



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE
CURSO DE FARMÁCIA

**RELAÇÃO DA ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA COM MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS E O ÓXIDO NÍTRICO CIRCULANTES EM
PACIENTES AMBULATORIAIS IDOSOS DO DISTRITO FEDERAL**

GLEICIANE GONTIJO DE AVELAR

CEILÂNDIA, DF

2017

GLEICIANE GONTIJO DE AVELAR

**RELAÇÃO DA ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA COM MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS E ÓXIDO NÍTRICO CIRCULANTES EM PACIENTES
AMBULATORIAIS IDOSOS DO DISTRITO FEDERAL**

Monografia submetida à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília – UnB/FCE, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Professor Doutor Otávio de Tolêdo Nóbrega

CEILÂNDIA, DF

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GG641r Gontijo de Avelar, Gleiciane
RELAÇÃO DA ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA COM MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS E O ÓXIDO NÍTRICO CIRCULANTES EM
PACIENTES AMBULATORIAIS IDOSOS DO DISTRITO FEDERAL /
Gleiciane Gontijo de Avelar; orientador Otávio de
Tolêdo Nóbrega. -- Brasília, 2017.
42 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade
de Brasília, 2017.

1. aterosclerose. 2. inflamação. 3. interleucina
17. 4. óxido nítrico. 5. idoso. I. de Tolêdo Nóbrega,
Otávio , orient. II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE
CURSO DE FARMÁCIA

**RELAÇÃO DA ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA COM MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS E ÓXIDO NÍTRICO CIRCULANTES EM PACIENTES
AMBULATORIAIS IDOSOS DO DISTRITO FEDERAL**

GLEICIANE GONTIJO DE AVELAR

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Otávio de Tolêdo Nóbrega

Prof.^aDr^a.: Carla Nunes de Araújo
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr.: Eduardo Antônio Ferreira
(FCE/ Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA,
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e por me manter forte até aqui plena de minhas faculdades mentais, com perfeitas capacidades físicas e emocionais para alcançar os meus objetivos.

Agradeço meus pais, Amilton e Célia, e meu irmão Gustavo, por representarem um pilar essencial na minha vida, sendo por toda a minha existência até aqui, responsáveis por fornecer os mais importantes subsídios.

Aos irmãos que a vida me proporcionou escolher Alisson César e Maíza Gomes, meus pupilos e exemplos de profissionais da saúde que além de sempre me orientarem em assuntos pertinentes a graduação e postura profissional, compartilharam comigo dos mais diversos sentimentos e experiências durante todos esses anos.

Ao meu amado companheiro, Charles Antônio, agradeço por toda compreensão, afeto e carinho destinados em a mim em todos os momentos e por tudo que representa na minha vida.

Aos amigos de juventude Lana Cristina, Fernanda Abreu, Vanessa Amâncio, Valéria Amâncio, Wlysses Gonzaga e Dheison Alves agradeço por todo apreço e suporte destinados a mim tanto em dias comemorativos quanto em dias difíceis.

Ao meu orientador, professor e amigo, Otávio Nóbrega, agradeço por todo tempo, paciência, organização e dedicação destinada a mim por todos esses anos de trabalho com sua excelente equipe. Em especial agradeço por todo conhecimento adquirido até aqui, pelos conselhos e por representar para mim um exemplo de profissional.

Aos diretores, coordenadores, professores e técnicos da Faculdade de Ceilândia agradeço por viabilizarem a compreensão de diversas questões referentes a ética no serviço público, ao serviço do profissional de saúde que, inclusive, demonstraram no âmbito farmacêutico os desafios e conquistas da profissão.

A todos os funcionários da Faculdade de Ceilândia que sempre foram solícitos em quaisquer situações. Em especial agradeço aos funcionários da segurança e dos serviços gerais que sempre serviram com prontidão a qualquer pessoa que necessitasse de seu serviço ou atenção.

Aos Centros Acadêmicos de Farmácia, Enfermagem, Terapia Ocupacional, Fisioterapia, Fonoaudiologia e Saúde coletiva que, juntos, contribuíram para o crescimento social, político e estudantil de todos os alunos que ali se fizeram presente.

Aos companheiros de universidade Danylo Vilaça, Breno Cardoso, Nathalia Rodrigues, Thaís Morais, Wilcelly, Wallisson Luan e demais alunos agradeço por todos os debates, atividades de classe e extraclasse, essenciais para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos companheiros de curso, em especial a Fernando Evaristo que, enquanto foi pertinente, representou para mim uma importante e valorosa companhia no ambiente universitário.

Por fim, agradeço todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização da minha graduação em uma universidade amplamente qualificada e bem reconhecida nacionalmente.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante. ”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Introdução: As doenças cardiovasculares (DCV) ainda são consideradas a principal causa de morte no mundo. Tendo conhecimento de que o principal achado clínico associado ao desenvolvimento de uma DCV corresponde à aterosclerose, o presente estudo buscou avaliar a possível associação entre as variáveis clínicas, bioquímicas e inflamatórias com níveis circulantes totais de óxido nítrico (NOx) em pacientes idosos que não apresentavam nenhum quadro inflamatório grave ou doença com elevada progressão. **Métodos:** 168 indivíduos idosos participantes do estudo de coorte prospectivo denominado Prognóstico e Terapêutica em Geriatria (ProTeGer) tiveram traçados os seus perfis clínicos, bioquímicos, antropométricos e metabólicos, sem distinção de sexo, que seguiram os critérios de inclusão do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Além disso, os níveis circulantes de 10 mediadores inflamatórios e de NO foram medidos. Por testes de correlação de Spearman ou Pearson, foram analisadas características categóricas ou contínuas (respectivamente) de acordo com NO sérico. Foi adotado $P < 0,005$ como limite de significância conforme convenção de Bonferroni. **Resultados:** Apesar de não terem sido encontradas associações entre o óxido nítrico (NO) e variantes clínicas, bioquímicas e antropométricas, foi demonstrada uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de NO e os níveis do mediador inflamatório Interleucina (IL)17a ($r = -0,236$; $P = 0,004$). **Conclusão:** Sendo o NOx um regulador das IL 17, uma interleucina inflamatória, infere-se que essa molécula gasosa corresponde a um fator protetor para aterosclerose, quando expresso em concentrações ideais.

Palavras-chave: aterosclerose, inflamação, interleucina 17, óxido nítrico, idoso

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular diseases (CVD) are still considered the leading cause of death in the world. Bearing in mind that the main clinical finding associated with the development of CVD is atherosclerosis, the present study sought to evaluate the possible association between clinical, biochemical and inflammatory variables with total circulating levels of nitric oxide (NO_x) in elderly patients who did not present a severe inflammatory or disease progression. **Methods:** 168 elderly individuals enrolled in the prospective cohort study, Prognostic and Therapeutic in Geriatrics (ProTeGer), had their clinical, biochemical, anthropometric and metabolic profiles, without gender distinction, which followed the inclusion criteria of the study and signed a term of Free and informed consent. In addition, circulating levels of 10 inflammatory mediators and NO mediators were measured. Through the Spearman or Pearson correlation tests, categorical or continuous characteristics (respectively) were analyzed according to serum NO. $P < .005$ was adopted as the limit of significance according to the Bonferroni convention. **Results:** Although there were no associations between nitric oxide (NO) and clinical, biochemical and anthropometric variants, a negative correlation was observed between plasma NO concentrations and levels of the inflammatory mediator Interleukin (IL) 17a ($r = -0.236$; $P = 0.004$). **Conclusion:** Being the NO_x a regulator of IL-17, an inflammatory interleukin, it is inferred that this gas molecule corresponds to a protective factor for atherosclerosis, when expressed in ideal concentrations.

Key words: atherosclerosis, inflammation, interleukin 17, nitric oxide, elderly

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 15 |
| 2. Justificativa | 23 |
| 3. Objetivos | 24 |
| 3.1 Objetivo Geral | 24 |
| 3.2 Objetivo Específico..... | 24 |
| 4. Metodologia | 25 |
| 4.1 Tipo de Estudo | 25 |
| 4.2 Procedimento clínicos | 25 |
| 4.3 Avaliação Laboratorial..... | 26 |
| 4.4 Mensuração do NO/nitrito/nitrato total..... | 27 |
| 4.5 Dosagem de citocinas | 27 |
| 4.6 Análises estatísticas..... | 28 |
| 5. Resultados | 29 |
| 6. Discussão | 35 |
| 7. Conclusão | 37 |
| 8. Referências Bibliográficas | 38 |

ANEXO I – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO II- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Processo de formação de placa aterosclerótica nas artérias (Adaptado). | 14 |
| Figura 2 – Artérias comumente acometidas por aterosclerose..... | 15 |
| Figura 3 – Principais citocinas envolvidas no processo inflamatório. | 18 |
| Figura 4 – Formação do óxido nítrico pela Via L-arginina (Adaptado)..... | 19 |
| Figura 5 – Comparação dos níveis circulantes de NOx através dos indivíduos agrupados em aumento dos quartis de níveis IL17a..... | 32 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e metabólicas da amostra investigada..... 32
- Tabela 2.** Análise da correlação dos níveis absolutos de citocinas séricas, bem como de escores de óxido nítrico através de características clínicas e bioquímicas dos 168 indivíduos na admissão. 33
- Tabela 3.** Análise de correlação entre os níveis brutos de citocinas séricas e escores de óxido nítrico no soro dos 168 pacientes no momento da internação..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR: Receptor para hidrocarboneto de arilo

CA: Circunferência abdominal

CT: Colesterol total

DCV: Doença cardiovascular

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

EDRF: Fator de relaxamento do endotélio

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

HA: Hipertensão Arterial

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HbA1c: Hemoglobina Glicada

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HOMA: Avaliação do modelo homeostático

IL: Interleucina

IFN: Interferon

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NFk β : Fator nuclear kappa β

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PC R: Proteína C - reativa

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SBD: Sociedade brasileira de diabetes

TNF: Fator de necrose tumoral

TSH: Hormônio estimulante da Tireóide

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) podem ser classificadas como uma variedade de doenças responsáveis por desencadear distúrbios no coração, artérias, veias e/ou capilares sanguíneos¹. Sendo definida como uma classe de doenças, as DCV incluem as doenças das artérias coronárias, infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais e angina, por exemplo. Dentre os seus variados tipos, cada doença apresenta suas particularidades com sintomatologia e níveis de prevalência variados. Apesar de todas essas diferenças, comumente é observado que a população mais acometida por DCV corresponde aquela em que os indivíduos apresentam idade mais avançada¹.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como idoso o indivíduo que, cronologicamente, apresenta idade igual ou superior a 60 anos². Neste contexto, o envelhecimento populacional, a nível mundial, acrescido de hábitos de vida pouco saudáveis, tem ocasionado crescente prevalência de DCV³. Estudos apontam que óbitos por DCV ocorrem, em sua maioria, em razão de doenças coronárias, isto é, devido a depósito gorduroso ou ceroso no interior das artérias que as tornam rígidas e irregulares. Outro dado importante a ser observado é que o maior contingente acometido por essas doenças corresponde aos países de baixa e média renda⁴. Dados da OMS revelam que, nas últimas décadas, dentre as 56,9 milhões de mortes ocorridas, as DCV foram responsáveis por 30,5% dessa mortalidade, permanecendo como principal causa de morte no mundo e uma importante questão de saúde pública a ser considerada⁵.

Nestas circunstâncias, o principal achado clínico associado ao desenvolvimento de DCV corresponde à aterosclerose⁶, que é definida de acordo com SPOSITO *et al.*, 2007, como “uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre”⁷. Sendo caracterizada pelo depósito de placas de gordura e cálcio no interior das artérias (Figura 1), a aterosclerose é capaz de dificultar ou obstruir a circulação sanguínea nos órgãos desencadeando diversos sintomas e agravos na saúde que variam de acordo com seu local de acometimento (Figura 2), fatores de risco modificáveis e não modificáveis¹.



Figura 1 – Processo de formação de placa aterosclerótica nas artérias (Adaptado).
 Fonte: <https://br.123rf.com/photo_38473541_a-forma%C3%A7%C3%A3o-de-aterosclerose.-art%C3%A9ria-saud%C3%A1vel-e-art%C3%A9rias-saud%C3%A1veis,-mostrando-passo-a-passo-co.html> Acesso em 23 de março de 2017.

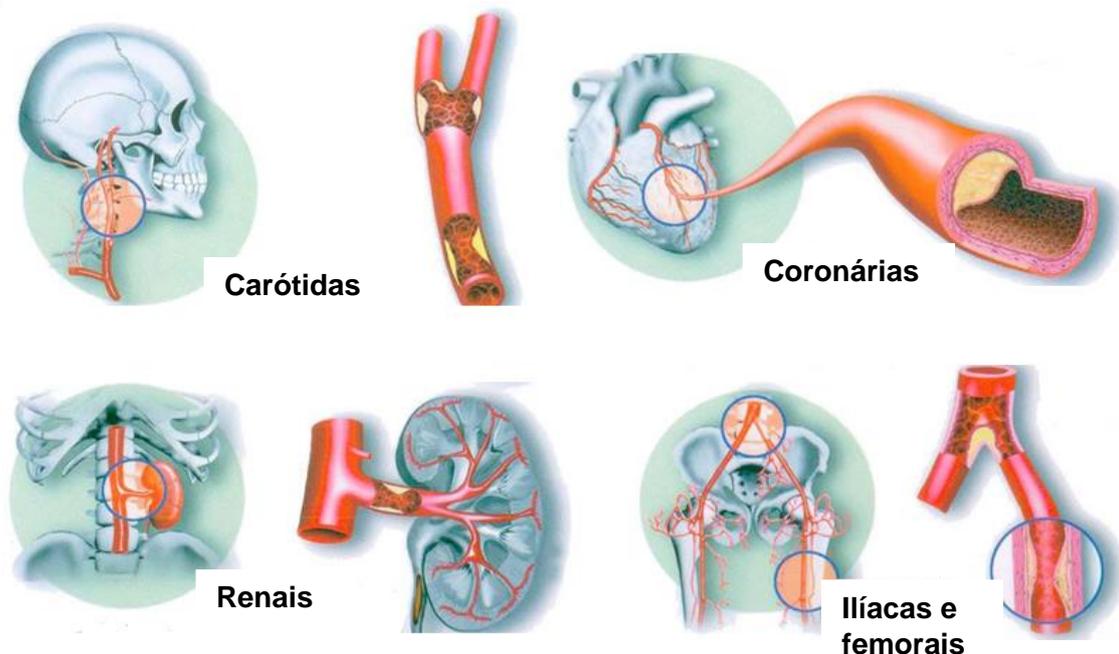


Figura 2 – Artérias comumente acometidas por aterosclerose (Adaptado).
 Fonte: <<http://claudiogabriele.com.br/cirurgias-arteriais/cirurgia-de-carotidas-aterosclerose/>> Acesso em 23 de março de 2017.

Dentre as principais causas da aterosclerose, podem ser consideradas aquelas que envolvem hábitos nocivos à saúde como, por exemplo, alcoolismo, tabagismo, sedentarismo e má alimentação. Tais fatores são capazes de gerar, dentre outras doenças, acúmulo de colesterol “ruim”, isto é, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sobre elementos fibrosos da camada íntima das artérias com consequente ativação focal do sistema imunológico^{6,8}. Rabelo *et al.*, 2001⁹, demonstrou em seu estudo que a gravidade e o avanço do processo aterosclerótico, além de estar relacionado à duração dos fatores de risco, também está associado à quantidade e intensidade dos

mesmos. Além disso, ao contrário do que se esperava, placas fibrosas e estrias gordurosas podem eventualmente ser observadas já no início da fase adulta, caracterizando esta doença não mais como exclusiva de indivíduos idosos^{9;10}.

Outras causas ateroscleróticas são advindas de fatores genéticos que, ao contrário das descritas acima, não podem ser evitadas nem tão pouco modificadas pelo indivíduo acometido. Exemplo disso corresponde à expressão exacerbada de células e/ou moléculas do sistema imune responsáveis por gerar reações inflamatórias em determinadas populações.

Em termos didáticos, o sistema imunológico pode ser dividido em células e moléculas solúveis. As células podem ser agrupadas de acordo com o tipo de resposta que o organismo desencadeia a uma ameaça exógena, sendo esse grupo denominado como células do sistema imune inato ou adquirido/adaptativo. O sistema imune inato, composto por fagócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos), células *natural killer* (NK), mastócitos, basófilos e eosinófilos é caracterizado por promover uma resposta rápida, típica e limitada a um grande número de antígenos¹¹.

Por sua vez, o sistema imune adquirido é caracterizado por sua maior especificidade e diversidade de reconhecimento de patógenos, apresentando mecanismos de memória, resposta especializada, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. Esse sistema é composto por linfócitos T, B e NK/T, células dendríticas ou apresentadoras de antígenos.

As moléculas solúveis fazem parte do sistema imunológico inato e adquirido, sendo divididas de acordo com o tipo de resposta desencadeada¹¹. Dentre as variadas moléculas solúveis capazes de contribuir para a defesa do organismo em diferentes estágios de uma infecção, existem as citocinas. Segundo VARELLA; FORTE, 2001, elas são classificadas como um grupo heterogêneo de proteínas extracelulares produzidas por diversos tipos celulares capazes de enviar sinais estimulatórios ou inibitórios para diferentes células do sistema imunológico ou outros sistemas¹². OLIVEIRA *et al.*, 2011, mostra em seu estudo que essas moléculas são capazes de atuar na ativação, diferenciação, proliferação e na sobrevivência das demais células imunológicas, bem como na síntese e ação de outras citocinas. Sendo assim, em situações de infecção e/ou lesão tecidual o tipo de resposta (pró- ou anti-inflamatória) além de depender da região em que um indivíduo é acometido pode também ser influenciada pelo tipo de citocina expressa¹³.

Podendo agir no local onde são produzidas, em células próximas ou secretadas na circulação a fim de desencadear efeitos à distância, as citocinas pró-inflamatórias são consideradas aquelas responsáveis por induzir o organismo a desencadear uma série de respostas que são percebidas pelos indivíduos acometidos como infecção e/ou inflamação. Desempenhando diversas funções relacionadas a processos inflamatórios, as interleucinas (IL) são consideradas como uma classe de citocinas denominadas numericamente a partir da sua ordem de descoberta, sendo ainda subdividas de acordo com suas respectivas e variadas funções. Segundo HERNÁNDEZ-URZÚA, 2001¹⁴, as IL são proteínas solúveis de baixo peso molecular capazes de, dentre outras atividades, mediar o crescimento celular, desencadear inflamação assim como promover imunidade, diferenciação e reparação celular (Figura 3). Além disso, de acordo com sua frequência de expressão, em determinadas regiões do organismo elas podem estar associadas a diversas doenças, inclusive a aterosclerose.

| Citocina/ quimiocina | Receptor | Principais efeitos | Principais células produtoras |
|------------------------------|---|---|--|
| IL-1 α e β | IL-1RI e IL-1RII | Pró-inflamatória, ativa a liberação de TNF- α e IL-6, promove a fase aguda da inflamação | Monócito, macrófago, neutrófilo |
| IL-1ra | IL-1 RI | Anti-inflamatória, competidor antagonista da IL-1 | Monócito, macrófago, neutrófilo |
| IL-2 | IL-2Ra, β , γ | Pró-inflamatória, proliferação de linfócitos T e B, induz produção de IFN- γ | Th0, Th1 |
| IL-12 | IL-12R | Pró-inflamatória, aumenta produção de IFN-g e induz diferenciação Th0-Th1 | Macrófago, célula dendrítica e NK |
| IL-18 (superfamília IL-1) | IL-18Ra, β | Pró-inflamatória, induz Th1 | Macrófago, célula dendrítica |
| IL-17 | IL-17R | Pró-inflamatória, induz IL-6 e IL-8 | Th17 |
| IFN- γ | IFN- γ R | Pró-inflamatória, ativa macrófago a produzir radicais tóxicos, produção de TNF- α | Th1, NK e células musculares |
| TNF- α | Membros da su- perfamília TNF-R | Pró-inflamatória, induz proteínas de choque, IL-1, apoptose | Monócito, macrófago |
| IL-4 | IL-4R | Anti-inflamatória, inibe produção de IL-1 α/β , TNF- α e IL-6; induz diferenciação de Th0-Th2, proliferação e diferenciação de linfócitos B, | Th2, mastócito e basófilo |
| IL-10 | IL-10R | Anti-inflamatória, inibe IL-1, IL-6 e TNF- α | Treg, Th2 e macrófago |
| IL-13 | IL-13R | Anti-inflamatória, inibe produção de IL-1, IL-6, TNF- α | Th2 |
| TGF- β | TGF- β RI, TGF- β RII complexo | Anti-inflamatória, inibe IFN- γ | Treg, macrófago |
| IL-6 | IL-6R | Pró/anti-inflamatória, ativa explosão respiratória em neutrófilos, produção de proteínas de fase aguda; inibe IL-1 e TNF- α ; captação de glicose no músculo esquelético; lipólise no tecido muscular e adiposo; gliconeogênese hepática | Monócito, macrófago e célula muscular |
| IL-8 (CXCL8) | IL-8R (CXCR1) | Pró-inflamatória, fator quimiotático para neutrófilo e basófilo; induz desgranulação e explosão respiratória em neutrófilo; angiogênese | Monócito, macrófago, neutrófilo e célula muscular |
| IL-15 | IL-15Ra e IL-2R β , γ | Pró-inflamatório, quimiotático para linfócito T e NK, induz IFN-g e TNF- α ; hipertrofia muscular | Monócito, fibroblasto e célula muscular |

Figura 3 – Principais citocinas envolvidas no processo inflamatório.

Fonte: TERRA, Rodrigo et al. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. *Rev. bras. med. esporte*, v. 18, n. 3, p. 208-214, 2012.

No que tange aos fatores considerados de elevada importância para o desenvolvimento de processos ateroscleróticos, a integridade do endotélio vascular é considerada um fator determinante. Sendo ele composto por uma fina camada de células especializadas que reveste internamente os vasos sanguíneos, o endotélio vascular além de ser uma barreira física responsável por exercer uma das primeiras linhas de defesa de um organismo contra um agente patogênico, desempenha diversas funções. Dentre essas funções pode-se destacar, por exemplo, o controle do tônus vascular, a coagulação sanguínea e a fibrinólise, além de promover interações com a adesividade leucocitária e plaquetária.

Em condições saudáveis, o endotélio é responsável por promover a regulação do fluxo sanguíneo, da resistência vascular, modular respostas imunitárias e liberar o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), hoje conhecido como o óxido nítrico (NO)^{15;16}.

Sendo o NO uma molécula gasosa solúvel com curto tempo de meia vida capaz de se difundir por entre as membranas celulares e atuar em diversos sistemas biológicos, o NO pode ser produzido por uma variedade de células a partir de uma série de estímulos diferentes. Sendo sintetizado pelas células endoteliais, o NO resulta na vasodilatação devido ao relaxamento da musculatura lisa ocasionado nas artérias. Além disso, a partir de estimulação prévia, os macrófagos liberam alta quantidade de NO que atuará contra uma série de microrganismos auxiliando o sistema imune na defesa do hospedeiro. Em outros sistemas, tais como respiratório, cardíaco, geniturinário, gastrointestinal ou sistema nervoso, inúmeras atividades do NO foram descritas e por esta razão, corresponde a uma molécula altamente investigada na comunidade acadêmica.

A partir da conversão de um aminoácido semi-essencial denominado L-arginina em L-citrulina através da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NO é produzido. Para isto, existem três tipos de enzimas (isoenzimas, isto é, múltiplas formas moleculares da mesma enzima) produtoras de NO que podem ser encontradas em áreas distintas do organismo. Tendo sido descoberta no endotélio vascular, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) produz, como o próprio nome sugere, NO no endotélio. Enzimas produtoras de NO no sistema nervoso periférico e cérebro são denominadas óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Outro tipo de enzima responsável pela síntese de NO através da ativação de células do sistema imunológico através de estímulos inflamatórios e/ou infecciosos corresponde a óxido nítrico sintase induzível (iNOS)¹⁷ (Figura 4).



Figura 4 – Formação do óxido nítrico pela Via L-arginina

O NO é sintetizado a partir de L-arginina e oxigênio molecular pelo grupo NOS de enzimas. Na inflamação, citocinas tais como IL-1 e TNF são suprarreguladas. As citocinas induzem a expressão do gene NOS (iNOS) induzível, levando à síntese da enzima iNOS, que produz óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina. O NO é uma molécula muito reativa e reage rapidamente com o oxigênio para formar nitrito e nitrato.

Fonte: VAN'T HOF, Rob J.; RALSTON, Stuart H. Nitric oxide and bone. *Immunology*, v. 103, n. 3, p. 255-261, 2001.

Dentre suas variadas funções, o NO é considerado um neurotransmissor capaz de promover o relaxamento do músculo liso, a vasodilatação, atuar no controle da circulação placentária, regular as contrações uterinas no trabalho de parto, atuar na memória e no aprendizado. Porém, em situações de inflamação ou processos de auto-imunidade¹⁸ diferentes concentrações desse mediador pode definir a ocorrência de um fenótipo clínico adverso ou resolutivo, indicando, conseqüentemente, que essa molécula pode atuar tanto como um agente benéfico ou tóxico para o organismo.

Neste sentido, pesquisas tendem a apontar que a produção exacerbada de NO pode desencadear lesões teciduais, havendo exemplo de sua atuação em processos patológicos como isquemia cerebral e doença de Parkinson¹⁹. Além disso, é observado que elevadas concentrações de enzimas responsáveis pela síntese de óxido nítrico (NOS) são capazes de aumentar a frequência de episódios isquêmicos e de neurotoxicidade no encéfalo²⁰.

Variados tipos celulares que participam de uma resposta inflamatória promovem a liberação de NO. Isso ocorre principalmente em decorrência de mediadores com propriedades inflamatórias que, ao se ligarem a seus respectivos receptores, ativam intracelularmente a transcrição gênica a fim de promover a síntese

e/ou funcionalidade de outras substâncias²¹. A exemplo disso, tem-se a produção do fator nuclear (NF) $\kappa\beta$, um fator de transcrição bastante estudado em processos ateroscleróticos, capaz de estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Além de ser associado à regulação de genes inflamatórios, o NF $\kappa\beta$ ativa a produção de NO, entre outras espécies reativas de oxigênio^{23;24}.

A maior proporção do NO circulante é produzida pelo endotélio vascular, através da ação catalítica da enzimática óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), onde ocorre a oxidação da L-arginina com a presença de cofatores como oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)²⁵. Considerando que este mediador promove importante vasodilatação, a perda ou deficiência de sua expressão sugere a intensificação de um processo aterosclerótico e/ou outros distúrbios vasculares^{9;26;27}.

Avaliando todo este cenário, é possível perceber que processos danosos e invasivos ao organismo fazem com que todo o sistema se organize para que reações enzimáticas ocorram de forma acelerada, que a produção de células do sistema imune seja aumentada e que a quantidade (e atividade) dos agentes causadores de doenças sejam reduzidos²². Desta forma, tanto as citocinas quanto as moléculas de NO desempenham atividades semelhantes quando o sistema é acometido por inflamação. Além disso, tendem a produzir respostas auto-imunes quando expressos exacerbadamente, podendo controlar níveis de expressão de variadas moléculas.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por uma porcentagem considerável de mortes por doenças não transmissíveis em todo o mundo. Tendo conhecimento de que fatores como hábitos de vida pouco saudáveis acrescidos às variações genéticas predisõem indivíduos idosos ao risco cardiovascular, este estudo associativo busca demonstrar fatores de risco que podem ser quantificados e analisados a fim de prever ou constatar doenças. Além disso, o presente estudo possibilita a compreensão referente aos processos fisiopatológicos que culminam na aterosclerose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sabendo que a susceptibilidade a eventos ateroscleróticos está associada a variações dos níveis circulantes de NO, o presente estudo objetivou investigar uma possível associação existente entre fatores de risco clássicos para aterosclerose e as concentrações circulantes de NO e de citocinas com conhecidas propriedades pró- e anti-inflamatórias.

3.2 Objetivo Específico

Traçar os perfis clínicos, bioquímicos, antropométricos, metabólicos e inflamatórios, sem distinção de sexo, de 168 participantes do estudo denominado Prognóstico e Terapêutica em Geriatria (Proteger). Para isso, realizou-se avaliação laboratorial do perfil bioquímico, quantificação de níveis séricos do óxido nítrico, dosagem de citocinas e análises estatísticas exploratórias, descritivas e inferenciais, com apresentação dos resultados obtidos da amostra desta população idosa do Distrito Federal.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

O presente estudo foi realizado através de análises de corte transversal com dados obtidos da comunidade idosa das cidades satélites do Distrito Federal. Este estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsinki e orientações sobre as boas práticas clínicas, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Além disso, todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I e II).

4.2 Procedimento clínicos

Para a obtenção das amostras do presente estudo, foram traçados os perfis clínicos, bioquímicos, antropométricos, metabólicos e inflamatórios, sem distinção de sexo, de 168 indivíduos idosos participantes do estudo de coorte prospectivo denominado Prognóstico e Terapêutica em Geriatria (ProTeGer), iniciado em 2011 e desenhado para identificar fatores de risco para prevenção primária ou secundária de eventos vasculares no segmento geriátrico brasileiro. Como critério de inclusão, foram arrolados participantes com idade ≥ 60 anos que procuraram atendimento de forma espontânea. Como critério de exclusão, o participante não poderia ser portador de doenças autoimunes, infecções crônicas ou recorrentes, doenças neoplásicas ativa ou progressiva, doença renal crônica (clearance de creatinina < 25 mL/min/1.73m²) e/ou ter usado medicamento por indicação anti-inflamatória nos 30 dias que antecederam os exames clínicos e bioquímicos. A participação foi voluntária e mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados foram coletados no período compreendido entre agosto de 2011 a julho de 2014, durante os atendimentos no Serviço de Geriatria do Hospital da Universidade Católica de Brasília (HUCB) e no Centro Multidisciplinar do Idoso (CMI) do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

Por meio da determinação do perfil clínico dos idosos, analisaram-se alterações de pressão, presença de diabetes *mellitus* e dislipidemia, sendo registradas suas comorbidades bem como a farmacoterapia empregada, caso houvesse. Para serem considerados praticantes de exercícios físicos os indivíduos deveriam praticar 30

minutos ou mais de qualquer exercício durante pelo menos quatro dias por semana, enquanto que o hábito de fumar foi definido como consumo de mais de 100 cigarros ao longo da vida. A diabetes tipo 2 foi definida de acordo com os valores de referência estabelecidos pela Associação Americana de Diabetes (glicemia de jejum ≥ 126 mg / dl) ou o uso atual de medicamentos hipoglicemiantes orais ou insulina. Pressão arterial sistólica e diastólica foram medidas como recomendado pelas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Pacientes com pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou a pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg, foram classificados como hipertensos, bem como os usuários de medicamentos anti-hipertensivos.

Para estimar a composição corporal da amostra, foi determinada a medida da circunferência abdominal, utilizando-se fita métrica inelástica e localizado o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca no momento da expiração do indivíduo.

4.3 Avaliação laboratorial

O perfil bioquímico foi analisado através da determinação do colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoproteins*, HDL), triglicerídeos (TG), glicose sérica, hemoglobina glicada, insulina, proteína C-reativa (PC-R), hormônio estimulante da tireoide (TSH) e homocisteína. Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo com EDTA, após um período de jejum de 12h. Os testes de laboratório foram realizados com base em análises clínicas de rotina, com reagentes adquiridos da Boehringer Mannheim (Alemanha) e processados em aparelho Autohumalyzer (Humana GMBH, Alemanha). Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoproteins Cholesterol*, VLDL) foi determinada dividindo os níveis TG por 5, enquanto que a equação de Friedewald foi usada para produzir LDL, por subtração de VLDL e de HDL da colesterolemia total. Os casos foram avaliados como positivos ou negativos para montar variáveis categóricas para distúrbios metabólicos. A categorização lipêmica foi realizada de acordo com do NCEP ATP III, com cada voluntário identificado como um portador (ou não) da hiperlipidemia mista (CT ≥ 200 mg/dl, LDL ≥ 130 mg/dl e/ou TG ≥ 150 mg/dl). O uso atual de drogas antilipêmicas foi considerado na definição da hiperlipidemia. O índice HOMA, definido como um modelo de avaliação homeostática capaz de estimar a resistência à insulina e a função das células beta no organismo, corresponde ao produto da insulina (μ UI/mL) e da glicemia

(mmol/L), ambas em jejum, dividido por 22,5 (para conversão da glicose de mg/dL para mmol/L, multiplica-se o valor em mg/dL por 0,0555).

4.4 Mensuração do no/nitrito/nitrato total

Para quantificação dos níveis séricos totais do mediador óxido nítrico (NO_x), foram empregados os ensaios enzimáticos de conversão do nitrato em nitrito (NO⁻²) por ação da nitrato redutase, seguida de detecção colorimétrica pela reação de diazotação de Griess, realizado conforme instruções de conjunto específico (R&D Systems Inc, MN, USA). As leituras das reações colorimétricas foram realizadas em aparelho Biotek ELX 800 (DeMorellis, SP, Brasil) em comprimento de onda de 490 nm.

4.5 Dosagem de citocinas

No momento da avaliação bioquímica, foi feita coleta de sangue total e obtidas amostras de soro, que foram mantidas congeladas a -80 °C até serem descongeladas para a avaliação dos mediadores inflamatórios.

As concentrações das citocinas foram obtidas por citometria de fluxo usando sistema *multiplex* com dois *sets* de imunensaio baseado em esferas, a saber: Human Th1/Th2/TH17 e o Human Inflammatory, ambos produzidos pela BD Biosciences® (San Diego, CA, USA).

Os procedimentos em laboratório seguiram os protocolos fornecidos pelo fabricante dos *kits*. Os *kits* juntos produziram medições para dez mediadores circulantes diferentes: Interleucina (IL)1 β , IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12p70, IL17a, interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α).

Os padrões de citocinas liofilizadas e as amostras de soro foram processados juntamente, seguindo protocolo do fabricante, e os resultados obtidos utilizando o citômetro de fluxo BD FACSCalibur, canal FL4. Trezentos eventos foram adquiridos por cada esfera de citocina utilizada no ensaio.

Os dados foram analisados usando o software FCAP software, versão 3.0 (BD Biosciences®, San Diego, CA, USA). A curva padrão para cada citocina foi gerada utilizando padrão do mediador fornecido no *kit*. A concentração em cada soro foi determinada por interpolação a partir da curva padrão correspondente.

4.6 Análises estatísticas

Para avaliar a ocorrência e a força da associação de níveis circulantes de óxido nítrico, foram obtidos coeficientes de correlação entre o mediador e variáveis contínuas e categóricas selecionadas de relevância clínica. Para isso, avaliou-se a distribuição próxima ao normal de todas as variáveis contínuas utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. A associação entre as variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson, enquanto que o envolvimento de pelo menos uma variável categórica ou um traço contínuo com distribuição não gaussiana (skewness > 3) foi feito utilizando a contraparte de Spearman, com homens e mulheres representados por 1 ou 2, e ausência ou presença de uma característica representada por 0 ou 1, respectivamente. Além disso, as concentrações brutas de NO foram testadas através dos níveis circulantes de um painel de 10 mediadores imunológicos diferentes, utilizando o teste de correlação de Spearman. Quando os resultados mostraram uma correlação significativa, os níveis diferenciais de óxido nítrico sérico foram testados entre os quartis do mediador imunológico por meio de análise de variância com o teste post-hoc de Tukey.

Todas as análises foram realizadas com o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows (versão 17.0), com limiar de significância estabelecido em $p < 0,05$. Somente para as análises exploratórias de correlação foi que um valor de p (bicaudal) foi adotado como significativo segundo o princípio de Bonferroni para múltiplas comparações ($k = 10$ testes $\therefore \alpha \leq 0,005$).

5. RESULTADOS

A amostra composta por 168 indivíduos idosos, predominantemente sedentários, do sexo feminino e com idade média de 73,3 anos, teve seus resultados analisados após a realização de testes bioquímicos, clínicos e antropométricos, apresentados na Tabela 1 em termos médios e frequenciais. Observa-se elevada prevalência de fatores de risco vascular em meio à amostra, a exemplo dos valores médios de circunferência abdominal, superior tanto àquele preconizado para mulheres (80 cm) quanto para homens (94 cm). Ademais, mostrou-se considerável (22%) a prevalência dos pacientes portadores de diabetes *mellitus* do tipo 2, sendo constatados valores médios de hemoglobina glicada (HbA1c) entre 4% a 6%. Mais recentemente, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2007) estabeleceu a meta de HbA1c menor que 6,5% para caracterização do bom controle glicêmico desde que não aumente o risco de hipoglicemia ou outras complicações do tratamento²⁸⁻³⁰.

No que tange os níveis pressóricos desta população, observa-se 76,2% dos pacientes em condições de hipertensão sistêmica, o que confirma dados da VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial ao mencionar uma associação direta e linear entre envelhecimento e prevalência de HA. Valores médios da pressão arterial sistólica foram encontrados acima do considerado normal (> 130 mmHg)³¹.

Também foram realizadas análises referentes ao perfil hormonal, visto que o TSH, por exemplo, influencia no metabolismo celular e, conseqüentemente, interfere no funcionamento cardíaco. Foi constatado que os valores médios encontrados estão dentro dos valores recomendados (entre 0,4 e 4 mUI/L)³².

Com relação ao perfil inflamatório, a PC-R, uma proteína de fase aguda identificada na circulação em resposta a citocinas inflamatórias é caracterizada como um biomarcador de inflamação sistêmica. A dosagem da PC R se mostrou, em termos

médios, acima da faixa de referência sobre a qual se indica monitoramento em cardiologia (0,1 a 0,25 mg/dL)³³, corroborando com cenário de risco insidioso na amostra. Além disso, nosso trabalho investigou outros mediadores inflamatórios de importância sistêmica, dentre os quais a IL17. Definida como uma nova linhagem das células T CD4, as células Th17 induzem a liberação da IL17 que, ao mesmo tempo que demonstram ser fator de proteção contra infecções bacterianas e fúngicas, tem ocasionado um quadro de doenças inflamatórias e auto-imunes quando expressa demasiadamente³⁴.

As variáveis clínicas, antropométricas e metabólicas da amostra investigada foram descritas na Tabela 1 demonstrando que esta população era acometida, em sua maior parte, por uma ou diversas enfermidades. No entanto, devido aos fatores de exclusão, não apresentavam nenhum quadro inflamatório grave ou doença com elevada progressão. Portanto, esses pacientes estavam dentro dos padrões de normalidade esperados.

Testes associativos entre as concentrações de NO e as características clínicas e bioquímicas dos pacientes foram realizados, não sendo identificados parâmetros que correlacionem, de forma significativa, níveis de NO com as diversas condições clínicas de base da amostra (Tabela 2).

Investigando a associação dos níveis absolutos das citocinas circulantes dosadas com as concentrações séricas de NO dos pacientes à admissão (Tabela 3), os resultados apresentaram correlação negativa ($P < 0,005$) com a IL17a, mas não com outros mediadores inflamatórios. Em face deste resultado, os diferentes níveis de óxido nítrico no soro foram testados ao longo dos quartis do referido mediador inflamatório, como pode ser observado na Figura 5. Essa análise de variância permitiu confirmar, sob outra perspectiva, a correlação negativa existente entre o NO e IL17.

Tabela 1. Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e metabólicas da amostra investigada.

| Variáveis | (n = 168) |
|--|-------------------|
| Sexo masculino, % | 41,6 |
| Idade, anos | 73,3 ± 8,9 |
| CA, cm | 97,3 ± 11,6 |
| Nível de Glicose, mg.dl ⁻¹ | 102,9 ± 28,1 |
| HbA1c, % | 5,9 ± 1,0 |
| Insulina [†] , mUI/MI | 6,7 (3,2 ; 10,8) |
| HOMA [†] index | 1,6 (0,9 ; 3,0) |
| DM2 [§] , % | 22,0 |
| Colesterol Total, mg.dl ⁻¹ | 191,7 ± 32,2 |
| LDL-c, mg.dl ⁻¹ | 114,5 ± 32,2 |
| Triglicérides, mg.dl ⁻¹ | 142,0 ± 65,1 |
| Hiperlipemia [§] , % | 48,8 |
| HDL-c, mg.dl ⁻¹ | 48,8 ± 10,9 |
| PAS, mm Hg | 134,6 ± 19,3 |
| PAD, mm Hg | 80,4 ± 11,3 |
| HAS, % | 76,2 |
| PC-R [†] , mg.dl ⁻¹ | 1,1 (0,3 ; 4,4) |
| TSH [†] , mIU.l ⁻¹ | 1,9 (1,3 ; 3,1) |
| Homocisteína [†] , μmol.l ⁻¹ | 11,3 (9,0 ; 14,5) |
| Sedentário [§] , % | 60,7 |
| Fumante [§] , % | 38,1 |
| /IFN γ [†] , pg/ml | 6,2 (5,4 ; 7,0) |
| IL1 β [†] , pg/ml | 2,0 (0,1 ; 9,5) |
| IL2 [†] , pg/ml | 8,4 (7,4 ; 9,6) |
| IL4 [†] , pg/ml | 9,6 (8,4 ; 10,6) |
| IL6 [†] , pg/ml | 21,0 (12,7; 30,5) |
| IL8 [†] , pg/ml | 43,1(27,2;100,4) |
| IL10 [†] , pg/ml | 0,2 (0,0 ; 2,2) |
| IL12 [†] , pg/ml | 9,3 (7,1 ; 11,0) |
| IL17a [†] , pg/ml | 38,1 (32,2; 42,8) |
| TNF α [†] , pg/ml | 0,4 (0,0 ; 1,9) |
| NO, μM | 57,9 ± 17,8 |

Os dados são expressos como média ± desvio padrão para parâmetros contínuos, como frequências relativas para características categóricas, e como intervalo médio e interquartil para traços contínuos com distribuição não Gaussiana. O teste t de Student ou o teste Qui-quadrado ou o teste de Mann-Whitney † foram utilizados. CA = circunferência abdominal; HbA1c = hemoglobina glicada A1c; HOMA = Avaliação do modelo homeostático; DM2 = diabetes mellitus tipo 2; LDL-c = colesterol de lipoproteína de baixa densidade; HDL-c = colesterol lipoproteico de alta densidade, PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; HAS = hipertensão arterial sistêmica; PC-R = proteína C-reativa; TSH = hormônio estimulante da tiróide; IFN = interferon; IL = interleucina, TNF = fator de necrose tumoral; NO = óxido nítrico.

Tabela 2. Análise da correlação dos níveis absolutos de citocinas séricas, bem como de escores de óxido nítrico através de características clínicas e bioquímicas dos 168 indivíduos na admissão.

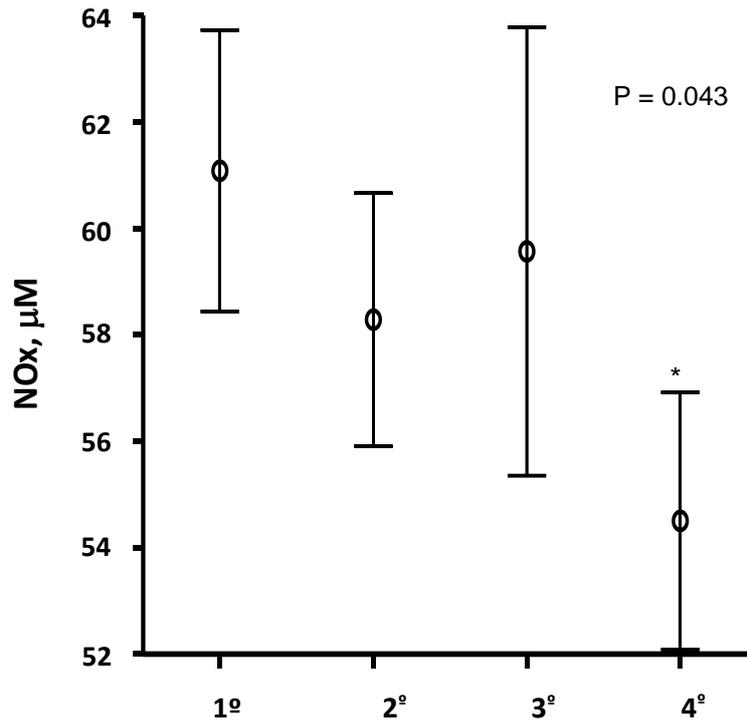
| Características Clínicas | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------|---------------|------------------|------------------|-----------|-------------|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------|
| Idade | Sexo [§] | CA | DM2 [§] | HAS [§] | PAS | PAD | Hiper-lipemia [§] | Fumante [§] | Sedentário [§] | |
| NO | -,004; ,960 | -,006; ,940 | ,062; ,442 | ,048; ,551 | ,165;037 | -,031; ,700 | -,052; ,517 | ,075; ,348 | ,003; ,968 | -,064; ,424 |
| Características Bioquímicas | | | | | | | | | | |
| PC-R | TSH | Homo-cisteína | CT | VLDL-c | HDL-c | TGL | Insulina | HOMA | HbA1c | |
| NO | -,075; ,346 | ,020; ,802 | -,012; ,877 | ,016; ,845 | ,066; 414 | ,060; ,455 | ,037; ,639 | -,039; ,634 | -,026; ,748 | ,033; ,686 |

O teste de correlação de Spearman® ou Pearson foi utilizado. Os dados são expressos em índice de correlação e nível de significância (r; P). PC-R = proteína C-reativa; PAD = pressão arterial diastólica; DM2 = diabetes *mellitus* tipo 2; HbA1c = hemoglobina glicada A1c; HDL-c = colesterol de lipoproteína de alta densidade; HOMA = Avaliação do modelo homeostático; NO = óxido nítrico; HAS = hipertensão arterial sistêmica; PAS = pressão arterial sistólica; PAD= Pressão arterial diastólica; CT = colesterol total; TNF = fator de necrose tumoral; TSH = hormônio estimulante da tireóide; VLDL-c = colesterol de lipoproteína de densidade muito baixa; CA = circunferência abdominal. * O limite de significância estabelecido em P <0,005 estava de acordo com a convenção de Bonferroni para cada painel de testes de correlação. O limiar de significância estabelecido em P <0,0025 estava de acordo com a convenção de Bonferroni para (κ) testes de correlação.

Tabela 3. Análise de correlação entre os níveis brutos de citocinas séricas e escores de óxido nítrico no soro dos 168 pacientes no momento da internação.

| | NOx, μ M |
|----------------------|--------------|
| INF γ , pg/ml | -,160; ,052 |
| IL1 β , pg/ml | -,030; ,712 |
| IL2, pg/ml | -,115; ,164 |
| IL4, pg/ml | -,187; ,023 |
| IL6, pg/ml | -,112; ,166 |
| IL8, pg/ml | ,053; ,510 |
| IL10, pg/ml | -,057; ,484 |
| IL12, pg/ml | ,028; ,729 |
| IL17a, pg/ml | -,236; ,004 |
| TNF α , pg/ml | -,008; ,926 |

O teste de correlação de Spearman foi utilizado. Os dados são expressos em índice de correlação e nível de significância (r; P). IFN = interferon; IL = interleucina; TNF = fator de necrose tumoral; NO = óxido nítrico. * O limiar de significância estabelecido em $P < 0,005$ estava de acordo com a convenção de Bonferroni para testes de correlação múltipla (κ).



Quartis dos níveis de IL17a

Figura 5 – Comparação dos níveis circulantes de NO através dos indivíduos agrupados em aumento dos quartis de níveis IL17a. A significância foi verificada por meio de análise de variância com o teste post-hoc de Tukey. As barras verticais representam intervalos de um erro padrão.

6. DISCUSSÃO

A correlação negativa encontrada no presente estudo entre os níveis circulantes totais de óxido nítrico e de IL17 pode ser atribuída à hipótese de que, endogenamente, todo o sistema colabora para que a produção de IL17 seja limitada pelo NO constitutivamente expresso pelo endotélio vascular saudável a fim de se evitar exacerbação ou perpetuação das respostas inflamatórias e, conseqüentemente, o surgimento de autoimunidades ou hipersensibilidades³⁴.

Informações recentes a respeito da IL17 tem sido descritas na literatura, devido a sua capacidade de atuação como mediador pró-inflamatório da recém-caracterizada linhagem de células T CD4, a Th17^{35;36}. A exemplo disso, estudos demonstraram a contribuição da IL17 quando expressa demasiadamente, em doenças como psoríase, doenças reumáticas, esclerose múltipla e distúrbios ósseos³⁴.

Estudos demonstraram que condições fisiológicas de hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus* e tabagismo, muito prevalentes na população estudada, predispõem à aterosclerose, estão associadas à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e quantidades reduzidas de NO bioativo na parede do vaso. Neste contexto, estudos demonstraram que o NO advindo do endotélio por intermédio da enzima eNOS, por ser um cofator que interage com superóxido derivado da NADPH oxidase, teve sua enzima descrita como uma enzima pró-aterosclerótica produtora de superóxido³⁷. Tudo isso sugere que o aumento de superóxido gera um maior estresse oxidativo e resulta em uma maior sobrecarga de enzimas antioxidantes levando um indivíduo, por exemplo, a apresentar sintomas da aterosclerose.

Além disso, o NO demonstrou ser um regulador negativo das células produtoras de IL17, capaz de inibir potencialmente sua função e proliferação, por suprimir a expressão de receptor para hidrocarboneto de arilo (AhR) em células T CD4. Pesquisas realizadas por Niedbala *et al.*, 2011, observaram que camundongos deficientes em óxido nítrico sintase induzível (iNOS, ou NOS 2) apresentavam um elevado número de células Th17, assim como uma expressão aumentada dos AhR em células circulantes na medula espinal, que é capaz de potencializar a diferenciação de células Th17. É válido salientar que os linfócitos não sofrem reprogramação, uma vez que na ausência de NO, ocorre a retomada da proliferação das células Th17³⁸.

Sendo conhecido como um tipo de “sensor celular para poluentes” ou receptor de dioxinas, os AhR possuem variados tipos de ligantes, podendo ser divididos como sintéticos e naturais. Dentre os ligantes de origem natural, o 6-formilindolo [3,2-b] carbazole (FICZ), corresponde a um fotoproduto do triptofano que possui uma estrutura química muito similar ao ICZ, um ligante natural dos AhR, com potente atividade indutora de CYP1A1 e CYP1A2³⁹.

Bio-aglutinantes como a dioxina e o metabolito 6-formolindolo [3, 2-b] carbazole (FICZ)³⁸ são contribuintes para o desenvolvimento de doenças autoimunes, muitas das quais são devidas à atividade de células T TH17⁴⁰. Sendo os AhR fatores de transcrição dependentes de ligante, sua atividade tem sido amplamente estudada, embora seu papel fisiológico ainda não seja muito bem compreendido⁴⁰.

Tomando por base que elevadas concentrações de NO além de estarem associadas à saúde, podem também promover uma gama de doenças, compreende-se que o principal mediador químico liberado pelo endotélio tem a capacidade de monitorar o estado de saúde de pacientes cardiovasculares, ser marcador clínico da atividade enzimática das NOS e de diversas doenças⁴¹. Estudo realizado por Ghasemi *et.al*⁴¹ com 3505 pacientes adultos saudáveis foi capaz de estabelecer um intervalo de referência para NO sérico (10,3-66,8 µM), o que viabilizou análises referentes a diferentes estados patológicos e concentrações variantes de NO. Considerando que o valor médio apresentado pelos pacientes da ProTeGer está dentro do intervalo estabelecido por Ghasemi *et.al*, os pacientes do presente estudo não exibem condições de saúde inflamatórias ou outras complicações (ver critérios de exclusão). Sendo assim, é possível considerar que seus respectivos endotélios estavam regularmente preservados, o que permite inferir níveis fisiológicos de NO dentro dos padrões de normalidade apesar da alta prevalência de comorbidades.

No que tange IL17, embora não corresponda a um mediador inflamatório com valor de referência já estabelecido para prever o risco de um indivíduo desenvolver determinadas doenças, a IL 17 tem demonstrado um papel significativo no sistema imunitário não só por ter sido evidenciada sua capacidade de ativar e/ou suprimir a expressão de outras células, mas também por ter sua função regulada por outras moléculas, como por exemplo, a correlação negativa demonstrada neste estudo.

7. CONCLUSÃO

Os achados obtidos no presente estudo remetem a uma nova forma de regulação do sistema imunológico exercida por uma molécula gasosa (NO) capaz de desempenhar uma atividade dual no organismo, a depender de sua concentração expressa. A hipótese levantada que justifica a correlação negativa encontrada no estudo é atribuída a um sistema homeostático endógeno capaz de limitar a produção de IL17 pelo NO constitutivamente produzido a partir do endotélio vascular saudável a fim de se evitar constantes reações inflamatórias.

Sendo o NO um regulador das IL 17, uma interleucina inflamatória, infere-se que essa molécula gasosa corresponde a um fator protetor para aterosclerose, quando expresso em concentrações ideais.

Estudos futuros devem estimar a magnitude da contribuição preventiva e/ou terapêutica do NO no fenótipo aterosclerótico dependente de Th17. Além disso, deve-se investigar a contribuição das diferentes isoformas de NOS para a regulação do perfil Th17, o que ainda gera muito debate científico e acadêmico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOURBON Mafalda; MIRANDA Natercia; VICENTE Astrid Moura; RATO Quitéria. Sabe como prevenir? Doenças Cardiovasculares. **Instituto Nacional de Saúde**. Fundação Calouste Gulbenkian. Disponível em: <<https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2016/03/DoencasCardiovasculares.pdf>> Acesso em 23 de março de 2017.
2. OMS Geneva/INPEA. Missing Voices: Views of Older Persons on Elder Abuse, 2002. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67371/1/WHO_NMH_VIP_02.1.pdf>
3. Cardiovascular disease. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/
4. Cardiovascular diseases. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
5. BUTLER, Declan et al. UN targets top killers. **Nature**, v. 477, n. 7364, p. 260-261, 2011.
6. SANTOS, Maria Gisele dos et al. Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. **Arq Bras Cardiol**, v. 90, n. 4, p. 301-308, 2008.
7. SPOSITO, Andrei C. et al. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 2-19, 2007.
8. TEODORO, Bruno Gonzaga et al. A influência da intensidade do exercício físico aeróbio no processo aterosclerótico. **Rev. bras. med. esporte**, v. 16, n. 5, p. 382-387, 2010
9. RABELO LM. Fatores de risco para doença aterosclerótica na adolescência. **J Pediatr**. 2001; 2: 153-64.
10. VERRI J, Fuster V. Mecanismos das síndromes isquêmicas agudas e da progressão da aterosclerose coronária. **Arq Bras Cardiol**. 1997; 68: 461-7.
11. CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.
12. VARELLA, Pedro PV; FORTE, Wilma C. Neves. Citocinas: revisão. **Rev bras alergias imunopatol**, v. 24, p. 146-154, 2001.
13. OLIVEIRA, Caio Marcio Barros de et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 2011.

14. HERNÁNDEZ-URZÚA, Miguel A.; ALVARADO-NAVARRO, Anabell. Interleucinas e imunidade inata. **Rev biomed**, v. 12, n. 4, p. 12, 2001.
15. DIAS, Rodrigo Gonçalves; NEGRÃO, Carlos Eduardo; KRIEGER, Marta Helena. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 96, n. 1, p. 68-75, 2011.
16. DE ANDRADE CARDOSO, Fernanda et al. Endotélio vascular: Parte I: função e propriedade. **Revista de Ciências Médicas-ISSN 2318-0897**, v. 3, n. 3, 2012.
17. CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. ÌXIDO NÈTRICO. REVISÃO. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, 2002.
18. FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.
19. SAMDANI, Amer F.; DAWSON, Ted M.; DAWSON, Valina L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke**, v. 28, n. 6, p. 1283-1288, 1997.
20. HUANG, Zhihong et al. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Science**, v. 265, n. 5180, p. 1883-1886, 1994.
21. OLIVEIRA, Caio Marcio Barros de et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 2011.
22. KRAUCHETE Durval Campos; CALASANS Maria Thais de Andrade; VALENTE Camila Motta Leal. Citocinas Pró-Inflamatórias e Dor [Pro-inflammatory cytokines and pain] **Rev Bras Reumatol**, v.46, n.3, p.199–206, mai/jun, 2006.
23. ZHANG, Guolong; GHOSH, Sankar. Toll-like receptor–mediated NF-κB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 1, p. 13-19, 2001.
24. WINTHER MP, KANTERS E, KRAAL G, HOFKER MH. Nuclear factor κB signaling in atherogenesis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 5, p. 904-914, 2005.
25. MARLETTA, Michael A. **Nitric oxide synthase structure and mechanism**. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 1993.
26. VIARO, Fernanda; NOBRE, Fernando; EVORA, Paulo Roberto B. Expressão das óxido nítrico sintetases na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol**, v. 74, n. 4, p. 365-379, 2000.
27. TEIXEIRA, Bruno Costa et al. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **Jornal vascular brasileiro**, v. 13, n. 2, 2014.

28. NIEDBALA, Wanda et al. Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation. **Nature communications**, v. 5, p. 4575, 2014.
29. Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes. <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>
30. PINTO, Esther Waite de Souza Oliveira; NAVARRO, Francisco. Relação da composição corporal ea hemoglobina glicada (HbA1c) de portadores de Diabetes tipo I. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 4, n. 24, p. 4, 2010.
31. VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf
32. TSH, Thyroid Stimulating Hormone. Hormônio de estimulação da tireóide (TSH) e correlações laboratoriais. **RBAC**, v. 41, n. 2, p. 161-164, 2009.
33. LIMA, Luciana Moreira et al. Proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **J Bras Med Lab**, v. 43, n. 2, p. 83-6, 2007.
34. BERINGER, Audrey; NOACK, Melissa; MIOSSEC, Pierre. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 3, p. 230-241, 2016.
35. NASCIMENTO, Manuela Sales Lima. **Papel de linfócitos Th17 durante a infecção experimental por Leishmania infantum/chagasi**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.
36. TORRES, Tiago; FILIPE, Paulo. Interleucina-17 como Alvo Terapêutico na Psoríase. **Acta Médica Portuguesa**, v. 27, p. 252-258, 2014.
37. FÖRSTERMANN, Ulrich. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. **Biological chemistry**, v. 387, n. 12, p. 1521-1533, 2006.
38. NIEDBALA, Wanda et al. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 22, p. 9220-9225, 2011.
39. RANNUG A, FRITSCH E. The aryl hydrocarbon receptor and light. **Biol. Chem.** 387:1149-1157.2006
40. VELDHOEN, Marc et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 106-109, 2008.
41. GHASEMI, Asghar; ZAHEDIASL, Saleh; AZIZI, Fereidoun. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. **Clinical biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 89-94, 2010.

ANEXO I – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 061/2011.

Título: "Associação de marcadores imunológicos e genômicos com doença aterosclerótica no paciente ambulatorial idoso".

Pesquisador Responsável: Otávio de Toledo Nóbrega.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 22/08/2011.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 10/10/2011.

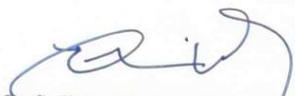
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 26/12/2011.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, a coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum" do CEP-FM, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para 20 de julho de 2012.

Brasília, 18 de Janeiro de 2012.


Prof.^a Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA – UCB
INSTITUTO DE CARDIOLOGIA - BIOCÁRDIOS**

“Associação de marcadores imunológicos e genômicos com doença aterosclerótica no paciente ambulatorial idoso.”

O envelhecimento pode ocasionar doenças ou o agravamento de suas manifestações no organismo, diminuindo a qualidade de vida da pessoa. Por isso, nós do Instituto de Cardiologia Biocárdios no Distrito Federal e do Hospital da Universidade Católica de Brasília (HUCB), em conjunto com pesquisadores da Universidade de Brasília (UnB), estamos trabalhando na busca por sinais clínicos e de laboratório que permitam antever o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, sobretudo aquelas doenças relacionadas a problemas em importantes artérias do corpo humano, a exemplo da artéria coronariana e das artérias carótídeas.

Assim sendo, com o objetivo de encontrar características do organismo que possam contribuir para o diagnóstico precoce de distúrbios nestas artérias, necessitamos do seu consentimento para realizamos uma avaliação médica e por exames laboratoriais, incluindo avaliações por ultrasonografia, tomografia computadorizada, exames de sangue e testes genéticos. Esta pesquisa poderá possibilitar uma melhoria da compreensão do processo de envelhecimento do ser humano, o que por sua vez permitirá melhorar o atendimento e o aconselhamento prestados aos idosos assistidos tantos pelos programas públicos e quantos privados de saúde.

Dependendo dos resultados e da avaliação, o(a) senhor(a) poderá ser incluído no grupo de portadores ou não-portadores de uma doença ou achado clínico importante sobre as artérias estudadas.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Fui informado que o protocolo experimental consistirá basicamente em uma avaliação médica e por exames laboratoriais e por imagem, e que tais procedimentos não comprometerão minhas atividades cotidianas e não serão diferentes daqueles procedimentos rotineiramente recomendados pela prática clínica moderna. Durante as consultas, responderei perguntas sobre os medicamentos que utilizo, como sigo o(s) tratamento(s) recomendado(s), do que me alimento e em quais quantidades, mas terei plena liberdade de me recusar a responder caso eu não queira. Fui informado(a) ainda que este trabalho não oferecerá riscos expressivos à minha saúde, já que não realizarei movimentos anormais, não terei mudança de rotina, não entrarei em contato com quaisquer substâncias nocivas, nem terei qualquer instrumento introduzido em meu corpo, a não ser por ocasião de uma única coleta de um pequeno volume (15 mililitros) de sangue, onde me será assegurada utilização de agulhas descartáveis. A equipe do projeto se responsabilizou por prestar esclarecimentos a mim a qualquer momento da pesquisa, inclusive relativos a exames de laboratório realizados, disponibilizando para tanto as formas de contato presentes no rodapé desta página.

O pesquisador garantiu sigilo sobre minha identidade, ficando os dados sob sua guarda, não sendo permitido acesso por pessoas não relacionadas à pesquisa. O pesquisador responsabilizou-se por qualquer dano que eu venha a sofrer, e também explicou que as amostras coletadas poderão ser estocadas para outras pesquisas, mas que serei contatado para conceder minha autorização para cada nova utilização.

Assim, por este documento, dou meu consentimento à exploração dos dados coletados por este projeto de pesquisa.

Brasília, _____ de _____ de 20_____.

Nome do paciente

Nome do profissional que prestou informações

Assinatura do paciente

Assinatura do profissional que prestou informações