

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ACTIVIDADE DA PLACA
NA DOENÇA CORONÁRIA

Sérgio Ricardo Silva Veloso

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ACTIVIDADE DA PLACA
NA DOENÇA CORONÁRIA**

Sérgio Ricardo Silva Veloso

Dissertação para obtenção do grau de Mestre, orientada por Doutora Teresa Pinheiro, Instituto Tecnológico e Nuclear, e Doutora Ana Maria Crespo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2010

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, directa ou indirectamente, tornaram esta tese possível. Em particular:

À Doutora Teresa Pinheiro, orientadora de mestrado, pela forma empenhada como acompanhou todo o trabalho e às condições que proporcionou,

À Doutora Patrícia Napoleão, investigadora integrada neste projecto cuja colaboração a diversos níveis foi fundamental para o bom termo desta tese,

À Sofia Andrade, colega de mestrado e de laboratório que dividiu comigo tantas tarefas rotineiras e a penosa fase de amostragem. Um obrigado por tornar o trabalho mais fácil,

À Mafalda Selas e Cláudia Freixo, enfermeiras no Hospital de Santa Marta, responsáveis, dia e noite, pela recolha e processamento inicial das amostras de sangue,

Ao Dr. Rui Cruz Ferreira e Dr. Miguel Mota Carmo, médicos do Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, pela selecção e examinação dos intervenientes, doentes e controlos,

À Doutora Maria Guarino, investigadora da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, que colaborou na quantificação do óxido nítrico plasmático,

Ao meu pai e tios por terem participado no estudo, bem como a todos os outros voluntários que aceitaram colaborar,

A todos os investigadores e funcionários dos Instituto Tecnológico e Nuclear que contribuíram para um excelente ambiente de trabalho,

A todos os meus amigos, colegas e familiares pelo apoio nos momentos mais difíceis e, muitas vezes, menos bem-humorados,

Ao Dr. Jorge Portugal, médico, pela dedicação, interesse e competência que demonstrou no tratamento de um pequeno problema de saúde com que me deparei no decurso desta tese,

E, para terminar, um especial agradecimento à Professora Doutora Ana Maria Crespo, co-orientadora desta tese, pela confiança que depositou em mim no convite para integrar o seu grupo de investigação e pelo valioso contributo na elaboração deste trabalho.

Poderia citar mais nomes que de forma indirecta contribuíram para o sucesso deste trabalho e por não o fazer peço desculpa. Um obrigado a todos.

RESUMO

As doenças cardiovasculares representam hoje a maior causa singular de morte no mundo ocidental. A aterosclerose é o processo patológico mais importante na gênese de doença cardiovascular, marcada genericamente por uma obstrução do vaso e alteração das suas propriedades elásticas e reactivas. Embora as suas causas não sejam inteiramente conhecidas, acredita-se que terá uma base inflamatória e uma progressão contínua ao longo de vários anos. O endotélio é o principal responsável pela regulação do tonus vascular. À sua incapacidade em modelar este processo chama-se disfunção endotelial, uma condição que precede o desenvolvimento de lesões sintomáticas e como tal, um candidato a marcador precoce de doença cardiovascular.

A placa de ateroma não é uma entidade inerte e a sua actividade pode ser avaliada através de elementos solúveis. O VEGF é considerado um dos principais responsáveis pela neovascularização da placa que favorece o processo inflamatório e deposição de lípidos. A Catepsina-L é uma enzima proteolítica expressa por macrófagos na zona da lesão, com a capacidade de destruir a matriz fibrótica que protege o ateroma, tornando-o mais frágil e susceptível a ruptura.

A activação das células endoteliais subjacente ao processo inflamatório induz a segregação de vesículas fosfolipídicas, as micropartículas, através de um fenómeno altamente regulado mas ainda longe de ser compreendido. Estas parecem exercer funções biológicas embora o seu papel seja ainda obscuro. Se são causa ou consequência de um processo deletério é uma pergunta que ainda carece resposta.

Neste estudo propusemo-nos avaliar o potencial do VEGF, Cat-L e micropartículas como marcadores de disfunção endotelial e da actividade do ateroma. Uma vez que a aterosclerose é um processo para o qual múltiplos factores contribuem através de uma interacção sinérgica, é pouco provável que um indicador singular seja eficaz. Como tal, existem algoritmos multivariados, como o *Framingham Point Score*, aos quais novos marcadores devem ser comparados no sentido de verificar a existência de informação adicional para a avaliação de risco.

A metodologia adoptada para a quantificação do VEGF e Cat-L foi o ELISA em amostras de soro humano. Na análise de micropartículas a citometria de fluxo é o método mais eficaz e o único com aplicação clínica. Neste estudo foram utilizados os marcadores CD31, CD42b e CD144 para discriminação de subpopulações endoteliais, três marcadores já associados a várias doenças do foro vascular.

Os nossos resultados apontam para uma relação entre a Cat-L, EMPs CD144⁺ e o *Framingham Point Score*. Foram encontrados fortes indícios de que a libertação de micropartículas é um processo activado em resposta a agressão e que desempenha um papel protector e regenerador no endotélio, que deverá justificar o aumento de MPs CD42b⁻CD144⁺ na disfunção endotelial. Embora o VEGF não esteja alterado na disfunção endotelial, evidencia uma ligação com a inflamação crónica característica da aterosclerose. A presença de lesão sintomática não aparenta influenciar os parâmetros estudados, mais dependentes dos factores de risco tradicionais. No entanto, a pequena dimensão da amostra e os constrangimentos de tempo e natureza do estudo não permitem retirar mais do que conclusões preliminares que justificam a continuação deste trabalho.

Palavras-chave: Catepsina-L, disfunção endotelial, factores de risco, micropartículas endoteliais, VEGF

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the major single cause of death in the western world. Atherosclerosis is the pathological process with most importance in the initiation of cardiovascular diseases, and it is characterized by an obstruction of the blood vessel and an alteration of its reactive and elastic proprieties. Although its causes are not completely understood, it is believed that it has an inflammatory basis and a continuous progress through many years. The endothelium is the main responsible for the regulation of vascular tone. The inability in modulating this process is called endothelial dysfunction, a condition that precedes the development of symptomatic lesions and, as such, a candidate to early maker of cardiovascular diseases.

The atheroma is not a static entity and its activity can be evaluated by soluble factors. The VEGF is considered one of the most important iniciators of plaque neovascularization that favors the inflammatory process and lipid deposition. Cathepsin-L is a proteolytic enzyme expressed by macrophages in the lesion zone, with the ability to destroy the fibrotic matrix that protects the atheroma, making it more fragile and susceptible to rupture.

The activation of endothelial cells by inflammation induces the segregation of phospholipidic vesicles, the microparticles, in a tightly regulated process still far from understood. These microparticles seem to have biological functions although their role is not yet known. If they are the cause or a consequence of a deleterious process is a question that still needs to be answered.

In this study, the potential of VEGF, Cat-L and microparticles as markers of endothelial dysfunction and plaque activity was evaluated. Because atherosclerosis is a process with multiple underlying factors with a synergistic action, it is highly unlikely that a single marker could be effective. As such, there are multivariate algorithms, like the Framingham Point Score, to which new markers must be compared to verify the addition of any useful information to risk evaluation.

The adopted methodology for the analysis of VEGF and Cathepsin-L was the ELISA of human serum samples. Flow cytometry is the most effective technique for the analysis of microparticles and the only one with clinical applicability. In this study the markers CD31, CD42b and CD144 were used to discriminate endothelial subpopulations, three markers already associated with diseases of the vascular system.

The results suggest a possible relationship between Cathepsin-L, microparticles CD144⁺ and the Framingham Point Score. It was found evidence supporting that microparticle production is a process activated in response to aggression and it plays a protective and regenerative role on the endothelium, justifying the verified increase in microparticles CD42b⁻CD144⁺ with endothelial dysfunction. Although VEGF was not altered in this condition, it points a connection with the chronic inflammation that characterizes atherosclerosis. The presence of symptomatic lesion does not seem to influence the studied parameters, more dependent on traditional risk factors. However, the limited sample, duration and nature of this study make it impossible to extract more than preliminary data that justifies the continuation of this research.

Keywords: Cathepsin-L, endothelial dysfunction, endothelial microparticles, risk factors, VEGF.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x

I. INTRODUÇÃO

1. Impacto socioeconómico das doenças cardiovasculares	2
2. O endotélio	3
2.1. Disfunção endotelial	4
3. Óxido Nítrico (NO)	5
3.1. Regulação do NO	6
3.2. Função biológica do óxido nítrico	9
4. VEGF e Catepsina-L na angiogénese e actividade da placa	11
4.1. VEGF	11
4.1.1. Função biológica do VEGF	12
4.1.2. O VEGF na aterosclerose	13
4.2. A Catepsina-L na remodelação da matriz e função endotelial	14
5. Micropartículas	16
5.1. Função biológica	18
5.2. Comunicação intercelular e iniciação da apoptose	19
5.3. Micropartículas na disfunção endotelial	21
5.4. Micropartículas e angiogénese	22
5.5. EMPs como marcadores de doença cardiovascular	22
6. Factores e indicadores de risco cardiovascular	23

II. OBJECTIVOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. População e grupos de estudo	29
1.1. Caracterização e avaliação clínica	29
2. Métodos analíticos	30
2.1. Micropartículas	30
2.2. Quantificação do NO	34
2.3. Quantificação de parâmetros solúveis por ELISA: VEGF e Cat-L	35
2.3.1. VEGF humano solúvel	36
2.3.2. Catepsina humana solúvel	36
3. Índices de risco: Índice Aterogénico de Plasma, CT/HDL-C e <i>Framingham Point Score</i>	37
4. Análise estatística	39

IV. RESULTADOS

1. Caracterização dos grupos de estudo	41
2. Óxido nítrico	44
3. VEGF	44

4. Catepsina-L	47
5. Micropartículas	49
6. Correlações entre as variáveis VEGF, Cat-L e micropartículas	51
7. Factores metabólicos de risco cardiovascular	53
V. DISCUSSÃO	55
1. Indicadores sistémicos na doença aterosclerótica	56
2. Representatividade da análise de micropartículas	59
3. Avaliação da função endotelial	61
4. Activação endotelial e actividade proteolítica da placa	63
5. Função endotelial e factores de risco	64
6. Avaliação de risco cardiovascular	65
VI. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	72
VII. REFERÊNCIAS	76
VIII. SUPLEMENTOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
AIP	Índice Aterogénico do Plasma (do inglês: <i>Atherogenic Index of Plasma</i>)
ALT	Alanina Aminotransferase
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Cinase AMP-Activada (do inglês: <i>AMP-Activated Protein Kinase</i>)
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína Activadora-1 (do inglês: <i>Activator Protein-1</i>)
AP-4	Proteína Activadora-4 (do inglês: <i>Activator Protein-4</i>)
apoB	Apolipoproteína B
APTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Activada
AST	Aspartato Aminotransferase
Bcl-2	Do inglês: <i>B-Cell Lymphoma-2</i>
bFGF	Factor de Crescimento Básico de Fibroblastos (do inglês: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)
BH₄	Tetrahidrobiopterina
Cat-L	Catepsina-L
Cav-1	Caveolina-1
cGMP	Guanidina Monofosfato Cíclico
CK	Creatina Cinase
Cox-	Ciclooxigenase
CRP	Proteína C-Reactiva
Cy5	Cianina 5
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Do inglês: <i>Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay</i>
EMP	Micropartícula Endotelial
EPC	Célula Progenitora Endotelial (do inglês: <i>Endothelial Progenitor Cell</i>)
EPCR	Receptor Endotelial da Proteína C (do inglês: <i>Endothelial Protein C Receptor</i>)
ERK	Cinase Regulada por Sinal Extracelular (do inglês: <i>Extracelular Signal-Regulated Kinase</i>)
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FITC	Fluoresceína Isotiocianato
FMN	Flavina Mononucleótido
FPS	Do inglês: <i>Framingham Point Score</i>
FSC	Dispersão Frontal (do inglês: <i>Forward-Scatter</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês: <i>High Density Lipoprotein</i>)
HDL-C	Colesterol associado a HDL
HIF-1	Factor Induzido por Hipóxia-1 (do inglês: <i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>)
HRP	Horseradish Peroxidase
hsCRP	CRP ultrasensível (do inglês: <i>High-Sensitive CRP</i>)
Hsp	Do inglês: <i>Heat-shock Protein</i>
HTA	Hipertensão Arterial
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1 (do inglês: <i>Intercelular Adhesion Molecule-1</i>)
IFN-	Interferão
IL-	Interleucina

IMC	Índice de Massa Corporal
INR	Índice Internacional Normalizado
IR	Receptor de Insulina
LCAT	Lecitina-Colesterol Acetiltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês: <i>Low Density Lipoprotein</i> ; prefixo ox-, oxidada; sd, <i>small-dense</i>)
LDL-C	Colesterol associado a LDL
L-NAME	L-N(G)-Nitroarginina Metil-éster
LPS	Lipopolissacárido Bacteriano
MAPK	Proteína Cinase Mitogénio-Activada (do inglês: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MCAM	Molécula de Adesão Celular de Melanoma (do inglês: <i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>)
MEK	MAPK cinase
MLCP	Fosfatase da Cadeia Média da Miosina (do inglês: <i>Myosin Light-Chain Phosphatase</i>)
MMP	Metaloproteinase da Matriz
MP	Micropartícula
NAD(P)H	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (fosfato)
NCEP/ATP III	Do inglês: <i>National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III</i>
NF-kB	Factor Nuclear-kB
NO	Óxido nítrico
NOA	Analisador de Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase (prefixo e-, endotelial; i-, indutível; n-, neuronal)
NP	Neuropilina
PAT	Tonometria Arterial Periférica (do inglês: <i>Peripheral Arterial Tonometry</i>)
PBS	Tampão Salino de Fosfato (do inglês: <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDGF	Factor de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	Molécula de Adesão Celular Plaqueta-Endotélio (do inglês: <i>Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>)
PFP	Plasma Livre de Plaquetas (do inglês: <i>Platelet-Free Plasma</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Cinase
PIGF	Factor de Crescimento da Placenta
PKA	Proteína Cinase A
PKB	Proteína Cinase B (ou Akt)
PKC	Proteína Cinase C
PKG	Proteína Cinase G (ou Proteína Cinase cGMP-Dependente)
PLC	Fosfolipase-C
PMP	Micropartícula Plaquetária
PP2A	Fosfatase Proteica 2A (do inglês: <i>Protein Phosphatase 2A</i>)
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
pro-BNP	pro-Péptido Natriurético Cerebral
PS	Fosfatidilserina
PSGL-1	Ligando Glicoproteico da P-Selectina-1 (do inglês: <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>)
PT	Tempo de Protrombina

RANTES	Do inglês: <i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RDW	Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (do inglês: Red Cell Distribution Width)
RHI	Índice de Hiperémia Reactiva (do inglês: <i>Reactive Hyperemia Index</i>)
ROS	Espécies Reactivas de Oxigênio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RTK	Receptor Tirosina Cinase
Ser	Serina
sGC	Guanilato Ciclase Solúvel
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
SOD	Superóxido Dismutase
sPLA₂	Fosfilipase A ₂ secretada
SP-1	Proteína Estimuladora-1 (do inglês: <i>Stimulator Protein-1</i>)
SSC	Dispersão Lateral (do inglês: <i>Side-Scatter</i>)
TF	Factor Tecidual
TFPI	Inibidor da Via do Factor Tecidual (do inglês: <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>)
TG	Triglicéridos
Thr	Treonina
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de Necrose Tumoral (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TNFR	Receptor de TNF
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular (do inglês: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>)
VEGF	Factor de crescimento endotelial-vascular (do inglês: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ; prefixo sv-, <i>snake venom</i>)
vWf	Factor de von Willebrand

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Progressão da lesão aterosclerótica	p. 4
Figura 2	Vias de sinalização e estimulação do NO no endotélio e músculo vascular liso	p. 8
Figura 3	Mecanismo de segregação de micropartículas	p. 18
Figura 4	Representação esquemática das regiões definidas para as micropartículas e plaquetas	p. 33
Figura 5	Identificação das MPs caracterizadas como duplo-positivas para CD31 e CD144	p. 33
Figura 6	Esquema ilustrativo do procedimento de análise das MPs CD42b ⁻	p. 34
Figura 7	<i>Boxplot</i> representativo dos níveis de VEGF no grupo controlo e em indivíduos com patologia coronária	p. 45
Figura 8	Níveis séricos de VEGF em fumadores e não-fumadores	p. 46
Figura 9	Varição na proporção de MPs com a administração de aspirina	p. 50
Figura 10	Relação entre a proporção de MPs e a função endotelial	p. 51
Figura 11	Diagramas de dispersão para a Cat-L e fenótipos de EMPs estudados	p. 52
Figura 12	Número de factores metabólicos de risco por indivíduo	p. 54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comprimentos de onda de excitação e emissão dos fluorocromos PE, FITC e PE-Cy5	p. 32
Quadro 2	Comparação das variáveis demográficas consideradas entre os grupos controle e com doença coronária	p. 41
Quadro 3	Fatores de risco no grupos controle e com doença coronária	p. 42
Quadro 4	Terapêutica farmacológica em curso nos grupos controle e com doença coronária	p. 42
Quadro 5	Parâmetros bioquímicos solúveis (grupo controle vs patologia coronária)	p. 43
Quadro 6	Variações nos índices AIP, CT/HDL-C e FPS entre os grupos controle e com doença coronária (DC)	p. 44
Quadro 7	Estatísticas do VEGF para os grupos controle e com patologia coronária	p. 45
Quadro 8	Correlações de Spearman do VEGF com os parâmetros bioquímicos solúveis analisados	p. 47
Quadro 9	Estatísticas da Catepsina-L para os grupos controle e com patologia coronária	p. 47
Quadro 10	Correlações de Spearman da Cat-L com os parâmetros bioquímicos solúveis analisados	p. 48
Quadro 11	Comparação dos fenótipos de MPs estudados entre os grupos controle e com patologia coronária	p. 49
Quadro 12	Correlações de Spearman com significância para os fenótipos de micropartículas considerados	p. 51
Quadro 13	Correlações de Spearman entre o VEGF, Catepsina-L e micropartículas analisadas	p. 52
Quadro 14	Análise da relação entre o número de fatores metabólicos de risco cardiovascular com o VEGF, Cat-L e micropartículas (ANOVA)	p. 54

I. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) agrupam diversas patologias do sistema circulatório, nomeadamente a doença coronária, doença cerebrovascular, hipertensão, doença vascular periférica, doença reumática, doença congénita e insuficiência cardíaca. A aterosclerose é a principal causa de doenças cardiovasculares no mundo moderno, particularmente de doença coronária, e o processo patológico no qual vários factores de risco convergem, como a hipercolesterémia, obesidade, hipertensão e tabagismo, dependendo também de uma pré-disposição genética individual. Genericamente, a aterosclerose é marcada pela perda da elasticidade vascular aliada a uma função anormal do endotélio, podendo ou não ocorrer um estreitamento obstrutivo do lúmen do vaso. O conhecimento crescente acerca dos mecanismos patofisiológicos da aterosclerose estabelece uma relação entre processos inflamatórios e oxidativos com a lesão da parede vascular. A acumulação de derivados de colesterol, lípidos e detritos da apoptose celular originam uma placa fibro-lipídica característica, o ateroma, susceptível a eventual ruptura e extravasão para a corrente sanguínea (**figura 1**). A aterosclerose pode ser avaliada em duas fases distintas: 1) num estágio pré-clínico com recurso a técnicas imagiológicas *in vivo* ou marcadores bioquímicos e 2) num estado patológico em que se manifesta através de sintomas e eventos agudos como a angina ou enfarte. É evidente a importância de desenvolver metodologias que permitam caracterizar a lesão em fases precoces da doença para um tratamento atempado que reduza o risco de ocorrência de eventos agudos potencialmente fatais ou debilitantes.

1. IMPACTO SOCIO-ECONÓMICO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte a nível mundial, responsáveis por cerca de 30% dos óbitos registados. Dados da Organização Mundial de Saúde apontam para um total de 17,1 milhões de mortes no ano de 2004 devido a complicações cardiovasculares, 7,2 milhões das quais correspondentes a doença coronária. Apesar de uma tendência global crescente, a sua incidência tem vindo a diminuir nos países industrializados. Acredita-se que esta tendência esteja relacionada com uma maior consciencialização dos factores de risco pela população em geral e, em especial, aos avanços tecnológicos e científicos que potenciaram o desenvolvimento de meios de diagnóstico e tratamento mais eficazes, bem como novos fármacos que permitiram o controlo da doença e aumentaram a esperança de vida. Infelizmente, estas inovações técnicas não estão ao alcance de todos e nos países em vias de desenvolvimento verifica-se um aumento na incidência das doenças cardiovasculares, reforçado por uma "ocidentalização" do estilo de vida, particularmente no que toca aos hábitos alimentares. Pela progressão corrente, estima-se que em 2030 as DCV sejam a

causa de 23,6 milhões de mortes a nível mundial. Portugal não escapa à regra e, em 2004, estas patologias foram responsáveis por 39% dos óbitos registados, com a maior fatia correspondendo a acidentes vasculares cerebrais. O seu impacto no sistema nacional de saúde é avultado, representando mais de metade das despesas em medicação (€506 milhões em 2003) e 8% do orçamento total para a saúde. Na verdade, os custos directos são apenas uma fracção do impacto das DCV, que atingem a população no auge da sua vida activa e com elevado grau de morbilidade. A grande mortalidade e morbilidade que lhes estão associadas, combinadas com as despesas nos cuidados de saúde, traduzem-se num custo anual estimado de €1762 milhões em Portugal [1].

2. O ENDOTÉLIO

O endotélio dos vasos sanguíneos é uma camada unicelular que separa duas regiões anatómicas distintas: o lúmen, onde o sangue circula, e os restantes tecidos corporais. Mais do que uma simples barreira, as células endoteliais exercem um papel fisiológico activo, interagindo através de mediadores químicos com vários tipos celulares como as plaquetas, os leucócitos e as células musculares lisas da túnica média. A sua função pode ser caracterizada por quatro aspectos essenciais: (1) um papel anti-coagulante, promovendo a manutenção do sangue num estado fluído, (2) o controlo das trocas de células, moléculas e plasma entre o sangue e tecidos corporais, (3) a regulação do fluxo sanguíneo por alteração da resistência vascular, (4) e um papel na resposta inflamatória a agentes agressores, promovendo a transmigração de leucócitos do sangue para os tecidos através da expressão de moléculas de adesão e citocinas [2].

A perfusão dos tecidos corporais depende da resistividade dos vasos sanguíneos, controlada pelas células de músculo liso nas artérias e arteríolas. O endotélio produz e segrega modeladores do tonus muscular e, em consequência, a resistividade arterial e fluxo sanguíneo. Estes mediadores são substâncias difusíveis de efeito vasodilatador, como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina, ou vasoconstritor como a endotelina-I, angiotensina-II e tromboxano A₂. Em condições normais, o balanço entre estes compostos é mantido pelas células endoteliais, integrando estímulos que regulam a função hemodinâmica [3-4].

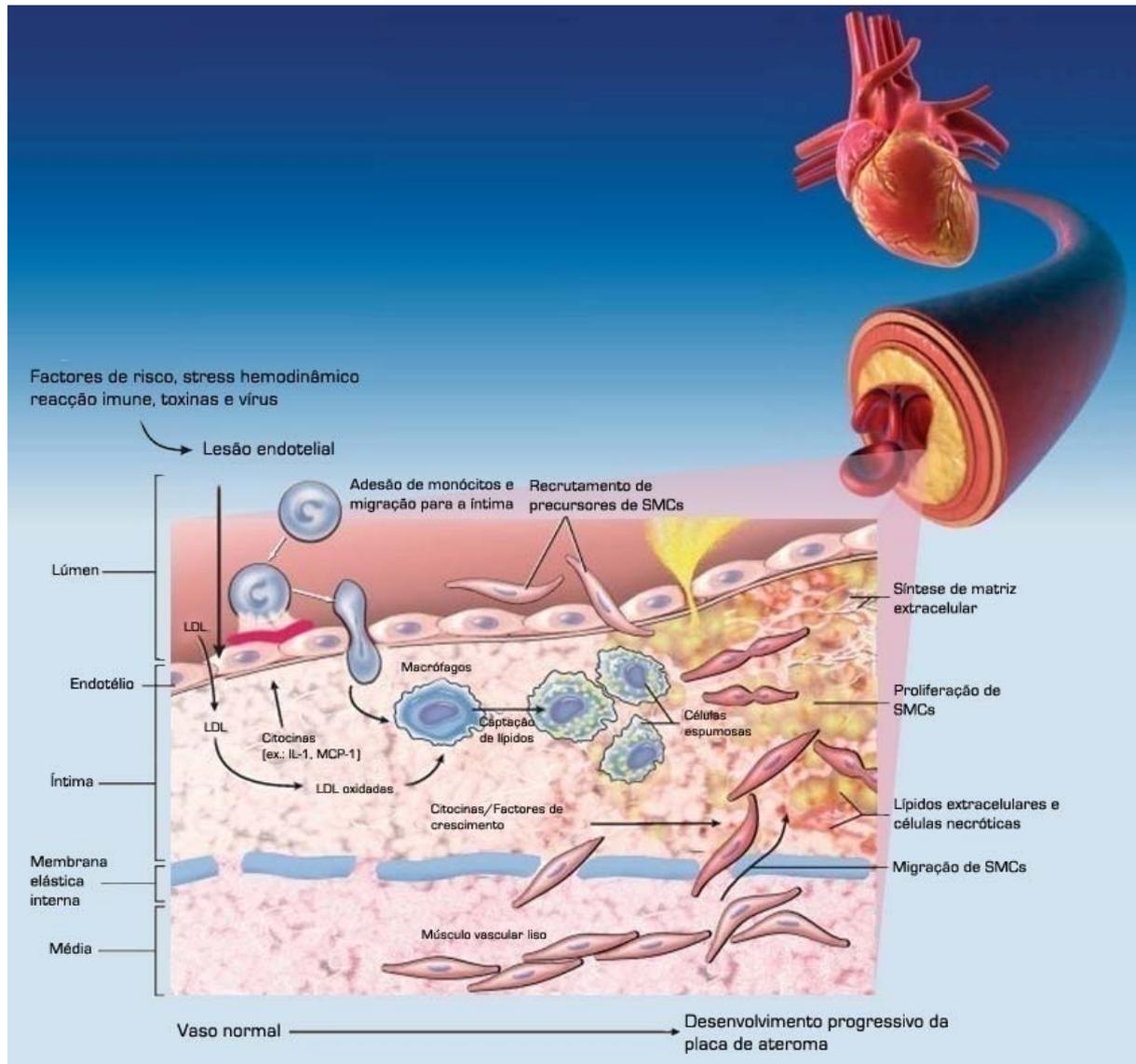


Figura 1 – Progressão da lesão aterosclerótica. Certos factores de risco induzem a lesão endotelial, resultando na adesão de plaquetas e transmigração de leucócitos para a íntima. Estas células libertam factores de crescimento que estimulam a proliferação e migração de músculo vascular liso para a íntima, onde produzem matriz extra-celular. Neste ambiente, as LDL sofrem oxidação e são reconhecidas e capturadas pelos receptores *scavenger* de macrófagos, dando origem às células espumosas. O seu secretoma favorece a progressão da lesão e a degeneração destas células contribui para a deposição lipídica característica do ateroma.

2.1. Disfunção endotelial

O endotélio é um tecido activo com funções fisiológicas importantes na manutenção do equilíbrio hemodinâmico e hemostático. O desempenho anormal das suas funções é definido como disfunção endotelial, caracterizado clinicamente pela incapacidade das células endoteliais em induzir vasodilatação quando a isso estimuladas. Esta disfunção pode ser provocada por *stress* bioquímico ou físico e resulta num

desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores, trombose e proliferação de células de músculo liso [5].

Vários estudos apontam para uma associação positiva entre a disfunção endotelial e o risco de eventos cardiovasculares. A disfunção endotelial foi detectada em indivíduos com factores de risco para doença coronária (hipercolesterémia, hipertensão, tabaco, diabetes e historial familiar) mas sem evidências estruturais notórias [6]. Quanto maior o número de factores de risco num indivíduo, maior a incapacidade de indução da dilatação vascular mediada por agonistas [7]. Estes dados provam a existência de disfunção endotelial em estados pré-clínicos de aterosclerose e, de facto, esta parece prever por si só eventos cardiovasculares em indivíduos com ou sem doença coronária, bem como a progressão da placa de ateroma [3]. Existem evidências da presença de disfunção endotelial em condições patológicas e fisiológicas que não do foro cardiovascular, como envelhecimento, diabetes mellitus tipo 1 e 2, resistência à insulina, obesidade, apneia do sono, entre muitas outras [8]. A disfunção endotelial é sugerida como marcador de risco e um prognóstico fiável e precoce de eventos agudos, aplicável tanto na função coronária como na vasculatura periférica, facilmente acessível, sem a necessidade de recorrer a métodos invasivos e perigosos [9].

3. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A vasodilatação mediada por factores produzidos no endotélio é conhecida desde 1980, mas apenas sete anos mais tarde se sugeriu o NO como mediador devido ao relaxamento induzido por nitritos em meio ácido na aorta de coelhos sujeita a ablação prévia do endotélio [10]. O óxido nítrico é gerado na conversão enzimática do aminoácido L-arginina em L-citrulina. Esta reacção é mediada pelo complexo enzimático óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase*, NOS), com a participação dos cofactores Ca^{2+} /calmodulina, NADPH, FAD, FMN e tetrahydrobiopterina (BH_4).

São conhecidas três isoformas de NOS. O NO é igualmente um neurotransmissor e foi no cérebro onde, em 1990, a primeira NOS foi clonada e purificada (NOS neuronal, nNOS). A segunda isoforma descoberta foi isolada de macrófagos com a particularidade de ser fortemente induzida por estímulos pro-inflamatórios e independente de cálcio (NOS indutível, iNOS). Curiosamente, a primeira fonte de óxido nítrico identificada, a NOS endotelial, foi a última a ser caracterizada. Esta eNOS, à semelhança de nNOS, é constitutiva e dependente de Ca^{2+} /calmodulina. Apesar de constitutivas, a expressão de eNOS e nNOS pode ser regulada em resposta a vários estímulos como citocinas, isquémia e forças hemodinâmicas [10]. É importante salientar que todas as isoformas de NOS podem ser encontradas em mais do que um tipo de tecido e, para além do endotélio, eNOS é igualmente expressa em plaquetas e músculo cardíaco [11].

3.1. Regulação do NO

A regulação fisiológica do NO pode ser assegurada a três níveis: 1) expressão de NOS, 2) actividade catalítica da enzima e 3) degradação do produto, NO. São conhecidos alguns polimorfismos genéticos de eNOS associados à aterosclerose. A substituição G892T é provavelmente a mais comum e, embora positivamente associada à doença cardiovascular em alguns grupos étnicos, existe ainda alguma controvérsia nesta relação devido à falta de conhecimento acerca da funcionalidade de eNOS nesta variante [5].

A actividade catalítica de eNOS é influenciada pela sua localização sub-celular nas *caveolae*. Nestas estruturas está presente a proteína caveolina-1 (Cav-1) que interage com eNOS inibindo reversivelmente a sua actividade por ocupação física do domínio de calmodulina [12]. As LDL e soro de pacientes hipercolesterémicos aumentam a expressão de Cav-1 e a formação do complexo heterodimérico caveolina-eNOS, atenuando a produção de NO nas células endoteliais [13]. O mesmo foi observado em modelo roedor de diabetes tipo I [14], reforçando o papel de Cav-1 na redução dos níveis de óxido nítrico e na disfunção endotelial associada a certas patologias.

Um outro processo de regulação envolve a fosforilação/desfosforilação de eNOS. A eNOS humana é estimulada pela fosforilação em Ser1177 e em Ser635 e inibida em Thr495 e Ser116 [11]. São conhecidas diversas cinases que participam neste processo, nomeadamente AMPK, proteína cinase C (PKC), proteína cinase cAMP-dependente (PKA) e Akt (proteína cinase B). A Akt é provavelmente a mais estudada e parece determinante na fosforilação de eNOS em Ser1177 e sua activação em resposta a agonistas como o estradiol [15], VEGF [16], insulina [17] e HDL [18]. Defeitos na sinalização Akt/eNOS foram encontrados na disfunção endotelial associada à diabetes tipo II, explicando em parte a hipertensão que geralmente se verifica nestes pacientes [17]. Outras cinases podem ter um papel inibitório na acção de eNOS. Em resposta a PKC verifica-se a desfosforilação em Ser1177 e fosforilação em Thr495, atenuando a actividade da enzima [19-20]. O processo inverso é mediado por PKA, estimulando eNOS [19] (**figura 2**).

A regulação do NO tem uma importante componente hormonal. Na verdade, as hormonas explicam parcialmente as diferenças na incidência de doenças cardiovasculares entre sexos, bem como o aumento de risco com a idade e diabetes. Elas actuam essencialmente de duas formas: 1) fosforilação rápida de eNOS em Ser1177 pela via PI3K/Akt e 2) alteração da expressão génica. Entre as famílias mais importantes estão as hormonas esteróides e a insulina. Os estrogénios actuam através de ER α activando a via PI3K/Akt e estimulam a síntese *de novo* de eNOS [21-22]. Durante muito tempo acreditou-se que as hormonas esteróides exerciam a sua acção através de receptores nucleares que modelam a expressão de genes específicos. No entanto, existem também receptores membranares que activam mecanismos de sinalização intracelular. Os

receptores de estrogénio membranares parecem favorecer a activação de eNOS pela via PI3K/Akt [22-23]. Por outro lado, não pode ser ignorada a capacidade do estradiol em diminuir a produção de superóxido e assim aumentar o NO disponível de forma indirecta [24]. Por outro lado, os androgénios são dominantes no sexo masculino e parecem exercer um efeito positivo e negativo na função endotelial. A testosterona tem um efeito vasoconstritor através da activação de canais iónicos e tromboxano A₂ [25]. Adicionalmente, é do conhecimento médico e científico que a terapia hormonal com testosterona associada à mudança de sexo é acompanhada por uma redução na função endotelial [26]. No entanto, os vasos sanguíneos contêm aromatase, uma enzima que catalisa a conversão de testosterona em estrogénio. Nos homens, este estrogénio derivado da actividade da aromatase tem um papel benéfico na regulação do NO e função endotelial [27]. Infelizmente não existem trabalhos que explorem o efeito directo da testosterona nos níveis de NO e regulação de eNOS. Quanto aos glucocorticoides, eles reduzem a produção de NO no endotélio através de um decréscimo na transcrição génica de eNOS [28], por aumento na produção de ROS pelas enzimas NAD(P)H oxidase e xantina oxidase [29], redução na síntese de tetrahydrobiopterina, redução no transporte membranar de L-arginina e inibindo a mobilização intracelular de cálcio [30-31]. De todas as hormonas, o efeito da insulina na produção de NO é provavelmente o melhor caracterizado. O receptor de insulina (IR) actua através de duas vias principais: 1) a via PI3K/Akt, conhecida como via metabólica e 2) através de MAPK, com acção mitogénica [32]. A PI3K/Akt não só actua activando eNOS como parece essencial para o aumento da síntese de eNOS em resposta à insulina. O AP-1, um factor de transcrição que se liga ao promotor de eNOS, é essencial para o aumento da expressão da enzima por acção desta hormona [33]. No síndrome de resistência à insulina, uma condição comum na actualidade, verifica-se curiosamente uma disfunção específica da via PI3K/Akt enquanto a via das MAPK se mantém funcional [34]. Como a resistência à insulina é geralmente acompanhada de hiperinsulinémia compensatória, a via das MAPK é sobre-estimulada e resulta em efeitos pró-hipertensivos através da activação de canais iónicos, aumento de endotelina-I e maior expressão de moléculas de adesão celular [32].



Figura 2 – Vias de sinalização e estimulação do NO no endotélio e músculo vascular liso. A integração de vários estímulos leva à fosforilação de eNOS em resíduos aminoacídicos específicos. O NO produzido na conversão enzimática de L-Arginina em L-Citrulina difunde-se até ao músculo vascular liso onde exerce um efeito relaxante e inibidor da proliferação e apoptose celulares. Uma descrição explicativa mais detalhada encontra-se anexada a este documento (**suplemento 1**).

Um outro aspecto de grande importância na modelação dos níveis de NO é o *stress oxidativo*. O NO é a molécula biológica com cinética mais favorável para o ião peróxido, reagindo cerca de três vezes mais rápido que a SOD [35]. Esta reacção

contribui não só para a redução dos níveis de NO disponível como também para a produção de peroxinitrito (ONOO^-), um potente oxidante com efeitos nefastos bem caracterizados. Adicionalmente, tanto o O_2^- como o ONOO^- oxidam a BH_4 , um cofactor essencial para a função da NOS. Na ausência de BH_4 dá-se o desacoplamento de NOS, que passa a produzir O_2^- em vez de NO, dando início a um ciclo vicioso em que o produto enzimático causa a perda de funcionalidade da enzima. O *stress* oxidativo resulta então numa reduzida biodisponibilidade de NO por uma combinação de eliminação directa e diminuição da sua produção, comprometendo a função do endotélio [36].

3.2. Função biológica do óxido nítrico

Embora quimicamente simples, constituída apenas por um átomo de oxigénio e azoto, os mecanismos de sinalização do NO são vários e complexos. Uma vez apolar, as membranas fosfolipídicas não limitam a sua difusão. Por outro lado, o coeficiente de difusão em água é relativamente alto, o que permite uma transmissão rápida a pequenas distâncias, limitado apenas pela sua meia-vida muito curta [11]. O NO é removido rapidamente pelos glóbulos vermelhos, combinando-se com a oxihemoglobina e originando nitratos. Este mecanismo é extremamente eficaz, pelo que a quantidade de NO produzida no endotélio é 10 a 40 vezes superior ao necessário para activar os mecanismos de sinalização no músculo liso vascular. A compartimentalização da hemoglobina pode ser considerada um mecanismo biológico de preservação do NO uma vez que nestas condições a reacção é 1000 vezes mais lenta [37]. Devido a esta labilidade, assume-se que o NO é sintetizado constitutivamente e exerce a sua acção em tecidos e órgãos próximos do local de produção. No entanto, existem moléculas mais estáveis que poderão funcionar como reserva e transporte de NO.

O nitrito é um produto da oxidação de NO que em certas circunstâncias pode ser reduzido novamente *in vivo*. A redução de NO_2^- ocorre espontaneamente em condições de hipoxia e isquémia (baixa tensão de O_2 e acidose), ou catalizada por proteínas com grupos prostéticos heme como a deoxihemoglobina, deoximioglobina, xantina oxiredutase, intermediários da cadeia respiratória e NOS [38]. Devido às condições extremas necessárias para a redução ácida e mediada pela xantina oxiredutase, um pH e tensão de oxigénio muito baixos, estes não deverão representar um importante mecanismo de produção de NO em condições fisiológicas. No entanto, no tecido isquémico são potencialmente relevantes para o efeito citoprotector do NO [39].

Apesar da auto-oxidação de NO ser um processo relevante na geração de nitrito, não tem uma cinética favorável e proteínas com função NO oxidase foram já descritas, nomeadamente a ceruloplasmina [40]. A dieta é também uma fonte importante de nitritos. As bactérias bucais produzem enzimas com actividade nitrato reductase que convertem os nitratos alimentares em nitritos [41]. A redução ácida de nitritos a NO no

estômago é também um mecanismo fisiológico bactericida e protector da mucosa por estimulação da secreção de muco e aumento do fluxo sanguíneo no estômago [42]. A ingestão de nitritos e nitratos está associada a uma redução directa da tensão arterial e é sugerida como possível explicação para o efeito cardioprotector da dieta mediterrânea [43].

Como vimos, a elevada reactividade do NO faz dele um sinalizador parácrino mas o nitrito plasmático poderá representar um mediador endócrino da sua acção. Recentemente foi demonstrado por Elrod e colaboradores [44] que NO endógeno é transportado no sangue e metabolizado em órgãos alvo, com efeito citoprotector contra a lesão causada por isquémia-reperfusão. Em ratos, a sobre-expressão de eNOS restrita aos cardiomiócitos resulta num aumento dos níveis de nitrito no sangue e seu transporte e armazenamento no fígado. O aumento das reservas hepáticas de nitrito atenua a lesão por isquémia-reperfusão através da produção de NO. Este trabalho apresenta evidências claras para um efeito endócrino do NO derivado de eNOS e reforça o seu papel citoprotector a um nível sistémico.

Adicionalmente à sua acção farmacológica amplamente descrita, os nitritos são um índice da actividade da NOS. Cerca de 80% do nitrito plasmático deriva da oxidação de NO gerado por eNOS e pode representar um marcador da função endotelial. Os níveis de nitrito correlacionam-se directamente com a vasodilatação fluxo-mediada e indirectamente com a espessura íntima-média [45].

A S-nitrosilação proteica é uma modificação pós-traducional dos grupos tiol de resíduos de cisteína [46]. Trata-se de uma reacção de carácter reversível com vários complexos enzimáticos a participar no processo de desnitrosilação como a S-nitrosoglutationa redutase, as tioredoxinas, superóxido dismutase e xantina oxidoreductase [47]. Esta modificação molecular resulta na alteração da actividade da proteína e protecção contra oxidação irreversível por outros agentes, permitindo assim o restauro funcional da proteína. Por exemplo, a S-glutationilação protege a glutatona de oxidação permanente e favorece uma resposta mais rápida ao *stress* oxidativo [48]. A nitrosoglutationa tem um efeito anti-plaquetário semelhante ao óxido nítrico, embora mais potente e selectivo, sugerindo uma sinergia entre os dois compostos [49]. As actividades da F₁F₀ATPase [50], citocromo c oxidase [51] e creatina cinase [52] são inibidas por S-nitrosilação e a actividade da α-cetoglutarato desidrogenase é estimulada [50]. A formação de nitrosotiois parece também exercer um papel cardioprotector pela modelação da actividade de enzimas relacionadas com a isquémia, *stress* oxidativo e apoptose. A S-nitrosilação de HIF-1α (*inducible hypoxia factor-1α*) promove a sua estabilização em condições normóxicas [53]. Na enzima NADPH oxidase endotelial verifica-se uma redução da actividade e supressão da geração de ROS [54]. A S-nitrosilação também exerce uma função anti-apoptótica por inibição da caspase-3 [55]. A

localização subcelular diferencial das isoformas de NOS assegura sinais restritos de S-nitrosilação e selectividade das proteínas alvo [56]. Adicionalmente, o *timing* da reacção é um factor que merece consideração. Por exemplo, durante a isquémia do tecido cardíaco são inibidas várias enzimas da cadeia respiratória, cuja actividade é regenerada na fase de reperfusão [47]. Isto deve-se a uma maior conversão de NO em ambiente condicionado pela isquémia a nível de pH e factores induzidos. Para além dos referidos, foram já identificados outros alvos de S-nitrosilação. A nitrosoalbumina poderá representar uma reserva bioactiva de NO com um tempo de vida prolongado [57]. A ligação covalente de NO à hemoglobina é também sugerida como um mecanismo de reserva e meio de transporte a longas distâncias [58].

São conhecidos vários mecanismos de transdução de sinal activados pelo óxido nítrico, sendo a produção de cGMP pela guanilatociclase solúvel (sGC) o melhor caracterizado. A sGC é uma hemoproteína que cataliza a conversão de GTP a cGMP. A ligação de NO promove activação alostérica da enzima e um aumento da sua actividade. O NO sintetizado no endotélio difunde-se até à camada de músculo liso na túnica média onde, através do cGMP e activação da proteína cinase G (PKG), provoca relaxamento muscular e vasodilatação por estimulação da MLCP (*myosin light-chain phosphatase*), responsável pela dessensibilização dos elementos contrácteis ao Ca^{2+} [59].

A reacção com radicais de tirosina é um processo associado a várias patologias e mediado por peroxinitrito, o produto reaccional do NO com espécies reactivas de oxigénio. A nitração de tirosina em certas proteínas altera a sua estrutura e função, tendo sido já descrita em dezenas de proteínas e em mais de 50 doenças humanas [60].

4. O VEGF E CATEPSINA-L NA ANGIOGÉNESE E ACTIVIDADE DA PLACA

Uma das características histomorfológicas mais evidentes nas lesões instáveis é a neovascularização da íntima e adventícia [61]. Da mesma forma, a remodelação da matriz extracelular é um dos mecanismos com maior influência na destabilização da placa e essencial para o irrompimento de novos vasos. O VEGF e as catepsinas desempenham aqui um papel de destaque.

4.1. VEGF

A família VEGF compreende sete membros já identificados, nomeadamente VEGF-A a -E, PlGF (Placental Growth Factor) e svVEGF (*snake venom VEGF*) [62]. Entre todos, VEGF-A é o melhor caracterizado e mais importante no processo angiogénico, apresentando relativa especificidade para as células endoteliais [62]. A sua acção é mediada por dois receptores tirosina cinase (RTKs), VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1 ou KDR). Este último é o principal mediador dos efeitos angiogénicos, permeabilizantes e

mitogénicos de VEGF-A no endotélio e envolve principalmente a via PI3K/Akt. O Flt-1 é importante na migração de células endoteliais e monócitos mas não aparenta ter uma função relevante na angiogénese em condições não-patológicas. Existe ainda um terceiro receptor, VEGFR-3 (Flt-4), mas que não liga a VEGF-A. Embora presente em todo o endotélio durante as fases iniciais do desenvolvimento, no adulto está restrito ao endotélio linfático e microvasculatura de tumores e feridas [63]. A neuropilina-1 e neuropilina-2 (NP-1 e NP-2) não se incluem na família dos RTKs mas são igualmente receptores de VEGF com um papel importante no desenvolvimento cardiovascular e neuronal [62, 64].

4.1.1. Função biológica do VEGF

A deficiência em VEGF é letal em estados prematuros o que limita o estudo do seu papel *in vivo*. As suas funções biológicas podem ser caracterizadas em 4 aspectos principais, sejam eles 1) estimular a proliferação e migração de células endoteliais, 2) inibir a apoptose, assegurando a sobrevivência e manutenção do endotélio, 3) promover a permeabilização vascular a células e macromoléculas e 4) regulação hemodinâmica com um potente efeito vasodilatador mediado pelo NO [65].

A actividade mitogénica do endotélio é iniciada por VEGFR-2 através das vias PLC- γ /PKC/Raf/MEK/ERK e PI3K/p70 S6K [62]. O VEGF promove também a manutenção das células endoteliais pelo aumento na expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e A1 [66], bem como pela activação da via PI3K/Akt [67]. O VEGFR-3 é expresso especificamente nas células terminais dos vasos em formação [63]. Ele interage com componentes da matriz extracelular, nomeadamente a integrina β 1, capaz de fosforilar VEGFR-3 de uma forma distinta de VEGF, contribuindo para determinar a morfologia correcta dos vasos sanguíneos [68].

A permeabilização do endotélio é uma reacção vascular à inflamação aguda. O VEGF induz permeabilidade vascular a água e macromoléculas, assistindo a reparação de tecidos e remodelação da matriz extracelular em resposta a uma lesão [69]. O controlo deste processo depende da modulação da expressão proteica e construção de *tight junctions*, bem como da fenestração vascular na monocamada endotelial [70-71]. Adicionalmente, o VEGF parece estimular a transmigração de leucócitos e monócitos para a placa de ateroma. A expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, P-selectina e E-selectina é superior em vasos recém-formados sob influência de VEGF [65, 72]. O VEGF actua também como uma citocina pró-inflamatória importante na proliferação e atracção de monócitos Flt-1⁺ e estimulando nestes a produção de TNF- α e IL-1 β , contribuindo assim para a manutenção da condição inflamatória [65]. Por outro lado, VEGF em níveis basais é importante na manutenção do endotélio num estado quiescente e assegura a estabilidade vascular. A sua neutralização com sFlt-1, uma forma solúvel do receptor

VEGFR-1, inviabiliza a vasodilatação mediada pelo endotélio e aumenta a expressão de moléculas de adesão a leucócitos [73].

O VEGF está também associado à deposição de outros elementos característicos da placa de ateroma. A fenestração da camada endotelial favorece a extravasão de plaquetas e eritrócitos, do que resulta a acumulação de ferro, hemoglobina e colesterol, característica de placas instáveis [65]. Da mesma forma, a permeabilidade a LDL aumenta [70], contribuindo para o *pool* de oxLDL na íntima comum nas lesões ateroscleróticas.

O efeito hemodinâmico de VEGF foi demonstrado em ratos Sprague-Dawley onde a infusão intravenosa resultou em marcada hipotensão e taquicardia compensatória, efeito este anulado por N(G)-nitro-L-argininametil-éster (L-NAME), um composto inibidor da síntese de NO [74]. Mais tarde demonstrou-se que VEGF-A induz a expressão e estimula a actividade de eNOS [75]. A activação da via PI3K/Akt por VEGF provoca a fosforilação de eNOS e, por conseguinte, estimulação da sua actividade [76]. De acordo, parte dos efeitos biológicos de VEGF, em particular a permeabilização endotelial e vasodilatação, podem ser explicados pelo estímulo à síntese de NO. Pacientes oncológicos submetidos a terapia sistémica anti-VEGF apresentam frequentemente hipertensão e vasoconstrição resultantes de uma reduzida produção de NO [77]. Outros mecanismos de protecção vascular atribuídos ao NO são indirectamente patrocinados por VEGF, como o efeito anti-proliferativo de músculo vascular liso, prevenção da formação de neointima, redução da expressão de moléculas adesivas no endotélio e inibição da actividade de plaquetas [64]. Na verdade, parece existir um *feedback* positivo entre VEGF e NO. Não só VEGF é capaz de estimular a síntese de NO como este aumenta a transcrição de VEGF e estabilidade do seu mRNA [78]. Doronzo e colaboradores demonstraram também que o aumento de VEGF em resposta à insulina é indirecto e mediado por NO [79].

4.1.2. O VEGF na aterosclerose

Níveis elevados de VEGF são frequentemente encontrados em placas de ateroma, contribuindo para a inflamação pelo aumento induzido da expressão de moléculas de adesão e recrutamento de linfócitos e monócitos para a íntima. No entanto, a vascularização *de novo* não se verifica em todas as placas mas especialmente em condições de instabilidade e em lesões restenóticas [65]. O bloqueio dos receptores de VEGF reduz a extensão da lesão na íntima independentemente de outros factores pro-aterogénicos. Em roedores, o tratamento com bevacizumab (AvastinTM, Genentech), um anticorpo monoclonal para VEGF-A, diminui a espessura da placa comparativamente a lesões não tratadas [80]. O VEGF é essencial para a manutenção da integridade endotelial e a sua aplicação após a implantação de um *stent* reduz a formação de

neointima mesmo com um aumento paralelo na neovascularização [65], provavelmente através do incremento na síntese de NO. Em condições de isquémia do miocárdio verifica-se um aumento nos níveis de VEGF em resposta à hipóxia, numa tentativa de restaurar a perfusão dos tecidos através da formação de novos vasos e regeneração do endotélio. A baixa tensão de O₂ induz a acumulação de HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1*) e adenosina, ambos com capacidade de aumentar a expressão de VEGF nos tecidos afectados [81]. Com o desenvolvimento da lesão, a íntima fica mais espessa, dificultando a difusão de O₂ e nutrientes para as zonas interiores. O elevado número de células inflamatórias na lesão aumenta o requerimento de O₂ agravando a condição de hipóxia. Em resposta, VEGF é induzido, promovendo a génese de novos vasos para a manutenção e progressão da placa de ateroma [82]. É então pertinente especular que a angiogénese tem um efeito protector da integridade da placa quando em hipóxia, mas contribui para a instabilidade da mesma quando estimulada pela condição pró-inflamatória. Não é claro que a angiogénese em si seja responsável pela destabilização da lesão aterosclerótica, sendo provável apenas um papel indirecto através da facilitação e promoção de processos inflamatórios [65].

4.2. Catepsina-L na remodelação da matriz e função endotelial

As catepsinas são uma família de proteases de cisteína produzidas por diversos tipos celulares e com papel activo na progressão e destabilização do ateroma, em particular a sua isoforma L (Cat-L). Ela participa na clivagem do domínio globular C-terminal (NC1) do colagénio XVIII, com consequente libertação de endostatina, um pequeno péptido solúvel de potencial anti-angiogénico e modelador da função endotelial [83]. É conhecida a sua interferência nos mecanismos de sinalização de VEGF dependentes de ERK1/2 [84]. Adicionalmente, a aplicação de endostatina reduz os níveis de NO endotelial por inibição da activação de eNOS pelo VEGF [85] e/ou por degradação de NO através da indução de superóxido [86]. A endostatina inibe a fosforilação e activação de eNOS por estimulação de PP2A (*protein phosphatase 2A*) [85]. Trabalhos recentes demonstram que os efeitos inibitórios em eNOS não se limitam ao bloqueio da activação mediada por VEGF. A endostatina é também responsável por uma redução pós-traducional nos níveis de sGC e favorecimento da sua degradação proteossómica num processo dependente de PP2A [87]. Recentemente demonstrou-se que a endostatina é produzida na artéria coronária quando Cat-L é abundante, resultando em disfunção endotelial por *stress oxidativo* [83]. Originalmente, a endostatina foi identificada como um inibidor da proliferação e migração de células endoteliais [88-89], embora hoje seja reconhecido o seu papel em outros tipos celulares. Existem ainda evidências de que possui receptores membranares próprios com cadeias de heparan-sulfato em células endoteliais, através dos quais poderá iniciar a morte celular programada por inibição de

proteínas anti-apoptóticas e aumento da actividade da caspase-3 [90]. A endostatina parece fazer parte de um mecanismo auto-controlado complexo que assegura um equilíbrio na angiogénese. O colagénio XVIII é o componente central de proteoglicanos de heparan-sulfato, necessários como cofactores na sinalização de VEGF, evidenciando um papel regulador positivo. A produção de Cat-L por células endoteliais em determinadas fases deste processo pode ser considerado um mecanismo retroactivo uma vez que provoca a libertação de endostatina e inibição da angiogénese. Paralelamente à sua acção inibitória da neovascularização, a endostatina favorece também a estabilização das estruturas tubulares primárias recém-formadas [91].

Em contraste ao efeito anti-angiogénico mediado pelo seu produto catalítico, a endostatina, a Cat-L também favorece a neovascularização através da degradação de componentes da matriz extracelular e da membrana basal, facilitando a "descolagem" de células endoteliais que participam da formação das estruturas tubulares que precedem os novos vasos [91]. No entanto, as propriedades colagenolíticas e elastinolíticas de Cat-L são essencialmente deletérias na placa de ateroma. Os macrófagos expressam grande quantidade de catepsinas que são secretadas e degradam a cápsula fibrótica contribuindo para a sua instabilidade [92]. A sua capacidade de processar caspases e induzir morte celular programada [93] poderá justificar a sua elevada expressão em macrófagos apoptóticos [94]. Apesar de virtualmente todas as células expressarem Cat-L em níveis basais, esta pode aumentar em resposta a citocinas como a IL-6, IL-1 β e IFN- λ em células epiteliais e monócitos [95]. O papel da Cat-L na progressão da aterosclerose é ainda superficialmente conhecido. As células endoteliais, macrófagos e células de músculo liso localizadas na lesão apresentam níveis superiores de Cat-L e o tratamento *in vitro* com TNF- α e IFN- λ estimula a sua produção e secreção. A expressão de Cat-L em placas de ateroma avançadas é mais evidente na cápsula fibrótica, túnica média e nas zonas de curvatura da placa [95]. Por outro lado, não só existe um aumento localizado de Cat-L como também se verifica um aumento sistémico da enzima em doentes com estenose >10%, independente de outros factores de risco para doença coronária [95]. De acordo com o conhecimento actual da patofisiologia da aterosclerose, os níveis serológicos elevados de Cat-L em pacientes afectados suporta a natureza inflamatória sistémica da doença.

A catepsina-L é também sobre-expressa em vários carcinomas humanos. Tal como acontece na angiogénese, ela também favorece a neovascularização de tumores e degradação da matriz extracelular circundante, dois processos essenciais para a progressão e metastização das células cancerígenas. Em células de glioblastoma, o VEGF induz a síntese e secreção de Cat-L através dos factores de transcrição SP-1 (stimulator protein-1) e AP-4 (activator protein-4) [96].

Estudos recentes têm contribuído para a mudança de paradigma acerca dos mecanismos de neovascularização pós-natal. Para além da migração e proliferação de células endoteliais maduras, as células progenitoras endoteliais (EPCs), derivadas da medula óssea, contribuem significativamente para a formação de novos vasos sanguíneos. A elevada expressão de Cat-L em EPCs, significativamente superior à verificada em células diferenciadas, é um requisito para a capacidade invasiva nos tecidos isquémicos que as caracteriza e a inibição farmacológica de Cat-L inibe a génese de novas estruturas vasculares em roedores [97]. Em diabéticos, altos níveis de glicose inibem a expressão de Cat-L, limitando a capacidade funcional de gerar novos vasos e reparar lesões [98]. Desta forma, a Cat-L em condições anómalas de expressão excessiva, como é característico da aterosclerose, tem um efeito negativo na angiogénese e função endotelial mas em níveis fisiológicos é essencial para o desenvolvimento de novos vasos e hemostase normal.

5. MICROPARTÍCULAS

As micropartículas (MPs) são microvesículas fosfolipídicas libertadas por diversos tipos celulares em resposta a um estímulo, seja ele activação ou apoptose, e que albergam à sua superfície antígenos característicos da célula-mãe. A história da sua descoberta remonta a 1949 quando Chargaff e colaboradores reconhecem que o plasma livre de plaquetas (PFP) continha um factor precipitável catalizador da geração de trombina [99]. Apenas em 1967 Wolf observa que plaquetas activadas libertam fragmentos com actividade pró-coagulante aos quais chamou "*platelet dust*" [100] e, desde então, vários trabalhos têm sido publicados identificando e caracterizando estas vesículas no Homem e em modelos animais.

As MPs são vesículas membranares com diâmetro compreendido entre os 100 nm e os 1,5 μm [101]. No entanto, é conveniente salientar que esta definição é arbitrária e existe uma grande diversidade inter-laboratorial de procedimentos e critérios para a caracterização de MPs [102]. Para uma maior homogeneidade e consistência de resultados, é frequente a aplicação da definição geral de micropartícula para um diâmetro máximo de 1 μm [103]. No entanto, é consensual que a metodologia mais adequada para a sua avaliação é a citometria de fluxo. Trata-se de um método expedito que permite a identificação simultânea de múltiplas sub-populações fenotipicamente distintas. Contudo, as reduzidas dimensões das MPs, muitas vezes inferiores ao comprimento de onda do laser de excitação e no limiar da resolução do equipamento, tornam difícil separá-las do ruído electrónico de fundo [103]. Outras técnicas mais precisas têm sido sugeridas, como a Microscopia de Força Atómica [104] ou Dispersão de Luz Dinâmica [105], mas sem aplicabilidade prática e clínica descortinável.

Apesar de libertadas por quase todas as células do organismo, as MPs derivadas de plaquetas (PMPs), endotélio vascular (EMPs) e de leucócitos são as melhor caracterizadas e de maior interesse na patofisiologia da doença cardiovascular [106]. Em particular, as micropartículas de origem endotelial foram já associadas a condições patológicas como aterosclerose e doença coronária, hipertensão arterial, esclerose múltipla, pré-eclampsia e diabetes [107].

O mecanismo de segregação de MPs é ainda obscuro mas parece evidente que não se trata de um processo aleatório mas sim minuciosamente regulado e resultado de diferentes tipos de estímulo. São conhecidos diversos agonistas da segregação de MPs como o lipopolissacárido bacteriano (LPS), TNF- α , IL-1, IL-6, complexo C5b-9 do complemento, LDL, ROS, trombina e histamina [101-102, 107]. A formação de EMPs requer modificações na arquitetura celular e ruptura das ligações entre a membrana e o citosqueleto. A teoria prevalente assenta na perda da assimetria membranar e o influxo de cálcio como processos chave na segregação de MPs. Em condições normais, a membrana celular é assimétrica no que respeita à composição de fosfolípidos, apresentando fosfatidil-colina e esfingomiéline no exterior e aminofosfolípidos aniónicos, fosfatidilserina (PS) e fosfatidil-etanolamina, na membrana interna. Esta assimetria é um processo activamente regulado por enzimas dependentes de cálcio, a *flipase*, *flopase* e *scramblase*. Em resposta a um estímulo, os níveis intracelulares de Ca^{2+} aumentam e a actividade destas enzimas é alterada, levando ao colapso da assimetria lipídica e quebra da ligação entre os aminofosfolípidos e os elementos do citosqueleto, comprometendo a estabilidade mecânica da célula. Adicionalmente, a calpaína é activada pelo Ca^{2+} degradando as interacções entre os microfilamentos de actina e as glicoproteínas membranares [102]. A ancoragem da membrana à célula é então destruída permitindo a segregação de vesículas que externalizam aminofosfolípidos na membrana, particularmente PS (PS^+ -MP) (**figura 3**).

A quantidade de MPs em circulação reflecte o balanço entre a sua segregação e degradação. PMPs de rato têm um tempo de vida de 30 min, em contraste com as células que lhes deram origem cujo tempo médio de vida é de 10 dias [108]. Apesar de o mecanismo de remoção não ser ainda claro, algumas hipóteses podem ser consideradas. A fosfolipase secretória A_2 (sPLA $_2$) parece participar na degradação de MPs de origem eritrocítica [109]. A PS exposta na membrana funciona como sinal de reconhecimento para fagocitose imediata ou facilitada por opsonização [110]. Adicionalmente, as células Kupffer no fígado são capazes de remover rapidamente vesículas derivadas de eritrócitos através dos seus receptores *scavenger* [111]. No entanto, a fagocitose pode ser inibida pela presença de oxLDL, capaz de bloquear o reconhecimento de MPs pelos receptores *scavenger* em macrófagos, indiciando um potencial mecanismo para a sua acumulação

em lesões ateroscleróticas [112]. Estes processos estão, como veremos, relacionados com as próprias funções biológicas reconhecidas para as micropartículas.

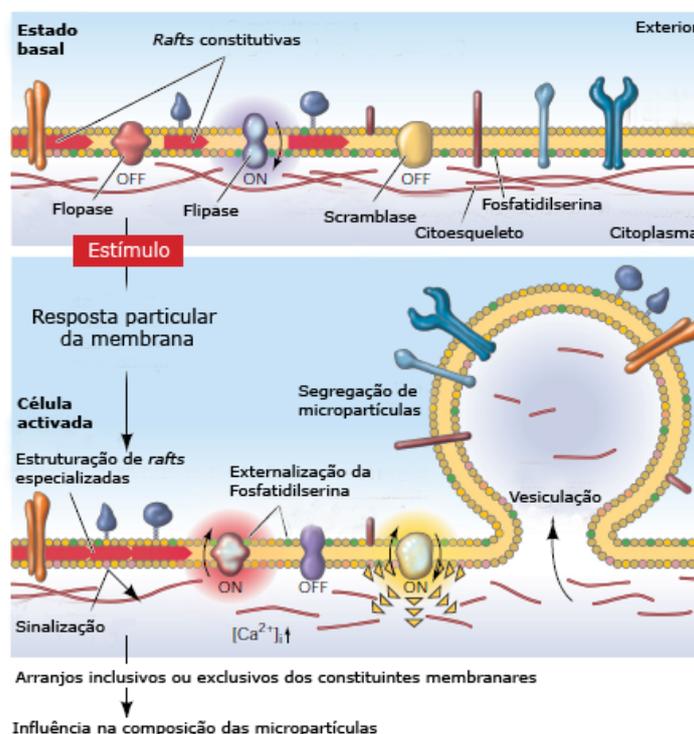


Figura 3 – Mecanismo de segregação de micropartículas. A membrana plasmática é uma entidade bem estruturada que se caracteriza por uma distribuição regulada de lípidos e proteínas. Para além de uma distribuição assimétrica de fosfolípidos entre as duas faces da membrana plasmática, existe também uma organização lateral em domínios chamados rafts lipídicos. Estes microdomínios compartimentalizam processos celulares e servem como centros organizadores para a ligação demoléculas de sinalização e controlam o tráfego de receptores na membrana. Após estimulação, as enzimas flopase, flipase e scramblase são activadas pela influxo de Ca^{2+} na célula, ocorrendo uma redistribuição dos elementos da membrana plasmática (externalização de PS e movimentação dos rafts lipídicos) que precede a libertação de MPs. A resposta da membrana a um estímulo é singular e específica, caracterizada pela inclusão ou exclusão de determinados constituintes distribuídos nos rafts e que originam MPs com uma composição particular. Adaptado de: *Hugel, 2005* [128].

5.1. Função biológica

A segregação de MPs não é um processo passivo e várias funções biológicas lhes são reconhecidas. De um modo geral, elas intervêm na coagulação, comunicação intercelular e auto-preservação das células-mãe [106]. O síndrome de Scott é uma patologia caracterizada por complicações hemorrágicas e hemostase anómala. Nestes pacientes, os eritrócitos e plaquetas não segregam MPs por incapacidade de expor PS na membrana plasmática [102]. A PS serve de ancoragem a factores de coagulação e amplificação catalítica na formação de trombina [106]. Algumas MPs apresentam ainda o factor tecidual (TF) à superfície e contribuem activamente para a formação do trombo. O

TF é expresso em monócitos associado a PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), promovendo o recrutamento de plaquetas CD62P⁺ (P-selectina) [102]. Células endoteliais activadas também exibem actividade pro-coagulante dependente de TF e TF⁺-EMPs foram já identificadas em associação a doenças humanas [113]. Trabalhos recentes demonstram ainda a existência de EMPs positivas para o factor von Willebrand (vWf) e que co-expressam E-selectina (CD62E), um marcador de activação endotelial [114]. O vWf presente nas EMPs difere do vWf solúvel e está presente sob a forma de múltímeros de maiores dimensões e mais estáveis. Estas vWf⁺-EMP interagem com as plaquetas e induzem a formação de agregados de mais difícil dissociação [115]. Em contraste, as MPs também exercem uma função anti-coagulante, suportando a actividade de proteína C e por expressão membranar de trombosmodulina, TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*), EPCR (receptor endotelial de proteína C) e proteína S [116]. Este duplo papel sublinha a importância das MPs e do estreito controlo dos antigénios por elas expressos na manutenção de um processo hemostático normal.

A preservação da célula parental é outro fim que a segregação de micropartículas pretende assegurar. Como vimos, a exposição de PS é um sinal de dano e marcação para fagocitose pelo sistema reticulo-endotelial. Uma vez que o dano pode ser temporário e susceptível de reparação, são necessários mecanismos de remoção da PS exposta. Duas hipóteses podem ser consideradas: a célula internaliza a PS exposta ou expulsa-a através de MPs. Uma vez que o primeiro é um processo lento e dependente de energia, é natural pensar na segregação de MPs como uma alternativa mais rápida e económica para a célula. Em adição, a libertação de microvesículas parece facilitar a remoção do complexo de ataque do complemento C5b-9, um agente perfurante e destabilizador da membrana, também envolvido na geração artificial de MPs *in vitro* [117]. A expulsão de outros agentes nocivos e patogénicos é também provável e a presença de proteínas de prião foi já detectada em MPs com a capacidade de propagar a infecção [118]. Da mesma forma, moléculas promotoras de apoptose podem ser excretadas desta forma, como é o caso da caspase-3, numa tentativa de reverter o processo de morte celular [119]. A teoria do "engodo" postula que receptores celulares libertados podem sequestrar ligandos e neutralizar a sua acção. Por exemplo, a P-selectina solúvel inibe a adesão de neutrófilos activados CD18⁺ ao endotélio [120]. Faz todo o sentido pensar que os antigénios das células parentais presentes nas MPs cumpram também esta função.

5.2. Comunicação intercelular e iniciação de apoptose

A morte celular induzida é um mecanismo imunológico de controlo da população linfocítica e prevenção de reacção autoimune. Fas e o seu ligando, FasL, são proteínas presentes na membrana celular que medeiam esta acção anti-proliferativa. Fas pertence à família dos receptores de TNF (TNFR) e, após ligação de FasL, induz apoptose pela

execução de um programa coordenado de activação hierárquica de caspases. FasL pode ser expresso por indução em células T ou de forma constitutiva em órgãos imuno-privilegiados [121]. O síndrome de Canale-Smith é caracterizado por uma redução na apoptose mediada por Fas, com manifestações clínicas de autoimunidade e proliferação linfocítica, duas condições relacionadas com propensão para a lesão aterosclerótica. Fas/FasL parece ter aqui um papel protector por regulação da inflamação vascular e deficiências neste mecanismo originam placas mais complexas e com maior número de células infiltradas [122]. A presença do ligando de Fas (FasL) em MPs foi detectada e pode representar um mecanismo remoto de iniciação da apoptose. A segregação de FasL⁺-MP induz a morte de células T e contribui para a manutenção da condição imuno-privilegiada de certos órgãos e estruturas, como é exemplo o trofoblasto [123].

As MP são capazes de interagir com numerosos tipos celulares e induzir uma variedade de respostas individuais. As EMPs em particular actuam sobre virtualmente todas as células do sistema circulatório, com um importante papel em mecanismos patofisiológicos como a aterogénese, trombose, angiogénese e disfunção endotelial. As EMPs induzem a expressão de TF em monócitos THP-1 *in vitro*. Este efeito é inibido por anti-CD54 (ICAM-1), pelo que esta interacção é suportada por ICAM-1 e respectivo receptor, CD11b/CD18, em monócitos, reforçando o papel das EMPs na amplificação e propagação de respostas celulares pro-coagulantes [124]. Adicionalmente, EMPs geradas por apoptose são mais fracas a produzir este efeito do que quando estimuladas por activação através de TNF- α , provavelmente por uma maior expressão de CD54 em resposta a esta citocina. Estes complexos EMP-monócito passam mais facilmente através da monocamada endotelial, o que sugere uma função pró-inflamatória para as EMPs por modelação da activação e transmigração de leucócitos [125]. Também as PMPs estimulam a adesão de monócitos ao endotélio por indução da expressão de ICAM-1 nas células endoteliais e respectivos receptores em monócitos [126]. As PMPs contêm também uma grande quantidade de RANTES (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*) e podem depositá-lo em células endoteliais activadas. Esta quimiocina, usualmente encontrada na placa de ateroma, promove o recrutamento de leucócitos e adesão ao endotélio, facilitando a transmigração de monócitos para a lesão aterosclerótica [127].

O envolvimento num tão amplo leque de funções biológicas torna evidente a necessidade de um controlo apertado da quantidade de MPs segregadas e dos antigénios nelas presentes. Os seus efeitos são determinados pela composição lipídica e proteica, característicos da célula parental, e o espectro de proteínas ancoradas nas MPs reflecte o estímulo que lhes deu origem. Especula-se que esta segregação selectiva seja assegurada por domínios *raft* que controlam os marcadores transportados em MPs (**figura 3**) [128]. Em células endoteliais, a concentração localizada de PECAM-1

(*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*, CD31) na superfície celular precede a libertação de MPs CD31⁺ [119].

5.3. Micropartículas na disfunção endotelial

As micropartículas também exercem efeitos vasoactivos, inibindo o relaxamento do músculo vascular liso mediado por NO. MPs na circulação provenientes de pacientes de enfarte do miocárdio agudo inibem a produção induzida de NO [129]. O processo deletério é ainda pouco claro. Em relação à expressão de eNOS, tanto uma redução [130], como manutenção [129, 131] ou aumento [132] foram relatados em trabalhos distintos. O tratamento de células endoteliais com MPs derivadas de linfócitos diminui os níveis de eNOS e induz um aumento significativo de Cav-1 inibindo a produção de NO [130]. Outros mecanismos como o balanço redox parecem estar envolvidos. Na verdade, alguns autores reportam um aumento na produção de superóxido [133] e outros uma diminuição [131]. No entanto, a redução no nível quantificado de superóxido poderá estar relacionado com a formação de peroxinitrito por combinação com NO, uma vez que se verifica um aumento concomitante da nitração proteica. Adicionalmente, parece haver uma redução na expressão de algumas subunidades de NADPH oxidase no endotélio e um aumento de SOD extracelular [131]. Em contraste, a subunidade p22(phox) de NADPH-oxidase foi detectada em EMPs, verificando-se um aumento nos níveis de superóxido no endotélio acompanhado por um funcionamento anómalo de eNOS [133]. Recentemente, Agouni e colaboradores mostraram que MPs de linfócitos geradas *in vitro*, portadoras da proteína morfogénica *sonic hedgehog* (shh), induzem a libertação de NO pelo endotélio, aumentam a expressão de eNOS, diminuem Cav-1 e inibem a produção de ROS, efeito este dependente do estímulo na origem das MPs [132]. Estes resultados foram corroborados *in vivo* com o restauro da função endotelial quando injectadas em rato [132]. As discrepâncias verificadas nestes trabalhos deverão residir nas diferentes populações de MPs em análise e estímulos na sua origem. A fosforilação de eNOS parece também implicada na regulação negativa de NO na disfunção endotelial induzida por MPs. Micropartículas de pacientes com síndrome metabólico estimulam a fosforilação inibitória de eNOS em Thr495 [131]. Sugere-se que após uma lesão inicial, as EMPs são importantes marcadores de disfunção endotelial e estão associadas a alterações funcionais das artérias. Apenas MPs CD31⁺CD41⁻ e CD144⁺ isoladas de pacientes com insuficiência renal, ambas de origem endotelial, se correlacionam inversamente com a dilatação fluxo-mediada da artéria braquial e com a rigidez arterial, dois factores de risco para doenças cardiovasculares [134]. Werner e colaboradores apontam que a disfunção endotelial depende do grau de apoptose celular e EMPs assim geradas [135]. A apoptose está independentemente relacionada com a disfunção endotelial e as EMPs são potenciais marcadores de interesse clínico para patologias vasculares.

5.4. Micropartículas e angiogénese

Embora geralmente tido como um processo deletério na neoplasia ou estabilidade da placa de ateroma, a angiogénese é essencial na recuperação e reperfusão de tecidos isquémicos. Efeitos contraditórios foram relatados quanto ao papel das MPs na angiogénese. As PMPs parecem estimular a neovascularização enquanto que as EMPs têm um papel tanto pró como anti-angiogénico. Plaquetas activadas produzem VEGF e estimulam a angiogénese [136]. A injeção localizada de PMPs no miocárdio isquémico promove a revascularização do tecido, num processo que depende de VEGF [137]. Kim e sua equipa demonstraram que PMPs estimulam a proliferação, sobrevivência, migração e formação do tubo em células endoteliais do cordão umbilical, num mecanismo dependente de VEGF [138]. As PMPs suportam também a progressão e metastase de tumores e estimulam a expressão de factores pro-angiogénicos, VEGF e metaloproteínases, em células cancerígenas [139].

Quanto às EMPs os resultados são mais inconsistentes. Elas contêm metaloproteínases da matriz, MMP-2 e MMP-9, responsáveis pela proteólise da membrana basal, facilitando a formação de estruturas neovasculares quando aplicadas em doses moderadas [140]. Em doses elevadas, patológicas, as EMPs são anti-angiogénicas e induzem apoptose, possivelmente através de processos oxidativos [140-141]. Nas células endoteliais, o *stress* oxidativo induzido por EMPs parece importante na gestão do balanço entre angiogénese e apoptose [133, 141]. Desta forma, grandes quantidades de EMPs em circulação, como as encontradas em doenças vasculares, podem ter um contributo directo para a sua patofisiologia e progressão clínica. Micropartículas isoladas da placa de ateroma promovem a proliferação do endotélio e angiogénese *in vivo*, contribuindo activamente para a neovascularização e instabilidade da placa [142].

5.5. EMPs como marcadores de doença cardiovascular

Alterações detectáveis nos níveis de MPs em circulação foram já observadas em várias doenças cardiovasculares. Em particular, as EMPs mostram-se promissoras como marcador específico de disfunção endotelial. A expressão em MPs de antigénios característicos de dano endotelial, como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, podem reflectir a gravidade da disfunção. Apenas MPs de origem endotelial positivas para CD146 (MCAM) estão elevadas em pacientes de enfarte agudo do miocárdio [143]. EMPs CD31⁺CD42⁻ estão elevadas em pacientes com doença da artéria coronária e relacionam-se directamente com a morfologia e severidade da estenose, avaliada por imagem angiográfica [144]. Adicionalmente, as EMPs são mais elevadas em estenose recente, provavelmente devido ao maior fluxo sanguíneo em estados precoces da lesão, o que

facilita a geração de MPs por estímulos mecânicos [145]. No síndrome coronário agudo, EMPs CD31⁺CD42⁻ e CD51⁺ estão elevadas especialmente naqueles que sofreram um primeiro enfarte comparativamente a eventos recorrentes. MPs CD31⁺ aparentam ser um marcador de eventos agudos enquanto que CD51⁺ reflete uma lesão endotelial crónica [144].

Micropartículas de origem endotelial estão também associadas a outras patologias. Na hipertensão severa, as EMPs são mais elevadas e apresentam marcadores de activação endotelial [146]. O colesterol é talvez o factor de risco mais mediático para doenças cardiovasculares e está correlacionado positivamente com EMPs CD31⁺CD42⁻. A presença de marcadores de apoptose evidencia o dano crónico induzido por oxLDL no endotélio [147]. Na esclerose múltipla, EMPs CD31⁺ estão elevadas apenas nas fases mais graves da doença. Por outro lado, EMPs CD51⁺ estão altas durante todos os estadios. Assim, tal como no síndrome coronário agudo, a expressão de CD51 parece estar relacionado com dano endotelial crónico [148].

Estamos ainda numa fase precoce do estudo de MPs mas todos os trabalhos apontam para um potencial de prognóstico e uma ferramenta poderosa na apreciação do risco cardiovascular, de especial interesse em pacientes assintomáticos. No entanto, alguns constrangimentos metodológicos têm de ser ultrapassados e só com a padronização da técnica é possível concretizar o potencial clínico que as micropartículas representam.

6. FACTORES E INDICADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

É sobejamente conhecido que factores como a idade, sexo, hipertensão, dislipidémias, tabagismo e diabetes estão fortemente associados ao risco em desenvolver doença cardiovascular [149]. Embora esta associação esteja bem documentada, o mecanismo através do qual cada um destes factores exerce o seu efeito patológico não está ainda bem definido. Vários estudos mostram uma correlação entre a disfunção endotelial e a presença de factores de risco cardiovascular em indivíduos sem doença estabelecida. A hipercolesterémia, hipertensão, tabagismo, diabetes e historial familiar de eventos agudos precoces, todos eles factores de predisposição para aterosclerose, estão também associados à disfunção endotelial [6]. Então, o endotélio parece ser o elo de ligação de muitos, senão todos, os factores de risco conhecidos e provavelmente medeia o efeito desses factores no desenvolvimento e progressão da doença vascular. Segundo Bonetti [9], a disfunção endotelial pode ser vista como “o derradeiro risco dos factores de risco” através do qual a doença se estabelece. Os mecanismos através dos quais os factores de risco cardiovascular interagem com o endotélio e favorecem a formação do ateroma são múltiplos. Esta temática ultrapassa o âmbito deste trabalho

mas, no fundo, todos os processos vão ultimar na produção de espécies reactivas oxidantes e inflamação [9].

De todos os factores de risco cardiovasculares estabelecidos, o tabagismo é um dos mais deletérios mas também o mais facilmente prevenível. Cerca de um terço das mortes relacionadas com o tabaco devem-se a complicações cardiovasculares, embora os mecanismos através dos quais ele favorece a lesão não sejam totalmente compreendidos [150]. O fumo do tabaco é uma mistura de mais de 4000 compostos com efeitos oxidantes demonstrados *in vivo*, capazes de degradar o NO e inibir a proliferação de células endoteliais e progenitoras [151]. Estes compostos podem da mesma forma provocar a oxidação de proteínas, lípidos e DNA. Um dos compostos que resulta da peroxidação lipídica é o malonaldeído, um índice comum de dano oxidativo generalizado [152]. A nicotina é a substância viciante do tabaco e, embora não carcinogénica por si só, induz a actividade angiogénica através de um incremento nos níveis de VEGF, bFGF e PDGF mediado pelos receptores colinérgicos nicotínicos [153]. No entanto, Konishi e colaboradores [154] demonstraram que a exposição crónica à nicotina dessensibiliza os receptores e atenua a libertação de VEGF nas células endoteliais, clarificando a inibição da angiogénese que se verifica em fumadores de longo termo com possíveis implicações no processo regenerativo e função do endotélio. A nicotina não é a única substância bioactiva presente no fumo do tabaco pelo que a sua acção não espelha toda a actividade do fumo no organismo. No entanto, ela parece alterar a expressão de genes relacionados com a aterosclerose e causar alterações morfológicas nas células endoteliais e favorecer o transporte trans-endotelial de macromoléculas do plasma [155]. No entanto, grande parte dos efeitos perniciosos do tabaco é revertido após cessação, incluído a disfunção endotelial [150, 156], o que sublinha o benefício que acarreta mesmo em fumadores crónicos de longo termo e a importância em termos de saúde pública.

Um problema comum à utilização de praticamente todos os factores de risco individualmente reside na dificuldade de excluir o efeito de outras variáveis de confundimento. Todos eles interagem de forma sinérgica e não simplesmente cumulativa na promoção da aterosclerose. Um exemplo bem evidente é a glicose que, apesar de serem conhecidos efeitos deletérios directos como o estímulo de ROS, inflamação ou alteração funcional e estrutural de moléculas, não é possível isolar os seus efeitos na formação e progressão do ateroma das dislipidémias que também origina [157]. Existe no entanto um marcador geral de inflamação crónica que parece sintetizar a informação dos vários factores de risco individuais. Trata-se da CRP, uma proteína de fase aguda que é estimulada por citocinas pró-inflamatórias em resposta a *stress* não-específico. Ela é produzida essencialmente em hepatócitos mas também em células endoteliais, músculo vascular liso e adipócitos [158]. A CRP responde a estímulos diversos como a infecção, trauma, doenças autoimunes, entre muitos outros [158]. Existe no entanto uma

diferença entre o estímulo associado a factores agudos e à doença cardiovascular. Enquanto que nos primeiros existe um pico muito elevado de CRP que pode durar alguns dias após o evento, em associação à aterosclerose existe um efeito crónico marcado por um aumento ligeiro mas persistente no tempo [159]. A detecção da CRP a estes níveis só se tornou possível com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, dos quais saiu a designação de hsCRP para evidenciar a medição por técnicas mais refinadas capazes de quantificar níveis próximos do nulo [159]. Através das metodologias tradicionais, os níveis detectados correspondem provavelmente a algum tipo de trauma ou infecção que mascara a associação da CRP à inflamação crónica.

Uma vez que a aterosclerose pressupõe a contribuição de múltiplos factores sinérgicos como a predisposição genética, tabagismo, idade, sexo, lipidémia, glicemia e tensão arterial, é muito pouco provável que algum indicador de risco individualmente possa prever com grande eficácia o risco de eventos cardiovasculares futuros. Desta forma, foram desenvolvidos algoritmos multivariados no sentido de integrar a informação de vários factores de risco num índice com utilidade clínica e mais poderoso na previsão de doença vascular do que cada parâmetro de forma singular. Embora a CRP seja de certa maneira o resultado da contribuição de vários factores de risco em conjunto, ela não parece adicionar grande informação aos indicadores tradicionais [160]. O *Framingham Point Score* (FPS) é um índice de risco que tem em conta vários parâmetros comuns, nomeadamente a idade, sexo, tensão arterial sistólica, colesterol total, níveis de HDL-C e hábitos tabágicos (qualquer cigarro fumado no mês precedente) e parece prever com grande eficiência o risco de um evento cardiovascular num período de dez anos [149]. A adição de outros parâmetros a este índice, como a CRP por exemplo, não contribui significativamente para o aumento da sensibilidade do FPS [160]. A elegância deste índice está na sua simplicidade que o torna bastante útil e adequado à prática clínica como indicador do tipo de terapia a recomendar e eficácia da mesma. Para decidir sobre a utilidade de novos marcadores de risco, estes devem ser comparados com índices de grande robustez como o FPS e não avaliar apenas a sua associação à doença. Do ponto de vista clínico, não interessa saber se um determinado marcador prevê ou diagnostica, mas sim se é melhor do que os já existentes e se pode contribuir com informação adicional, o que raramente acontece [161].

II. OBJETIVOS

As doenças cardiovasculares são hoje a principal causa singular de morte a nível mundial e acarretam um elevado custo socioeconómico para os países industrializados em particular. O avultado número de estudos efectuados nas últimas décadas permitem hoje um conhecimento profundo acerca dos mecanismos patofisiológicos na sua génese e a formulação de fármacos eficazes no seu tratamento. O desenvolvimento de meios de diagnóstico e indicadores de risco cada vez mais precoces é de especial importância para uma abordagem profiláctica da doença e é neste âmbito que se enquadra este estudo.

O principal objectivo do projecto em que esta tese se insere é investigar a relação entre parâmetros sanguíneos solúveis e micropartículas com a função endotelial e actividade da placa, indicadores precoces e fiáveis de risco cardiovascular. Foram estudados:

- **VEGF**, com um papel fulcral na neovascularização do ateroma e re-endotelização;
- **NO**, o principal controlador da função endotelial pelo seu efeito vasodilatador e anti-agregante plaquetário;
- **Micropartículas endoteliais**, um marcador recente de disfunção endotelial ao qual se tem atribuído cada vez mais importância embora pouco se conheça acerca dos mecanismos envolvidos na segregação e suas implicações fisiológicas;
- **Catepsina-L**, uma enzima proteolítica que caracteriza a actividade da placa como indicador de destabilização estrutural e como inibidor da migração e proliferação de células endoteliais.

Nunca esquecendo a multiplicidade de factores de risco e suas interacções sinérgicas, foi também efectuada uma análise integrada dos parâmetros referidos com indicadores antropométricos, fisiológicos e bioquímicos obtidos na caracterização dos grupos de estudo. A inexistência de marcadores viáveis da função endotelial e actividade da placa valoriza estudos como este, no sentido de contribuir para o arsenal clínico no combate precoce à doença cardiovascular, em estados pré-sintomáticos, sem a necessidade de recurso a métodos invasivos de risco elevado, incómodos tanto para o paciente como para o profissional que os opera.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO E GRUPOS DE ESTUDO

A amostra envolvida neste estudo é composta por indivíduos de ambos os sexos, recrutados entre Fevereiro de 2010 e Junho do mesmo ano. O recrutamento e acompanhamento foi efectuado no Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, em Lisboa.

Grupo com patologia coronária: inclui 11 casos de doença coronária confirmada (9 homens e 2 mulheres, com idade superior a 25 anos), admitidos no Hospital de Santa Marta, 6 dos quais com síndrome coronário agudo (5 enfartes do miocárdio com elevação ST e 1 sem elevação ST) e 5 com angina estável, sujeitos a intervenção percutânea e angioplastia.

Grupo controlo: constituído por 49 voluntários, 30 do sexo masculino e 19 do sexo feminino, sem historial de doença coronária ou co-morbilidades associadas e com mais de 25 anos. Foram admitidos indivíduos com dislipidémias, hipertensão e diabetes não-dependentes de insulina. O tabagismo não foi critério de exclusão na ausência de patologias derivadas.

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética do centro hospitalar segundo o regulamento vigente, com todos os intervenientes esclarecidos acerca dos objectivos deste trabalho e aos quais foi pedido o consentimento informado.

1.1. Caracterização e avaliação clínica

A caracterização clínica teve em conta dados demográficos e epidemiológicos reportados no preenchimento de um inquérito e consulta no Hospital de Santa Marta. Foi tido em conta o sexo, idade, peso, altura, pressão arterial, frequência cardíaca, historial médico individual e familiar, sintomática cardíaca prévia, hábitos tabágicos, outros comportamentos de risco e medicação em curso. Todos os voluntários incluídos no grupo controlo foram avaliados no centro hospitalar através da realização de um electrocardiograma em esforço, tonometria arterial periférica (do inglês: *Peripheral Arterial Tonometry*, PAT) e análises clínicas diversas.

A prova de esforço consiste num exame não-invasivo que coloca o coração sob *stress* através do exercício em passadeira rolante. A electrofisiologia do coração é monitorizada e a pressão arterial é medida em períodos de tempo controlados à medida que a velocidade e inclinação do tapete aumentam, de acordo com o protocolo de Bruce. A duração da prova depende da capacidade do indivíduo e é geralmente cessada quando se atinge 80-90% do VO_2 max (capacidade aeróbica) para a idade. O electrocardiograma em esforço está indicado para o despiste de doença coronária e arritmias cardíacas.

Para avaliação da função endotelial por tonometria arterial periférica recorreu-se a um equipamento EndoPAT® (Itmar Medical Inc., Israel), devidamente validado em estudos previamente publicados [162-164]. O EndoPAT® regista a tensão arterial no dedo com recurso a sondas pneumáticas que exercem uma pressão uniforme sobre a superfície da falange distal e medem as variações de volume pulsáteis. Estes sinais são então filtrados, amplificados e integrados para análise posterior. O sinal é registado por um período inicial de 5 min para o estabelecimento do nível basal, após o qual se provoca a oclusão do fluxo arterial por insuflamento de um balão braquial. Após 5 min, o fluxo é restaurado e o sinal PAT é registado por um igual período de tempo. O índice de hiperémia reactiva (RHI) é medido como o rácio do volume pulsátil digital em hiperémia relativamente ao estado basal em instantes de tempo equivalentes e representa uma medida válida da função endotelial, avalia o risco de ocorrência de eventos agudos futuros [165] e indica a eficácia de uma intervenção terapêutica [166]. A relação do PAT com a função endotelial é evidenciada pelo facto de a administração de inibidores de NO durante o exame anularem a resposta hiperémica [167].

A informação clínica dos intervenientes foi complementada com a análise a vários parâmetros bioquímicos do sangue. O **suplemento 5** descreve todos os indicadores bioquímicos analisados no âmbito deste estudo. As recolhas foram efectuadas por venopunctura cubital na admissão no hospital após um evento agudo ou, no caso dos controlos, pela manhã em jejum. No **suplemento 7** estão indicados os valores de referência para os parâmetros analisados.

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1. Micropartículas

A citometria de fluxo é o método mais comum e eficaz para a análise de micropartículas. Esta técnica permite o ensaio simultâneo de largos milhares de vesículas e fornece informação acerca do seu tamanho e complexidade morfológica. No entanto, a sua grande vantagem relativamente a outras metodologias reside na possibilidade de usar vários anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos, o que permite analisar múltiplos antigénios numa mesma partícula de forma expedita. A citometria de fluxo fundamenta-se nas propriedades de dispersão da luz por parte de células ou partículas e na emissão de fluorescência característica de certas moléculas após excitação. Os corpos são injectados num fluxo líquido, geralmente uma solução salina, e interrogadas por um laser fixo de frequência específica. A luz que intercepta a partícula é captada por tubos fotomultiplicadores dispostos a um ângulo de 90° e 180° que permitem caracterizar as partículas de acordo com a sua complexidade interna e tamanho respectivamente. Para

além destes dois detectores, a maioria dos equipamentos modernos possui também detectores de fluorescência que, através de filtros *band-pass*, seleccionam comprimentos de onda específicos e discriminam diferentes emissões de fluorescência associadas a fluorocromos. Estes sinais são integrados e analisados em *software* próprio e cada partícula captada é designada de evento. A representação gráfica destes eventos agrupa-os de acordo com características semelhantes e permite a distinção de populações que, se satisfizerem determinados critérios, correspondem a um determinado tipo celular.

As MPs são corpos membranares passíveis de ser analisados por citometria de fluxo. A especificidade dos seus antigénios permite inferir sobre a origem celular e processo de geração das MPs. Para a identificação de MPs de origem endotelial e plaquetária foram utilizados anticorpos para os marcadores CD31, CD42b e CD144. Os dois primeiros são de especial utilidade pois permitem numa única análise distinguir as duas populações. O CD31 é expresso tanto em plaquetas como em células endoteliais, não podendo por si só discriminar as EMPs. Por seu lado, o CD42b é exclusivamente expresso em plaquetas e, em conjunto com CD31, distingue populações CD31⁺CD42b⁺, de origem plaquetária, e CD31⁺CD42b⁻, endoteliais. Na verdade, os leucócitos também geram MPs CD31⁺CD42b⁻ mas numa quantidade negligenciável segundo alguns autores [168]. Para confirmar a identificação de EMPs foi utilizado o marcador CD144 (VE-caderina), um antigénio considerado altamente específico do endotélio e um excelente marcador de origem celular, já associado à disfunção endotelial [134].

Neste trabalho recorreu-se a um equipamento de citometria FACSCalibur (BD®) e respectivo *software* de aquisição CellQuest. Para obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP), o sangue total obtido por venopunctura cubital e recolhido em tubos contendo citrato de sódio 3,2% como anticoagulante foi centrifugado a 250 g por 10 min. A fase líquida resultante foi novamente centrifugada a 1500 g por 7 min, obtendo-se o sobrenadante que constitui o PPP. A 100 µL de PPP em citrato de sódio, recolhido e processado numa janela de 4 horas e refrigerado a 4°C, foram adicionados, num tubo de poliestireno, 10 µL dos anticorpos monoclonais anti-CD31-FITC (BD, cat. # 555445, lot # 84455), anti-CD42b-PE-Cy5 (BD, cat. # 55141, lot # 64345) e 20 µL de anti-CD144-PE (BD, cat. #560410, lot # 26245, clone 55-7HI). No **Quadro 1** referem-se os comprimentos de onda de emissão e excitação dos fluorocromos utilizados. Seguiu-se um período de incubação de 20 min em agitação orbital a 100 rpm, ao abrigo da luz e temperatura ambiente. Findo este passo, adicionou-se 1 mL de PBS 1% PFA filtrado por membrana de celulose 0,22 µm (Whatman®), de forma a remover partículas estranhas à amostra que pudessem interferir com a análise citométrica. Apesar de dispensável, o *para*-formaldeído (PFA) permite a conservação da amostra caso a análise não seja possível de imediato. A concentrações reduzidas ele permite a fixação dos componentes membranares e inibição de reacções metabólicas com possível implicação na análise

[169]. Como referência dimensional adicionou-se aos tubos de autofluorescência, não marcados, 50 μL de uma solução de esferas 0,69 μm (Bangs Laboratories, Ref. PS03N) e 50 μL de outra solução com esferas de 0,4 μm (Bangs Laboratories, Ref. PS02N), previamente sujeitas a tratamento ultrasónico para desagregar e assegurar a correcta dispersão das microesferas. Um tubo adicional de PBS com ambas as soluções de esferas foi considerado como referência. As amostras foram analisadas em baixo fluxo para um total de 300000 eventos.

Quadro 1 – Comprimentos de onda de excitação e emissão dos fluorocromos PE, FITC e PE-Cy5.

	c.d.o. excitação (nm)	c.d.o. emissão (nm)	Filtro
PE	496, 565	575	585/40
FITC	493	519	530/30
PE-Cy5	496	670	695/40
c.d.o. – comprimentos de onda; FITC – fluoresceína isotiocianato; PE – Ficoeritrina; PE-Cy5 – ficoeritrina-cianina 5			

A estratégia para a identificação de MPs está representada na **figura 4**. Foram consideradas micropartículas todos os eventos situados abaixo da região definida para as plaquetas em *side scatter* (SSC), até um limite inferior, tanto de SSC como *forward scatter* (FSC) de modo a eliminar com um grau de confiança elevado o ruído electrónico de fundo. O poder de resolução do equipamento dificulta a análise de partículas de pequeno tamanho, $<0,4 \mu\text{m}$ [103] tendo-se optado por assumir a população de plaquetas, bem definida e reconhecível, como referência. Na região definida para as MPs, a sua origem celular foi inferida por critérios de fluorescência baseados na expressão de CD31, CD42b e CD144. O limiar de fluorescência para identificação de eventos positivos foi estabelecido em 1% no tubo de autofluorescência (**figura 5 e 6**). Para este trabalho optou-se por uma quantificação relativa, percentual, das MPs e suas sub-populações.

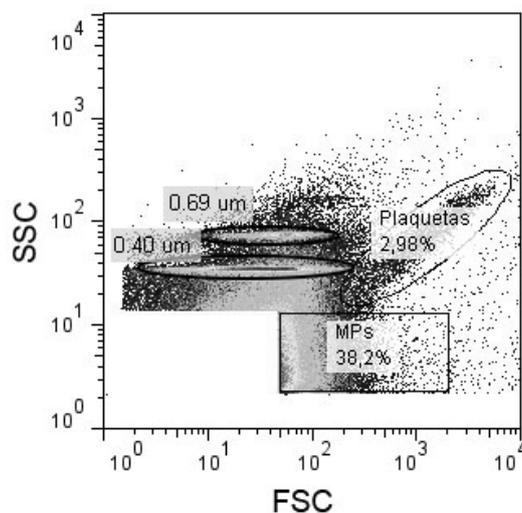


Figura 4 – Representação esquemática das regiões definidas para as micropartículas e plaquetas. A zona cortada no canto inferior esquerdo corresponde a ruído electrónico de fundo que foi excluído na aquisição dos eventos. Acima, encontram-se as microesferas de 0.40 μm e 0.69 μm utilizadas como referência para o diâmetro das MPs.

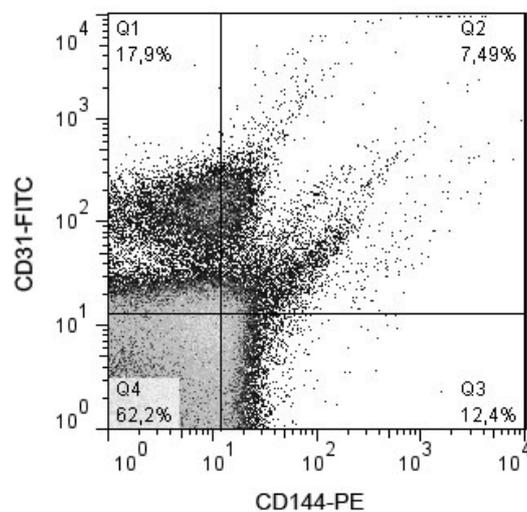


Figura 5 – Identificação das MPs caracterizadas como duplo-positivas para CD31 e CD144, representadas no quadrante 2 (Q2).

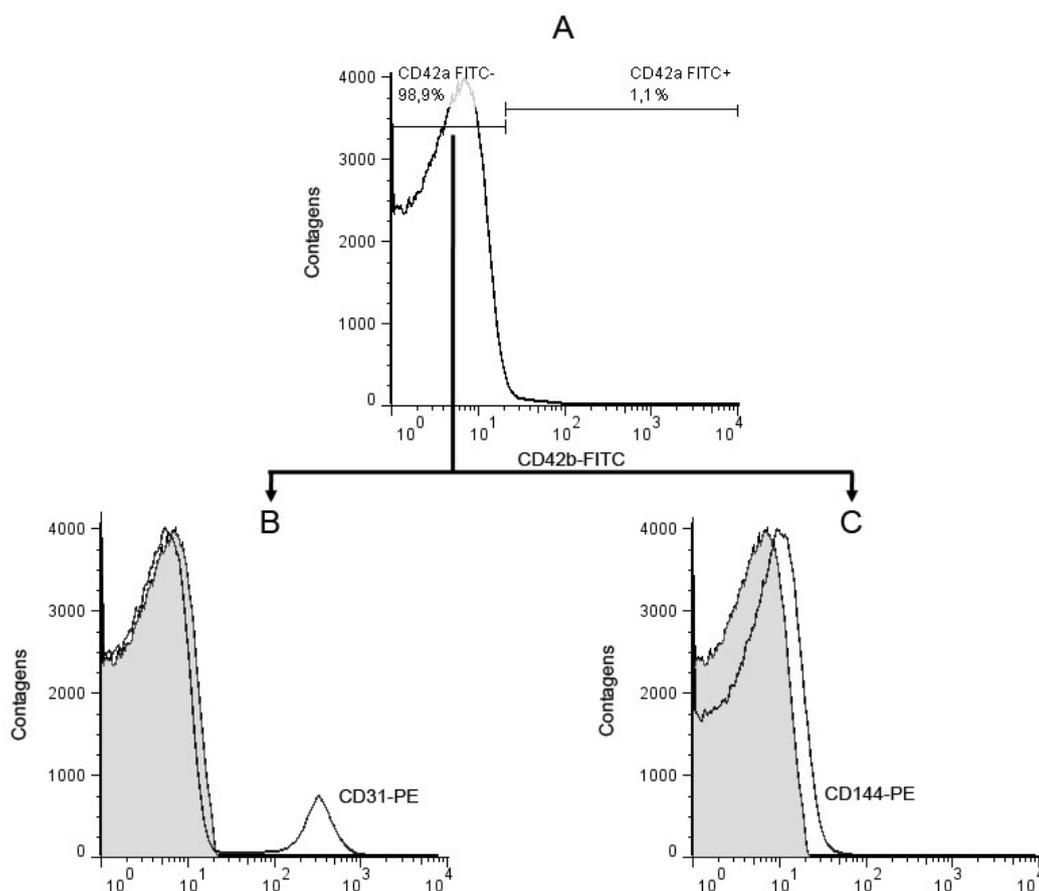
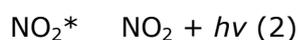


Figura 6 – Esquema ilustrativo do procedimento de análise das MPs CD42b⁻. O limiar de fluorescência foi definido em 1% no tubo não-marcado (A). Dos eventos considerados negativos para CD42b (a cinzento em B e C), procedeu-se à contagem dos eventos positivos ou negativos para CD31 (B) e CD144 (C).

2.2. Quantificação do NO

O NO plasmático foi avaliado com recurso a um analisador de óxido nítrico (NOA), modelo 280 NOATM, fabricado pela Sievers Instruments, um equipamento que permite a quantificação de NO com base numa reacção em fase gasosa com o ozono que gera dióxido de azoto e oxigénio molecular. A energia calorífica libertada na reacção é canalizada para a excitação electrónica do produto reaccional, que emite quimioluminescência na região do vermelho e infravermelho do espectro electromagnético (600 nm – 875 nm) [170], detectada por um tubo fotomultiplicador sensível a esta gama de comprimentos de onda (1, 2).



O NO tem um tempo de vida curto e é rapidamente oxidado no sangue. Como tal, o nível endógeno é estimado indirectamente através dos seus metabolitos, nitritos e nitratos plasmáticos (NO_x), reduzidos a NO por reacção com cloreto de vanádio (III) em HCl [171]. Um pH inferior a 2 é condição essencial à conversão de NO_x em NO, bem como uma temperatura entre os 85°C e os 95°C no caso dos nitratos [171]. Para um doseamento correcto do NO é recomendada uma desproteínização prévia de forma a que a turbidez provocada pela precipitação proteica nas condições extremas do ensaio não interfira com a densidade óptica. Os métodos de desproteínização ácida devem ser evitados em amostras biológicas devido à rápida conversão de nitritos a NO e NO_2 em meio ácido, dois gases, resultando em subestimação dos valores reais de NO_x . Metodologias que recorrem a sulfato de zinco, acetonitrilo, etanol, microfiltração, entre outros, são preferidos em doseamentos de sangue [172].

A preparação inicial da amostra consistiu na centrifugação de 3 mL de sangue em EDTA a 12000 g, 0°C, durante 3 min, e volumes de 500 μL de plasma foram retirados para microtubos de 1,5 mL. De seguida procedeu-se à desproteínização da amostra, que consistiu na adição de 1 mL de etanol absoluto a cada microtubo e repouso em gelo durante 30 min. Findo este período, os microtubos foram centrifugados durante 5 min a 12000 g e a uma temperatura de 0°C. O sobrenadante foi recolhido em novos microtubos devidamente identificados. Estas amostras podem ser conservadas a -80°C até ao seu doseamento. Para a quantificação do NO no analisador colocou-se na câmara reaccional do aparelho uma solução de 5 mL de cloreto de vanádio (III) preparada em HCl 1M. Após estabilização do sistema e saturação com hélio de forma a retirar possíveis interferentes gasosos, foram injectadas com uma seringa Hamilton 5 μL das amostras. O registo e integração dos valores da área dos picos obtidos foram efectuados pelo software NOAnalysis™, e calculados a partir de uma curva de calibração realizada previamente com soluções padrão de nitratos de concentração conhecida (0 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM e 100 μM).

2.3. Quantificação de parâmetros solúveis por ELISA: VEGF e Cat-L

O ELISA é uma técnica adequada ao ensaio específico e selectivo de moléculas para as quais existem anticorpos disponíveis. Apesar da modernização que a técnica sofreu nas últimas décadas, os seus princípios mantêm-se inalterados. Baseia-se na afinidade antigénio-anticorpo e em reacções enzimáticas cromogénicas, cuja intensidade reflecte a quantidade de um composto particular presente em solução numa amostra. O ELISA é hoje uma técnica expedita e de grande precisão. A existência de *kits* comerciais permite padronizar a metodologia entre laboratórios, possibilitando a comparação de resultados com elevado grau de confiança.

2.3.1. VEGF humano solúvel.

As amostras de soro humano, armazenadas a -80°C por um período máximo de 6 meses, foram analisadas através do *kit Quantikine® Human VEGF* (Cat. # DVE00) da R&D Systems, Inc. Este ensaio emprega o método de ELISA em *sandwich*. Aos poços da microplaca revestida com anti-VEGF foi adicionado, em duplicado, 100 μL de soro, padrão ou de amostra controlo de concentração definida, ao que se seguiu um período de incubação de 2h à temperatura ambiente. Por lavagens sucessivas com o tampão apropriado removeram-se todas as substâncias não ligadas, adicionando-se posteriormente um anticorpo policlonal anti-VEGF conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP). Após nova incubação por 2h à temperatura ambiente, adicionou-se o substrato, uma solução de peróxido de hidrogénio e tetrametil-benzidina (TMB), que, quando incubada por 30 min ao abrigo da luz e temperatura ambiente, desenvolve coloração proporcional à quantidade de VEGF presente na amostra. De seguida foi adicionado um reagente *stop* (ácido sulfúrico 2N) que cessa a reacção por desnaturação enzimática. A intensidade da coloração foi medida por espectrofotometria com a leitura de absorvência efectuada a 450 nm e com correcção a 540 nm para irregularidades na superfície dos poços da microplaca. As amostras foram testadas sempre em duplicado e de acordo com o protocolo que acompanha o *kit*, tomando como resultado a absorvência média das duas leituras.

A diferença máxima de absorvências tolerada entre leituras da mesma amostra foi de 10%, repetindo-se sempre que esta condição não se verificava. O ajustamento de calibração foi gerado por modelo logístico de Boltzmann (função de quatro parâmetros) e as concentrações calculadas a partir de uma simulação numérica da função inversa no *software* estatístico OriginPro 8.0, *OriginLabs*.

2.3.2. Catepsina-L humana solúvel.

Para o ensaio de Cat-L foi utilizado o *kit Human Catepsin-L* (Cat. # BMS257) da Bender MedSystems, baseado no método de imunoensaio em *sandwich*. Foi necessária uma adaptação do protocolo recomendado devido a dificuldades em reproduzir os resultados como esperado. Sucintamente, os poços da microplaca foram lavados previamente com uma solução fornecida no *kit*. Foram adicionados em duplicado 100 μL de amostra não-diluída ou padrões, reconstituídos de acordo com o protocolo, e 50 μL do conjugado de biotina seguindo-se um período de incubação de 2 h em agitação orbital a 100 rpm. Findo este passo, a placa foi lavada três vezes por decantação com tampão apropriado, adicionando-se de seguida 100 μL de estreptavidina-HRP a todos os poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 1 h e em agitação orbital a 100 rpm.

Seguidamente, os poços foram lavados novamente de acordo com o protocolo já descrito e foi adicionado o substrato TMB. O desenvolvimento de cor foi monitorizado no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 620 nm em intervalos de 2 min, até que o padrão mais concentrado atingisse uma absorvência de 0.90 – 0.95. Neste ensaio foram necessários 36 min. Para parar a reacção adicionou-se 100 µL de ácido fosfórico 1M a cada poço, procedendo-se à leitura a 450 nm com correcção a 620 nm.

Os resultados foram obtidos como a média de cada um dos poços referentes a uma amostra ou padrão. A recta de calibração, modelo linear, foi traçada e as concentrações das amostras inferidas através da equação correspondente. Os cálculos recorreram ao software Excel 2007® (Microsoft).

3. ÍNDICES DE RISCO: ÍNDICE ATEROGÉNICO DO PLASMA, CT/HDL-C E FRAMINGHAM POINT SCORE

É pacificamente aceite que o perfil lipoproteico e lipídico do plasma é um factor de risco importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Embora os níveis de colesterol total, LDL-C, HDL-C e triglicéridos sejam por si só indicativos, existem índices mais precisos para a avaliação de risco e previsão de eventos agudos. Entre eles, o rácio CT/HDL-C (colesterol total/HDL-C) é o mais comum pela sua praticabilidade. No entanto, este indicador despreza outros factores importantes como a dimensão das partículas lipoproteicas no plasma. Uma predominância de LDL de pequenas dimensões, sdLDL, está relacionada com um risco aumentado de doença coronária enquanto que HDL de grandes dimensões tem uma relação inversa [173]. Para uma avaliação mais precisa torna-se necessário medir a distribuição dimensional das lipoproteínas, o que acarreta algumas limitações técnicas. Existe no entanto uma forma indirecta que se baseia na taxa das reacções enzimáticas que ocorrem nessas partículas, nomeadamente a esterificação do colesterol livre. O princípio do teste assenta na medição da taxa de esterificação do colesterol (FER_{HDL}) pela enzima LCAT em plasma contendo apenas HDL. A esterificação do colesterol é mais eficaz em partículas de HDL menores, enquanto que as de maiores dimensões inibem a reacção. Existe uma correlação negativa entre a dimensão das partículas HDL e a FER_{HDL} , podendo este último ser usado para prever o tamanho das primeiras [174]. Adicionalmente, o FER_{HDL} também prevê o tamanho das partículas de LDL, $r = -0.82$ [173], mesmo numa reacção em plasma isento de lipoproteínas apoB.

Os triglicéridos (TG) têm visto a sua contribuição para doenças cardiovasculares negligenciada, embora se reconheça que qualquer intervenção hipolipidémica influencie as características lipídicas e apoproteicas do plasma. Níveis elevados de triglicéridos estão relacionados com um aumento de sdLDL e da transferência de ésteres de colesterol

para lipoproteínas apoB [175], para além de determinar a remodelação de partículas HDL no plasma [176]. Baixo HDL-C e elevados triglicéridos aumentam a proporção de partículas de HDL pequenas e sdLDL. Existe uma forte correlação inversa entre o FER_{HDL} e o HDL-C e directa com a concentração de triglicéridos no plasma. O índice que relaciona os triglicéridos e HDL-C designa-se de Índice Aterogénico do Plasma (AIP). Neste estudo o AIP foi calculado segundo Dobiášová e Frohlich através da equação,

$$AIP = \log_{10} \left(\frac{TG}{HDL - C} \right)$$

com cada concentração expressa em mmol/L [173]. Uma vantagem prática deste índice é que os valores variam entre o negativo e positivo, com o zero a corresponder a um diâmetro de LDL de aproximadamente 25.5 nm, tamanho usado como *cut-off* entre padrões de risco em outros estudos [173]. O risco aumenta do negativo para o positivo e dados epidemiológicos estabelecem três categorias: baixo risco <0.11, intermédio 0.11 – 0.21 e elevado >0.21 [177].

Embora a importância das dislipidémias para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares seja indubitavelmente valorizada, os índices que apenas têm em conta o perfil lipoproteico podem ser considerados redutores. É reconhecido que muitos outros factores dão o seu contributo, como o sexo, idade, tabagismo, pressão arterial e diabetes. Além disso, os factores de risco agrupam e interagem entre si sinergicamente na promoção de doenças cardiovasculares. Torna-se então imperativo desenvolver algoritmos multivariados que permitam prever e sintetizar a informação dos diversos factores de risco numa estimativa de risco geral de doença. Um deles baseia-se numa actualização da base de dados e metodologias do estudo de Framingham [178], de 1976, que calcula a percentagem de risco a dez anos tendo em conta o sexo, idade, colesterol total, HDL, pressão arterial sistólica e tabagismo. Este indicador é o resultado da soma de pontos que reflectem níveis nos factores de risco. Este índice traduz-se numa percentagem de risco a dez anos para doenças cardiovasculares e é designada como *Framingham Point Score*. A matriz de cálculo encontra-se representada no **suplemento 2** que acompanha esta tese. Este indicador foi utilizado no sentido de relacionar o seu *score*, intensamente estudado e validado, com potenciais marcadores de disfunção endotelial, um reconhecido precursor de aterosclerose e doenças cardiovasculares no geral.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados recolhidos foram submetidos a uma análise exploratória preliminar para avaliação da normalidade e heterocedastidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene respectivamente. Todos os valores limite a mais de 1.5 vezes o intervalo interquartil (valores extremos) foram excluídos para as variáveis VEGF e todos os fenótipos de micropartículas. Esta decisão foi tomada pela disparidade de valores no primeiro caso. Quanto às MPs, verificou-se que todos os extremos se distribuíam de forma sequencial, indicando a possibilidade dos eventos estarem associados a questões técnicas e não variabilidade amostral. As variáveis contínuas foram expressas pela sua média \pm desvio padrão ($M \pm SD$) ou mediana quando apropriado. As variáveis categóricas foram sumariadas pelo número de eventos em cada categoria.

A heterogeneidade entre grupos foi avaliada por teste t (t) e ANOVA sempre que adequado ou através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (H), χ^2 , quando a assumpção de normalidade era violada, dando-se sempre prioridade aos métodos paramétricos quando aplicáveis. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de *chi-quadrado* (χ^2) e apresentados em tabelas de contingência. Nenhuma análise foi aplicada a grupos com menos de cinco elementos devido às limitações dos testes estatísticos utilizados. A correlação entre variáveis contínuas foi estudada pelo método de Spearman (Spearman *Rho*), válido tanto para distribuições normais como para não-paramétricas. Consideraram-se estatisticamente significativas as correlações bilaterais quando $p < 0.05$.

Na análise dos dados recorreu-se aos *softwares* estatísticos SPSS 17® (Statistical Packages for Social Sciences) e Origin Pro 8.0 (*OriginLabs*).

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Todos os participantes neste estudo foram caracterizados por parâmetros demográficos, epidemiológicos e clínicos. Exceptuando peso, altura, pressão arterial e frequência cardíaca, avaliados no local, todos os dados foram auto-reportados no preenchimento de um inquérito, método este que, infelizmente, dá azo a imprecisões e valores em falta pelo preenchimento incorrecto ou omissivo de alguns campos. Um dos indivíduos foi excluído por indefinição do grupo de estudo e inconsistência de dados.

O **quadro 2** resume a comparação das médias entre os grupos controlo e patológico para as variáveis contínuas idade, peso, altura, IMC, tensão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca, bem como a distribuição de frequências para o sexo dos participantes. Nenhum dos parâmetros referidos revelou diferenças significativas entre os grupos controlo e com doença coronária.

Quadro 2 – Comparação das variáveis demográficas consideradas entre os grupos controlo e com doença coronária.

	Controlo		Doença coronária		t	χ^2
	N	M \pm SD	N	M \pm SD		
Sexo (M/F)	29/19	n/a	9/2	n/a	n/a	1.788
Idade	48	58.5 \pm 9.9	11	59.6 \pm 12.4	-0.333	
Peso (Kg)	46	71.9 \pm 11.9	10	74.2 \pm 12.9	-0.547	
Altura (cm)	45	165.2 \pm 9.9	10	169.0 \pm 8.7	-1.103	
IMC	45	26.4 \pm 3.4	10	26.1 \pm 4.9		0.074 ^a
TA sist. (mmHg)	48	130.9 \pm 14.0	10	133.4 \pm 33.9	-1.344	
TA diast. (mmHg)	48	78.2 \pm 10.1	10	74.1 \pm 18.9		3.457 ^a
FC (bpm)	40	77.2 \pm 14.3	9	77.1 \pm 13.7		0.054 ^a

BMI – Índice de massa corporal; bpm – batimentos por min; F – feminino; FC – frequência cardíaca; M – masculino; M_x – média; n/a – não aplicável; SD – desvio padrão; TA – tensão arterial.
* p<0.05; **p<0.01
^a – Teste Kruskal-Wallis.

Para inferir sobre a heterogeneidade entre grupos foram ainda considerados os factores de risco tabagismo, hipertensão arterial, dislipidémia e diabetes tipo 2, bem como a administração de terapêutica farmacológica adjuvante. Não existem diferenças com poder estatístico significativo para nenhuma das variáveis estudadas. O pequeno número de elementos impossibilitou a aplicação de testes comparativos para o historial familiar, tabagismo e diabetes. De qualquer forma, é de assinalar a percentagem bem superior de fumadores no grupo patológico (36.4%) relativamente aos controlos (8.3%) (**quadro 3**).

A medicação em curso foi agrupada em três categorias, nomeadamente a toma de aspirina, anti-hipertensores (inibidores da enzima conversora de angiotensina, antagonistas dos receptores de angiotensina-II e diuréticos), e estatinas. Apesar da impossibilidade de aplicação do teste *chi*-quadrado devido às dimensões dos grupos, é de notar percentagens muito semelhantes entre controlos e doentes (**quadro 4**).

Quadro 3 – Factores de risco nos grupos controlo e com doença coronária.

		Controlo		Doença coronária		χ^2
		N	%	N	%	
Historial familiar	Sim	3/48	6.3	1/11	9.1	n/a
	Não	45/48	93.7	10/11	90.9	
Fumador	Sim	4/48	8.3	4/11	36.4	n/a
	Não	44/48	91.7	7/11	63.6	
Ex-fumador	Sim	5/48	10.4	1/11	9.1	n/a
	Não	43/48	89.6	10/11	90.9	
HTA	Sim	21/48	43.8	4/11	36.4	1.419
	Não	27/48	56.2	7/11	63.6	
Dislipidémia	Sim	25/48	52.1	5/11	45.5	0.157
	Não	23/48	47.9	6/11	54.5	
Diabetes	Sim	3/48	6.3	1/11	9.1	n/a
	Não	45/48	93.6	10/11	90.9	

HTA – Hipertensão arterial; N – Número de casos; n/a – não aplicável.

Quadro 4 – Terapêutica farmacológica corrente nos grupos controlo e com doença coronária.

		Controlo		Doença coronária		χ^2
		N	%	N	%	
Aspirina	Sim	4/48	8.3	4/11	36.4	n/a
	Não	44/48	91.7	7/11	63.6	
Anti-HTA	Sim	14/48	29.2	3/11	27.3	n/a
	Não	34/48	70.8	8/11	72.7	
Estatinas	Sim	11/48	22.9	4/11	36.4	n/a
	Não	37/48	77.1	7/11	63.6	

Anti-HTA – Anti-hipertensores; N – Número de casos; n/a – não aplicável

Foram também realizados exames complementares de diagnóstico, PAT e prova de esforço, sendo apenas possível obter informação de alguns indivíduos. Neste último, verificaram-se apenas dois positivos no grupo controlo. Não se encontra até ao momento determinada a causa do resultado positivo. Quanto ao PAT, 28 em 40 (70%) dos indivíduos revelaram um exame normal e aos restantes 30% foi diagnosticada disfunção endotelial, embora apenas tenham sido recolhidos dados no grupo controlo.

A caracterização da amostra foi complementada com a análise a vários elementos sanguíneos solúveis comuns, descritos no **quadro 5**. Os níveis de HDL foram significativamente inferiores no grupo com patologia ($H(1) = 6.557$, $p < 0.01$), assim como foi verificado para a albumina ($t(50) = 2.506$, $p < 0.05$), hemoglobina ($H(1) = 5.074$, $p < 0.05$) e hematócrito ($t(56) = 2.548$, $p < 0.05$). Foram ainda encontradas diferenças em sentido crescente para a AST ($H(1) = 6.556$, $p < 0.01$), número de neutrófilos ($H(1) = 5.069$, $p < 0.05$), tempo de protrombina ($H(1) = 6.095$, $p < 0.05$), concentração de CRP ($H(1) = 6.538$, $p < 0.01$), de troponina ($H(1) = 29.104$, $p < 0.01$) e

de pro-BNP ($H(1) = 17.527$, $p < 0.01$). Estas diferenças eram espectáveis pelo que se conhece da fisiologia da doença coronária.

Quadro 5 – Parâmetros bioquímicos solúveis (grupo controlo vs patologia coronária)

	Controlo		Doença coronária		t	χ^2
	N (/48)	M±SD	N (/11)	M±SD		
CT	44	215.4±34.4	10	191.9±35.8	1.935	n/a
LDL-C	43	144.7±35.4	9	130.6±24.7	n/a	0.637
HDL-C	44	49.3±13.1	9	34.4±14.5	n/a	6.557**
TG	42	103.1±53.6	10	158.6±98.8	n/a	3.281
Proteína total	46	67.6±4.0	7	64.7±4.9	1.717	n/a
Albumina	44	39.9±2.6	8	37.3±3.3	2.506*	n/a
Glicose	47	96.5±27.6	10	111.4±32.0	n/a	3.036
Ureia	47	33.2±8.6	11	36.0±13.2	-0.868	n/a
Creatinina (soro)	47	0.957±0.292	11	1.091±0.302	n/a	1.809
AST	44	27.5±9.2	11	66.1±58.7	n/a	6.556**
ALT	43	30.7±15.5	11	45.8±29.2	n/a	2.465
CK	42	165.4±147.7	11	236.1±259.5	n/a	0.301
Hemoglobina	47	14.5±1.3	11	13.5±1.4	n/a	5.074*
Eritrócitos	47	4.9±0.361	11	4.5±0.776	1.640	n/a
Hematócrito	47	43.2±3.3	11	40.2±4.3	2.548*	n/a
RDW	47	13.5±0.802	11	14.2±1.3	n/a	3.267
Leucócitos	47	6.1±1.4	11	9.1±6.5	n/a	1.324
Neutrófilos	47	3.5±1.1	11	12.9±19.6	n/a	5.069*
Linfócitos	47	2.0±0.551	11	3.6±6.6	n/a	1.847
Monócitos	47	0.488±0.172	11	1.1±1.9	n/a	2.952
Plaquetas	47	231.9±60.9	11	192.8±48.3	1.985	n/a
PT	46	11.2±0.769	11	11.8±0.603	n/a	6.095*
INR	46	1.017±0.062	11	1.053±0.053	-1.780	n/a
APTT	46	29.6±4.4	9	47.9±41.3	n/a	0.134
CRP	47	0.502±0.904	9	0.740±0.511	n/a	6.538**
Troponina	46	0.014±0.013	11	0.520±0.698	n/a	29.104**
Pro-BNP	46	50.6±48.3	11	2528.2±4439.1	n/a	17.527**

ALT – Alanina aminotransferase; AST – Aspartato aminotransferase; APTT – Tempo de tromboplastina parcial activada; CK – Creatina cinase; CRP – Proteína C-reactiva; CT – Colesterol total; INR – Índice Internacional Normalizado; HDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de alta densidade; LDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade; pro-BNP – *pro-Brain Natriuretic Peptide*; PT – Tempo de protrombina; RDW – *Red cell distribution width*; TG – Triglicéridos
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Os indicadores de risco são de extrema utilidade para uma avaliação clínica da probabilidade de ocorrência de síndrome aguda de uma forma rápida e simples, numa fase pré-sintomática ou pré-clínica. Foram calculados alguns indicadores de risco usuais, nomeadamente o Índice Aterogénico do Plasma (AIP), rácio TC/HDL e o *score* de Framingham (FPS). O AIP está fortemente relacionado com a presença ou não de doença coronária, claramente superior no grupo de patologia com uma significância $p < 0.01$ (**quadro 6**). Apesar de não ser esta a aplicação comum deste indicador, podemos concluir que os indivíduos com doença coronária estabelecida estão em maior risco de

um segundo evento ou que os factores de risco que levaram ao desenvolvimento de doença não estão controlados.

Quadro 6 – Variação dos índices AIP, CT/HDL-C e FPS entre os grupos controlo e com doença coronária (DC).

	Controlo M±SD	DC M±SD	t
AIP	-0.082±0.285	0.258±0.416	-2.987**
CT/HDL-C	4.67±1.41	6.48±2.51	-2.096
FPS	13.41±4.84	14.22±1.99	-0.530

AIP – Índice Aterogénico do Plasma; CT – Colesterol total; DC – Doença coronária; FPS – Framingham Point Score; HDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de alta densidade.
* p<0.05; **p<0.01

2. ÓXIDO NÍTRICO

Infelizmente não foi possível realizar a quantificação do NO no sangue por motivos alheios a este trabalho. Não houve acesso às amostras nem aos resultados da análise, tendo apenas sido disponibilizadas as médias dos dois grupos sem qualquer tratamento estatístico. Assim, não estamos em condições de estabelecer qualquer relação inter-grupos ou com qualquer outro parâmetro em análise. Estando consciente de que esta lacuna compromete o estudo da função endotelial, a quantificação directa do NO será ignorada na discussão dos resultados obtidos. Os valores que foram facultados apontam para concentrações médias nos controlos na ordem dos 21.4 µM e nos doentes de 22.5 µM. Não aparenta haver diferenças com significado estatístico entre os dois grupos, confirmando resultados anteriores, obtidos para doentes com enfarte agudo do miocárdio [179].

3. VEGF

O VEGF é um factor de crescimento pró-angiogénico que tem sido alvo de um interesse crescente no estudo dos mecanismos da aterosclerose e instabilidade da placa. É reconhecido o seu papel na neovascularização da placa e permeabilização vascular, dois processos que podem culminar na destabilização e ruptura do ateroma. Por outro lado, o VEGF é um dos principais inductores de NO e, como tal, pode ser considerado um interveniente importante na manutenção da função endotelial. A sua acção pró-migratória e proliferativa nas células endoteliais é essencial para a reendotelização da lesão vascular e regeneração de zonas isquémicas. É também possível que factores de risco reconhecidos para doença cardiovascular, como a tabagismo, exerçam a sua acção, em parte, através da modelação dos níveis de VEGF e funcionalidade dos seus receptores.

O VEGF sérico foi quantificado por ELISA em amostras previamente congeladas a -80 °C obtendo-se resultados válidos em 42 dos 48 controlos e em 6 dos 11 doentes. O valor médio encontrado para o grupo controlo foi de 435.7 ± 276.2 pg/mL, variando entre 50.1 pg/mL e 1005.6 pg/mL. A distribuição de valores neste grupo viola a assumpção de normalidade, testada pelo método de Shapiro-Wilk. Como tal, os dados são melhor descritos pela sua mediana, calculada em 359.7 pg/mL. Relativamente ao grupo de doentes, a média verificada foi de 345.7 ± 159.1 pg/mL, com um mínimo de 113.0 pg/mL e um máximo de 600.1 pg/mL, com mediana muito próxima da estatística calculada para os controlos (**quadro 7** e **figura 7**). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Quadro 7 – Estatísticas do VEGF para os grupos controlo e com patologia coronária.

	Controlo	Doença coronária	χ^2
N	41/48	6/11	
Média	435,7	345.7	0.190
SD	276.2	159.1	
I.C. 95%	348.6 – 522.9	178.7 – 512.6	
Mediana	359.7	353.6	
I.C. – Intervalo de confiança			

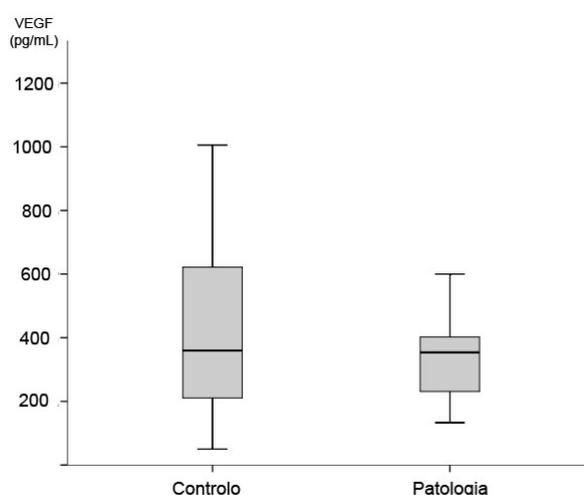


Figura 7 – *Boxplot* representativo dos níveis de VEGF no grupo controlo e em indivíduos com patologia coronária.

Na avaliação de factores de risco auto-reportados pelos intervenientes e considerando os dois grupos em conjunto, apenas o tabaco se revelou associado à concentração de VEGF sérico. Os fumadores no momento do estudo apresentaram um nível médio cerca de 2.3 vezes inferior relativamente aos não-fumadores (192.5 ± 114.6 pg/mL vs 451.8 ± 264.4 pg/mL) (**figura 8**). Os hábitos tabágicos prévios não estão aqui associados à concentração de VEGF. No caso da prevalência de diabetes e historial

familiar de doença coronária, não foi possível estabelecer relação uma vez que a dimensão dos grupos não permitiu uma análise estatística fiável. Em relação à medicação também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, tal como se verificou para o PAT. O pequeno número de resultados positivos na prova de esforço não permitiu a aplicação de qualquer teste estatístico robusto.

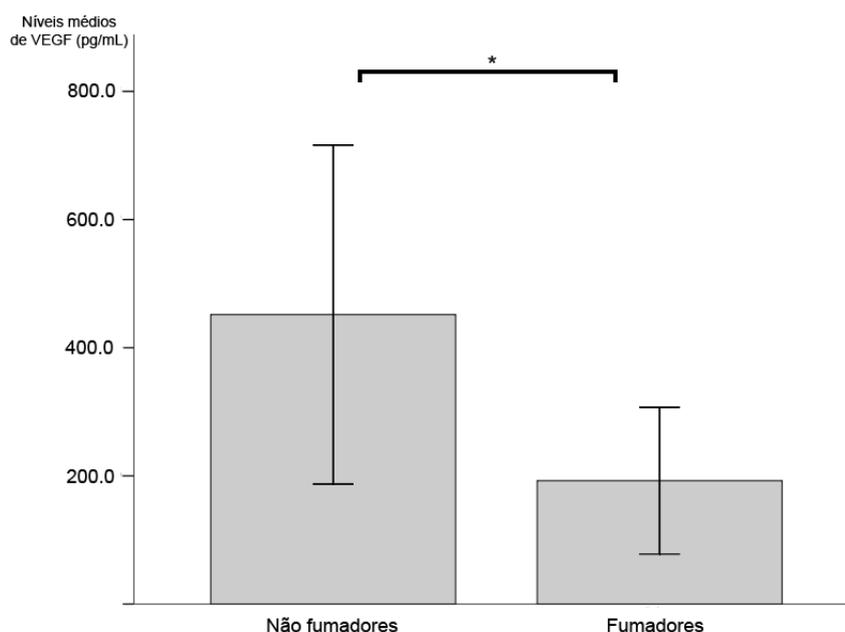


Figura 8 – Níveis séricos de VEGF em fumadores e não-fumadores. A concentração de VEGF é significativamente inferior nos fumadores (192.54 ± 114.56 pg/mL) em comparação com não-fumadores (451.81 ± 264.42 pg/mL), $H(1) = 5.344$, $p < 0.05$.

A análise correlacional entre as variáveis contínuas estudadas com o VEGF encontra-se sumariada no **quadro 8**. Foram encontradas associações significativas com a idade ($r_s = 0.305$, $p < 0.05$) e frequência cardíaca ($r_s = 0.371$, $p < 0.05$). Entre os parâmetros bioquímicos solúveis analisados, verificou-se uma correlação positiva com os níveis de glicose sérica ($r_s = 0.305$, $p < 0.05$) e CRP ($r_s = 0.339$, $p < 0.05$). Os indicadores de risco AIP, CT/HDL e *Framingham Point Score* não revelaram qualquer associação estatisticamente relevante.

Quadro 8 – Correlações de Spearman do VEGF com os parâmetros bioquímicos solúveis analisados.

Parâmetro	r_s	Parâmetro	r_s	Parâmetro	r_s
Idade	0.305*	Ureia	0.051	Monócitos	-0.036
IMC	0.165	Creatinina (soro)	0.235	Plaquetas	0.168
TA sistólica	0.199	AST	-0.009	PT	-0.145
TA diastólica	0.171	ALT	-0.181	INR	-0.183
Frequência cardíaca	0.371*	CK	0.003	APTT	-0.099
CT	0.141	Hemoglobina	0.020	CRP	0.339*
LDL-C	0.081	Eritrócitos	0.018	Troponina	-0.043
HDL-C	0.139	Hematócrito	0.061	Pro-BNP	0.149
TG	-0.031	RDW	-0.139	FPS	0.224
Proteínas	0.090	Leucócitos	0.136	AIP	-0.103
Albumina	-0.057	Neutrófilos	0.142	TC/HDL	-0.029
Glicose	0.305*	Linfócitos	-0.003		

AIP – Índice Aterogénico do Plasma; ALT – Alanina aminotransferase; AST – Aspartato aminotransferase; APTT – Tempo de protromboplastina parcial activada; CK – Creatina cinase; CRP – Proteína C-reativa; CT – Colesterol total; INR – Índice Internacional Normalizado; FPS – *Framingham Point Score*; HDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de alta densidade; IMC – Índice de Massa Corporal; LDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade; pro-BNP – *pro-Brain Natriuretic Peptide*; PT – Tempo de protrombina; RDW – *Red cell distribution width*; TA – Tensão arterial; TG – Triglicéridos
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

4. CATEPSINA-L

A Cat-L é uma enzima proteolítica produzida por vários tipos celulares, entre os quais macrófagos e células endoteliais. O seu interesse no campo das doenças cardiovasculares deve-se sobretudo à possibilidade de estar envolvida em processos estabilizadores da placa e aumento da susceptibilidade de ruptura pela degradação de componentes da matriz extracelular que constitui a cápsula fibrótica. Adicionalmente, a Cat-L intervém na produção de endostatina, um factor anti-angiogénico que dificulta a regeneração do endotélio e inibe a síntese de NO.

Os níveis de Cat-L foram avaliados por ELISA em amostras de soro em 5 doentes ($M = 4.18 \pm 0.39$ ng/mL) e 28 controlos ($M = 4.06 \pm 1.01$ ng/mL), não tendo sido encontrada uma diferença significativa entre os dois grupos (**quadro 9**). No entanto, o pequeno número de doentes com quantificação de Catepsina-L diminui a confiança estatística para uma extrapolação destes resultados.

Quadro 9 – Níveis de Catepsina-L nos grupos controlo e com patologia coronária.

	Controlo	Doença coronária	t
N	28/48	5/11	
Média	4.06	4.18	-0.283
SD	1.01	0.39	
I.C. 95%	3.65 – 4.44	3.70 – 4.66	
Mediana	3.94	4.15	
Min - Máx	2.31 – 6.27	3.76 – 4.79	

I.C. – Intervalo de confiança

As mulheres intervenientes neste estudo revelaram níveis significativamente superiores de Cat-L (N = 17; M = 4.43±1.09 ng/mL) em comparação com o sexo masculino (N = 16; M = 3.68±0.57 ng/mL), a um nível de confiança $p = 0.019$. Apesar de a pequena dimensão da amostra dificultar a comparação entre grupos, é legítimo e importante procurar diferenças estatísticas entre a Cat-L e a presença de factores de risco cardiovascular. No entanto, não foram encontradas relações com a presença de hipertensão ($H(1) = 0,472$, $p = 0,501$) ou dislipidémias ($t(31) = -0,985$, $p = 0,332$). Embora sem poder estatístico, é de salientar uma diferença notória nos níveis de Cat-L em fumadores (N = 4; M = 4.83±1.13 ng/mL) e não-fumadores (N = 29; M = 3.96±0.87 ng/mL), em sentido contrário ao encontrado para o VEGF. Não foi possível testar eventuais relações para o historial familiar de doença cardiovascular e diabetes devido ao pequeno número de indivíduos nestas condições. Da mesma forma, não foi estabelecida associação da Cat-L com a administração de aspirina. Não existem diferenças significativas com o tratamento farmacológico com anti-hipertensores ($H(1) = 0.005$, $p = 0.959$) ou estatinas ($H(1) = 0.286$, $p = 0.611$).

Apesar de o pequeno número de indivíduos não providenciar o poder estatístico necessário a uma análise robusta, os indivíduos com disfunção endotelial diagnosticada por PAT apresentam valores notoriamente inferiores de Cat-L (N = 4; M = 3.12±0.38 ng/mL) em comparação com saudáveis (N = 22; M = 4.15±1.01 ng/mL).

Na análise de correlação foram encontradas associações entre a Cat-L e a ALT ($r_s = -0.365$, $p < 0.05$), albumina ($r_s = -0.406$, $p < 0.05$), hemoglobina ($r_s = -0.405$, $p < 0.05$), hematócrito ($r_s = -0.365$, $p < 0.05$), eritrócitos ($r_s = -0.414$, $p < 0.05$) e glicose ($r_s = -0.454$, $p < 0.01$). Foi também encontrada uma correlação positiva com o FPS ($r_s = 0.421$, $p < 0.05$) (**quadro 10**).

Quadro 10 – Correlações de Spearman da Cat-L com os parâmetros bioquímicos solúveis analisados.

Parâmetro	r_s	Parâmetro	r_s	Parâmetro	r_s
Idade	-0.028	Ureia	-0.162	Monócitos	-0.026
BMI	-0.287	Creatinina (soro)	0.093	Plaquetas	-0.003
TA sistólica	-0.057	AST	-0.173	PT	0.140
TA diastólica	-0.119	ALT	-0.365*	INR	0.050
Frequência cardíaca	0.109	CK	0.013	APTT	0.013
TC	0.118	Hemoglobina	-0.405*	CRP	-0.113
LDL	0.022	Eritrócitos	-0.414*	Troponina	0.225
HDL	0.003	Hematócrito	-0.365*	Pro-BNP	0.213
TG	0.076	RDW	-0.075	FPS	0.421*
Proteínas	-0.239	Leucócitos	-0.172	AIP	0.026
Albumina	-0.406*	Neutrófilos	-0.178	TC/HDL	0.053
Glicose	-0.454**	Linfócitos	-0.209		

AIP – Índice Aterogénico do Plasma; ALT – Alanina aminotransferase; AST – Aspartato aminotransferase; APTT – Tempo de tromboplastina parcial activada; CK – Creatina cinase; CRP – Proteína C-reactiva; CT – Colesterol total; INR – Índice Internacional Normalizado; FPS – Framingham Point Score; HDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de alta densidade; IMC – Índice de Massa Corporal; LDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade; pro-BNP – pro-Brain Natriuretic Peptide; PT – Tempo de protrombina; RDW – Red cell distribution width; TA – Tensão arterial; TG – Triglicéridos
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

5. MICROPARTÍCULAS

As micropartículas são fragmentos celulares libertados após activação ou apoptose que albergam à superfície membranar marcadores da sua origem. Existem também algumas evidências de que são importantes mediadores metabólicos e que podem transportar efectores num processo de comunicação inter-celular. Embora a sua análise seja ainda controversa, aponta-se para uma possível relação entre as EMPs, função endotelial e regeneração vascular.

O **quadro 11** resume os dados obtidos em relação aos fenótipos de MPs analisados, CD31⁺ e CD144⁺, seleccionadas a partir do sub-grupo CD42b⁻. Relativamente ao sub-grupo das CD31⁺, a média da percentagem de eventos foi de 25.44±11.06% para o grupo controlo e 22.89±12.54% para os doentes. As MPs CD31⁺CD144⁺ revelaram médias de 8.58±4.14% vs 6.71±4.46% para o grupo controlo e patológico respectivamente. Quanto ao fenótipo CD42b⁻CD144⁺, não foi verificada variação entre os grupos controlo (M = 27.91±4.94%) e de patologia (M = 25.05±5.90%). Por último, o fenótipo CD42b⁻CD31⁺ obteve um valor médio de 17.21±5.80% no grupo controlo e 16.48±8.42% nos doentes. Nenhum destes fenótipos se evidenciou como estatisticamente significativo na análise comparativa entre os dois grupos de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Quadro 11 – Comparação dos fenótipos de MPs estudados entre os grupos controlo e com patologia coronária.

		Controlo	Doença coronária	χ^2
MPs CD31 ⁺ (%)	N	41	9	0.027
	Média ± SD	25.44±11.06	22.89±12.54	
	Mediana	25.80	25.93	
MPs CD31 ⁺ CD144 ⁺ (%)	N	40	8	1.619
	Média ± SD	8.58±4.14	6.71±4.46	
	Mediana	8.34	5.77	
MPs CD42b ⁻ CD144 ⁺ (%)	N	41	9	0.970
	Média ± SD	27.91±4.94	25.05±5.90	
	Mediana	26.82	26.41	
MPs CD42b ⁻ CD31 ⁺ (%)	N	39	9	0.070
	Média ± SD	17.21±5.80	16.48±8.42	
	Mediana	17.90	18.59	

Nenhum dos factores de risco considerados, historial familiar, tabagismo, hipertensão, dislipidémia e diabetes, se revelou associado significativamente com os fenótipos estudados ou o tamanho do grupo não permitiu a aplicação conclusiva do teste estatístico. Também não foram encontradas diferenças entre sexos.

O tratamento farmacológico com anti-hipertensores ou estatinas não se revelou associado a qualquer dos fenótipos estudados. No entanto, os indivíduos sob

administração de aspirina apresentam uma percentagem de EMPs CD42b⁻CD144⁺ significativamente inferior ($M = 23.57 \pm 6.01$) aqueles que não a tomam ($M = 28.02 \pm 4.82$), $H(1) = 4.05$, $p < 0.05$ (**figura 9**).

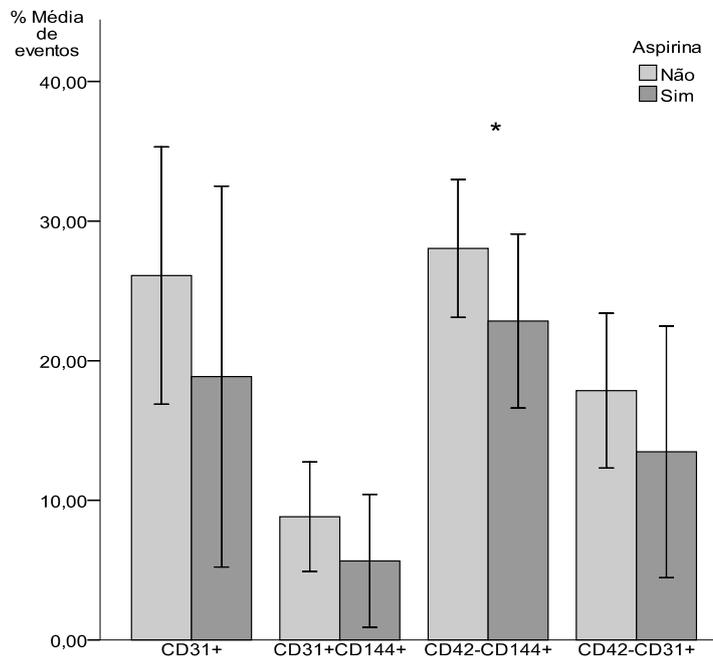


Figura 9 – Variação na proporção de MPs com a administração de aspirina. As EMPs CD42b⁻CD144⁺ estão significativamente reduzidas em indivíduos sob administração de aspirina ($H(1) = 4.05$, $p < 0.05$), não se tendo verificado qualquer relação com outro fenótipo; * $p < 0.05$.

Relativamente à avaliação da função endotelial com recurso ao EndoPAT, foi encontrada uma associação com a proporção de EMPs CD42b⁻CD144⁺. Indivíduos com exame positivo, diagnosticante de disfunção endotelial, tendem para valores superiores das referidas EMPs ($M = 31.59 \pm 5.72$) comparativamente àqueles com resultado normal ($M = 27.11 \pm 4.51$), significativos a $t(34) = -2.41$, $p < 0.05$ e representando um efeito de $r = 0.38$ (**figura 10**).

As EMPs CD42b⁻CD144⁺ foram associadas de forma inversa à idade ($r_s = -0.315$, $p < 0.05$) e *Framingham Point Score* ($r_s = -0.494$, $p < 0.01$). Mesmo quando apenas são considerados os indivíduos controlo, a correlação com o FPS ($r_s = -0.473$, $p < 0.01$) é mantida. Os outros indicadores de risco, o Índice Aterogénico do Plasma e rácio TC/HDL, não foram estatisticamente significativos para nenhum dos fenótipos estudados. Relativamente aos parâmetros bioquímicos solúveis, a percentagem de CD31⁺ foi correlacionada com os níveis de colesterol total ($r_s = 0.367$, $p < 0.05$) e LDL-C ($r_s = 0.324$, $p < 0.05$). Não foi encontrada qualquer relação com os níveis de VEGF sérico. Por motivos de espaço, o **quadro 12** sintetiza a análise de correlações apenas para as variáveis com significâncias inferiores a 0.05. No **suplemento 6** poderão ser vistas todas elas em maior detalhe.

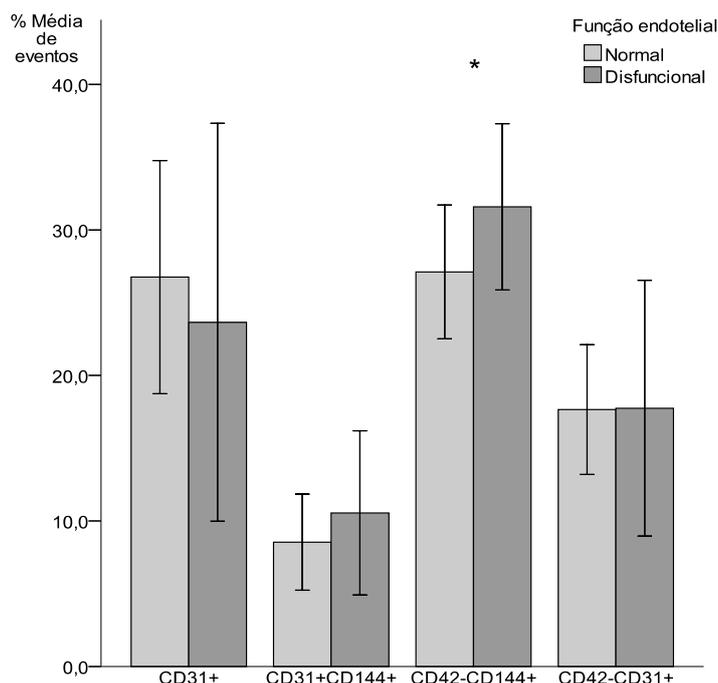


Figura 10 – Relação entre a proporção de MPs e a função endotelial, avaliada pelo EndoPAT®. De todos os fenótipos estudados, apenas foi encontrada uma associação com as EMPs CD42b⁻CD144⁺. Indivíduos diagnosticados com disfunção endotelial tendem para valores superiores destas EMPs (M = 31.59±5.72) comparativamente aos resultados negativos (M = 27.11±4.51), significativos a $t(34) = -2.41$, $p < 0.05$ e com um efeito de $r = 0.38$; * $p < 0.05$.

Quadro 12 – Correlações de Spearman com significância para os fenótipos de micropartículas considerados.

	Idade	TA sist.	TA diast.	FPS	Linfócitos	CT	LDL-C
CD31⁺	-0.225	-0.023	0.108	-0.149	0.158	0.367*	0.324*
CD31⁺CD144⁺	-0.248	-0.116	0.018	-0.281	0.074	0.264	0.186
CD42⁻CD144⁺	-0.315*	-0.275	-0.170	-0.494**	0.088	0.143	0.057
CD42⁻CD31⁺	-0.214	-0.047	0.099	-0.191	0.160	0.278	0.231

CT – Colesterol total; FPS – Framingham Point Score; LDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade; TA diast. – Tensão arterial diastólica; TA sist. – Tensão arterial sistólica
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

6. CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS VEGF, CAT-L E MICROPARTÍCULAS

As correlações entre as variáveis alvo deste estudo foram testadas pelo método de Spearman, não tendo sido encontrada nenhuma com significado para o VEGF. Por outro lado, a Cat-L foi correlacionada com as MPs CD31⁺CD144⁺ ($r_s = -0.401$, $p < 0.05$), CD42b⁻CD144⁺ ($r_s = -0.512$, $p < 0.01$) e CD42b⁻CD31⁺ ($r_s = -0.471$, $p < 0.01$) (**quadro 13**). Por regressão linear, calcula-se que as MPs CD31⁺CD144⁺, CD42b⁻CD144⁺ e CD42b⁻CD31⁺ partilhem respectivamente 12.0%, 15.4% e 15.7% da variabilidade verificada para a Cat-L (**figura 11**).

Quadro 13 – Correlações de Spearman entre o VEGF, Catepsina-L e micropartículas analisadas.

	VEGF	Catepsina-L	CD31 ⁺	CD31 ⁺ CD144 ⁺	CD42b ⁻ CD144 ⁺	CD42b ⁻ CD31 ⁺
VEGF		-0.273	-0.004	-0.121	-0.122	-0.031
Catepsina-L	-0.273		-0.282	-0.401*	-0.512**	-0.471**
CD31 ⁺	-0.004	-0.282				
CD31 ⁺ CD144 ⁺	-0.121	-0.401*				
CD42b ⁻ CD144 ⁺	-0.122	-0.512**				
CD42b ⁻ CD31 ⁺	-0.031	-0.471**				

* p<0.05; **p<0.01

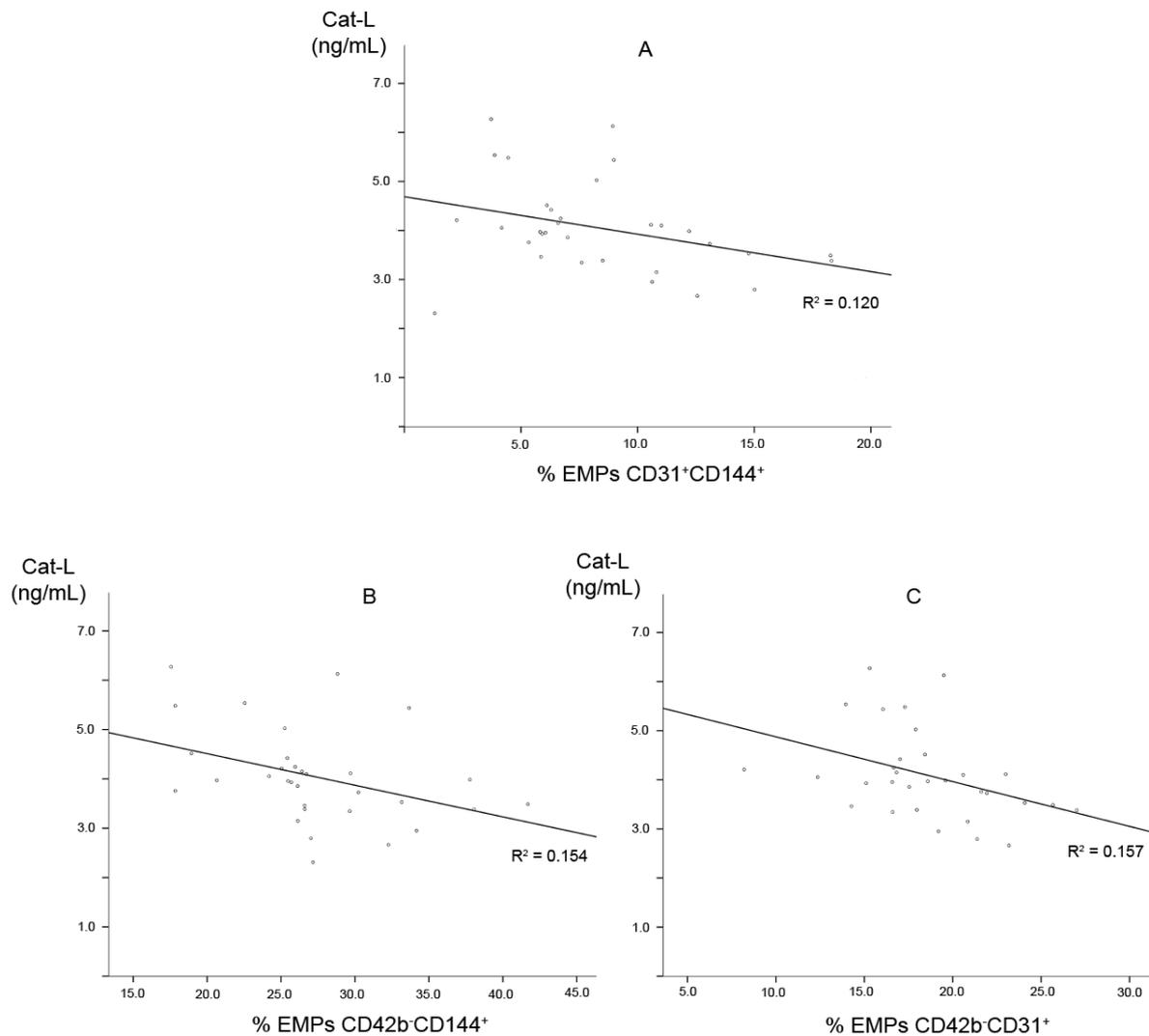


Figura 11 – Diagramas de dispersão para a Cat-L e fenótipos de EMPs estudados, e ajustamento por regressão linear. (A) Cat-L vs EMPs CD31⁺CD144⁺, $R^2 = 0.120$; (B) Cat-L x EMPs CD42b⁻CD144⁺, $R^2 = 0.154$; (C) Cat-L vs EMPs CD42b⁻CD31⁺, $R^2 = 0.157$.

7. FACTORES METABÓLICOS DE RISCO CARDIOVASCULAR

Uma série de estudos comprova um aumento de risco para doença cardiovascular aterosclerótica de acordo com a presença de factores metabólicos e fisiológicos alterados. O relatório do NCEP/ATPIII (National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III) [180] sugere os níveis de triglicéridos, HDL, glicose e tensão arterial como parâmetros fisiológicos a serem considerados numa avaliação epidemiológica de risco, sendo hoje aceites pela comunidade médica no geral. Concentrações elevadas de (TG \geq 150 mg/dL), HDL-C reduzido (<40 mg/dL nos homens e <50 mg/dL nas mulheres), níveis de glicose elevados em jejum (\geq 110 mg/dL, para a população portuguesa), pressão arterial alta (\geq 130 mmHg sistólica ou \geq 85 mmHg diastólica) ou o tratamento farmacológico para qualquer uma destas disfunções são considerados factores de risco para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares no futuro.

Um outro factor de risco cardiovascular, em grande parte associado aos parâmetros metabólicos, é o nível de CRP plasmática. Verificámos neste estudo uma correlação entre a CRP, idade ($r_s = 0.317$, $p < 0.05$), glicemia ($r_s = 0.296$, $p < 0.05$) e com o *Framingham Point Score* ($r_s = 0.372$, $p < 0.01$), embora nenhuma relação tenha sido encontrada para as variáveis de perfil lipídico.

Neste estudo foi verificada uma considerável incidência de disfunções metabólicas no conjunto dos participantes e em ambos os grupos separadamente. Para os quatro parâmetros considerados (TG, HDL-C, glicemia e pressão arterial), o grupo controlo apresentou uma média de 1.4 factores de risco por indivíduo contra os 2.1 verificados nos doentes, para uma média global de 1.5 por indivíduo. A maioria dos participantes tinha entre 1 e 2 factores presentes (**figura 12**).

Como este estudo é de carácter transversal e não pretende o acompanhamento dos participantes, os indicadores referidos serão considerados no conjunto dos indivíduos, no sentido de estabelecer relações com os parâmetros em análise: VEGF, Cat-L e MPs. Nenhum deles se revelou associado individualmente, embora o efeito do HDL-C nas EMPs CD42b⁻CD144⁺ seja digno de nota ($r = 0.280$), mas não significativo ($p = 0.063$). Indivíduos em risco apresentam níveis tendencialmente inferiores de EMPs (M = 25.97 \pm 3.71%) relativamente áqueles com HDL-C normal (M = 28.8 \pm 5.61%). Alguns síndromes humanos são avaliados de acordo com o número de factores de risco dentro de uma selecção, como é o caso do síndrome metabólico. Para testar se o total de factores de risco estava relacionado com os níveis de VEGF, Cat-L ou MPs, foram criados três grupos de forma a aumentar o tamanho dos mesmos e assim a robustez estatística. Foi verificada uma diferença significativa entre grupos para as EMPs CD31⁺CD144⁺, em sentido decrescente (**quadro 14**). A presença de pelo menos três factores de risco

mostrou-se associada à percentagem destas EMPs ($t(20.9) = 3.27, p < 0.01$), com uma tendência inversa.

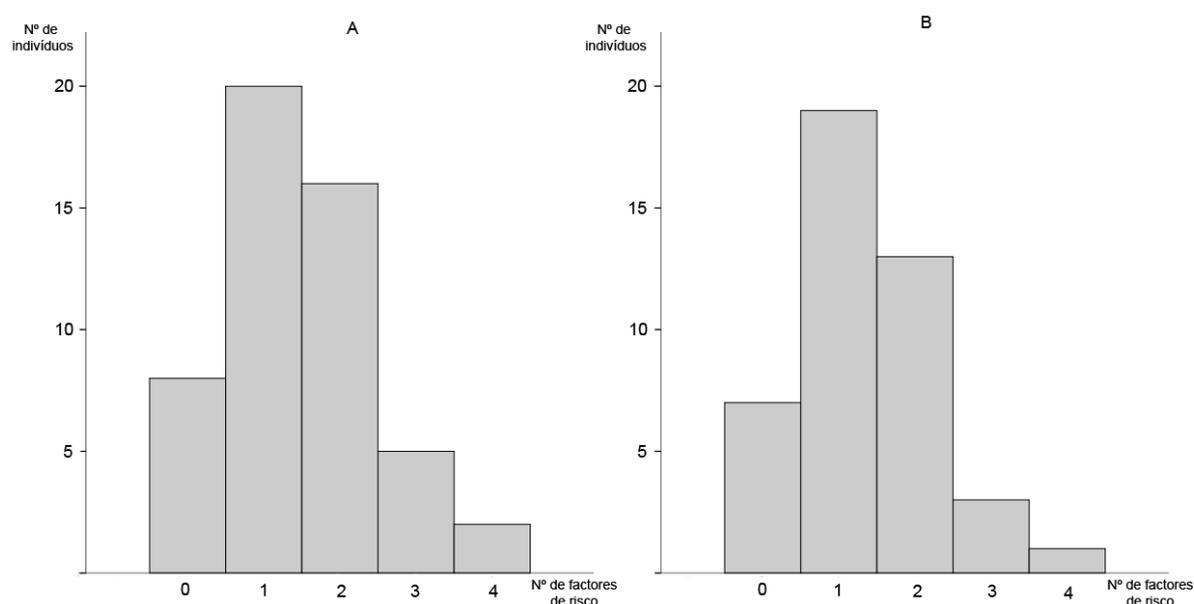


Figura 12 – Número de factores metabólicos de risco por indivíduo. (A) Grupo controlo e (B) Grupo controlo + grupo com patologia coronária.

Quadro 14 – Análise da relação entre o número de factores metabólicos de risco cardiovascular com o VEGF, Cat-L e micropartículas (ANOVA).

	Nº de factores	N	M ± SD	F	p
VEGF (pg/mL)	≤ 1	23	460±291	0.905	0.413
	2	14	345±172		
	≥ 3	5	444±273		
Cat-L (ng/mL)	≤ 1	15	4.18±1.28	0.106 ^a	0.900
	2	9	4.00±0.66		
	≥ 3	6	4.05±0.46		
MPs CD31⁺ (%)	≤ 1	24	27.6±12.2	0.590	0.559
	2	15	25.0±10.1		
	≥ 3	5	22.4±3.3		
MPs CD31⁺CD144⁺ (%)	≤ 1	23	9.35±4.75	5.140 ^a	0.014*
	2	14	8.41±3.51		
	≥ 3	5	6.05±1.25		
MPs CD42b⁻CD144⁺ (%)	≤ 1	23	28.9±5.85	1.506	0.219
	2	16	26.7±4.00		
	≥ 3	5	25.3±3.28		
MPs CD42b⁻CD31⁺ (%)	≤ 1	22	18.7±5.93	0.585	0.562
	2	15	17.0±6.36		
	≥ 3	5	16.2±2.30		

*Significante para $p < 0.05$
^a – Correção de Welch

V. DISCUSSÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Ocidente e um dos problemas de saúde pública de maior importância a nível mundial. A aterosclerose é uma patologia da parede vascular reconhecida como a principal causa de DCV. É uma doença inflamatória em que a imunidade interage com factores de risco metabólicos e demográficos na iniciação e propagação da lesão arterial e ateroma, num processo contínuo ao longo de vários anos. O endotélio é o principal regulador da homeostase vascular, bem como da inflamação arterial e trombose. Quando este balanço é perturbado, instala-se uma condição clínica conhecida como disfunção endotelial, caracterizada por hiporeactividade vascular e inflamação crónica. De especial importância, a disfunção endotelial é considerada um marcador precoce de aterosclerose, precedente ao desenvolvimento de lesões evidentes em angiografia ou outras técnicas imagiológicas [3]. Como tal, é um indicador pré-clínico e pré-sintomático cujo diagnóstico poderá ajudar a uma intervenção profilática, prévia à ocorrência de um evento agudo [9]. Até ao momento, não existem marcadores solúveis reconhecidos para a disfunção endotelial e torna-se imperativo o estudo da sua relação bioquímica com a aterosclerose de forma a desenvolver não só meios de diagnóstico precoces e não-invasivos como novas terapias eficazes no combate às doenças cardiovasculares.

1. INDICADORES SISTÉMICOS NA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA

O NO é provavelmente o principal mediador funcional do endotélio e diversas funções biológicas lhe são atribuídas, como a regulação do tónus vascular, pró-angiogénese e como anti-agregante plaquetário. Infelizmente, não foi possível levar a termo um dos objectivos deste estudo: quantificar os níveis de NO e estabelecer relações com indicadores biológicos e factores de risco cardiovascular. No entanto, os valores médios obtidos nos controlos e doentes sugerem que não existem diferenças notórias, o que aliás está de acordo com resultados prévios [179]. O NO é um elemento lábil com um tempo de vida muito curto no organismo devido à sua elevada reactividade [11]. A sua quantificação *in vivo* requer meios indirectos através de moléculas de azoto mais estáveis, o nitrito e nitrato, precursores biológicos de NO. Uma disponibilidade reduzida de nitrito é característica da disfunção endotelial e a sua concentração reflecte alterações na actividade de eNOS [181]. No entanto, os resultados obtidos não são de estranhar dada a homogeneidade entre os grupos de estudo, tanto a nível demográfico como em presença factores de risco. Embora sem evidências de doença coronária, há uma incidência considerável de factores de risco cardiovascular no grupo controlo, como hipertensão, dislipidémias e tabagismo, que podem mascarar qualquer diferença relativa ao grupo com doença coronária confirmada.

O VEGF é um factor de crescimento pró-angiogénio essencial para manutenção da integridade do endotélio. Embora os mecanismos que acciona estejam bem caracterizados, a sua função ambígua desperta o interesse no estudo da sua relação com a aterosclerose. Como qualquer tecido biológico, o crescimento da placa está dependente de um fornecimento adequado de nutrientes e oxigénio que só pode ser assegurado com a formação de novos vasos sanguíneos, processo este mediado pelo VEGF [82]. Estes vasos recém-formados são altamente permeáveis a LDL e expressam moléculas de adesão que facilitam a migração de células inflamatórias para o ateroma [65]. No entanto, em resposta a hipóxia, ele estimula a regeneração de zonas isquémicas após enfarte e a produção de NO pelo endotélio [81]. Após enfarte agudo do miocárdio, os níveis de VEGF aumentam [182] e estão da mesma forma relacionados com doença coronária [183], hipertensão [184] e hiperlipidémia [185]. Aqui, não encontramos quaisquer diferenças entre a concentração sérica de VEGF no grupo controlo e com patologia. Aparentemente, os níveis de VEGF são mais reduzidos nos doentes mas trata-se de um artefacto originado pelo enviesamento da distribuição no grupo controlo. Estes resultados poderão ser explicados novamente pela incidência de factores de risco para doenças cardiovasculares no grupo controlo. Os resultados dos estudos que avaliam a relação entre os níveis de VEGF e a doença coronária são conflituosos. Embora seja reconhecida uma tendência para concentrações superiores de VEGF na condição patológica, também existe a mesma associação com factores de risco como a hipertensão, dislipidémia e tabagismo, fazendo dele um potencial marcador da propensão para a lesão e não da doença já estabelecida [186]. Adicionalmente, a severidade da lesão não está relacionada com as concentrações plasmáticas de VEGF [187] e a terapia anti-hiperlipidémica [185] ou anti-hipertensiva [184] reduz eficazmente os níveis de VEGF nestes doentes, sugerindo que a relação com a doença coronária poderá ser secundária.

Embora a Catepsina-L seja um factor reconhecido na destabilização da placa de ateroma, massivamente expresso por macrófagos na zona de curvatura e associado à apoptose e degradação da matriz extracelular [95], a relevância dos seus níveis sistémicos não é ainda clara. O ensaio da Cat-L foi incluído no âmbito deste estudo na tentativa de estabelecer uma relação entre a actividade da placa e sua natureza inflamatória com o comprometimento da função endotelial. A sua ligação com a actividade da placa torna-a promissora como marcador biológico do risco de eventos agudos. Além dos macrófagos, a Cat-L é expressa em vários tipos celulares como células endoteliais e músculo liso vascular [95]. Shi e colaboradores mostraram que os níveis séricos de Cat-L eram significativamente superiores em pacientes com estenose >10% numa das artérias coronárias comparativamente a indivíduos sem lesão detectável [95]. A mesma equipa sugere mais tarde que a Cat-L possa ser usada como marcador de

doença coronária [188]. As células endoteliais aumentam a expressão de Cat-L em resposta a citocinas pró-inflamatórias como o IFN- λ e TNF- α [95]. Os níveis elevados de Cat-L na doença coronária poderão reflectir a natureza inflamatória sistémica da doença ou apenas uma maior produção localizada que verte na corrente sanguínea devido à degeneração da matriz extracelular e cápsula fibrótica. Em defesa da primeira, os autores foram capazes de estabelecer uma relação positiva entre a Cat-L e hsCRP [188]. Neste estudo não foi possível reproduzir estes resultados e não foram encontradas diferenças significativas entre indivíduos sem aterosclerose evidente e grupo com patologia coronária. Embora a pequena dimensão da amostra não permita refutar com confiança a hipótese de uma associação positiva, a presença de factores de risco com natureza inflamatória poderá ter mascarado essa associação. De facto, embora existam diferenças significativas entre grupos nos níveis de CRP, reflectindo um estado de inflamação crónica, a mesma associação não foi verificada em relação à Cat-L. Para além do grupo de Shi, não há conhecimento de outros estudos que estabeleçam uma relação directa entre a aterosclerose e os níveis sistémicos de Cat-L, possivelmente devido a resultados inconsistentes como os aqui verificados.

O sangue transporta vesículas fosfolipídicas, as micropartículas, derivadas de diversos tipos celulares, entre eles as plaquetas e células endoteliais, como resultado de um processo estimulante particular. MPs de diferentes fenótipos foram já documentadas em associação a várias patologias, em especial às do sistema cardiovascular, e estão relacionadas com diferentes parâmetros patofisiológicos. Os níveis de MPs em circulação estão aumentados na maioria das doenças cardiovasculares quando comparada uma população afectada com indivíduos saudáveis [101]. Num estudo comparativo, foi demonstrado que pacientes com enfarte agudo do miocárdio apresentam maior concentração de EMPs de efeito pró-coagulante do que casos com doença estável ou controlos [135, 143]. Adicionalmente, níveis elevados de EMPs estão associados a lesões de alto risco avaliadas por angiografia [145]. No entanto, conclusões retiradas de estudos clínicos não podem ser generalizadas a todas as MPs com a mesma origem mas apenas ao fenótipo analisado em particular. Existem evidências de que as MPs CD31⁺CD42⁻, presumivelmente de origem endotelial, estão elevadas em casos de síndrome coronário agudo [144]. No entanto, em relação à população alvo deste estudo não foram encontradas tais relações para nenhum dos fenótipos testados (CD31⁺, CD31⁺CD144⁺, CD42b⁻CD144⁺ e CD42b⁻CD31⁺). A explicação óbvia deste resultado prende-se com a pequena dimensão da amostra e heterogeneidade relativa à sua condição clínica. No grupo patológico foram incluídos enfartes agudos com e sem elevação de ST, anginas estáveis e instáveis. Se por um lado o poder estatístico aumentou, é possível que as relações caso vs controlo tenham sido comprometidas. Por outro lado, a elevada incidência de factores de risco cardiovascular no grupo controlo,

nomeadamente a hipertensão e hiperlipidémia, poderá mascarar eventuais relações uma vez que as MPs foram já associadas positivamente a esses factores de risco [101]. No entanto, essa correspondência entre grupos poderia ajudar a compreender se de facto o aumento verificado seria devido à lesão em si. A resposta não é consensual e, embora as MPs tenham sido inequivocamente associadas a processos patofisiológicos pró-ateroscleróticos, existem fortes indícios de que poderão representar um papel cardioprotector. Embora a concentração de MPs verificada no ateroma seja muito superior à circulante, a hipótese de a elevação verificada se dever à extravasão da placa é altamente improvável devido às diferentes proporções das origens celulares das partículas e à necessidade de ruptura simultânea de numerosas placas para um efeito notório [101]. Adicionalmente, enquanto que alguns autores salientam o efeito vasoconstritor e pró-trombótico das MPs, outros defendem papéis inversos. A transferência de ácido araquidónico (AA) de PMPs para células endoteliais aumenta a produção de tromboxano A₂, um potente agente vasoconstritor e hipertensivo. Por outro lado, essa mesma transferência aumenta igualmente a produção de prostaciclina de efeito vasodilatador [189]. A actividade de COX-2 em conjunto com uma maior disponibilidade de AA pode funcionar em ambos os sentidos, com resultados totalmente antagónicos. Da mesma forma, embora seja dado especial ênfase ao papel pró-trombótico e coagulante das MPs, especialmente quando albergam à superfície o factor tecidual, estas permitem igualmente a assemblagem de complexos anticoagulantes como a proteína C e podem expressar trombomodulina, TFPI, EPCR ou proteína S, indicando um potencial papel anticoagulante [116]. A segregação de EMPs pode também ser vista como um mecanismo de manutenção da integridade vascular uma vez que expulsam iniciadores de apoptose como a caspase-3, estimulados por processos deletérios, e asseguram a manutenção da célula e estrutura do vaso [190]. Parece então clara a dificuldade em estabelecer uma relação perentória entre as MPs e um processo fisiológico, patológico ou não, ou pelo menos em explicar os resultados evidenciados nas publicações disponíveis. As micropartículas serão a causa ou resultado da aterosclerose? Não existe resposta a esta pergunta pois embora as MPs induzam a adesão e transmigração de leucócitos para a zona da lesão, favoreçam a produção de citocinas e apresentem efeitos pró-coagulantes, sugerindo um papel pró-aterogénico, níveis elevados de MPs são também resultado dessa inflamação, coagulação e disfunção vascular [189].

2. REPRESENTATIVIDADE DA ANÁLISE DE MICROPARTÍCULAS

A título de crítica, assiste-se por vezes à conclusão abusiva de que as micropartículas de um determinado tipo celular estão relacionadas com um qualquer

processo biológico ou doença. É pouco provável que algum marcador singular possa discriminar todas as micropartículas de um tecido ou tipo celular. Durante bastante tempo foi assumido que as MPs $CD31^+CD42b^-$ tinham origem no endotélio, mesmo reconhecendo uma percentagem diminuta destas originárias de leucócitos [168]. Recentemente foi demonstrado que as próprias plaquetas poderiam gerar *in vitro* MPs $CD42b^-$ em quantidade apreciável [191-192], questionando as conclusões de trabalhos anteriores uma vez que estariam a ser medidas populações de ambos os tipos celulares. Embora a relação estatística com determinada doença ou processo exista, esta poderá não reflectir a sua origem. Daí, os últimos estudos em EMPs começam a dar primazia ao $CD144$, um marcador considerado altamente específico das células endoteliais e já relacionado à disfunção deste tecido. No entanto, em indivíduos saudáveis as EMPs $CD144^+$ estão em número reduzido embora este marcador seja massivamente expresso pelas células endoteliais [168]. Este facto dificulta a detecção do marcador uma vez que muitos equipamentos necessitam de um mínimo de 500 moléculas fluorescentes por partícula [107]. Por outro lado, reforça a noção de que a segregação de MPs não é um processo aleatório e a expressão de certos antígenos é activamente regulada.

Um outro aspecto incontornável quando tratamos da análise de MPs em tecidos biológicos são os constrangimentos técnicos da sua detecção. Embora a citometria seja o método por excelência para a sua análise, está longe de ideal. O seu emprego deve-se essencialmente à facilidade de execução e, acima de tudo e plenamente justificativo, à possibilidade de utilização em clínica como meio de diagnóstico. As MPs são geralmente definidas entre os 100 nm e 1000 nm e resulta de uma lei física que partículas de dimensão inferior ao comprimento de onda do feixe incidente não podem ser medidas com precisão. A maioria dos citómetros e em particular o equipamento utilizado neste trabalho possuem *lasers* que emitem a 490 nm, dimensão abaixo da qual a sensibilidade do aparelho não é previsível. Numa tentativa recente de padronizar a quantificação de PMPs no plasma concluiu-se que quando o limite inferior era colocado nos 500 nm é possível obter um coeficiente de variação inter-laboratorial aceitável [103]. Além do mais, as MPs encontram-se num nível próximo do ruído de fundo e os procedimentos comuns para o eliminar não podem ser empregues sob consequência de perda de eventos e subestimação dos números. As MPs aparecem graficamente no primeiro quadrante em escala logarítmica, junto ao ruído electrónico e detritos celulares. Não é possível discriminar pelo tamanho duas partículas distintas usando apenas a dispersão de luz porque o sinal de um evento grande nem sempre é superior a um mais pequeno [102]. De tudo isto resultam diferentes definições do instrumento entre laboratórios, o que dificulta a comparação e validação dos resultados. Um outro aspecto que inviabiliza essa comparação é a falta de consenso em relação às variáveis pré-analíticas [168]. É reconhecido que procedimentos tão básicos como o anti-coagulante usado, calibre da

agulha, centrifugação, armazenamento e temperatura têm um impacto muito significativo no resultado da análise. Por exemplo, a centrifugação a alta velocidade (10000 g) leva a uma perda considerável de MPs CD31⁺CD42b⁻ e a refrigeração a 4 °C durante 7h afecta especificamente as EMPs CD144⁺ [168]. Portanto, antes de qualquer discussão séria acerca do eventual papel das micropartículas na doença ou sua utilidade como marcador clínico, é imperativo que as técnicas sejam padronizadas de forma a tornar possível a comparação de resultados entre diferentes grupos de trabalho e uma avaliação meta-analítica consistente.

3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio não é uma mera barreira física que separa o lúmen do vaso e sangue dos restantes tecidos. Ele desempenha um papel activo na hemodinâmica e hemostase, mediado em grande parte pela síntese de NO nas células endoteliais. Uma função endotelial comprometida, caracterizada por uma resposta insuficiente a estímulos químicos ou físicos, é um marcador precoce de doença vascular aterosclerótica que precede o desenvolvimento de uma lesão detectável e sintomática. Um dos métodos de avaliação da função endotelial é o PAT, uma técnica não-invasiva e de prática aplicação. Muito sinteticamente, o PAT avalia de forma indirecta a produção de NO no endotélio estimulada pela hiperémia reactiva provocada por oclusão da artéria braquial. Existem já alguns equipamentos no mercado mas o uso ainda não é generalizado. Neste estudo foi utilizado o EndoPAT®, devidamente validado em estudos clínicos precedentes [162-164]. Uma vez que o grande potencial desta técnica é a capacidade de prever o desenvolvimento de doença cardiovascular, não faria sentido examinar o grupo patológico, com doença coronária já caracterizada. Como tal, apenas indivíduos do grupo controlo foram submetidos a este exame na tentativa de relacionar o VEGF, a Cat-L ou os vários fenótipos de MPs com a função endotelial, estudando a sua potencialidade como marcador bioquímico deste parâmetro fisiológico.

É reconhecido o papel da Cat-L na destabilização da placa de ateroma e apoptose de macrófagos na zona lesionada. No entanto, o significado dos níveis sistémicos desta enzima é ainda obscuro, pensando-se que poderão depender do estado inflamatório ou extravasão da placa por degeneração da cápsula. Ainda menos caracterizado é o papel da Cat-L na disfunção endotelial. O colagénio XVIII é um importante componente estrutural da membrana basal das células endoteliais que assegura a sua estabilidade. A perda de colagénio XVIII potencia a neovascularização e permeabilidade vascular na aterosclerose [83]. Adicionalmente, a activação de Cat-L leva à clivagem de uma região particular do colagénio XVIII libertando endostatina, um dos anti-angiogénicos mais poderosos e de acção específica no endotélio. Em grande parte, a função anti-

angiogénica da endostatina é mediada por antagonização aos efeitos do VEGF. A produção excessiva de endostatina deverá estar também relacionada com a disfunção endotelial. Foi já demonstrado que a endostatina inactiva eNOS por desfosforilação da Ser1177 [85]. Adicionalmente, também actua a nível do produto por activação de NAD(P)H oxidases, com conseqüente libertação de O_2^- que reage com o NO e gera peroxinitrito [83]. Embora conceptualmente interessante, não existem evidências de que, em condições fisiológicas, este mecanismo seja importante a nível sistémico. Neste estudo não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre a concentração de Cat-L e o resultado do EndoPAT®, embora sejam notórios níveis inferiores de Cat-L em indivíduos diagnosticados com disfunção endotelial. Convém reforçar que apenas foram avaliados controlos, sem doença coronária evidente mas com factores de risco cardiovascular presentes. Paralelamente, a variação verificada nos valores foi muito pequena e sempre dentro do referenciado (2.4-14.2 ng/dL), não sendo possível falar de uma produção excessiva de Cat-L. De qualquer forma, os resultados obtidos são particularmente interessantes na perspectiva inflamatória da disfunção endotelial. A albumina é uma proteína plasmática produzida no fígado, importante para a manutenção da pressão osmótica e representa mais de metade das proteínas do sangue. O seu papel na inflamação é reconhecido, tratando-se de uma proteína de fase aguda negativa (diminui em resposta à inflamação). Foi encontrada uma correlação inversa entre os níveis de Cat-L e a albumina, sugerindo uma relação entre a inflamação e níveis aumentados de Cat-L. Na verdade, a IL-6 é o principal iniciador da resposta de fase aguda [193] e foi demonstrado que estimula a produção de Cat-L em diversos tipos celulares [95]. Em adição, níveis reduzidos de albumina favorecem a produção de NO por eNOS *in vitro* [194]. No nosso trabalho foram encontrados valores superiores de albumina na disfunção endotelial ($t(35) = -2.081, p < 0.05$), sugerindo que em indivíduos sem doença cardiovascular os mecanismos que regulam a função endotelial são outros que não a inflamação crónica.

Evidências experimentais sugerem que o nível de MPs de origem endotelial é um marcador específico da disfunção deste órgão em indivíduos com doença vascular. Os níveis de EMPs $CD144^+$ e $CD31^+CD41^-$ correlacionam-se inversamente com a vasodilatação fluxo-mediada em pacientes com insuficiência renal crónica, o que não se verifica para MPs de origem plaquetária ou eritrocítica, evidenciando uma correlação específica de uma população de MPs com parâmetros avaliadores da função endotelial [134]. Da mesma forma, Werner e colaboradores estabeleceram uma relação inversa entre os níveis de MPs derivadas de apoptose, $CD31^+Anexina V^+$, com a vasodilatação mediada pelo endotélio em pacientes com doença coronária [135]. À semelhança, os níveis de MPs $CD31^+CD42b^-$ estão relacionados negativa e independentemente com a disfunção endotelial em diabéticos [195]. Na população alvo deste estudo, apenas as MPs

CD42b⁻CD144⁺, originárias do endotélio, se revelaram associadas à função endotelial avaliada por PAT. Embora sem significância estatística, é de salientar que todos os fenótipos indicativos de origem endotelial estão mais elevados em indivíduos com disfunção diagnosticada (**figura 10**). Embora as MPs CD31⁺, sem origem definida, estejam correlacionadas com o colesterol total e LDL-C, não mostraram relação com o EndoPAT®. As EMPs, por seu lado, não estão relacionadas com estes parâmetros lipídicos, sugerindo que este factor de risco não está associado à disfunção endotelial nesta população. Da mesma forma, nem a tensão arterial sistólica ($t(38) = 0.325$, $p = 0.747$) nem a diastólica ($t(38) = 0.97$, $p = 0.923$) estão associadas ao resultado do EndoPAT®. Uma diferença em relação a estudos anteriores é que estes indivíduos não possuem complicações cardiovasculares, sugerindo que as EMPs são marcadores de disfunção endotelial, independentemente da presença de doença e não correlacionados linearmente com a hipertensão ou hipercolesterémia. No entanto, os nossos resultados devem ser interpretados com parcimónia devido ao reduzido número de voluntários examinados.

4. ACTIVAÇÃO ENDOTELIAL E ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA DA PLACA

Um dos resultados mais interessantes deste estudo foi a correlação inversa entre a Cat-L e todos os fenótipos endoteliais de MPs (**tabela 13**). Embora sem significância estatística, vimos que indivíduos com um pré-diagnóstico de disfunção endotelial apresentaram valores tendencialmente inferiores de Cat-L e superiores de EMPs. No entanto, o significado desta relação não é claro e não há conhecimento de estudos conclusivos a este respeito. Na verdade, trata-se de uma relação contra-intuitiva já que alguns factores reconhecidos como estimulantes da produção de Cat-L em células endoteliais, nomeadamente TNF- α e IL-1 β [95], sejam também potenciadores da secreção de micropartículas *in vitro* [101]. Infelizmente não foram recolhidos dados relativos a estas citocinas. A insuficiência (ou inexistência) de estudos publicados acerca da relação entre as micropartículas e a Cat-L dificultam a interpretação do significado biológico da correlação aqui verificada. Na verdade, não é claro o papel, se algum, da Cat-L presente no soro já que a sua actividade é potenciada por pH ácido [196]. É conhecida a função protectora e quimioattractiva do NO nas células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea [197]. Estas células expressam grandes quantidades de Cat-L, um pré-requisito à sua capacidade invasiva na formação de novos vasos [97]. É possível, embora meramente especulativo, que a disfunção endotelial, caracterizada por uma reduzida biodisponibilidade de NO e marcada por um aumento de EMPs, possa inviabilizar as células progenitoras reflectindo-se nos níveis séricos de Cat-L.

5. FUNÇÃO ENDOTELIAL E FACTORES DE RISCO

TABACO

Existe uma ligação próxima entre a função endotelial e factores de risco cardiovascular, entre os quais o tabagismo é um dos mais deletérios. O fumo do tabaco contém mais de 4000 substâncias que induzem *stress oxidativo in vivo* e provocam a desnaturação de eNOS [198], reduzindo a biossíntese de NO. Adicionalmente, as espécies reactivas de oxigénio presentes no fumo podem degradar directamente o NO, inibir a proliferação de células endoteliais [199] e reduzir a vasodilatação dependente do endotélio em resposta a hiperémia [200]. É conhecido o efeito do tabaco no VEGF e muitos dos efeitos reportados podem derivar da inibição deste factor de crescimento. O fumo do tabaco diminui a migração de células endoteliais induzida por VEGF, estando este efeito ligado à produção de ROS, juntamente com um bloqueio da via Akt/eNOS/NO [201]. Foi proposto que o tabaco inibe a expressão de receptores VEGFR-2 e diminui a sua activação e sinalização a jusante, incluindo eNOS [202]. O tratamento com anti-oxidantes (N-acetil-cisteína e vitamina C) recupera a função de VEGF comprovando que os efeitos perniciosos do tabaco são mediados por ROS [201]. Da mesma forma, os níveis de glutathiona estão correlacionados com a função endotelial em fumadores [152]. Adicionalmente, é sabido que a exposição aguda à nicotina tem um efeito contrário ao fumo do tabaco como estimulante da angiogénese, provavelmente patológica e ligada ao desenvolvimento de cancro e metastização [153]. A relação entre os níveis de VEGF e os hábitos tabágicos não é clara. Enquanto alguns autores reportam uma diminuição dos níveis de VEGF sob exposição ao fumo [202], outros não encontram relação [203]. No entanto, parece existir uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de VEGF e a vasodilatação fluxo-mediada [203]. Neste trabalho foi verificado um decréscimo significativo nos níveis de VEGF em fumadores activos sem relação com o resultado do EndoPAT®. Na verdade, fumadores intensivos e de longo prazo sem disfunção endotelial apresentam níveis inferiores de VEGF e, curiosamente, a vasodilatação fluxo-mediada correlaciona-se positivamente com a função maços-ano, sugerindo que estes indivíduos possam desenvolver algum mecanismo protector [203]. Infelizmente não foram recolhidos dados acerca da quantidade e duração dos hábitos tabágicos no nosso grupo. É possível que a relação inversa entre os níveis de VEGF e a função endotelial derive da resposta à agressão vascular no sentido de regenerar o tecido e reverter a condição disfuncional. Em fumadores intensivos crónicos, outros mecanismos, ainda desconhecidos, protectores do endotélio que não o VEGF poderão estar em jogo.

PROTEÍNA C-REACTIVA E INFLAMAÇÃO

A aterosclerose é hoje vista como uma doença inflamatória crónica e marcadores bioquímicos dessa inflamação podem ter utilidade clínica na detecção, avaliação de risco e prognóstico de eventos agudos. Um dos factores mais fortemente associado à doença cardiovascular é a proteína C-reativa (CRP). Embora alvo de muitas críticas, a CRP aparenta prever independentemente a ocorrência de enfarte do miocárdio em homens assintomáticos e saudáveis [204]. Esta proteína de fase aguda é sintetizada principalmente nos hepatócitos em resposta a citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-6 mas também IL-1 e TNF- α [158]. Estudos *in vitro* demonstram que a CRP pode também ser produzida por adipócitos, músculo vascular liso e células endoteliais [158]. A produção de CRP aumenta, paralelamente a outros marcadores de inflamação, em resposta a vários estímulos sistémicos não-específicos como infecção, trauma, doenças autoimunes, entre outros. Em condições basais, os níveis de CRP circulante são muito baixos e de difícil detecção. O desenvolvimento de metodologias mais sensíveis veio revolucionar o estudo deste marcador, permitindo detectar níveis próximos de zero e indicativos de inflamação moderada. A este método chama-se CRP ultrassensível (hsCRP) e veio substituir outros mais grosseiros apenas capazes de indicar elevações agudas da proteína, que geralmente refletem infecção ou trauma [159]. Como esperado, os níveis de hsCRP são tendencialmente mais elevados em pacientes com doença coronária relativamente a indivíduos aparentemente saudáveis. Pelo interesse crescente que a CRP tem sido alvo nos últimos anos, foi estudada a sua associação com o VEGF, Cat-L e MPs, verificando-se uma correlação significativa e positiva entre a hsCRP e os níveis de VEGF no soro ($r_s = 0.339$, $p < 0.05$). Uma explicação possível para esta observação fundamenta-se no trabalho de Yang e colaboradores [205] que demonstra uma inibição da expressão dos receptores de VEGF em células endoteliais após exposição a doses de CRP semelhantes às encontradas em processos inflamatórios. Embora este autor não tenha verificado qualquer efeito da CRP na expressão de VEGF, mais tarde, Bello [206] mostra que a CRP estimula a expressão de VEGF-A em monócitos através da via PI3K e ERK 1/2. Destes resultados é possível teorizar que a redução do número de receptores para VEGF e um aumento paralelo da produção de VEGF-A em células inflamatórias culminará num aumento dos níveis de VEGF-A livre em circulação, sem receptores disponíveis para ligação. Isto poderá estar na origem de uma activação insuficiente de eNOS estimulada por VEGF e, conseqüentemente, disfunção endotelial e incapacidade regenerativa, o que aliás está de acordo com resultados conhecidos de outros estudos.

É também inevitável referir a forte correlação verificada entre a hsCRP e a concentração de neutrófilos ($r_s = 0.584$, $p = 0.000$), à semelhança dos resultados

obtidos na comparação caso vs controlo ($H(1) = 5.069$, $p < 0.05$), indiciando uma possível relação entre estas células e a produção de CRP, provavelmente através da libertação de citocinas pró-inflamatórias estimulantes da resposta de fase aguda. A mesma relação foi estabelecida por van Eeden em fumadores [207]. Estes apresentam maior número de neutrófilos que são libertados da medula óssea e recrutados para a zona de inflamação. A IL-1 β e IL-6 que são estimuladas em resposta estão implicadas tanto na indução de CRP como na estimulação da libertação de células inflamatórias por parte da medula. Embora no nosso estudo não tenha sido encontrada uma associação entre os níveis de neutrófilos e os hábitos tabágicos, não é de excluir um mecanismo semelhante em que a região inflamada seria o ateroma ou o tecido isquémico após enfarte.

Tendo a aterosclerose uma base inflamatória, é importante estudar os efeitos da medicação apropriada a esta condição em parâmetros biológicos relacionados com as doenças cardiovasculares. Um dos fármacos mais usados na prevenção de eventos agudos é a aspirina, essencialmente devido ao seu efeito anti-plaquetário. O risco de um primeiro enfarte do miocárdio é reduzido em 44% com a administração de aspirina [204]. A COX-1 é a enzima responsável pela produção de tromboxano A₂ nas plaquetas, um potente activador da sua actividade. A aspirina acetila as ciclooxigenases irreversivelmente inibindo a sua acção [208]. Uma vez que as plaquetas são desprovidas de núcleo, não têm a capacidade de gerar mais enzima funcional, daí a extrema eficácia da aspirina nestas células relativamente a outras com capacidade de síntese. Adicionalmente a este efeito anti-agregante em plaquetas, a aspirina também favorece a inactividade de NF-kB em células endoteliais e assim atenua os fenómenos relacionados com a activação inflamatória [208]. Na verdade, a redução do risco de eventos cardiovasculares associada à aspirina parece estar associada aos níveis de CRP e, como tal, à inflamação [204]. O desenho deste estudo não é o apropriado para estabelecer relações entre a aspirina, CRP e risco de eventos agudos. Trata-se de um estudo transversal caso vs controlo em que, como não é de estranhar, a toma de aspirina é bem superior em indivíduos com doença coronária estabelecida. Como tal, e ao contrário do que seria expectável em condições normais, os níveis de CRP são mais elevados em quem toma aspirina ($M = 0.876 \pm 1.23$ mg/L) comparativamente a quem não o faz ($M = 0.406 \pm 0.615$ mg/L).

De todos os parâmetros analisados neste estudo, apenas as EMPs CD42b⁻CD144⁺ revelaram associação com a administração de aspirina, associação esta inversa. Estes resultados não são de todo inesperados. Como vimos, a atenuação do processo inflamatório em células endoteliais deverá resultar numa menor segregação de micropartículas. Embora não tenha sido possível testar a associação da aspirina com a função endotelial, é expectável que, ao contrário do que acontece com as EMPs CD42b⁻

CD144⁺, se verifique uma relação inversa. É conhecido que uma dose terapêutica de aspirina induz a produção de NO por estimulação directa de eNOS [209]. Adicionalmente, o 15-epi-LXA₄, um composto derivado da acção modificada de COX-2 pela aspirina em células endoteliais, é um mediador da produção de NO neste tecido e reduz a inflamação em sistemas microvasculares [210]. É igualmente provável que a inibição da produção de TXA₂ por parte da aspirina em plaquetas favoreça uma reactividade vascular mais acentuada em resposta à hiperémia. O tromboxano A₂ induz a produção de radicais livres e a elevação dos seus níveis precede o desenvolvimento de disfunção endotelial [211].

GLICEMIA

Existem fortes evidências epidemiológicas que fundamentam uma associação entre a glicemia e o risco de doenças cardiovasculares, nomeadamente através das conclusões do estudo de Framingham [157]. São inúmeros os mecanismos pelos quais os níveis elevados de glicose favorecem a iniciação e progressão da aterosclerose, mediados directa ou indirectamente através dos AGEs (produtos avançados da glicação) ou ROS. Um dos processos envolvidos é a activação de NF-κB e consequente expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão [212]. Níveis moderadamente elevados de glicose em jejum estão geralmente associados a intolerância à glicose, um estado pré-diabético marcado pela inflamação crónica e que integra patologias vasculares e metabólicas [213]. Nas células endoteliais, a estimulação dos receptores de insulina activa a via PI3K/Akt resultando na produção de NO. Foi demonstrado que a sinalização deficiente dos receptores insulínicos no endotélio resulta numa reduzida produção de NO por insuficiente activação da via PI3K/Akt [213]. Apesar desta relação bem estabelecida entre a glicemia e a função endotelial, os mecanismos através dos quais a glicose exerce a sua acção em indicadores biológicos da saúde vascular não é tão clara.

A relação entre a glicemia e o VEGF têm sido alvo de um estudo intenso, em grande parte devido a patologias associadas à diabetes como a insuficiência renal e retinopatia. No entanto, os dados são paradoxais e apontam para efeitos específicos em cada tipo celular. Níveis elevados de glicose estimulam a expressão de VEGF no músculo vascular liso e retina. No entanto, em células endoteliais da veia umbilical, uma concentração elevada de glicose inibe o VEGF e, através deste efeito, promove a apoptose destas células [214]. Convém salientar que estes resultados foram obtidos em sistemas *in vitro*, com concentrações de glicose muito elevadas, até 30 mM, e que não mimetizam as flutuações fisiológicas a que os tecidos estão expostos. No nosso estudo foi verificada uma correlação positiva e significativa entre os níveis de glicose e o VEGF no soro. Embora desenhos experimentais deste tipo apenas estabeleçam associações e não causalidade, existem alguns mecanismos que podem explicar este resultado. Tendo em

conta que estudos precedentes indicam que a glicose inibe a produção de VEGF em células endoteliais, não é certo que o VEGF sérico seja reflexo da sua produção no endotélio. Na verdade, este parece derivar essencialmente de plaquetas [186]. Por outro lado, sabe-se que a insulina aumenta a expressão de VEGF em múltiplos tipos celulares através da via PI3K/Akt em condições normais de glicemia (5 mM) [215]. É possível que níveis elevados de glicose, a um ponto não-tóxico, *in vivo* induzam hiperinsulinemia moderada e desta forma estimulem a produção de VEGF. Wu e colaboradores [215] demonstraram que tanto a insulina como a glicose estimulam a síntese de VEGF em células endoteliais da retina de bovino e que o efeito combinado da insulina e glicose é inferior ao da insulina por si só. Isto significa que, embora a glicose possa induzir a produção de VEGF nestas células, ela inibe a estimulação induzida pela insulina. Os autores sugerem que este efeito seja devido à disfuncionalidade da via PI3K/Akt. Na verdade, já antes tinha sido reportado que níveis elevados de glicose diminuem a actividade de PI3K até 85% [215]. Este mecanismo é alias elucidativo do papel deletério da hiperglicémia na função endotelial por inibição da síntese de NO [216]. No entanto, não foi encontrada qualquer relação entre o PAT e os níveis de glicose no sangue que poderá reflectir em parte a baixa incidência de diabetes no conjunto de indivíduos estudados.

Este estudo também mostra uma correlação negativa entre a glicemia e a concentração de Cat-L no soro. Embora, como discutido, não seja clara a função e origem da Cat-L em circulação, ficou levantada a hipótese de esta derivar de células progenitoras endoteliais (EPCs), hipótese corroborada por estes resultados. Concentrações elevadas de glicose reduzem a expressão e actividade de Cat-L em EPCs do sangue periférico. Em diabéticos, as EPCs revelam uma capacidade funcional reduzida, avaliada por menor poder invasivo e proliferativo, atribuída à menor expressão de Cat-L [98]. É possível que esta inibição se venha a reflectir nos níveis sistémicos de Cat-L e assim explique os nossos dados. Os trabalhos relativos ao papel da Cat-L na patofisiologia da aterosclerose e intolerância à glicose são ainda incipientes, não sendo possível compreender as implicações e significado destes resultados, se algum, na avaliação do risco cardiovascular.

Como vimos, a aterosclerose representa um estado inflamatório crónico marcado por níveis de CRP moderadamente mas significativamente elevados. A estimulação de vias pró-inflamatórias várias em condições de hiperglicémia deverá contribuir para esta condição, em grande parte pela indução de IL-6, IL-1 β E TNF- α em diversos tipos celulares [213]. De facto, encontrámos uma correlação positiva entre a concentração de glicose no sangue e hsCRP ($r_s = 0.296$, $p < 0.05$), demonstrando que, como esperado, a hiperglicemia induz um estado de inflamação crónica sistémica que poderá estar na génese de doenças cardiovasculares, em particular a aterosclerose. No entanto, uma

relação causal directa é ainda prematura. Reproduzir as condições de um sistema biológico com esta complexidade *in vitro* não é fácil e não existem modelos animais adequados ao estudo do metabolismo da glicose dos quais possam ser extrapolados resultados para o Homem [157].

6. AVALIAÇÃO DE RISCO CARDIOVASCULAR

Embora a utilização da CRP e outros indicadores singulares para avaliação de risco cardiovascular seja recomendada, a sua real utilidade não é consensual. A observação de que factores de risco singulares são maus indicadores na previsão de doença cardiovascular pode ser explicada pelo facto de se tratar de uma doença complexa com múltiplos antecedentes. Assim, foram desenvolvidos algoritmos multivariados para previsão do risco absoluto e relativo de ocorrência de eventos agudos em dez anos. Um deles, e possivelmente o mais robusto, é o *Framingham Point Score* [161]. Os factores de risco tradicionais, considerados em conjunto, fornecem boas aproximações do risco cardiovascular, superiores às fornecidas por indicadores univariados [161]. Desta forma, as estimativas de risco multivariadas devem representar os padrões aos quais novos factores de risco devem ser comparados. As evidências mostram que após ajustamento para idade, sexo e outros indicadores já estabelecidos, a associação de vários marcadores inflamatórios, como a CRP, é bastante atenuada e não fornecem informação adicional aos factores de risco tradicionais [160]. Por esta razão, embora este estudo não tenha carácter predictivo, achou-se relevante comparar o VEGF, Cat-L e MPs com o *Framingham Point Score*, Índice Aterogénico do Plasma (AIP) e rácio CT/HDL-C. Em relação aos dois últimos, nenhuma relação foi verificada com os parâmetros em análise, o que não é de estranhar tendo em conta apenas as MPs CD31⁺ se mostraram correlacionadas com variáveis lipídicas individualmente (CT e LDL-C). O AIP, no entanto, está fortemente associado com a doença estabelecida, o que seria de esperar dado que grande parte dos indivíduos inseridos no grupo com patologia sofreu um enfarte pouco tempo antes da recolha.

Os resultados obtidos em relação ao FPS foram muito mais interessantes. De acordo com os resultados de Albert [217], a hsCRP correlaciona-se de forma positiva e altamente significativa ($p < 0.01$) com o *Framingham Point Score*, embora as correlações com as componentes individuais do índice sejam mais fracas. Isto poderá indiciar que de facto a CRP sintetiza a contribuição de vários indicadores de risco individuais, embora não responda à questão de haver ou não informação adicional útil. Apesar de esta não ser a temática do estudo, a confiança nos resultados fica reforçada pela reprodução de outros trabalhos publicados e reconhecidos pelos pares. No âmbito deste estudo, o FPS correlaciona-se com a Cat-L e EMPs CD42b⁻CD144⁺, dois parâmetros fortemente

relacionados entre si ($r_s = -0.512$, $p < 0.01$). Entre os factores considerados no cálculo do FPS, o único que se revelou associado de forma individual com os níveis de EMPs CD42^bCD144⁺ foi a idade, e nenhum com a Cat-L, embora exista uma correlação negativa entre o FPS e a glicemia ($r_s = -0.454$, $p < 0.01$) que poderá indiciar uma relação com a diabetes não-controlada que não se verificou possivelmente devido ao número muito reduzido de indivíduos com esta patologia. Convém lembrar que o FPS não considera os níveis de glicose em jejum mas é desaconselhado em diabéticos. Embora a correlação entre as EMPs CD42^bCD144⁺ e o FPS seja mais forte do que com a idade, é notório que este componente tem uma importante influência. Forest e colaboradores [218] abordaram muito recentemente a relação entre as EMPs CD144⁺ e a idade pela primeira vez. Inesperadamente, e como verificado neste estudo, as EMPs CD144⁺ estão significativamente reduzidas em idosos saudáveis comparativamente a controlos jovens. Estas EMPs, como marcadores robustos de uma deficiente vasodilatação mediada pelo endotélio, deveriam aumentar com a idade. No entanto, não é este o caso [218]. Este resultado vem em suporte da teoria que defende um papel protector e reparador das micropartículas. Esta redução no número de EMPs com o avançar da idade pode reflectir uma reduzida regeneração do endotélio e *turnover* celular, indicadores de um endotélio senescente e menos activo. A mesma hipótese pode ser levantada na correlação negativa entre as MPs CD42^bCD144⁺ e o FPS. O aumento do risco cardiovascular a dez anos previsto pelo FPS poderá envolver uma menor capacidade regenerativa e actividade metabólica do endotélio que se reflecte num menor número de EMPs circulantes, independentemente da disfunção endotelial que deverá corresponder a um processo de activação celular, e que não está relacionada com a propensão a eventos agudos com o avançar da idade. Mais difícil de compreender é o papel da Cat-L neste processo, se algum, devido aos poucos estudos efectuados nesta temática. No entanto, como vimos, a Cat-L é necessária em processos neovasculares e regenerativos que poderão estar mais activos em indivíduos de risco. É uma hipótese que fica em aberto e a relação entre as EMPs CD144⁺, Cat-L e FPS merece ser alvo de estudos mais aprofundados.

As doenças cardiovasculares e a doença coronária aterosclerótica em particular são multifactoriais e compreendem dois tipos de factores de risco: os subjacentes, essencialmente demográficos, genéticos e comportamentais, e os metabólicos, nos quais todos os outros se acabam por reflectir. Entre os factores de risco metabólicos, os mais reconhecidos são a pressão arterial alta, glicose plasmática elevada em jejum e um perfil lipídico aterogénico (TG elevados, HDL-C reduzido e LDL-C elevado). Para estudar a relação entre o VEGF, Cat-L e MPs com os factores de risco referidos foram utilizados quatro dos critérios clínicos para diagnóstico de Síndrome Metabólico propostos pelo NCEP/ATP III e revistos [180, 219], nomeadamente TG elevados (≥ 150 mg/dL), baixo HDL (< 40 mg/dL nos homens e < 50 mg/dL nas mulheres), pressão arterial elevada (\geq

130 mmHg sistólica e/ou ≥ 85 mmHg diastólica) e glicose em jejum elevada (≥ 110 mg/dL). Para diagnóstico de Síndrome Metabólica é também considerado o perímetro da cintura mas, embora extremamente relevante por avaliar a adiposidade intra-abdominal, não é um parâmetro fisiológico por si só. Embora a recomendação actual para os níveis de glicose plasmática se situem abaixo dos 100 mg/dL, foi utilizado o valor de 110 mg/dL por duas razões. Primeiro, os participantes têm uma idade média avançada e existe uma tendência crescente natural para os níveis de glicose. Segundo, o valor de risco sugerido para a população portuguesa pelo laboratório do Centro Hospitalar de Lisboa é de 110 mg/dL e não 100 mg/dL. Não foi encontrada qualquer relação com significado estatístico com os parâmetros estudados. No entanto, os níveis de EMPs CD42b⁻CD144⁺ parecem ligeiramente influenciados pela HDL e de forma directa (EMPs são mais reduzidas em indivíduos de risco), o que sugere mais uma vez um papel protector e não patogénico destas EMPs no nosso estudo.

Existem evidências crescentes de que a propensão a aterosclerose resulta de uma combinação de factores e não a um em particular. O número de factores de risco presentes pode ter um impacto que se reflecte em indicadores bioquímicos como aqueles avaliados neste estudo. Nós observámos uma tendência decrescente de EMPs CD31⁺CD144⁻ com o número de factores de risco presentes (**tabela 14**) e a existência de pelo menos três em quatro factores de risco, indiferenciadamente, está associada aos níveis destas EMPs de forma decrescente e robusta. Mais uma vez, a relação negativa verificada suporta a hipótese de um papel protector das MPs que se deteriora em certas condições patológicas ou de risco. Curiosamente, a definição de Síndrome Metabólica compadece de um critério de diagnóstico semelhante de pelo menos três factores em cinco, quatro dos quais avaliados no nosso estudo [219]. Isto reforça uma eventual associação entre as EMPs CD31⁺CD144⁺ e risco de doenças cardiovasculares, a principal consequência do Síndrome Metabólico [219] que, numa amostra homogénea em factores de risco, parece evidenciar um défice em mecanismos fisiológicos reparadores e não um papel deletério inerente.

VI. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar dos numerosos estudos que abordam a patofisiologia das doenças cardiovasculares e da aterosclerose em particular, existem ainda áreas controversas que urgem ser exploradas. Tão ou mais importante do que avançar no tratamento da doença estabelecida e após a ocorrência de um evento agudo, é providenciar aos profissionais de saúde ferramentas que permitam o diagnóstico numa fase pré-clínica, no sentido de actuar de forma profilática e precoce. A disfunção endotelial aparenta ser essa ferramenta que precede o desenvolvimento de doença cardiovascular e, como tal, útil para uma avaliação de risco atempada que pode evitar complicações irreversíveis.

Existem vários indicadores estabelecidos que marcam a presença de doença aterosclerótica. No entanto, e como sugere o nosso trabalho, alguns desses marcadores parecem estar associados com maior robustez a factores de risco cardiovascular como as dislipidémias, hipertensão, hiperglicemia, entre outros. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de VEGF, Cat-L ou micropartículas entre indivíduos com doença coronária estabelecida e voluntários isentos de complicações cardiovasculares. No entanto, e ao contrário da maioria dos trabalhos publicados, os dois grupos são bastante homogéneos no que diz respeito à presença de factores de risco, o que poderá diluir qualquer associação e sugere que, de facto, esses factores têm mais influência em determinados parâmetros bioquímicos do que a doença em si. A relação do VEGF, Cat-L e dos fenótipos de micropartículas estudados com a doença cardiovascular parece ser secundária, onde os factores de risco representam o elo de ligação. No entanto, estes resultados devem ser interpretados com cautela, devido não só à reduzida dimensão da amostra mas também aos vários estados clínicos incluídos no grupo com patologia coronária. É possível e provável que existam diferenças nos parâmetros avaliados que não foram exploradas neste estudo e que merecem uma análise futura mais cuidada.

Todos os fenótipos endoteliais de micropartículas considerados, $CD42b^-CD144^+$, $CD31^+CD144^+$ e $CD42b^-CD31^+$, estão mais elevados na disfunção endotelial avaliada por PAT, embora só as $CD42b^-CD144^+$ revelem significado estatístico. Uma vez que apenas foram examinados indivíduos do grupo controlo, estas EMPs aparentam ser bons indicadores da saúde do endotélio e independentes do estabelecimento de aterosclerose. Curiosamente, a Cat-L correlacionou-se de forma inversa com todas as EMPs estudadas sem evidenciar uma relação significativa com a vasodilatação dependente do endotélio. A inflamação é um possível ponto em comum que integra todos estes parâmetros e exerce um papel intermediário nos processos fisiológicos que levam a formação do ateroma e lesão vascular. Na verdade, a administração de fármacos com função anti-inflamatória como a aspirina parece reduzir o número de EMPs $CD42b^-CD144^+$ em circulação. Este resultado aponta para uma melhoria na função endotelial, acompanhada por uma redução nos níveis de EMPs, embora não facilite a compreensão do papel que estas

desempenham na fisiologia endotelial. As EMPs podem tanto ser a causa como a consequência de disfunção endotelial, dois papéis que não são mutuamente exclusivos. Os trabalhos que abordam o papel da Cat-L e EMPs na patofisiologia da aterosclerose são ainda muito incipientes, o que torna difícil compreender as implicações e significado biológico dos resultados obtidos neste estudo.

A aterosclerose, como processo na gênese de doença cardiovascular, apresenta múltiplos antecedentes que interagem sinergicamente. Desta forma, é pouco provável que um indicador singular possa prever com eficácia o risco de ocorrência de um evento agudo futuro. Por esta razão existe interesse em desenvolver algoritmos multivariados que tenham em conta vários factores de risco reconhecidos e integrem o papel individual de cada um num índice geral com utilidade clínica prática. Fica demonstrado neste estudo que as EMPs CD42b⁻CD144⁺ e a Cat-L estão correlacionadas com o *Framingham Point Score*, um índice estabelecido para a previsão de risco cardiovascular num período de dez anos. De acordo com trabalhos muito recentes, verificámos uma associação inversa entre os níveis de EMPs CD42b⁻CD144⁺ e a idade que pode indicar senescência do endotélio e menor actividade metabólica. O aumento de risco cardiovascular discriminado pelo FPS pode reflectir essa mesma senescência e incapacidade regenerativa. A menor actividade das células endoteliais poderá levar a uma diminuição na secreção de MPs uma vez que se trata de um processo activo e altamente regulado que carece de um controlo celular apertado. Em reforço da hipótese multifactorial da aterosclerose, as MPs CD31⁺CD144⁺ foram associadas ao número de factores de risco metabólicos, de acordo com estudos precedentes. Todos estes resultados despertam o interesse no estudo mais aprofundado das relações entre as EMPs, Car-L e risco cardiovascular, ao qual esta tese não pode responder mas que fornece algumas linhas de orientação para o futuro.

Os nossos resultados indiciam um papel protector das MPs CD144⁺ como mecanismo fisiológico reparador que responde a algum tipo de agressão. Literatura recente corrobora esta hipótese e é possível que nos próximos anos se assista a uma mudança de paradigma quanto ao papel das MPs no organismo. Talvez sejam apenas um mecanismo natural de defesa e não deletérias por si só, reflectindo não mais que uma maior actividade celular. É de sublinhar o facto de apenas terem sido encontradas relações com MPs CD144⁺, de origem endotelial segura, evidenciando o importante papel deste órgão na saúde cardiovascular. No entanto, e antes de qualquer debate conclusivo, é necessário ultrapassar os problemas técnicos inerentes ao estudo das MPs em tecidos biológicos. Apenas com uma padronização de metodologias vai ser possível comparar os resultados obtidos por diferentes grupos de investigação e testar a validade do seu uso como marcador clínico.

O principal objectivo deste estudo era uma análise preliminar do potencial do VEGF, Cat-L e MPs como marcadores de disfunção endotelial e, como tal, de risco cardiovascular, o qual foi cumprido. Embora os constrangimentos óbvios de um estudo tão curto e transversal, com uma amostra muito limitada, ficaram levantadas algumas hipóteses que certamente irão ser exploradas num futuro próximo. Mais do que estabelecer associações entre parâmetros é necessário estudar a sua causalidade e se de facto acrescentam informação útil aos índices clínicos de risco já estabelecidos, intensivamente estudados e validados.

VII. REFERÊNCIAS

1. Leal, J., et al., *Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union*. European Heart Journal, 2006. **27**(13): p. 1610-1619.
2. Ley, K. and J. Reutershan, *Leukocyte-endothelial interactions in health and disease*, in *The vascular endothelium II*, S. Moncada and A. Higgs, Editors. 2006, Springer. p. 97-133.
3. Giannotti, G. and U. Landmesser, *Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis*. Herz, 2007. **32**: p. 568-572.
4. Busse, R. and I. Fleming, *Vascular endothelium and blood flow*, in *The vascular endothelium II*, S. Moncada and A. Higgs, Editors. 2006, Springer. p. 43-78.
5. Yang, Z. and X. Ming, *Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Clinical Medicine & Research, 2006. **4**(1): p. 53-65.
6. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23): p. 27-32.
7. Vita, J.A., et al., *Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk-factors for coronary-artery disease*. Circulation, 1990. **81**(2): p. 491-497.
8. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2006. **291**(3): p. H985-H1002.
9. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction - A marker of atherosclerotic risk*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2003. **23**(2): p. 168-175.
10. Moncada, S. and E.A. Higgs, *The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology*. British Journal of Pharmacology, 2006. **147**: p. S193-S201.
11. Dudzinski, D.M., et al., *The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2006. **46**: p. 235-276.
12. Michel, J.B., et al., *Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(25): p. 15583-15586.
13. Feron, O., et al., *Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase*. Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**(6): p. 897-905.
14. Bucci, M., et al., *Diabetic mouse angiopathy is linked to progressive sympathetic receptor deletion coupled to an enhanced caveolin-1 expression*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2004. **24**(4): p. 721-726.
15. Haynes, M.P., et al., *Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells*. Circulation Research, 2000. **87**(8): p. 677-682.
16. Dimmeler, S., E. Dernbach, and A.M. Zeiher, *Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration*. Febs Letters, 2000. **477**(3): p. 258-262.
17. Montagnani, M., et al., *Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179)*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(32): p. 30392-30398.
18. Nofer, J.R., et al., *HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P(3)*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **113**(4): p. 569-581.
19. Michell, B.J., et al., *Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(21): p. 17625-17628.
20. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circulation Research, 2001. **88**(11): p. E68-E75.
21. McNeill, A.M., et al., *Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels*. Stroke, 1999. **30**(10): p. 2186-2190.

22. Moriarty, K., K.H. Kim, and J.R. Bender, *Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling*. *Endocrinology*, 2006. **147**(12): p. 5557-5563.
23. Levin, E.R., *Plasma membrane estrogen receptors*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2009. **20**(10): p. 477-482.
24. Madamanchi, N.R., A. Vendrov, and M.S. Runge, *Oxidative stress and vascular disease*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2005. **25**(1): p. 29-38.
25. Deenadayalu, V.U.P., et al., *Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2001. **281**(4): p. H1720-H1727.
26. McCredie, R.J., et al., *Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens*. *Journal of the American College of Cardiology*, 1998. **32**(5): p. 1331-1335.
27. Mendelsohn, M.E. and G.M.C. Rosano, *Hormonal regulation of normal vascular tone in males*. *Circulation Research*, 2003. **93**(12): p. 1142-1145.
28. Liu, Y., et al., *Glucocorticoid response elements and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression*. *Cardiovascular Research*, 2009. **81**(1): p. 140-147.
29. Iuchi, T., et al., *Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction*. *Circulation Research*, 2003. **92**(1): p. 81-87.
30. Simmons, W.W., et al., *Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(39): p. 23928-23937.
31. Whitworth, J.A., et al., *The nitric oxide system in glucocorticoid-induced hypertension*. *Journal of Hypertension*, 2002. **20**(6): p. 1035-1043.
32. Muniyappa, R., et al., *Cardiovascular actions of insulin*. *Endocrine Reviews*, 2007. **28**(5): p. 463-491.
33. Fisslthaler, B., et al., *Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1*. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 2003. **8**(4): p. 253-261.
34. Cusi, K., et al., *Insulin resistance differentially affects the PI3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle*. *Journal of Clinical Investigation*, 2000. **105**(3): p. 311-320.
35. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases - The role of oxidant stress*. *Circulation Research*, 2000. **87**(10): p. 840-844.
36. Wallace, J.P., et al., *Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review*. *International Journal of Clinical Practice*, 2010. **64**(3): p. 389-403.
37. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. *Physiological Reviews*, 2007. **87**(1): p. 315-424.
38. Lefer, D., *Emerging Role of Nitrite in Myocardial Protection*. *Archives of Pharmacal Research*, 2009. **32**(8): p. 1127-1138.
39. Godber, B.L.J., et al., *Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(11): p. 7757-7763.
40. Shiva, S., et al., *Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis*. *Nature Chemical Biology*, 2006. **2**(9): p. 486-493.
41. Spiegelhalter, B., G. Eisenbrand, and R. Preussmann, *Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-Nitroso Compounds*. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1976. **14**(6): p. 545-548.
42. Bjorne, H., et al., *Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness*. *Journal of Clinical Investigation*, 2004. **113**(1): p. 106-114.
43. Larsen, F.J., et al., *Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers*. *New England Journal of Medicine*, 2006. **355**(26): p. 2792-2793.
44. Elrod, J.W., et al., *Nitric oxide promotes distant organ protection: Evidence for an endocrine role of nitric oxide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(32): p. 11430-11435.

45. Gladwin, M.T., et al., *The emerging biology of the nitrite anion*. Nature Chemical Biology, 2005. **1**(6): p. 308-314.
46. Wolzt, M., et al., *Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin - Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(41): p. 28983-28990.
47. Sun, J.H. and E. Murphy, *Protein S-Nitrosylation and Cardioprotection*. Circulation Research, 2010. **106**(2): p. 285-296.
48. Martinez-Ruiz, A. and S. Lamas, *Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences*. Cardiovascular Research, 2007. **75**(2): p. 220-228.
49. Debelder, A.J., et al., *Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation* Cardiovascular Research, 1994. **28**(5): p. 691-694.
50. Sun, J.H., et al., *Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport*. Circulation Research, 2007. **101**(11): p. 1155-1163.
51. Zhang, J.L., et al., *Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2005. **288**(4): p. C840-C849.
52. Arstall, M.A., et al., *Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1998. **30**(5): p. 979-988.
53. Lima, B., et al., *S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling*. Circulation Research, 2010. **106**(4): p. 633-646.
54. Selemidis, S., et al., *Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells*. Cardiovascular Research, 2007. **75**(2): p. 349-358.
55. Maejima, Y., et al., *Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2005. **38**(1): p. 163-174.
56. Hess, D.T., et al., *S-nitrosylation: spectrum and specificity*. Nature Cell Biology, 2001. **3**(2): p. E46-E49.
57. Stamler, J.S., et al., *Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(16): p. 7674-7677.
58. Schechter, A.N. and M.T. Gladwin, *Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(15): p. 1483-1485.
59. Surks, H.K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I alpha*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1583-1587.
60. Greenacre, S.A.B. and H. Ischiropoulos, *Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction*. Free Radical Research, 2001. **34**(6): p. 541-581.
61. Shah, P.K., *Mechanisms of plaque vulnerability and rupture*. Journal of the American College of Cardiology, 2003. **41**(4): p. 15S-22S.
62. Takahashi, H. and M. Shibuya, *The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions*. Clinical Science, 2005. **109**(3): p. 227-241.
63. Tammela, T., et al., *Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation*. Nature, 2008. **454**(7204): p. 656-U68.
64. Zachary, I., *Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001. **280**(6): p. C1375-C1386.
65. Holm, P.W., et al., *Atherosclerotic plaque development and instability: A dual role for VEGF*. Annals of Medicine, 2009. **41**(4): p. 257-264.

66. Gerber, H.P., V. Dixit, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(21): p. 13313-13316.
67. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase Akt signal transduction pathway - Requirement for Flk-1/KDR activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(46): p. 30336-30343.
68. Galvagni, F., et al., *Endothelial Cell Adhesion to the Extracellular Matrix Induces c-Src-Dependent VEGFR-3 Phosphorylation Without the Activation of the Receptor Intrinsic Kinase Activity*. *Circulation Research*, 2010. **106**(12): p. 1839-U125.
69. Bates, D.O. and S.J. Harper, *Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors*. *Vascular Pharmacology*, 2002. **39**(4-5): p. 225-237.
70. Wong, B.W., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor Increases Human Cardiac Microvascular Endothelial Cell Permeability to Low-Density Lipoproteins*. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2009. **28**(9): p. 950-957.
71. Roberts, W.G. and G.E. Palade, *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth-factor*. *Journal of Cell Science*, 1995. **108**: p. 2369-2379.
72. Tenaglia, A.N., et al., *Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris*. *American Journal of Cardiology*, 1997. **79**(6): p. 742-747.
73. Walshe, T.E., et al., *Inhibition of VEGF or TGF-beta Signaling Activates Endothelium and Increases Leukocyte Rolling*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2009. **29**(8): p. 1185-U70.
74. Yang, R.H., et al., *Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1996. **27**(6): p. 838-844.
75. Kroll, J. and J. Waltenberger, *A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): Rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **265**(3): p. 636-639.
76. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 601-605.
77. Kamba, T. and D.M. McDonald, *Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer*. *British Journal of Cancer*, 2007. **96**(12): p. 1788-1795.
78. Dulak, J., et al., *Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2000. **20**(3): p. 659-666.
79. Doronzo, G., et al., *Insulin activates vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: influence of nitric oxide and of insulin resistance*. *European Journal of Clinical Investigation*, 2004. **34**(10): p. 664-673.
80. Stefanadis, C., et al., *Inhibition of plaque neovascularization and intimal hyperplasia by specific targeting vascular endothelial growth factor with bevacizumab-eluting stent: An experimental study*. *Atherosclerosis*, 2007. **195**(2): p. 269-276.
81. Ferrara, N. and T. DavisSmyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. *Endocrine Reviews*, 1997. **18**(1): p. 4-25.
82. Ribatti, D., F. Levi-Schaffer, and P.T. Kovanen, *Inflammatory angiogenesis in atherogenesis a double-edged sword*. *Annals of Medicine*, 2008. **40**(8): p. 606-621.
83. Zhang, F., Y. Zhang, and P.L. Li, *Dependence of cathepsin L-induced coronary endothelial dysfunction upon activation of NAD(P)H oxidase*. *Microvascular Research*, 2009. **78**(1): p. 45-50.
84. Shichiri, M. and Y. Hirata, *Antiangiogenesis signals by endostatin*. *Faseb Journal*, 2001. **15**(6): p. 1044-1053.

85. Urbich, C., et al., *Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin*. *Faseb Journal*, 2002. **16**(3): p. 706-+.
86. Zhang, A.Y., et al., *Endostatin uncouples NO and Ca²⁺ response to bradykinin through enhanced O²(-center dot) production in the intact coronary endothelium*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2005. **288**(2): p. H686-H694.
87. Schmidt, A., et al., *Endostatin down-regulates soluble guanylate cyclase (sGC) in endothelial cells in vivo: Influence of endostatin on vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling*. *Endothelium-Journal of Endothelial Cell Research*, 2005. **12**(5-6): p. 251-257.
88. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 277-285.
89. Yamaguchi, N., et al., *Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding*. *Embo Journal*, 1999. **18**(16): p. 4414-4423.
90. Dhanabal, M., et al., *Endostatin induces endothelial cell apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(17): p. 11721-11726.
91. Zatterstrom, U.K., et al., *Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis*. *Cell Structure and Function*, 2000. **25**(2): p. 97-101.
92. Liu, J.A., et al., *Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2004. **24**(8): p. 1359-1366.
93. Ishisaka, R., et al., *Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3*. *Cell Structure and Function*, 1999. **24**(6): p. 465-470.
94. Li, W., et al., *Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2001. **21**(7): p. 1124-1130.
95. Liu, J., et al., *Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells*. *Atherosclerosis*, 2006. **184**(2): p. 302-311.
96. Keerthivasan, S., et al., *Transcriptional upregulation of human cathepsin L by VEGF in glioblastoma cells*. *Gene*, 2007. **399**(2): p. 129-136.
97. Urbich, C., et al., *Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization*. *Nature Medicine*, 2005. **11**(2): p. 206-213.
98. Urbich, C., et al., *High glucose reduces cathepsin L activity and impairs invasion of circulating progenitor cells*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2008. **45**(3): p. 429-436.
99. Chargaff, E. and R. West, *The biological significance of the thromboplastic protein of blood*. *Journal of Biological Chemistry*, 1946. **166**(1): p. 189-197.
100. Wolf, P., *Nature and significance of platelet products in human plasma*. *British Journal of Haematology*, 1967. **13**(3): p. 269-8.
101. Boulanger, C.M., N. Amabile, and A. Tedgui, *Circulating microparticles - A potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease*. *Hypertension*, 2006. **48**(2): p. 180-186.
102. Burnier, L., et al., *Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009. **101**(3): p. 439-451.
103. Key, N.S., et al., *Membrane microparticles in VTE and cancer*. *Thrombosis Research*, 2010. **125**: p. S80-S83.
104. Yuana, Y., et al., *Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2010. **8**(2): p. 315-323.
105. Lawrie, A.S., et al., *Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma*. *Vox Sanguinis*, 2009. **96**(3): p. 206-212.
106. Piccin, A., W.G. Murphy, and O.P. Smith, *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications*. *Blood Reviews*, 2007. **21**(3): p. 157-171.
107. Horstman, L.L., et al., *Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction*. *Frontiers in Bioscience*, 2004. **9**: p. 1118-1135.

108. Flaumenhaft, R., *Formation and fate of platelet microparticles*. Blood Cells Molecules and Diseases, 2006. **36**(2): p. 182-187.
109. Fourcade, O., et al., *Secretory Phospholipase A2 Generates the Novel Lipid Mediator Lysophosphatidic Acid in Membrane Microvesicles Shed from Activated Cells*. Cell, 1995. **80**(6): p. 919-927.
110. Wu, Y., N. Tibrewal, and R.B. Birge, *Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill*. Trends in Cell Biology, 2006. **16**(4): p. 189-197.
111. Willekens, F.L.A., et al., *Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2141-2145.
112. Morel, O., et al., *Procoagulant microparticles - Disrupting the vascular homeostasis equation?* Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2006. **26**(12): p. 2594-2604.
113. Shet, A.S., et al., *Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2678-2683.
114. Jimenez, J.J., et al., *Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation*. British Journal of Haematology, 2003. **123**(5): p. 896-902.
115. Jy, W., et al., *Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005. **3**(6): p. 1301-1308.
116. Morel, O., et al., *Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious?* Haematologica-the Hematology Journal, 2009. **94**(3): p. 313-317.
117. Hamilton, K.K., et al., *Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(7): p. 3809-3814.
118. Simak, J., et al., *Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma*. Transfusion, 2002. **42**(3): p. 334-342.
119. Jy, W., et al., *Agonist-induced capping of adhesion proteins and microparticle shedding in cultures of human renal microvascular endothelial cells*. Endothelium-New York, 2002. **9**(3): p. 179-189.
120. Katayama, M., et al., *Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic-uremic syndrome*. British Journal of Haematology, 1993. **84**(4): p. 702-710.
121. Askenasy, N., et al., *Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1396-1404.
122. Aprahamian, T., et al., *Impaired clearance of apoptotic cells promotes synergy between atherogenesis and autoimmune disease*. Journal of Experimental Medicine, 2004. **199**(8): p. 1121-1131.
123. Abrahams, V.M., et al., *First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis*. Molecular Human Reproduction, 2004. **10**(1): p. 55-63.
124. Sabatier, F., et al., *Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3962-3970.
125. Jy, W., et al., *Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: Elevated emppmonocyte conjugates in multiple sclerosis*. Frontiers in Bioscience, 2004. **9**: p. 3137-3144.
126. Barry, O.P., et al., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(1): p. 136-144.

127. Mause, S.F., et al., *Platelet microparticles - A transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2005. **25**(7): p. 1512-1518.
128. Hugel, B., et al., *Membrane microparticles: Two sides of the coin*. *Physiology*, 2005. **20**: p. 22-27.
129. Boulanger, C.M., et al., *Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2649-2652.
130. Martin, S., et al., *Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression*. *Circulation*, 2004. **109**(13): p. 1653-1659.
131. Agouni, A., et al., *Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome*. *American Journal of Pathology*, 2008. **173**(4): p. 1210-1219.
132. Agouni, A., et al., *Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release*. *Faseb Journal*, 2007. **21**(11): p. 2735-2741.
133. Brodsky, S.V., et al., *Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004. **286**(5): p. H1910-H1915.
134. Amabile, N., et al., *Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005. **16**(11): p. 3381-3388.
135. Werner, N., et al., *Circulating CD31(+) annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2006. **26**(1): p. 112-116.
136. Brill, A., H. Elinav, and D. Varon, *Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis*. *Cardiovascular Research*, 2004. **63**(2): p. 226-235.
137. Brill, A., et al., *Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization*. *Cardiovascular Research*, 2005. **67**(1): p. 30-38.
138. Kim, H.K., et al., *Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro*. *British Journal of Haematology*, 2004. **124**(3): p. 376-384.
139. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer*. *International Journal of Cancer*, 2005. **113**(5): p. 752-760.
140. Taraboletti, G., et al., *Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells*. *American Journal of Pathology*, 2002. **160**(2): p. 673-680.
141. Mezentsev, A., et al., *Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2005. **289**(3): p. H1106-H1114.
142. Leroyer, A.S., et al., *CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008. **52**(16): p. 1302-1311.
143. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2000. **101**(8): p. 841-843.
144. Bernal-Mizrachi, L., et al., *High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes*. *American Heart Journal*, 2003. **145**(6): p. 962-970.
145. Bernal-Mizrachi, L., et al., *Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes*. *International Journal of Cardiology*, 2004. **97**(3): p. 439-446.
146. Preston, R.A., et al., *Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles*. *Hypertension*, 2003. **41**(2): p. 211-217.
147. Jimenez, J.J., et al., *Elevated endothelial microparticles (EMP) and decreased endothelial progenitors are associated with increased serum cholesterol levels*. in

- 45th Annual Meeting of the American-Society-of-Hematology. 2003. San Diego California: Blood.
148. Minagar, A., et al., *Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis*. *Neurology*, 2001. **56**(10): p. 1319-1324.
 149. D'Agostino, R.B., et al., *General cardiovascular risk profile for use in primary care - The Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2008. **117**(6): p. 743-753.
 150. Johnson, H.M., et al., *Effects of Smoking and Smoking Cessation on Endothelial Function 1-Year Outcomes From a Randomized Clinical Trial*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010. **55**(18): p. 1988-1995.
 151. Yoshida, O., et al., *Pitavastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Ameliorates Endothelial Function in Chronic Smokers*. *Circulation Journal*, 2010. **74**(1): p. 195-202.
 152. Tanriverdi, H., et al., *Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries*. *Circulation Journal*, 2006. **70**(5): p. 593-599.
 153. Dasgupta, P., et al., *Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines*. *International Journal of Cancer*, 2009. **124**(1): p. 36-45.
 154. Konishi, H., J. Wu, and J.P. Cooke, *Chronic exposure to nicotine impairs cholinergic angiogenesis*. *Vascular Medicine*, 2010. **15**(1): p. 47-54.
 155. Conklin, B.S., et al., *Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells*. *American Journal of Pathology*, 2002. **160**(2): p. 413-418.
 156. Hosokawa, S., et al., *Effects of smoking cessation on coronary endothelial function in patients with recent myocardial infarction*. *International Journal of Cardiology*, 2008. **128**(1): p. 48-52.
 157. Chait, A. and K.E. Bornfeldt, *Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia?* *Journal of Lipid Research*, 2009. **50**: p. S335-S339.
 158. Bisioendial, R.J., J.J.P. Kastelein, and E.S.G. Stroes, *C-reactive protein and atherogenesis: From fatty streak to clinical event*. *Atherosclerosis*, 2007. **195**(2): p. E10-E18.
 159. Casas, J.P., et al., *C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review*. *Journal of Internal Medicine*, 2008. **264**(4): p. 295-314.
 160. Anand, S.S. and S. Yusuf, *C-reactive protein is a bystander of cardiovascular disease*. *European Heart Journal*, 2010. **31**(17): p. 2092-U25.
 161. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Narrative review: Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease*. *Annals of Internal Medicine*, 2006. **145**(1): p. 35-42.
 162. Goor, D.A., et al., *Peripheral arterial tonometry: A diagnostic method for detection of myocardial ischemia induced during mental stress tests: A pilot study*. *Clinical Cardiology*, 2004. **27**(3): p. 137-141.
 163. Lavie, P., et al., *Peripheral arterial tonometry: A novel and sensitive non-invasive monitor of brief arousals during sleep*. *Israel Medical Association Journal*, 2000. **2**(3): p. 246-247.
 164. Faizi, A.K., D.W. Kornmo, and S. Agewall, *Evaluation of endothelial function using finger plethysmography*. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 2009. **29**(5): p. 372-375.
 165. Rubinshtein, R., et al., *Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events*. *European Heart Journal*, 2010. **31**(9): p. 1142-1148.
 166. Kitta, Y., et al., *Persistent Impairment of Endothelial Vasomotor Function Has a Negative Impact on Outcome in Patients With Coronary Artery Disease*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009. **53**(4): p. 323-330.
 167. Nohria, A., et al., *Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans*. *Journal of Applied Physiology*, 2006. **101**(2): p. 545-548.

168. van Ierssel, S.H., et al., *Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): Effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied*. Thrombosis Research, 2010. **125**(4): p. 332-339.
169. Macey, M., in *Flow Cytometry: Principles and Application*. 2007, Humana Press: New Jersey. p. 46.
170. Fontijn, A., A.J. Sabadell, and R.J. Ronco, *Homogeneous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone*. Analytical Chemistry, 1970. **42**(6): p. 575-&.
171. Braman, R.S. and S.A. Hendrix, *Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium(III) reduction with chemiluminescence detection*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(24): p. 2715-2718.
172. Ghasemi, A., M. Hedayati, and H. Biabani, *Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay*. Journal of Medical Sciences Research, 2007. **2**: p. 29-32.
173. Dobiasova, M. and J. Frohlich, *The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FERHDL)*. Clinical Biochemistry, 2001. **34**(7): p. 583-588.
174. Dobiasova, M., et al., *Cholesterol esterification rate in plasma depleted of very low and low density lipoproteins is controlled by the proportion of HDL2 e HDL3 subclasses: study in hypertensive and normal middle-age and septuagenarian men*. Journal of Lipid Research, 1992. **33**(10): p. 1411-1418.
175. Guerin, M., et al., *Proatherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL1 and dense LDL in type 2 diabetes - Impact of the degree of triglyceridemia*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2001. **21**(2): p. 282-288.
176. Murakami, T., et al., *Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1995. **15**(11): p. 1819-1828.
177. Dobiasova, M., *Atherogenic index of plasma Log(Triglycerides/HDL-cholesterol: Theoretical and practical implications*. Clinical Chemistry, 2004. **50**(7): p. 1113-1115.
178. Kannel, W.B., D. McGee, and T. Gordon, *General cardiovascular risk profile - Framingham study* American Journal of Cardiology, 1976. **38**(1): p. 46-51.
179. Napoleão, P., *Inflammation, thrombosis and endothelial dysfunction in myocardial infarction*, in *Departamento de Biologia*. 2009, Universidade de Lisboa: Lisboa. p. 103.
180. Grundy, et al., *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*. 2002, National Heart, Lung, and Blood Institute.
181. Kleinbongard, P., et al., *Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **40**(2): p. 295-302.
182. Hojo, Y., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **35**(4): p. 968-973.
183. Blann, A.D., et al., *Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or type II diabetes*. Clinical Science, 2002. **102**(2): p. 187-194.
184. Belgore, F.M., et al., *Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (sFlt-1) in essential hypertension*. American Journal of Cardiology, 2001. **87**(6): p. 805-+.
185. Blann, A.D., et al., *Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of Fluvastatin or Fenofibrate*. American Journal of Cardiology, 2001. **87**(10): p. 1160-1163.
186. Kimura, K., et al., *Serum VEGF - As a prognostic factor of atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2007. **194**(1): p. 182-188.

187. Chung, N.A., et al., *Angiogenesis, thrombogenesis, endothelial dysfunction and angiographic severity of coronary artery disease*. *Heart*, 2003. **89**(12): p. 1411-1415.
188. Liu, Y.X., et al., *Usefulness of Serum Cathepsin L as an Independent Biomarker in Patients With Coronary Heart Disease*. *American Journal of Cardiology*, 2009. **103**(4): p. 476-481.
189. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. *Cardiovascular Research*, 2003. **59**(2): p. 277-287.
190. Hussein, M.N.A., et al., *Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2007. **98**(5): p. 1096-1107.
191. Koga, H., et al., *Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005. **45**(10): p. 1622-1630.
192. Sutherland, W.H.F., et al., *Ingestion of native and thermally oxidized polyunsaturated fats acutely increases circulating numbers of endothelial microparticles*. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 2010. **59**(3): p. 446-453.
193. Yudkin, J.S., et al., *Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? Atherosclerosis*, 2000. **148**(2): p. 209-214.
194. Bevers, L.M., et al., *Low albumin levels increase endothelial NO production and decrease vascular NO sensitivity*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2006. **21**(12): p. 3443-3449.
195. Feng, B., et al., *Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Atherosclerosis*, 2010. **208**(1): p. 264-269.
196. Lutgens, S.P.M., et al., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease*. *Faseb Journal*, 2007. **21**(12): p. 3029-3041.
197. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. *Nature Medicine*, 2003. **9**(11): p. 1370-1376.
198. Barua, R.S., et al., *Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase - An in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells*. *Circulation*, 2003. **107**(18): p. 2342-2347.
199. Ockene, I.S. and N.H. Miller, *Cigarette smoking, cardiovascular disease, and stroke - A statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. *Circulation*, 1997. **96**(9): p. 3243-3247.
200. Zeiher, A.M., V. Schachinger, and J. Minners, *Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function*. *Circulation*, 1995. **92**(5): p. 1094-1100.
201. Michaud, S.E., et al., *Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: Role of NO and reactive oxygen species*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2006. **41**(2): p. 275-284.
202. Edirisinghe, I., et al., *VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction*. *Faseb Journal*, 2008. **22**(7): p. 2297-2310.
203. Schmidt-Lucke, C., et al., *Soluble vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor Flt-1 and endothelial function in healthy smokers*. *International Journal of Cardiology*, 2005. **100**(2): p. 207-212.
204. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. *New England Journal of Medicine*, 1997. **336**(14): p. 973-979.
205. Yang, H., et al., *C-reactive protein decreases expression of VEGF receptors and neuropilins and inhibits VEGF(165)-induced cell proliferation in human endothelial cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **333**(3): p. 1003-1010.

206. Bello, G., et al., *C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells via a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway*. *Atherosclerosis*, 2008. **200**(2): p. 286-293.
207. van Eeden, S.F. and J.C. Hogg, *The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking*. *European Respiratory Journal*, 2000. **15**(5): p. 915-921.
208. Yasuda, O., et al., *Aspirin: recent developments*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008. **65**(3): p. 354-358.
209. Taubert, D., et al., *Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action*. *British Journal of Pharmacology*, 2004. **143**(1): p. 159-165.
210. Paul-Clark, M.J., et al., *15-epi-lipoxin A(4)-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation*. *Journal of Experimental Medicine*, 2004. **200**(1): p. 69-78.
211. Gendron, M.E. and E. Thorin, *A change in the redox environment and thromboxane A(2) production precede endothelial dysfunction in mice*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007. **293**(4): p. H2508-H2515.
212. Piga, R., et al., *Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2007. **193**(2): p. 328-334.
213. Bansilal, S., M.E. Farkouh, and V. Fuster, *Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis*. *American Journal of Cardiology*, 2007. **99**(4A): p. 6B-14B.
214. Yang, Z.H., et al., *Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose*. *Apoptosis*, 2008. **13**(11): p. 1331-1343.
215. Wu, H., et al., *High glucose attenuates insulin-induced VEGF expression in bovine retinal microvascular endothelial cells*. *Eye*, 2010. **24**(1): p. 145-151.
216. Schnyder, B., et al., *Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2002. **282**(1): p. E87-E94.
217. Albert, M.A., R.J. Glynn, and P.M. Ridker, *Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham Coronary Heart Disease Risk Score*. *Circulation*, 2003. **108**(2): p. 161-165.
218. Forest, A., et al., *Circulating Microparticles and Procoagulant Activity in Elderly Patients*. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*, 2010. **65**(4): p. 414-420.
219. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome - An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. *Current Opinion in Cardiology*, 2006. **21**(1): p. 1-6.

VIII. SUPLEMENTOS

SUPLEMENTO 1



A produção de NO nas células endoteliais é estimulada por uma variedade de fatores mecânicos e humorais. A interação de eNOS com Cav-1 mantém a enzima sequestrada nas *caveolae*, efeito este contrariado pela calmodulina (Calm), num processo adjuvado por Hsp90. Forças mecânicas como o sazilamento laminar activam diversas vias de sinalização através da proteína G, que incluem PI3K (fosfoinositol 3-cinase), PDK (cinase

dependente de fosfoinosítido) e AC (adenilatociclase), todas elas fosforilando e activando eNOS em Ser1779. Mediadores bioquímicos como a acetilcolina, o VEGF, a insulina, os estrogénios, esfingosina 1-fosfato (S-1P) e bradiquinina (Bdk) actuam através dos seus receptores (AChR, RTKs, ESR e BdkR), activando a via PI3K/Akt ou estimulando PLC- γ (fosfolipase C- γ) e PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato). Este último mecanismo induz um aumento nos níveis de Ca²⁺ e DAG (diacilglicerol) intracelulares, responsável pela activação de Calm que, por seu turno, activa eNOS. Por outro lado, o DAG regula negativamente eNOS por estimulação de PKC e desfosforilação de eNOS. O *stress* metabólico provoca uma redução nos níveis de ATP que estimula a AMPK a fosforilar e activar eNOS. Outras proteínas relacionadas com a activação de eNOS são a dinamina-2, porina e PKA (proteína cinase A), embora as suas funções biológicas sejam ainda pouco claras. O fornecimento do substrato para a síntese de NO, L-arginina, é assegurado por CAT-1 (*cationic amino acid transporter-1*), presente nas *caveolae*.

Modificações lipídicas e interacções proteicas com eNOS são essenciais ao acoplamento com as vias de transdução de sinal e à localização física da enzima no espaço subcelular. Recentemente, um sistema complexo de regulação foi descrito, envolvendo as proteínas NOSTRIN (*nitric oxide synthase traffic inducer*) e NOSIP (*nitric oxide synthase interacting protein*). NOSTRIN induz o tráfego de eNOS da membrana plasmática para estruturas vesiculares, inibindo a produção de NO. Por seu lado, NOSIP interage com o domínio oxigenase de eNOS e, à semelhança de NOSTRIN, induz a excisão de eNOS das *caveolae* para outros compartimentos celulares, desacoplando a produção de NO. A CHIP (*C-terminal Hsp70-interacting protein*) é uma co-chaperona que interage com Hsp70 e Hsp90 e promove o tráfego de eNOS do Golgi para estruturas em que, ao invés do que acontece com um direccionamento normal para a membrana celular, inviabiliza eNOS e a produção de NO é inibida.

O NO produzido no endotélio e difundido até às células do músculo vascular liso activa sGC (guanilato ciclase solúvel), aumentando o cGMP que promove a degradação da ciclina-A e permitindo desta forma a proliferação celular. Adicionalmente, a nitrosilação da caspase-3 e caspase-8 inactiva-as e inibe a apoptose por elas iniciada, favorecendo a preservação celular. Um aumento de cGMP afecta também resistividade vascular por diminuição dos níveis de Ca²⁺ através dos canais CNG (*cyclic-nucleotide gated ion channel complex*), bem como por activação de PGK (proteína G-cinase) e fosforilação de Hsp20. Este mecanismo regula o tónus vascular por desfosforilação da miosina e dessensibilização dos elementos musculares contrácteis ao Ca²⁺.

SUPLEMENTO 2 – Matriz de cálculo para o Framingham Point Score

Idade	Pontos	
	Homens	Mulheres
20-34	-9	-7
35-39	-4	-3
40-44	0	0
45-49	3	3
50-54	6	6
55-59	8	8
60-64	10	10
65-69	11	12
70-74	12	14
75-79	13	16

Colesterol total (mg/dL)	Pontos									
	Homens					Mulheres				
	Idade 20-39	Idade 40-49	Idade 50-59	Idade 60-69	Idade 70-79	Idade 20-39	Idade 40-49	Idade 50-59	Idade 60-69	Idade 70-79
<160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160-199	4	3	2	1	0	4	3	2	1	1
200-239	7	5	3	1	0	8	6	4	2	1
240-279	9	6	4	2	1	11	8	5	3	2
≥280	11	8	5	3	1	13	10	7	4	2

Hábitos tabágicos	Pontos									
	Homens					Mulheres				
	Idade 20-39	Idade 40-49	Idade 50-59	Idade 60-69	Idade 70-79	Idade 20-39	Idade 40-49	Idade 50-59	Idade 60-69	Idade 70-79
Não-fumador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fumador	8	5	3	1	1	9	7	4	2	1

HDL (mg/dL)	Pontos	
	Homens	Mulheres
≥60	-1	-1
50-59	0	0
40-49	1	1
<40	2	2

TA sistólica (mmHg)	Pontos			
	Homens		Mulheres	
	Sem tratamento	Com tratamento	Sem tratamento	Com tratamento
<120	0	0	0	0
120-129	0	1	1	3
130-139	1	2	2	4
140-159	1	2	3	5
≥160	2	3	4	6

Homens		Mulheres	
Pontos (total)	Risco a 10 anos (%)	Pontos (total)	Risco a 10 anos (%)
<0	<1	<9	<1
0	1	9	1
1	1	10	1
2	1	11	1
3	1	12	1
4	1	13	2
5	2	14	2
6	2	15	3
7	3	16	4
8	4	17	5
9	5	18	6
10	6	19	8
11	8	20	11
12	10	21	14
13	12	22	17
14	16	23	22
15	20	24	27
16	25	≥25	≥30
≥17	≥30		

SUPLEMENTO 3 – Dados detalhados da caracterização demográfica e epidemiológica dos participantes.

Quadro 1 – Dados relativos ao grupo controle								
Referência	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)	BMI (Kg/m ²)	TA sist. (mmHg)	TA diast. (mmHg)	FC (bpm)
CAD 100	F	67	62	156	25,5	140	80	92
CAD 101	F	65	70	152	30,3	130	80	74
CAD 102	F	78	90			160	90	76
CAD 103	F	56	58	153	24,8	120	80	90
CAD 104	F	56	56	162	21,3	120	80	114
CAD 106	F	50	75	154	31,6	110	60	61
CAD 107	M	73	58	160	22,7	140	80	69
CAD 108	M	58				145	95	77
CAD 109	M	59				120	80	60
CAD 110	M	54	80	166	29,0	130	80	72
CAD 111	M	67	67	164	24,9	120	70	79
CAD 116	F	60	60	165	22,0	140	80	
CAD 117	F	68	80	162	30,5	150	90	
CAD 118	F	67	52	161	20,1	150	90	
CAD 119	F	59	52	150	23,1	130	80	
CAD 120	F	51	69	170	23,9	110	80	90
CAD 121	M	54	97	182	29,3	120	80	
CAD 122	F	58	56	148	25,6	130	80	
CAD 123	M	63	71	173	23,7	160	90	
CAD 124	M	57	73	167	26,2	150	95	
CAD 125	F	54	61	160	23,8	130	90	75
CAD 126	M	47	68	170	23,5	110	70	80
CAD 127	M	75	70	160	27,3	130	80	89
CAD 128	F	69	56	156	23,0	120	70	76
CAD 129	F	64	65	151	28,5	120	60	76
CAD 130	F	66	72	156	29,6	130	80	77
CAD 131	M	63	100	162	38,1	150	90	59
CAD 132	F	70	50	155	20,8	140	60	97
CAD 133	M	57	114	175	37,2	120	80	107
CAD 134	M	51	70	175	22,9	130	80	74
CAD 136	M	38	80	184	23,6	100	60	52
CAD 137	M	38	80	180	24,7	130	70	75
CAD 138	M	35	81	186	23,4	110	70	62
CAD 140	M	65	85	174	28,1	150	90	68
CAD 141	M	52	85	170	29,4	140	75	69
CAD 142	M	69	90	174	29,7	130	80	66
CAD 143	M	66	72	164	26,8	120	80	64

VIII. SUPLEMENTOS

CAD 144	M	53	84	178	26,5	125	80	73
CAD 145	M	38	88	182	26,6	120	70	74
CAD 147	M	65	70	160	27,3	150	90	108
CAD 148	M	67	65	164	24,2	110	50	105
CAD 149	M	57	79	178	24,9	140	80	80
CAD 152	M	51	71	173	23,7	130	70	64
CAD 153	M	53	86	173	28,7	125	77	58
CAD 154	F	48	72	162	27,4	140	80	75
CAD 155	M	49	72	172	24,3	120	60	70
CAD 156	F	55	74	155	30,8	140	90	73
CAD 158	M	69	69	160	27,0	130	80	93
CAD 159	M	60	66	157	26,8	140	80	102

BMI – índice de Massa Corporal; TA sist. – Tensão arterial sistólica; TA diast. – Tensão arterial diastólica; FC – Frequência cardíaca
M – Masculino; F – Feminino

Quadro 2 – Dados de indivíduos com doença coronária								
Referência	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)	BMI (Kg/m ²)	TA sist. (mmHg)	TA diast. (mmHg)	FC (bpm)
CAD 105	M	58	70	170	24,2	209	120	95
CAD 112	M	60				166	86	71
CAD 113	M	61	80	168	28,3	130	76	81
CAD 114	M	80	65	175	21,2	131	62	64
CAD 115	M	54	92	170	31,8	154	67	67
CAD 135	M	61	76	185	22,2	143	74	
CAD 139	M	42	89	170	30,8	120	71	55
CAD 146	F	47	52	163	19,6			
CAD 150	M	62	58	160	22,7	91	48	80
CAD 151	F	82	80	154	33,7	135	67	91
CAD 157	M	49	80	175	26,1	125	70	90

BMI – índice de Massa Corporal; TA sist. – Tensão arterial sistólica; TA diast. – Tensão arterial diastólica; FC – Frequência cardíaca
M – Masculino; F – Feminino

Quadro 3 – Dados relativos ao grupo controle												
Referência	Sexo	Fumador	Ex-fumador	HTA	Anti-HTA	Dislipidemia	Estatinas	DM	Anti-DM orais	Aspirina	Prova de Esforço	EndoPAT
CAD 100	F					X					-	
CAD 101	F			X	X	X					-	
CAD 102	F			X	X	X	X				-	
CAD 103	F					X					-	
CAD 104	F			X	X						-	
CAD 106	F	X				X					-	
CAD 107	M			X	X	X	X				-	

Quadro 3 – Dados relativos ao grupo controle												
Referência	Sexo	Fumador	Ex-fumador	HTA	Anti-HTA	Dislipidemia	Estatinas	DM	Anti-DM orais	Aspirina	Prova de Esforço	EndoPAT
CAD 156	F			X	X	X		X	X		-	+
CAD 158	M					X	X				-	+
CAD 159	M			X	X	X	X			X	-	+

DM - diabetes mellitus; HTA - hipertensão arterial

Quadro 4 – Dados relativos a indivíduos com doença coronária												
Referência	Sexo	Fumador	Ex-fumador	HTA	Anti-HTA	Dislipidemia	Estatinas	DM	Anti-DM orais	Aspirina	Prova de Esforço	EndoPAT
CAD 105	M			X	X						n/a	n/a
CAD 112	M			X	X	X	X	X	X	X	n/a	n/a
CAD 113	M			X	X	X	X			X	n/a	n/a
CAD 114	M		X	X	X	X	X			X	n/a	n/a
CAD 115	M	X		X	X						n/a	n/a
CAD 135	M										+	n/a
CAD 139	M	X				X					n/a	n/a
CAD 146	F										n/a	n/a
CAD 150	M	X									n/a	n/a
CAD 151	F			X	X	X	X			X	n/a	n/a
CAD 157	M	X		X	X						n/a	n/a

DM - diabetes mellitus; HTA - hipertensão arterial

SUPLEMENTO 4 – Resultados individuais das análises clínicas efectuadas.

Ref	CT (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	Prot. Total	Albumina	Glicose	Ureia	Creatinina sérica	AST	ALT	CK	Hemoglobina	Eritrócitos	Hematócrito	RDW	Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Plaquetas	PT	INR	APTT	CRP	Tropoina	ProBNP
CAD 100	209	120	69	98	68,20	36,90	85,0	30,0	1,00	33,0	34,0	77,0	13,30	4,27	41,60	13,0	3,49	2,01	1,09	0,38	301	11,0	0,97	26,0	0,30	0,01	54,4
CAD 101	179	120	37	108	65,70	38,80	112,0	45,0	1,00	22,0	21,0	97,0	14,30	4,99	44,20	14,0	5,77	3,39	1,97	0,30	71	12,0	1,11	31,0	0,31	0,01	79,2
CAD 102	217	143	50	118	60,10	38,60	118,0	49,0	1,00				13,70	4,80	41,50	14,0	4,65	2,54	1,84	0,18	206	11,0	0,97	25,0	0,17	0,01	22,2
CAD 103	247	175	39	165	66,50	40,20	86,0	31,0	1,00	16,0	18,0	74,0	14,80	5,02	45,50	14,0	7,35	4,83	1,91	0,49	194	11,0	1,00	34,0	0,17	0,01	21,5
CAD 104	189	109	56	122	70,40	40,00	97,0	22,0	1,00	27,0	23,0		13,60	4,35	40,80	13,0	6,88	3,51	2,88	0,39	263	11,0	1,00	28,0	0,10	0,01	5,0
CAD 105	219	155	27	184	63,10	32,20	125,0	59,0	2,00	40,0	21,0	165,0	14,20	4,73	42,40	13,0	12,97	11,20	1,22	0,48	218	11,0	1,04	22,0		0,85	7203,0
CAD 106	200	136	31	163	62,90	37,20	96,0	38,0	1,00	17,0			10,10	4,01	31,60	16,0	4,31	2,32	1,39	0,47	297	11,0	0,99	32,0	0,10	0,01	63,4
CAD 107	184	124	30	148	67,20	38,00	97,0	49,0	1,00	22,0	20,0	94,0	15,50	5,23	46,40	13,0	6,17	3,21	2,26	0,44	161	11,0	0,99	28,0	0,31	0,01	89,2
CAD 108	182	84	39	294	68,40	40,60	105,0	24,0	1,00	45,0	78,0	108,0	16,50	4,96	46,90	13,0	4,81	2,18	2,07	0,43	144	12,0	1,04	29,0	0,21	0,01	33,3
CAD 109					63,90	41,80	91,0	33,0	1,00	32,0	32,0		15,00	4,79	45,00	13,0	7,39	4,15	1,99	0,67	241	11,0	0,97	30,0	0,10	0,01	23,3
CAD 110	243	177	39	137	68,80	42,10	88,0	26,0	1,00	34,0	38,0	281,0	15,80	5,33	47,90	14,0	5,16	2,83	1,52	0,57	201	10,0	0,96	28,0	0,19	0,01	5,0
CAD 111	247	177	35	177	71,20	40,60	103,0	28,0	1,00	26,0	26,0	133,0	14,50	4,96	44,00	14,0	4,82	2,95	1,36	0,44	225	10,0	0,96	27,0	0,34	0,01	23,1
CAD 112	156	86	20	249	67,40	37,90	97,0	29,0	1,00	40,0	49,0	87,0	13,40	4,37	40,10	16,0	4,42	2,64	1,28	0,28	244	12,0	1,05		0,59	0,01	69,1
CAD 113	208	147	38	116	71,70	42,50	100,0	33,0	1,00	19,0	24,0	227,0	15,70	5,62	47,00	13,0	5,22	2,78	2,02	0,34	242	11,0	1,00		0,10	0,01	16,6
CAD 114	199	144	35	138				56,0	1,00	92,0	28,0	139,0	14,10	4,34	41,70	14,0	12,50	10,60	1,10	0,70	192	12,0	1,05	23,0	0,50	0,22	232,0
CAD 115	239	141	21	386			70,0	38,0	1,00	40,0	28,0	205,0	12,60	4,18	39,90	17,0	6,32	3,20	2,25	0,56	240	12,0	1,12	40,0	0,77	0,43	606,1
CAD 116	160	93	51	78	68,90	35,90	85,0	40,0	1,00	19,0	16,0	70,0	13,00	4,52	40,90	13,0	7,52	4,10	2,16	1,02	318	12,0	1,11	31,0	1,76	0,01	33,0
CAD 117	240	184	42	68	68,00	35,90	84,0	31,0	1,00	17,0	15,0	79,0	12,60	4,68	39,20	13,0	7,51	4,62	2,17	0,56	292	12,0	1,08	29,0	4,84	0,01	160,3
CAD 118	284	203	68	64	70,10	41,50	83,0	21,0	1,00	27,0	21,0	115,0	13,90	4,63	42,70	13,0	4,98	2,83	1,64	0,40	184	12,0	1,04	33,0	0,10	0,01	171,5
CAD 119	232	148	68	80	64,00	39,90	75,0	30,0	1,00	23,0	20,0	98,0	14,00	4,73	41,80	14,0	4,76	2,14	2,18	0,36	301	11,0	0,97	29,0	0,12	0,01	23,5
CAD 120	202	141	52	45	68,30	38,40	97,0	34,0	1,00	20,0	18,0	218,0	13,50	4,69	40,90	13,0	6,26	2,58	2,94	0,61	244	12,0	1,04	29,0	0,10	0,01	113,1
CAD 121					74,20	43,00	115,0	28,0	1,00	36,0	62,0	129,0	14,60	4,84	43,80	14,0	8,35	5,15	2,39	0,65	387	10,0	0,90	32,0	0,79	0,01	7,8
CAD 122	190	102	78	48	63,30	34,40	83,0	50,0	1,00	16,0	14,0	67,0	11,80	4,48	37,00	13,0	8,50	5,39	2,40	0,56	314	12,0	1,12	48,0	3,72	0,01	59,5
CAD 123	247	186	51	50	63,60	37,10	90,0	41,0	1,00	19,0	21,0	61,0	15,00	4,94	44,30	14,0	5,17	2,92	1,73	0,44	241	11,0	1,04	28,0	0,15	0,01	50,1
CAD 124	145	79	50	79	69,50	40,30	89,0	37,0	1,00	27,0	35,0	61,0	13,20	4,18	38,70	14,0	5,17	2,68	2,06	0,37	219	11,0	1,00	25,0	0,10	0,01	69,0
CAD 125	177	101	65	55	67,60	40,10	88,0	23,0	0,00	20,0	20,0	75,0	13,90	4,66	41,50	13,0	4,61	3,22	1,12	0,23	237	12,0	1,11	39,0	0,14	0,01	44,0
CAD 126	274	195	47	162	74,80	42,70	98,0	31,0	1,00	33,0	43,0	200,0	14,80	4,86	44,10	13,0	6,95	2,77	3,37	0,55	171	11,0	1,01	28,0	0,15	0,01	10,2
CAD 127	231	150	51	149	73,20	40,40	100,0	34,0	2,00	30,0	16,0	94,0	15,70	5,78	47,30	15,0	9,38	5,14	3,25	0,81	262	11,0	0,96	31,0	0,36	0,01	132,3
CAD 128	202	110	81	54	64,80	39,20	95,0	28,0	1,00	23,0	18,0	116,0	14,40	4,81	42,60	13,0	4,00	2,28	1,47	0,18	197	11,0	0,96	27,0	0,13	0,01	50,3
CAD 129	200	114	72	72	74,50	34,60	244,0	43,0	0,00	21,0	21,0	52,0	12,10	4,74	37,70	15,0	8,19	5,97	1,59	0,61	369				1,37	0,01	47,1
CAD 130	195	123	53	95	76,10	42,20	100,0	47,0	1,00	37,0	46,0	262,0	15,70	5,55	49,30	13,0	4,52	2,15	1,95	0,27	337	11,0	1,02	27,0	0,54	0,01	50,4
CAD	208	144	44	100	67,40	43,70	124,0	29,0	1,00	55,0	74,0	826,0	15,50	4,84	44,80	14,0	6,10	3,48	1,91	0,53	168	12,0	1,04	33,0	0,29		

VIII. SUPLEMENTOS

Ref	CT (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	Prot. Total	Albumina	Glicose	Ureia	Creatinina sérica	AST	ALT	CK	Hemoglobina	Eritrócitos	Hematócrito	RDW	Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Plaquetas	PT	INR	APTT	CRP	Tropoina	ProBNP	
131																												
CAD 132	202	128	40		74,60	44,40	115,0	13,0	0,00	32,0	32,0	41,0	14,00	4,68	42,80	13,0	6,00	3,65	1,97	0,30	263	12,0	1,04	31,0	0,56	0,01	21,1	
CAD 134	212	146	44	108	65,70	39,80	78,0	28,0	1,00	24,0	27,0	124,0	15,20	4,84	45,00	13,0	5,54	2,23	2,80	0,43	205	12,0	1,08	32,0	0,10	0,09	211,9	
CAD 135	141	107	18	78			99,0	33,0	1,00	19,0	16,0	80,0	13,20	5,67	40,80	14,0	4,94	68,60	23,30	6,70	186	13,0	1,14	32,0	0,85	0,09	235,2	
CAD 136	306	231	36	193	66,50	44,10	79,0	36,0	1,00	32,0	41,0	240,0	16,20	5,57	47,90	14,0	5,47	2,48	2,46	0,44	240	11,0	1,04	25,0	0,10	0,01	8,7	
CAD 137	183	127	42	71		42,60	81,0	40,0	1,00	26,0	29,0	266,0	15,10	4,90	44,70	12,0	6,77	3,98	1,91	0,74	238	11,0	1,04	22,0	0,10	0,01	11,2	
CAD 138	213	150	47	82	66,40	43,40	76,0	30,0	1,00	22,0	44,0	91,0	14,10	4,99	42,40	13,0	3,86	1,84	1,54	0,32	199	11,0	0,96	32,0	0,10	0,01	11,0	
CAD 139	206	143	55	40	64,70	40,50	86,0	30,0	1,00	63,0	72,0	518,0	14,70	4,91	43,50	14,0	9,42	4,92	3,41	0,76	226	12,0	1,07	120,0	0,75	2,46	170,7	
CAD 140	303	228	46	144	61,30	38,00	105,0	39,0	1,00	21,0	20,0	116,0	15,90	5,09	46,60	13,0	6,00	4,00	1,40	0,40	161	10,0	0,93	25,0	0,55	0,01	84,4	
CAD 141	243	192	36	73	64,50	37,40	85,0	32,0	1,00			99,00	16,40	5,31	47,00	12,0	7,30	3,80	2,60	0,60	205	10,0	0,97	33,0	0,20	0,01	7,0	
CAD 142	224	162	53	43	60,50	35,70	123,0	26,0	1,00	23,0	26,0	202,0	14,60	4,45	42,20	13,0	5,60	4,00	1,00	0,50	202	12,0	1,13	28,0	0,15	0,01	52,1	
CAD 143	213	129	70	69	61,50	40,40	82,0	47,0	1,00	28,0	26,0	214,0	15,50	4,86	43,90	13,0	4,70	2,70	1,60	0,30	169	13,0	1,18	36,0	0,10	0,01	115,8	
CAD 144	233	165	53	77	66,60	39,80	87,0	24,0	1,00	25,0	24,0	96,0	14,50	4,54	41,30	12,0	7,90	5,10	1,90	0,70	198	11,0	1,00	24,0	0,16	0,01	25,8	
CAD 145	191	140	40	54	67,10	41,00	82,0	37,0	1,00	28,0	29,0	273,0	15,00	5,07	42,80	13,0	5,10	2,70	1,90	0,40	203	12,0	1,09	32,0	0,10	0,01	7,0	
CAD 146						35,70	87,0	12,0	1,00	46,0	76,0	38,0	11,40	3,12	32,40	13,0	4,90	2,60	1,70	0,50	100	12,0	1,02	26,0		0,53	709,0	
CAD 147																												
CAD 148	201	134	58	45	67,30	41,90	82,0	46,0	1,00	19,0	28,0	108,0	16,40	5,19	47,50	15,0	7,50	4,70	1,70	0,70	249	10,0	0,95	28,0	0,11	0,03	108,3	
CAD 149	249	172	45	158	74,00		93,0	26,0	1,00				15,60	5,15	45,20	14,0	8,10	3,90	2,80	0,60	303	11,0	1,03	27,0	0,10	0,03	19,0	
CAD 150	162	104	39	93	67,60	37,00	137,0	44,0	1,00	205,0	64,0	179,0	12,90	3,79	38,60	15,0	6,70	5,10	0,90	0,70	123	11,0	0,97	120,0	0,71	0,19	358,0	
CAD 151	154			154	62,70	34,60	136,0	28,0	1,00	22,0	22,0	49,0	11,30	3,71	33,20	14,0	6,40	4,30	1,60	0,50	167	12,0	1,11	25,0	1,96	0,26	1403,0	
CAD 152	196	147	35	69	67,20	41,20	72,0	41,0	1,00	42,0	34,0	344,0	15,70	4,93	45,10	13,0	8,10	4,90	2,40	0,60	193	11,0	1,04	30,0	0,37	0,01	5,0	
CAD 153	212	157	36	96	70,20	43,20	90,0	28,0	1,00	55,0	62,0	591,0	14,50	4,64	42,00	14,0	4,50	1,90	2,00	0,40	263	10,0	0,95	32,0	0,11	0,03	14,8	
CAD 154	207	124	68	75	63,60	38,40	78,0	32,0	1,00	19,0	16,0	72,0	13,80	4,58	40,70	13,0	6,60	4,30	1,80	0,30	237	10,0	0,94	21,0	0,82	0,03	32,5	
CAD 155					72,90		76,0	25,0	1,00	23,0	21,0	152,0	16,10	5,07	47,20	13,0	5,60	2,60	2,30	0,70	174	12,0	1,08	30,0	0,10	0,01	21,0	
CAD 156	213	133	41	194	65,70	40,20	148,0	31,0	1,00	32,0	47,0	296,0	13,60	4,61	39,30	14,0	7,70	4,80	2,10	0,40	214	10,0	0,93	31,0	0,61	0,01	5,0	
CAD 157	235	148	57	148	56,00	38,10	177,0	34,0	1,00	141,0	104,0	910,0	14,80	4,62	42,90	13,0	26,50	24,70	0,90	1,00	183	12,0	1,01	23,0	0,43	0,67	4180,0	
CAD 158	176	120	46	48	67,80	38,90	88,0	34,0	1,00	27,0	23,0	162,0	14,50	4,54	41,50	13,0	6,40	3,20	2,30	0,70	253	11,0	0,98	28,0	0,39	0,01	64,3	
CAD 159	216		35		65,80		87,0	25,0	1,00	35,0	42,0	74,0	15,60	5,45	45,10	14,0	7,00	4,80	1,00	0,50	186	12,0	1,04	27,0	1,79	0,01	62,1	

SUPLEMENTO 5 – Quantificação individual dos parâmetros VEGF, Cat-L e micropartículas.

REF	VEGF (pg/mL)	Cat-L (ng/mL)	MPs (%)	MPs CD31+ (%)	MPs CD31+CD144+ (%)	MPs CD42b ⁻ CD144 ⁺ (%)	MPs CD31 ⁺ CD42b ⁻ (%)
CAD 100	548,58	5,54	49,63	18,99	3,87	22,54	13,95
CAD 101	285,68	3,96	21,50	23,26	6,05	25,47	16,58
CAD 102	482,85	3,86	18,07	25,54	7,00	26,12	17,54
CAD 103	530,16	4,42	33,39	24,04	6,29	25,42	17,02
CAD 104		4,25	21,95	24,35	6,70	25,95	16,66
CAD 105	600,11	4,15	13,52	23,35	6,59	26,41	16,82
CAD 106	185,39	5,03	18,90	27,83	8,24	25,25	17,90
CAD 107	399,32	3,93	23,43	21,79	5,91	25,69	15,10
CAD 108	150,97	4,06	15,08	17,04	4,17	24,19	12,36
CAD 109	125,92	3,39	15,99	26,87	8,50	26,60	17,97
CAD 110	111,06	3,73	82,34	35,63	13,09	30,23	21,93
CAD 111	585,10	4,11	39,35	34,38	10,57	29,70	23,00
CAD 112		3,97	22,19	25,93	5,82	20,65	18,59
CAD 113	402,62	3,76	11,87	30,93	5,33	17,84	21,61
CAD 114	133,04	4,21	24,08	9,99	2,24	25,03	8,20
CAD 115	347,31	4,79					
CAD 116	399,48	6,27	12,03	23,28	3,72	17,56	15,30
CAD 117	1448,11	4,51	10,94	28,02	6,11	18,93	18,43
CAD 118	359,68	5,48	7,04	25,80	4,45	17,84	17,29
CAD 119	50,13	6,13	30,46	28,62	8,93	28,82	19,49
CAD 120	546,94	4,10	70,28	34,09	11,02	26,71	20,59
CAD 121	704,71	3,46	14,51	20,87	5,85	26,59	14,27
CAD 122	779,98	3,15	5,24	36,66	10,81	26,13	20,85
CAD 123	525,98	2,79	8,55	43,24	15,01	27,02	21,38
CAD 124	130,30	2,95	3,27	26,86	10,62	34,16	19,19
CAD 125	82,92	3,98	7,72	23,70	12,21	37,77	19,59
CAD 126	170,26	3,49	7,86	32,65	18,27	41,69	25,67
CAD 127	915,81	3,38	19,48	37,28	18,31	38,06	27,02
CAD 128	694,48	5,44	41,76	22,22	8,98	33,66	16,06
CAD 129	210,82	3,53	63,13	35,75	14,76	33,16	24,07
CAD 130	928,32	2,31	19,49	3,83	1,30	27,16	3,25
CAD 131	691,93	2,66	11,17	32,42	12,56	32,26	23,18
CAD 132	835,96	3,34	18,08	22,49	7,60	29,64	16,60
CAD 134	340,13		15,44	27,82	10,22	32,06	20,33

VIII. SUPLEMENTOS

REF	VEGF (pg/mL)	Cat-L (ng/mL)	MPs (%)	MPs CD31+ (%)	MPs CD31+CD144+ (%)	MPs CD42b ⁻ CD144 ⁺ (%)	MPs CD31+CD42b ⁻ (%)
CAD 135	231,01		10,51	39,00	14,66	28,67	25,91
CAD 136	270,33		25,19	25,89	9,39	32,15	18,42
CAD 137	380,85		27,04	25,48	8,44	29,99	18,44
CAD 138	167,21		26,42	37,63	12,75	28,60	24,64
CAD 139			57,41	34,60	5,71	29,03	24,00
CAD 140	855,10		26,07	40,75	13,49	26,82	25,61
CAD 141	253,98		20,48	28,20	10,92	27,52	16,82
CAD 142	273,72		65,48	125,80	41,21	27,93	78,92
CAD 143	267,49		60,54	60,22	35,97	43,37	45,92
CAD 144	1005,57		64,42	54,08	31,49	42,83	40,09
CAD 145	272,33		39,73	68,96	39,59	43,44	53,10
CAD 146			18,65	30,00	11,76	34,08	23,43
CAD 147	973,26		17,91	6,29	4,31	24,62	5,12
CAD 148	331,64		37,08	5,97	4,36	24,78	5,48
CAD 149	203,98		19,66	8,35	3,60	24,28	6,46
CAD 150			28,09	7,93	28,37	28,02	6,49
CAD 151	359,96		42,87	4,28	1,53	15,76	3,28
CAD 152	214,48		48,15	5,49	4,04	26,39	5,29
CAD 153	621,71		53,38	6,74	3,82	26,29	8,95
CAD 154			49,78	12,99	7,21	28,68	6,62
CAD 155							
CAD 156							
CAD 157							
CAD 158							
CAD 159							

SUPLEMENTO 6 – Análise correlacional (método de Spearman).

	VEGF (pg/mL)	Catepsina L (ng/mL)	% MPs	% MPs CD31 ⁺	% MPs CD31 ⁺ CD144 ⁺	% MPs CD42 ⁻ CD144 ⁺	% MPs CD42 ⁻ CD31 ⁺	TC/HDL	AIP	FPS
Idade	,305[†]	-,028	,003	-,225	-,248	-,315[†]	-,214	-,125	-,089	,590^{**}
BMI	,165	-,287	,162	,044	-,088	-,105	,036	,119	,058	,073
TA Sistólica (mm Hg)	,199	-,057	-,440^{**}	-,023	-,116	-,275	-,047	,210	,186	,492^{**}
TA Distólica (mm Hg)	,171	-,119	-,442^{**}	,108	,018	-,170	,099	-,092	-,030	,251
FC (bpm)	,371[†]	,109	-,106	-,289	-,169	-,242	-,265	-,271	-,090	,200
VEGF (pg/mL)		-,273	,055	-,004	-,121	-,122	-,031	-,029	-,103	,224
Catepsina L (ng/mL)	-,273		,357[†]	-,282	-,401[†]	-,512^{**}	-,471^{**}	,053	,026	,421[†]
% MPs	,055	,357[†]		-,287[†]	-,141	,005	-,386^{**}	-,118	-,204	-,276
% MPs CD31 ⁺	-,004	-,282	-,287[†]		,746^{**}	,422^{**}	,957^{**}	,134	-,073	-,149
% MPs CD31 ⁺ CD144 ⁺	-,121	-,401[†]	-,141	,746^{**}		,749^{**}	,744^{**}	,041	-,076	-,281
% MPs CD42 ⁻ CD144 ⁺	-,122	-,512^{**}	,005	,422^{**}	,749^{**}		,554^{**}	-,131	-,152	-,494^{**}
% MPs CD42 ⁻ CD31 ⁺	-,031	-,471^{**}	-,386^{**}	,957^{**}	,744^{**}	,554^{**}		,096	-,008	-,191
Colesterol total (mg/dl)	,141	,118	,070	,367[†]	,264	,143	,278	,378^{**}	,143	,189
LDL-C (mg/dl)	,081	,022	,081	,324[†]	,186	,057	,231	,519^{**}	,165	,089
HDL-C (mg/dl)	,139	,003	,142	,101	,126	,184	,109	-,880^{**}	-,813^{**}	-,214
Triglicéridos (mg/dl)	-,031	,076	-,159	-,130	-,115	-,155	-,055	,602^{**}	,926^{**}	,358^{**}
Proteínas totais (g/dl)	,090	-,239	-,192	-,131	-,118	,100	,056	-,029	,137	-,076
Albumina (g/dl)	-,057	-,406[†]	-,084	-,060	-,016	,260	,096	,161	,155	-,336[†]
Glicose (mg/dl)	,305[†]	-,454^{**}	-,089	-,048	,044	-,010	,043	,080	,301[†]	,294[†]
Ureia (mg/dl)	,051	-,162	,010	-,063	-,020	-,136	-,053	-,021	,032	,078
Creatinina sérica (mg/dl)	,235	,093	-,045	,049	-,075	-,148	,001	,254	,309[†]	,086
AST/TGO (U/l)	-,009	-,173	,050	-,285	-,223	,208	-,140	,163	,306[†]	-,068
ALT/TGP (U/l)	-,181	-,365[†]	,028	-,208	-,193	,153	-,072	,165	,281	-,258
CK (U/l)	,003	,013	,231	-,107	-,154	,085	,002	,189	,186	-,242
Hemoglobina (g/dl)	,020	-,405[†]	,071	-,033	-,010	,122	,000	,248	,127	-,188
Eritrócitos (x10 ⁶ /ul)	,018	-,414[†]	-,053	,194	,192	,152	,280	,333[†]	,172	-,081
Hematócrito (%)	,061	-,355[†]	-,032	-,061	-,035	,076	,024	,285[†]	,175	-,033
RDW (%)	-,139	-,075	,000	-,025	,012	-,008	,020	,247	,342[†]	,181
Leucócitos (x10 ³ /ul)	,136	-,172	-,058	,000	-,080	-,078	-,136	,029	-,002	,012
Neutrófilos (x10 ³ /ul)	,142	-,178	-,049	,042	-,004	-,071	-,088	,053	-,012	,076

VIII. SUPLEMENTOS

	VEGF (pg/mL)	Catepsina L (ng/mL)	% MPs	% MPs CD31 ⁺	% MPs CD31 ⁺ CD144 ⁺	% MPs CD42 ⁻ CD144 ⁺	% MPs CD42 ⁻ CD31 ⁺	TC/HDL	AIP	FPS
Linfócitos (x10 ³ /ul)	-,003	-,209	-,298*	,158	,074	,088	,160	,071	,050	-,131
Monócitos (x10 ³ /ul)	-,036	-,026	,000	,184	,071	,008	,053	,127	,021	-,172
Plaquetas (x10 ³ /ul)	,168	-,003	-,057	-,028	-,159	-,125	-,027	-,244	-,223	,076
PT (seg)	-,145	,140	-,226	,071	-,072	-,124	,147	-,134	-,146	-,007
INR	-,183	,050	-,223	,018	-,133	-,159	,073	,008	-,100	-,099
APTT (seg)	-,099	,013	-,224	,144	,132	-,001	,169	-,012	-,117	,004
CRP (mg/dl)	,339*	-,113	-,045	-,065	-,112	-,113	-,063	,081	,101	,372**
Troponina (mg/dl)	-,043	,225	,046	-,264	-,244	-,014	-,223	,130	,163	-,095
Pro-BNP (pg/ml)	,149	,213	-,100	-,001	-,061	-,129	,046	-,051	-,034	,199
TC/HDL-C	-,029	,053	-,118	,134	,041	-,131	,096		,804**	,265
AIP	-,103	,026	-,204	-,073	-,076	-,152	-,008	,804**		,314*
FPS	,224	,421*	-,276	-,149	-,281	-,494**	-,191	,265	,314*	

AIP – Índice Aterogénico do Plasma; ALT – Alanina aminotransferase; AST – Aspartato aminotransferase; APTT – Tempo de protomboplastina parcial activada; CK – Creatina cinase; CRP – Proteína C-reativa; CT – Colesterol total; FPS – *Framingham Point Score*; INR – Índice Internacional Normalizado; HDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de alta densidade; LDL-C – Colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade; pro-BNP – *pro-Brain Natriuretic Peptide*; PT – Tempo de protrombina; RDW – *Red cell distribution width*; TG – Triglicéridos
* p<0.05; **p<0.01

SUPLEMENTO 7 – Valores de referência para parâmetros bioquímicos comuns.

Parâmetro	Valores de referência
Colesterol total (mg/dL)	Normal: <200 Moderadamente alto: 200-239 Elevado: ≥240
LDL-C (mg/dL)	<130
HDL-C (mg/dL)	>35
Triglicéridos (mg/dL)	<150
Proteínas totais (g/dL)	6.0-8.0
Albumina (g/dL)	3.5-5.0
Glicose (mg/dL)	60-100
Ureia (mg/dL)	10-20
Creatinina sérica (mg/dL)	<1.5
AST (U/L)	4-36
ALT (U/L)	10-35
CK (U/L)	Homens: 30-180 Mulheres: 25-150
Hemoglobina, sangue total (g/dL)	Homens: 13.5-18.0 Mulheres: 12-15
Eritrócitos	Homens: 4.6-6.0 x10 ⁶ /mm ³ Mulheres: 4.0-5.0 x10 ⁶ /mm ³
Hematócrito (%)	Homens: 40-54 Mulheres: 36-46
RDW (%)	11.5-14.5
Leucócitos	4.5-10.0 x10 ³ /mm ³
Neutrófilos	2.5-7.0 x10 ³ /mm ³
Linfócitos	1.7-3.5 x10 ³ /mm ³
Monócitos	0.2-0.6 x10 ³ /mm ³
Plaquetas	150-400 x10 ³ /mm ³
Tempo de protrombina (seg)	10.0-13.0
INR	0.9-1.2
APTT (<i>Activated Partial-Thromboplastin Time</i>) (seg)	20.0-35.0
CRP (mg/dL)	Desejável: <0.1 Positivo: ≥0.3
Troponina (ng/mL)	Troponina I: 0.1-0.5 Troponina T: <0.2
NT-proBNP (pg/mL)	<100

Valores baseados em: Kee, JL (2009). *Prentice Hall Handbook of Laboratory and Diagnostic Tests with Nursing Implications*, 6ª edição. Pearson Prentice Hall.