001	0,449	-0,011	0,430
Nitração camada média (%)	-0,059	0,741	-0,007	0,969	0,142	0,428
Nitração camada íntima (%)	-0,032	<0,01	0,026	0,052	0,042	0,02

Relativo à composição da placa, observamos que os indivíduos deste subgrupo não apresentaram diferença entre os Grupos III, IV e V e o grupo de referência, na porcentagem de colágeno na camada íntima. Foi demonstrado um número significativamente mais alto de linfócitos e macrófagos nas camadas adventícia e íntima no Grupo III, em relação ao grupo II de obstrução moderada. Porém, quando analisamos os grupos com grau de estenose crítico e sem trombo (Grupos IV e V), verificamos que o Grupo IV apresentou uma quantidade consideravelmente maior somente de macrófagos na adventícia, em relação ao Grupo II. Número maior de macrófagos na adventícia também encontrado no Grupo V que, além disso, também mostrou número significativamente maior quantidade de linfócitos na camada íntima, em relação ao grupo de referência. Na figura (14) observamos imagens representativas de linfócitos e macrófagos nas camadas adventícia e íntima.

Figura 14. Figura demonstrando a marcação de linfócitos na camada íntima (A), na camada adventícia (B) e macrófagos na camada íntima (C) e camada adventícia (D).

Ainda relativamente à composição da placa, verificamos que a porcentagem de proteínas nitradas foi significativamente mais baixa na camada íntima no Grupo V em relação ao Grupo II. Porém, quando confrontamos o grupo de referência com o grupo apresentando o desfecho mais grave, ou o Grupo III, observamos que a nitração proteica na camada íntima deste grupo é consideravelmente maior que a do grupo de referência, como pode ser observada na figura (15). Todos os resultados podem ser observados nas figuras 16 a 20.

Figura 15. Figura demonstrando marcação positiva para proteínas nitradas em um segmento do Grupo III e com ruptura de placa (acima) e em um segmento do Grupo II. (objetiva de 20x).

4.7.2 Análise comparativa entre segmentos dos indivíduos que apresentaram erosão como causa do trombo.

Quando os indivíduos com ruptura de placa foram analisados, notamos diferenças significativas nos Grupos III, IV e V em relação ao grupo de referência em um grande número de variáveis. Os indivíduos com erosão de placa como causa do trombo apresentaram resultados com um padrão muito diferente em relação ao subgrupo com trombo.

Aspectos morfométricos implicados na vulnerabilidade da placa não apresentaram diferença significativa entre o grupo com desfecho mais grave desta categoria (erosão de placa – Grupo III), os Grupos IV e V e o grupo de referência. Exceto a área do lúmen do Grupo V, que foi a única variável relacionada aos estudos morfométricos que aumentou de forma significativa em relação ao Grupo II dos indivíduos desta categoria. De forma interessante, verificamos que o número de linfócitos na camada adventícia foi significativamente mais baixo no Grupo V em relação ao Grupo II, foi a única diferença relativa ao número de células inflamatórias observada entre os grupos dos indivíduos desta categoria. No que diz respeito à composição da placa, nem a porcentagem de colágeno na camada íntima, tampouco a porcentagem da área ocupada por proteínas nitradas nas camadas média e íntima variaram nos Grupos III, IV e V quando comparados ao grupo de referência. Estes dados mostram que aspectos relacionados à vulnerabilidade das placas não se apresentam de forma difusa nos indivíduos que apresentaram erosão de placa como causa do trombo.

Os resultados podem ser observados nas figuras 16 a 20.

Tabela 9. Análise comparativa entre segmentos dos indivíduos que apresentaram erosão como causa do trombo.

	Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
	Estimativa (β)	p – valor	Estimativa (β)	p - valor	Estimativa (β)	p - valor
Área do lúmen (mm²)	-0,032	0,857	0,083	0,646	-0,589	<0,01
Área da placa (mm²)	0,040	0,155	0,054	0,104	-0,012	0,431
Área do vaso (mm²)	-0,041	0,27	-0,061	0,21	-0,032	0,35
Área core lipídico (mm²)	---	---	---	---	---	---
Core lipídico (%)	---	---	---	---	---	---
Colágeno (%)	-0,008	0,286	-0,011	0,094	-0,006	0,311
Linfócitos camada adventícia	0,007	0,158	0,014	0,121	0,022	0,038
Linfócitos camada íntima céls / (mm²)	0,040	0,155	0,054	0,104	-0,012	0,431
Macrófagos camada adventícia	-0,017	0,221	0,004	0,861	-0,006	0,725
Macrófagos camada íntima céls / (mm²)	-0,069	0,130	-0,018	0,734	-0,039	0,398
Nitração camada média (%)	-0,059	0,741	-0,007	0,969	0,142	0,428
Nitração camada íntima (%)	-0,008	0,69	0,008	0,67	-0,001	0,93

Figura 16. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis área do lúmen e área da placa, nos subgrupos erosão e ruptura.

Figura 17. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis área do vaso (área da LEE) e colágeno, nos subgrupos erosão e ruptura.

Figura 18. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis linfócitos na camada adventícia e na camada íntima, nos subgrupos erosão e ruptura.

Figura 19. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis macrófagos na camada adventícia e na camada íntima, nos subgrupos erosão e ruptura.

Figura 20. Box-plot: comparação dos Grupo III, IV e V com o Grupo II em relação às variáveis nitração proteica na camada média e na camada íntima, nos subgrupos erosão e ruptura.

4.8 Análise comparativo de placas não vulneráveis e vulneráveis

Este estudo incluiu placas não vulneráveis, ou fibroatheromas, placas vulneráveis, referidas como placas de capa fibrosa fina, e placas com ruptura ou erosão de placa. Com o intuito de demonstrar se houve diferença nos parâmetros morfométricos e na composição da placa, como na percentagem do colágeno, nos níveis de marcadores de estresse oxidativo e no número de células inflamatórias em placas vulneráveis, quando comparadas às placas não vulneráveis, ajustamos um modelo hierárquico e adicionamos ao efeito fixo o fator vulnerável e não vulnerável. O grupo das placas vulneráveis foi representado tanto pelas placas com capa fibrosa fina como pelas placas com ruptura e erosão de placa.

Áreas da placa e do vaso, apontadas como variáveis envolvidas no agravamento da vulnerabilidade e na instabilidade da placa, inesperadamente não apresentaram diferença quando comparadas ao grupo de placas não vulneráveis. A percentagem da área ocupada pelo core na placa foi maior no grupo das placas vulneráveis, como esperado. Em relação à inflamação, apenas o número de linfócitos na camada íntima apresentou-se mais alto em relação às placas não vulneráveis. Através da detecção da nitrotirosina, verificamos que os níveis de estresse nitroxidativo na camada íntima foram mais altos no grupo das placas vulneráveis. Os valores dos marcadores de estresse nitroxidativo na camada média não apresentaram diferença entre os grupos. (Tabela 10)

Tabela 10. Análise comparativa entre placas vulneráveis e não vulneráveis.

	Estimativa (β)	p - valor
Área do lúmen (mm²)	-0,021	0,893
Área da placa (mm²)	-0,03	0,841
Área do vaso (mm²)	-0,01	0,934
Core lipídico (%)	0,567	<0,001
Área core lipídico (mm²)	-0,03	0,841
Colágeno (%)	-0,14	0,55
Linfócitos camada íntima céls/(mm²)	0,475	<0,001
Linfócitos camada adventícia	---	---
Macrófagos camada íntima céls/(mm²)	0,01	0,972
Macrófagos camada adventícia	0,205	0,463
Nitração camada íntima (%)	0,392	0,002
Nitração camada média (%)	-0,174	0,588

Dentro do grupo das placas vulneráveis, se fôssemos considerar apenas as placas com capa fibrosa fina, e que não apresentam trombo, o poder estatístico seria baixo, devido ao reduzido número de observações. Independentemente disto, foi mostrada de forma descritiva o comportamento das variáveis deste grupo separadamente das placas que apresentam trombo (Figuras 21 a 23). Demonstrando a importância de uma análise mais profunda em trabalhos futuros com um número maior de placas.

Figura 21. Box plot: comparação das placas não vulneráveis, placas com trombo placas e vulneráveis em relação às variáveis área do lúmen, área da placa, área do vaso (área da LEE) e porcentagem da área ocupada pelo core lipídico na placa.

Figura 22. Box plot: comparação das placas não vulneráveis, placas com trombo e placas vulneráveis em relação às variáveis área do core, porcentagem de colágeno na camada íntima, linfócitos na camada adventícia e na camada íntima.

Figura 23. Box plot: comparação das placas não vulneráveis, placas com trombo e placas vulneráveis em relação às variáveis macrófagos na camada adventícia e na camada íntima e nitração proteica na camada média e íntima.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo utilizamos artérias humanas provenientes de necropsias para a caracterização de placas ateroscleróticas em relação à morfologia, à inflamação e à nitração proteica, sendo esta última considerada um importante marcador de estresse oxidativo. Nenhum estudo histopatológico quantificou e analisou a distribuição tecidual de proteínas nitradas em segmentos coronários de diferentes graus de vulnerabilidade de um mesmo indivíduo. Em nosso estudo, os diferentes grupos de segmentos foram expostos ao mesmo ambiente vascular e receberam tratamento idêntico, já que se originaram do mesmo coração, sendo considerados controlados internamente. Isso sustenta a validação dos nossos dados.

Apesar de estudos terem evidenciado a associação da hipertensão arterial sistêmica (KAPUKU, 2016), do diabetes mellitus (MARTIN-GALLÁN, 2003; SEGHROUCHNI, 2002), e do tabagismo com estresse oxidativo, estes fatores de risco tradicionalmente envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose não tiveram associação com a nitração proteica nas camadas média e íntima. O estresse oxidativo aumenta com o processo de envelhecimento, resultando em um aumento da produção das EROs ou decréscimo nas defesas antioxidantes. De acordo com Harman (1956, apud Skibska and Goraca 2015) os mecanismos de defesa antioxidantes se tornam menos eficazes a partir dos 40 anos de idades. O fato de a população do estudo ser composta somente por indivíduos de meia-idade e idosos contribui para a nitração proteica também não apresentar relação com a idade dos mesmos.

Embora estudos tenham observados menores concentrações de proteínas nitradas em vasos de mulheres, estes estudos foram feitos com mulheres antes da menopausa, protegidas pelo hormônio estrogênio, o que não corresponde as mulheres analisadas neste estudo (meia-idade e idosas). A explicação biológica mais comum para diferenças relacionadas ao sexo na nitração proteica está ligada aos hormônios, principalmente ao estrogênio. Relativo ao ambiente vascular, o estrogênio tem poder anti-inflamatório, que pode ser modulado pelo efeito antioxidante (Mccullough and Hurn 2003). Mulheres no período pós-menopausa que fazem a reposição hormonal

apresentam resposta similar às que estão no período pré-menopausa (Matteis et al. 1998). Então, mesmo diante das características das mulheres da população estudada (predominantemente idosas), seria possível sugerir que as artérias coronárias destas pacientes apresentassem um ambiente mais protegido. No entanto, os níveis de estresse oxidativo apresentaram independência em relação ao sexo.

Para uma caracterização robusta de segmentos de coronárias com obstrução leve, moderada, severa e dos segmentos com a presença de trombo, foram realizados estudos morfométricos nos mesmos. No presente trabalho, procuramos tanto por trombo parcial como oclusivo no Grupo III, já que ambos podem estar envolvidos na causa do óbito (FARB, BURKE, TANG, 1996).

Foi observado que a média da área da placa foi maior no Grupo III. Apesar disso, a área do lúmen deste grupo está mais preservada em relação aos Grupos IV e V. Isso pode ser explicado pela maior área do vaso em relação a estes grupos. O fenômeno do aumento do vaso é referido como remodelamento (positivo) arterial (S et al. 1987), e descreve um processo pelo qual a parede arterial se adapta a insultos patofisiológicos. Estudos destacaram que segmentos coronários que experimentam remodelamento positivo são mais propensos à ruptura (Martí and Cilla 2014). Independentemente do fato de não termos analisado a comparação da área do vaso de forma padronizada em relação a um segmento de referência (Bezerra et al. 2001), uma vez que não houve diferença entre os grupos em relação à distribuição nos principais segmentos coronarianos e à distância em relação ao óstio coronário, nosso estudo corrobora com este dado demonstrando maior área do vaso em segmentos com trombo. Achados de estudos com pacientes que foram submetidos à angiografia coronária prévia e posteriormente a um evento cardíaco confirmam que lesões ateroscleróticas não estenóticas representam a maioria das placas com ruptura. O nosso estudo patológico demonstrou resultados diferentes, mas que concordam com outros autores, (Qiao and Fishbein 1991) os quais demonstram que trombooses agudas ocorreram em locais com grave estreitamento luminal (79,53%).

Tanto a composição como o tamanho do core estão relacionados à vulnerabilidade da placa (Oliver et al. 1998). Os resultados encontrados demonstraram que a porcentagem de área ocupada pelo core na placa e a espessura da capa fibrosa estão fortemente correlacionadas de forma negativa. Isso indica que há um ponto em que o tamanho do core supera a rigidez da capa fibrosa (Dickson and Gotlieb 2003).

Nosso estudo demonstrou sincronia na quantidade de macrófagos e linfócitos entre as camadas adventícia e íntima nos diversos estágios da aterosclerose, mas já foi descrito que isso pode ocorrer desde os estágios iniciais da doença (Kortelainen and Porvari 2014), demonstrando a importância da adventícia em todo o processo da aterosclerose.

A contribuição do aumento do número de linfócitos na camada íntima para o aumento da área da placa estar relacionada com a formação de colágeno na matriz extracelular por estas células (HOFMANN, 2012). A correlação de macrófagos com o aumento da área do vaso já foi descrita, está relacionada com a liberação de proteinases (como por exemplo, as metaloproteinases) na camada íntima permitindo o alargamento do vaso (Dollery and Libby 2006).

Apesar de haver uma considerável associação e sobreposição entre estresse oxidativo e condições pró-inflamatórias, ainda não está totalmente esclarecido se estes podem ser controlados independentemente ou se afetam um ao outro reciprocamente (Narasimhulu et al. 2016). No nosso trabalho, rupturas de placa apresentaram alto número de células inflamatórias nas camadas adventícia e íntima, e também evidenciamos um aumento na porcentagem de proteínas nitradas. No entanto, não houve correlação entre a porcentagem de proteínas nitradas e o número de linfócitos ou macrófagos nos segmentos de nenhum dos grupos em que foram divididos, sugerindo a independência entre as condições de estresse oxidativo.

Na análise realizada entre os Grupos I e II, como esperado, foram observados valores maiores das medidas morfométricas, como área do lúmen, da placa e do vaso, e das células inflamatórias no Grupo II. O primeiro sinal

visível da aterogênese em humanos é o espessamento adaptativo intimal, um processo caracterizado pelo acúmulo intimal de células musculares lisas, embebidas em uma matriz extracelular de proteoglicanos, comumente situados em locais com fluxo sanguíneo alterado hemodinamicamente (Virmani et al. 2000). A transição para a forma mais inicial de uma lesão aterosclerótica, denominada espessamento intimal patológico está associada com alterações morfométricas e bioquímicas das células musculares lisas e da matriz extracelular (Kolodgie et al. 2007). Apesar disto, o presente estudo demonstrou extensa nitração proteica anteriormente a esta transição, em segmentos em que ainda não estava presente uma lesão aterosclerótica, sendo que a nitração de proteínas foi significativamente mais alta que no Grupo II.

O *shear stress*, força de cisalhamento exercida pelo fluxo sanguíneo na parede do vaso, constitui um importante fator hemodinâmico envolvido na aterosclerose. Em ambientes vasculares com lesões intimaes há a ocorrência de *shear* estresse endotelial baixo e oscilatório (Gimbrone 1999). Contribuindo para esta informação, foi relatado que a presença de uma lesão estenótica em um ramo coronário e em suas ramificações leva a uma redução no volume de fluxo através deste ramo, que reduz o *shear* estresse na área (Chaniotis et al. 2010). Diante disto, assumimos que o ambiente vascular a que os segmentos da população deste estudo estão submetidos, apresenta condições de *shear stress* alterado. Desta forma, apesar da ausência de lesão intimal, alterações no fluxo podem estar envolvidas na estimulação da produção de EROs pelas células endoteliais (Mcnally et al. 2003), levando à promoção de nitração proteica. Além disso, a nitração proteica mais alta no Grupo reforça a ideia de que esta modificação proteica não está envolvida apenas no progresso da aterosclerose, mas também na sua iniciação.

Determinados resultados do presente estudo, previamente discutidos, ressaltam a heterogeneidade das placas na doença aterosclerótica e sustentam o conceito de que vários mecanismos são susceptíveis de estarem envolvidos na formação do trombo. Assim, destacamos a importância da quantificação do colágeno intimal, que está entre as abordagens utilizadas na caracterização da placa (Schaar et al. 2003).

A degradação do colágeno é uma das causas da desestabilização da placa (SHAH, FALK, BADIMON, 1995). O colágeno é o maior componente estrutural da matriz extracelular da parede arterial, com predominância dos tipos I e III (Katsuda et al. 1992), sendo que o tipo I contribui para a rigidez vascular e o tipo III confere extensibilidade (Kong et al. 2013) encontrou expressão desproporcional entre os tipos I e III de colágeno em placas de pacientes que sofreram IAM, em que uma perda de colágeno tipo III levou a redução das fibras tipo I maduras.

A coloração de Picrosírius é uma técnica histológica amplamente usada na visualização da distribuição do colágeno em secções de tecidos pela utilização de microscópio de luz comum ou de luz polarizada (Whittaker et al. 1994). Contudo, a quantificação do colágeno por microscopia de luz polarizada é bastante elaborada, não sendo aplicada para uma avaliação rápida com uma visão geral por secção, a qual é considerada essencial para a análise abrangente de tecido fibrótico distribuído de forma não homogênea em vários tecidos (Vogel et al. 2015).

Para a análise da distribuição da quantidade total de colágeno na camada íntima dos segmentos deste estudo utilizamos a microscopia de luz comum. Com a utilização desta técnica evidenciamos que não houve diferença nas médias porcentagens desta variável na camada íntima entre os grupos de segmentos com diferentes graus de vulnerabilidade em nenhum dos grupos de indivíduos. Contudo, podemos assegurar somente que a quantidade total de colágeno não variou, não sendo possível afirmar que não houve variabilidade em relação à maturação do colágeno entre os segmentos.

Avanços recentes na pesquisa da aterosclerose revelaram novos alvos no imageamento molecular, entre estes os alvos está o estresse oxidativo. Este, quando observado em lesões pode contribuir para a aterosclerose promovendo oxidação lipídica e morte celular, além da sustentação da resposta inflamatória (Quillard and Libby 2016).

Neste trabalho, destacamos também distribuições distintas da inflamação entre as categorias dos indivíduos que apresentaram ruptura de

placa e erosão de placa no Grupo III. Os indivíduos pertencentes a categoria que apresentou ruptura de placa no Grupo III foram caracterizados pelo aumento das médias do número de células inflamatórias nas diferentes camadas do vaso, como, por exemplo, de macrófagos na camada adventícia e linfócitos na camada íntima em placas multifocais. Isso reforça a ideia de que, pelo menos nestes indivíduos, a doença coronária reflete um processo patofisiológico generalizado com um potencial de desestabilização de placas através da árvore coronariana (Naghavi et al. 2003; Tabas et al. 2007; Moore and Tabas 2011; Gomez and Owens 2012).

Na categoria dos indivíduos em que o Grupo III apresentou erosão, além de as médias do número de células inflamatórias terem apresentado valores mais baixos em todos os grupos, não foi conferida uma variabilidade entre os mesmos. A hipótese é que o processo envolvido na erosão da placa seja pontual. Erosão de placa é identificada quando o segmento arterial com trombo não revela uma ruptura (Virmani et al. 2000). O desnudamento endotelial da placa aterosclerótica expõe a matriz extracelular ao sangue. A causa deste desnudamento focal não é totalmente conhecida, mas entre as possibilidades estão o vasoespasmo e o cisalhamento elevado no local (van der Wal et al. 1994), induzindo a apoptose das células endoteliais (Durand et al. 2004). Diante destas informações podemos sugerir que as causas destes estados patológicos diferem, já que à primeira vista a erosão não depende da inflamação, e que estes requerem abordagens preventivas e de tratamento diferenciadas.

Avanços recentes na pesquisa da aterosclerose revelaram novos alvos no imageamento molecular, entre estes os alvos está o estresse oxidativo. Este, quando observado em lesões pode contribuir para a aterosclerose promovendo oxidação lipídica e morte celular, além da sustentação da resposta inflamatória (Quillard and Libby 2016). Apenas o grupo com ruptura de placa demonstrou aumento de proteínas nitradas, sendo que o grupo com erosão de placa não apresentou diferença significativa em relação ao grupo de referência. Isso corrobora com o conceito de que a erosão reflete um fenótipo de uma placa não vulnerável (Campbell et al. 2014).

Estudos realizados a partir de necropsias que confirmaram a presença de múltiplas placas, tanto vulneráveis como aquelas que sofreram ruptura, em ramos que não estão envolvidos com o evento agudo coronariano (GOLDSTEIN et al. 2000) reforçam a importância da qualificação das placas instáveis/vulneráveis e não vulneráveis.

A transição de placas não vulneráveis para placas vulneráveis, está em constante debate (Otsuka et al. 2014). Mecanismos patológicos como a inflamação e o aumento do *core* lipídico estão envolvidos na vulnerabilidade da placa (Kolodgie et al. 2003; Hansson 2005; Narula and Strauss 2007) e são demonstrados pelos nossos resultados. No entanto, morfometricamente, placas vulneráveis e não vulneráveis não apresentaram diferença, a despeito que a área da LEE (NARULA, 2013), por exemplo, já tenha sido descrita como um fator importante no desenvolvimento da vulnerabilidade da placa.

Os resultados destacam a relação entre proteínas nitradas e vulnerabilidade da placa, já que foi observada na camada íntima o aumento destas proteínas no grupo das placas vulneráveis.

Em suma, a doença aterosclerótica é um processo com grandes implicações clínicas cujo diagnóstico está em constante evolução, e biomarcadores adicionais poderão contribuir nesse sentido.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Considerações finais

Foi possível identificar diferenças entre a composição de placas com ruptura e placas com erosão, e demonstrar que a erosão de placa, apesar de grave, se assemelha a uma placa não vulnerável em relação à estrutura e aos níveis de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

Observamos também que marcadores de inflamação e de estresse oxidativo foram diferencialmente distribuídos em placas com graus de vulnerabilidade distintos, sendo que foi observado aumento dos mesmos em placas com características de vulnerabilidade.

Esses marcadores possuem potencial em auxiliar na prática clínica para melhor diagnóstico e prognóstico de lesões ateroscleróticas. Demais estudos com maior número amostral devem ser realizados para confirmar esses achados.

7 REFERÊNCIAS

- Barbosa M. Diretrizes das indicações da ecocardiografia. *Arq Bras Cardiol* 2009;93(6 supl3):e265-e302. 2009;93(6 supl.3):e265–302.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1996;271:C1424–37.
- Bezerra HG, Higuchi MDL, Gutierrez PS, Palomino SA, Silvestre JMLC, Libby P, et al. Atheromas that cause fatal thrombosis are usually large and frequently accompanied by vessel enlargement. *Cardiovasc Pathol*. 2001;10(4):189–96.
- Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Mann GE. Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J Physiol* [Internet]. 1996;490 (Pt 1):229–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1158659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Buchanan JR, Kleinstreuer C, Hyun S, Truskey GA. Hemodynamics simulation and identification of susceptible sites of atherosclerotic lesion formation in a model abdominal aorta. *J Biomech*. 2003;36(8):1185–96.
- Campbell IC, Suever JD, Timmins LH, Veneziani A, Vito RP, Virmani R, et al. Biomechanics and inflammation in atherosclerotic plaque erosion and plaque rupture: Implications for cardiovascular events in women. *PLoS One*. 2014;9(11).
- Chaniotis AK, Kaiktsis L, Katritsis D, Efstathiopoulos E, Pantos I, Marmarellis V. Computational study of pulsatile blood flow in prototype vessel geometries of coronary segments. *Phys Medica* [Internet]. 2010;26(3):140–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmp.2009.03.004>
- Deeb RS, Hao G, Gross SS, Lainé M, Qiu JH, Resnick B, et al. Heme catalyzes tyrosine 385 nitration and inactivation of prostaglandin H2 synthase-1 by peroxynitrite. *J Lipid Res* [Internet]. 2006;47(5):898–911. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470026>
- Dickson BC, Gotlieb AI. Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. 2003;12:237–48.
- Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. 2006;69:625–35.
- Durand E, Scoazec A, Lafont A, Boddaert J, Al Hajzen A, Addad F, et al. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation: A clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion. *Circulation*. 2004;109(21):2503–6.
- Ettenson DS, Gotlieb AI. Basic Fibroblast Growth Factor Is a Signal for the Initiation of Centrosome Redistribution to the Front of Migrating Endothelial Cells at the Edge of an In Vitro Wound. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:515–21.
- Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 SUPPL.):0–5.
- Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn A V., Virmani R. Update on acute coronary syndromes: The pathologists' view. *Eur Heart J*. 2013;34(10):719–28.
- Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang Y, Mannan P, Smialek J, et al. Coronary Plaque Erosion Without Rupture Into a Lipid Core. *Circulation*. 1996;93(7).
- Fields A, Frostegård J, Ulfgrén A, Nyberg P, Hedin U, Sw J, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques : dominance of pro-inflammatory (Th1

-) and macrophage- stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;9150(99):7–8.
- Gimbrone MA. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1999;82(2):722–6.
- GOLDSTEIN JAAG, EMETRIOU DED, RINES CILG, ICA MAP, HOUKFEH MAS, EILL WIWO. Multiple Complex Coronary Plaques in Patients With Acute Myocardial Infarction. *New Engl J Med*. 2000;343:915–22.
- Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2012;95(2):156–64.
- Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary Artery Calcium Combined With Framingham Score for Risk Prediction in Asymptomatic Individuals. *Jama [Internet]*. 2004;291(2):210–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722147>
- Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med [Internet]*. 2005;353(4):429–30. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200507283530425>
- Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med [Internet]*. 1989;170(5):1595–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509626> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2189494>
- Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol [Internet]*. 2011;12(3):204–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2001> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321594>
- Hassan M, Said K, Rizk H, ElMogy F, Donya M, Houseni M, et al. Segmental peri-coronary epicardial adipose tissue volume and coronary plaque characteristics. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;(ii).
- Hermansson A, Ketelhuth DFJ, Strodthoff D, Wurm M, Hansson EM, Nicoletti A, et al. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exp Med [Internet]*. 2010;207(5):1081–93. Available from: <http://jem.rupress.org/content/207/5/1081>
- Huynh J, Nishimura N, Rana K, Peloquin JM, Joseph P, Montague CR, et al. Age-Related Intimal Stiffening Enhances Endothelial Permeability and Leukocyte Transmigration. *Sci Transl Med*. 2011;3(112).
- Kang SJ, Mintz GS, Pu J, Sum ST, Madden SP, Burke AP, et al. Combined IVUS and NIRS detection of fibroatheromas: Histopathological validation in human coronary arteries. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8(2):184–94.
- Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arter Thromb [Internet]*. 1992;12(4):494–502. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1373075
- Kolodgie FD, Burke a P, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J, et al. The thin-cap

- fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* [Internet]. 2001;16(5):285–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11584167>
- Kolodgie FD, Burke AP, Nakazawa G, Virmani R. Is Pathologic Intimal Thickening the Key to Understanding Early Plaque Progression in Human Atherosclerotic Disease? *Arter Thromb Vasc Biol*. 2007;27:986–90.
- Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2316–25.
- Kong C, Yun X, Cheng C, Chew H, Neng C. Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction : tissue microarray detection of collagen I , collagen III and elastin levels. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;16(October 2012):11–5.
- Kortelainen ML, Porvari K. Adventitial macrophage and lymphocyte accumulation accompanying early stages of human coronary atherogenesis. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2014;23(4):193–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2014.03.001>
- Van Lammeren GW, Reichmann BL, Moll FL, Bots ML, De Kleijn DP V, De Vries JPPM, et al. Atherosclerotic plaque vulnerability as an explanation for the increased risk of stroke in elderly undergoing carotid artery stenting. *Stroke*. 2011;42(9):2550–5.
- Leeuwenburgh C, Hardy MM, Hazen SL, Wagner P, Oh-ishi S, Steinbrecher UP, et al. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem*. 1997;272(3):1433–6.
- Lesko L, Atkinson Jr AJ. Development and Use of in Developing Countries. *Fish*. 2001;41:347–66.
- Libby P. Coronary Syndromes. 2014;114(12):365–72.
- Libby P, Lichtman A, Hansson G. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. *Immunity*. 2013;38(6):1092–104.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* [Internet]. 2011;473(7347):317–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593864>
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111(25):3481–8.
- Loppnow H, Libby P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest* [Internet]. 1990;85(3):731–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=296489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lukanova D, Nikolov N, Genova K, Stankev M, Valcheva E. The accuracy of noninvasive imaging techniques in diagnosis of carotid plaque morphology. *Röntgenol i Radiol* [Internet]. 2014;53(4):258–65. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L605630278>

- Lusis A. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233–41.
- Maiellaro K, Taylor WR. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):640–8.
- Martí MA, Cilla M. Mathematical modelling of atheroma plaque formation and development in coronary arteries. 2014;
- Martin KH, Lindsey BD, Ma J, Nichols TC, Jiang X, Dayton PA. Ex Vivo Porcine Arterial and Chorioallantoic Membrane Acoustic Angiography Using Dual-Frequency Intravascular Ultrasound Probes. *Ultrasound Med Biol* [Internet]. 2016;(Jackson 2011):1–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562916300448>
- Matteis M, Troisi E, Monaldo BC, Caltagirone C, Silvestrini M. Age and Sex Differences in Cerebral Hemodynamics A Transcranial Doppler Study. *Stroke*. 1998;29:963–7.
- Mccullough LD, Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection : an integrated view. 2003;14(5):228–35.
- Mcnally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Jo H, et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD (P) H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress Vascular Signaling by Free Radicals Role of xanthine oxidoreductase and NAD (P) H oxidase in endothelial superoxide prod. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2003;285:H2290–7.
- Megnien JL, Simon a, Gariépy J, Denarie N, Cocaul M, Linhart a, et al. Preclinical changes of extracoronary arterial structures as indicators of coronary atherosclerosis in men. *J Hypertens* [Internet]. 1998;16(2):157–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535142>
- MJ B, D D, JG J, M G, J S, E H, et al. Diagnostic performance of 64-multidetector row coronary computed tomographic angiography for evaluation of coronary artery stenosis in individuals without known coronary artery disease: results from the prospective multicenter ACCURACY (Assessment by Coro. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(21):1724–32.
- Moncada S, Higgs E a. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991;21(4):361–74.
- Moore KJ, Tabas I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cell* [Internet]. 2011;145(3):341–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3111065/>
- Mulder WJM, Strijkers GJ, van Tilborg GAF, Griffioen AW, Nicolay K. Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging. *NMR Biomed*. 2006;19(1):142–64.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. Review : Current Perspective From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies : Part I Vulnerable Patient : Part I. 2003;(439):1664–73.
- Narasimhulu CA, Fernandez-ruiz I, Selvarajan K, Jiang X, Sengupta B. ScienceDirect Atherosclerosis — do we know enough already to prevent it ? 2016;(Ldl):92–102.

- Narula J, Strauss HW. News and views. 2007;13(5):532–4.
- Nie X, Laforest R, Elvington A, Randolph GJ, Zheng J, Voller T, et al. PET/MR imaging of hypoxic atherosclerosis using ⁶⁴Cu-ATSM in a rabbit model. *J Nucl Med* [Internet]. 2016; Available from: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.116.172544>
- Oliver MF, Medicine C, Heart N. The atheromatous lipid core. *Eur Heart J*. 1998;(19):16–8.
- Osiecki H. The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. *Altern Med Rev* [Internet]. 2004;9(1):32–53. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/15005643> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005643>
- Otsuka F, Joner M, Prati F, Virmani R, Narula J. Clinical classification of plaque morphology in coronary disease. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2014;11(7):379–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776706> \n <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2014.62>
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2007;87(1):315–424. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2248324&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pessotti CFX, Jatene MB, Jatene IB, Oliveira PM, Succi FMP, Moreira V de M, et al. Comparative trial of the use of antiplatelet and oral anticoagulant in thrombosis prophylaxis in patients undergoing total cavopulmonary operation with extracardiac conduit: echocardiographic, tomographic, scintigraphic, clinical and laboratory analysis. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [Internet]. 2014;29(4):595–605. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=25714215>
- Qiao J, Fishbein MC. The Severity of Coronary Atherosclerosis at Sites of Plaque Rupture With Occlusive Thrombosis. 1991;17(5):1138–42.
- Quillard T, Libby P. Molecular Imaging of Atherosclerosis for Improving Diagnostic and Therapeutic Development ER. 2016;
- Ramsey SA, Gold ES, Aderem A. A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol Med*. 2010;2(3):79–89.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* [Internet]. 2009;373(9670):1175–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60447-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60447-5)
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* [Internet]. 1993;362(6423):801–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8479518>
- Rudd JHF, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose positron

- emission tomography. *Circulation*. 2002;105(23):2708–11.
- S G, E W, CK Z, R S, GJ. K. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316(22):1371–5.
- Sacks HS, Fain JN. Human epicardial adipose tissue: A review. *Am Heart J*. 2007;153(6):907–17.
- Schaar JA, Korte CL De, Mastik F, Strijder C, Pasterkamp G, Boersma E, et al. Intravascular Elastography. 2003;2636–42.
- Schmidt P, Youhnovski N, Daiber A, Balan A, Arsic M, Bachschmid M, et al. Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem*. 2003;278(15):12813–9.
- Skibska B, Goraca A. The Protective Effect of Lipoic Acid on Selected Cardiovascular Diseases Caused by Age-Related Oxidative Stress. 2015;2015.
- Stary HC, Chandler a B, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Jr WI, et al. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis Atherosclerotic Lesion Types Advanced by Histology Type IV Lesions. *Circulation* [Internet]. 1995;92(5):1355–74. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/92/5/1355.long>
- Steinberg D, Witztum JL. Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2010;30(12):2311–6. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.108.179697>
- Tabas I, Williams KJ, Bor??n J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007;116(16):1832–44.
- Underwood SR, Anagnostopoulos C, Cerqueira M, Ell PJ, Flint EJ, Harbinson M, et al. Myocardial perfusion scintigraphy: The evidence - A consensus conference organised by the British Cardiac Society, the British Nuclear Cardiology Society and the British Nuclear Medicine Society, endorsed by the Royal College of Physicians of London and t. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(2):261–91.
- Virmani R, Virmani R, Kolodgie FD, Kolodgie FD, Burke AP, Burke AP, et al. Lessons From Sudden Coronary Death. *Arterioscler Thromb*. 2000;1262–75.
- Vogel B, Siebert H, Hofmann U, Frantz S. Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX*. 2015;2:124–34.
- van der Wal a C, Becker a E, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89(1):36–44.
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light *. 1994;410(November 1991):397–410.
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to

peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996;93(13):6770–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Yamamoto S, Yancey PG, Zuo Y, Ma L-J, Kaseda R, Fogo AB, et al. NIH Public Access. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):2856–64.

APÊNDICE 1 - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa

3723/11/141

Ao

Dr. Alexandre da Costa Pereira

Comissão Científica do Incor

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **20.06.2012** tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **482/11**, intitulado: **“Identificação de proteínas nitradas com potencial diagnóstico de vulnerabilidade de placas ateroscleróticas”**, contempla o **sub-projeto** intitulado: **“Correlação de características histológicas de placas ateroscleróticas coronarianas com fatores de risco e a presença de biomarcadores”** que será **Dissertação de Mestrado** da(o) aluna(o) **Bianca Kiers**, tendo como **orientador(a) Dr. Alexandre da Costa Pereira**.

CEP-FMUSP, 22 de junho de 2012.

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

25/06/12

Cearine

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa