



**Adriana Manuela
Rocha Duarte**

**Possível associação do polimorfismo 3´UTR-NFkBIA
na Doença Arterial Coronária**



**Adriana Manuela
Rocha Duarte**

**Possível associação do polimorfismo 3´UTR-NFkBIA
na Doença Arterial Coronária**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Dra. Susana Magadán Mompó, Professora Doutora, Investigadora no Centro de Oceanográfico de Vigo e do Dr. António Correia, Professor Doutor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao meu marido Ricardo, meu irmão Alípio e meus pais Adriano e Manuela. O meu obrigada por tudo o que têm feito e sido para mim.

O júri

Presidente: Prof.^a Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Vogais: Prof.^o Doutor António Carlos Matias Correia, professor catedrático da Universidade de Aveiro (orientador)

Doutora Susana Magadán Mompó, Investigadora em Pós-Doutoramento, Centro Oceanográfico de Vigo - Instituto Español de Oceanografía (co-orientadora)

Prof.^a Doutora Sandra Isabel Moreira Pinto Vieira, Professora convidada da Secção Autónoma das Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro, Investigadora em pós-doc do Centro de Biologia Celular, departamento de Biologia, Universidade de Aveiro (arguente)

agradecimentos

Não poderia deixar de agradecer com um obrigada muito sincero a várias pessoas amigas que me ajudaram no trabalho prático, teórico e sempre.

Ficarei para sempre grata:

À Doutora Susana Magadan, minha orientadora, por ter aceite orientar este meu trabalho, por ter acreditado em mim, pela sua disponibilidade, ajuda e companheirismo.

Ao Doutor António Correia pelo seu apoio, compreensão e disponibilidade.

Ao Instituto Superior de Saúde do Alto Ave (ISAVE) por me ter disponibilizado as suas instalações para a elaboração deste trabalho.

Ao Centro Hospitalar do Alto Ave por me ter permitido a recolha de diversas amostras para o trabalho prático.

Às minhas amigas Mestres Dianne Catalão, Rita Caldas, Alexandra Pinto, amigo Paulo Costa, amigo e irmão Alípio por tudo o que fizeram, fazem e continuarão a fazer por mim, por nós. Sem vocês tudo teria sido muito complicado, muito demoroso, muito custoso. Ficarei para sempre grata pela vossa amizade, incentivo, compreensão, companheirismo e disponibilidade prestada na minha vida pessoal e profissional.

O meu muito obrigada a todos que de uma forma mais ou menos directa contribuíram para que hoje aqui estivesse a escrever esta dedicatória.

Aos meus queridos pais, irmão e marido o meu obrigada por serem as pessoas que são e pela força que me deram na realização deste trabalho.

Palavras-chave

Aterosclerose, factores risco, factor nuclear de transcrição NFkB, polimorfismo 3'UTR-NFkBIA.

Resumo

Em Portugal, no último ano, de um total de 105.582 mortes, ocorreram cerca de 41.000 por doenças cardiovasculares, das quais 21.000 por acidente cerebro-vascular e mais de 9.000 por enfarte do miocárdio.

A disfunção endotelial é o ponto inicial da aterosclerose e sabe-se que é resultante de uma agressão sistemática que promove respostas compensatórias que alteram a homeostase do endotélio, através da activação de leucócitos e plaquetas, bem como, da alteração de sua permeabilidade às lipoproteínas e outros constituintes plasmáticos. A resposta vascular à lesão induzida pelos factores de risco (idade, género, história familiar, hipertensão arterial, hipercolesteremia, diabetes mellitus, tabagismo) é do tipo inflamatório e envolve a interacção de diversos grupos celulares, tais como: células endoteliais, monócitos, macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica, complexa, multifactorial, lenta e progressiva, sendo o resultado de uma combinação de factores genéticos e ambientais.

Entre os diversos factores genéticos envolvidos na aterosclerose encontra-se o factor nuclear de transcrição NFkB. Este factor destaca-se pela sua vasta gama de acções e pelo facto de diversas proteínas estarem integradas na dinâmica da sua activação.

A sua activação conduz a uma expressão coordenada de vários genes que codificam proteínas, citocinas, moléculas de adesão e enzimas, assim como, óxido nítrico sintetase, COX2 e factor tecidual, implicados na iniciação e permanência da resposta inflamatória. Foram colhidas 36 amostras de doentes com doença cardíaca coronária diagnosticada por cateterismo cardíaco. A todas elas foi extraído o DNA e determinado o genótipo do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA mediante PCR-RFLP.

Keywords

Atherosclerosis, risk factors, nuclear transcription factor NFkB , 3'UTR - NFkBIA polymorphism

Abstract

In Portugal, 105.582 deaths occurred in last year, which about 41.000 were due to cardiovascular diseases, 21.000 by cerebrovascular accident and more than 9.000 by myocardial infarction.

Endothelial dysfunction is the starting point of atherosclerosis and it is known that it is the result of a systematic aggression that promotes compensatory responses and alters endothelial homeostasis, via activation of leukocytes and platelets, as well as modification of its permeability to lipoproteins and other plasma constituents. The vascular response to injury induced by risk factors (age, gender, family history, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, smoking) is an inflammatory type and involves the interaction of different cell groups, such as endothelial cells, monocytes, macrophages, T lymphocytes and smooth muscle cells.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease, complex, multifactorial, slow and progressive, being the result of a combination of genetic and environmental factors.

Among the many genetic factors involved in atherosclerosis is the nuclear transcription factor NFkB. This factor stands out for its wide range of actions and the fact that several proteins involved in the dynamics of its activation.

Its activation leads to a coordinated expression of several genes that encode proteins, cytokines, adhesion molecules and enzymes as well as nitric oxide synthetase, COX2, and tissue factor, implicated in the initiation and maintenance of the inflammatory response.

We collected 36 samples from patients with coronary heart disease diagnosed by cardiac cateterismo. All of them DNA was extracted and tested for genotype 3'UTR- NFkBIA polymorphism by PCR-RFLP.

Índice

1.Introdução	1
1.1. Doença coronária	3
1.2. Célula endotelial e o endotélio	4
1.3. Aterosclerose	5
1.3.1 <i>A placa aterosclerótica e a sua fisiopatologia</i>	7
1.4. Factores de risco associados à aterosclerose	11
1.5.Polimorfismos genéticos na procura de novos factores de risco	14
a) <i>Factores genéticos</i>	15
2. Factor nuclear de transcrição NFkB	16
2.1 Estrutura NFkB	19
2.2.NFkB: Propriedades aterogénicas	22
2.3. <i>Dados experimentais obtidos in vivo</i>	23
2.4. Doenças relacionadas com a activação do NFkB	25
2.5. Polimorfismos genéticos	26
3. Material e Métodos	28
3.1 Amostras Biológicas Humanas	28
3.2.Processamento das amostras biológicas	28
3.2.1. <i>Isolamento de DNA genómico</i>	28
3.2.2. <i>Análise do polimorfismo do padrão dos fragmentos de restrição (PCR-RFLPs)</i>	29
3.2.3. <i>Equilíbrio Hardy e Weinberg e avaliação da associação genética</i>	30
4. Resultados	31
4.1. Análise do polimorfismo 3'UTR-IkBA	32
5- Discussão e conclusão	40
6 - Referências bibliográficas	43

Anexo

Índice de figuras

Figura I - Esquema representativo da aterosclerose que indica os diferentes tipos de células envolvidas no processo	10
Figura II - Activação NFkB.As duas cascatas da sua activação	21
Figura III - Eletroforese de produtos de PCR - RFLP em gel de agarose a 3%	33

Índice de tabelas

Tabela I – Factores de risco envolvidos na aterosclerose	13
Tabela II– Polimorfismos genéticos como factores de risco na aterosclerose	15
Tabela III – Genes regulados pelo factor de transcrição NFkB	17
Tabela IV– Lista de inibidores do NFkB	19
Tabela V – Genótipo resultante do cruzamento dos gâmetas masculino e feminino	30
Tabela VI - Relação entre os factores de risco e faixas etárias em indivíduos com DAC	32
Tabela VII- Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo 3'UTR – IkB-A	34
Tabela VIII - Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR- IKB-A em indivíduos com DAC, segundo a idade	35
Tabela IX - Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR - IkB-A em indivíduos com DAC, segundo a HTA	36
Tabela X- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR-IkB-A em indivíduos com DAC, segundo a dislipidemia	37
Tabela XI- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR-IkB-A em indivíduos com DAC, segundo tabagismo	38
Tabela XII- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR-IkB-A em indivíduos com DAC, segundo diabetes mellitus	39

Índice de esquemas

Esquema I- Eventos iniciais na formação de lesão aterosclerótica

12

Abreviaturas

ACE: Enzima conversora da angiotensina

ADN: Ácido desoxiribonucléico

Ang II: Angiotensina II

Apo B: Apolipoproteína B

Apo E: Apolipoproteína E

AVC: Acidente vascular cerebral

CHAA: Centro Hospitalar do Alto Ave

CSF: Factor estimulador de colónias

DAC: Doença arterial coronária

dNTPs: Desoxiribonucleotídeos trifosfatados

EAM : Enfarte agudo do miocárdio

EDRF: Factor relaxamento derivado do endotélio

EDTA: Etilenodiaminotetra cético

FGF: Factor de crescimento de fibroblastos

HDL:Lipoproteína de alta densidade

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HTA: Hipertensão arterial

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular

ICC: Insuficiência cardíaca congestiva

IFN- γ : Interferão gama

ICAMs: Moléculas de adesão intercelular

I kB: Proteínas inibitórias do NFkB

IL: Interleucina

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LDLox : Lipoproteína de baixa densidade oxidada

LPS:Lipopolissacarídeos

LXR: Receptor do fígado X

mA: Milamperes

MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos 1

M-CSF: Factor estimulador de colónia de macrófago

MTHFR: Metilenotetrahidrofolato

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

NFkB: Factor nuclear Kappa B

NLS: Do inglês nuclear colalization signal

NO: Óxido nítrico

Pb: Pares de base

PCR: Do inglês, polymerase chain reaction

PCR – RLPs: Polimorfismo da longitude dos fragmentos de restrição

PDGF: Factor de crescimento derivado de plaquetas

PPAR - γ : Receptor activador da proliferação de peroxissoma gama

RHD: Do inglês, Rel Homology Domain

RNA_m : Ácido ribonucléico mensageiro

SNP: Polimorfismo de um único nucleótido

SRA : Receptor acetilado do LDL

TASCP: Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública

TDs: Do inglês, Transactivation domains

TGF- β : Factor beta de transformação do crescimento

TLR ou TL: Receptor Toll - like

TNF α : Factor necrose tumoral

UV: Ultravioleta

VCAMs: Molécula de adesão celular vascular

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular -1

VEGF: Factor de crescimento do endotélio vascular

1.Introdução

Apesar dos grandes progressos da cardiologia, ocorridos nos últimos anos, verifica-se hoje em Portugal e no mundo, um crescimento considerável de doenças cardiovasculares (*Carrageta M., 2009*).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 1 bilião de pessoas tem excesso de peso ou são obesas e estima-se que 60% da população mundial seja fisicamente pouco activa ou inactiva. Cerca de 700 milhões são hipertensos, a maior parte dos quais, não estão diagnosticados, tratados ou controlados. Presentemente, 150 milhões de indivíduos são diabéticos e este número irá duplicar até 2025. O número de fumadores é superior aos 500 milhões e estima-se que de 2000 a 2025, morrerão cerca de 150 milhões de indivíduos devido às doenças causadas pelo tabagismo (*Carrageta M., 2009*).

Em Portugal, no último ano, de um total de 105.582 mortes, ocorreram cerca de 41.000 por doenças cardiovasculares, das quais 21.000 por acidente cerebro-vascular e mais de 9.000 por enfarte do miocárdio. A tendência dos últimos anos mostra uma ligeira redução dos acidentes vasculares cerebrais (AVC) e um ligeiro aumento no número de enfartes do miocárdio fatais. No seu conjunto, as doenças cardiovasculares são responsáveis por quase metade da mortalidade total da população portuguesa (*Carrageta M., 2009*). As doenças cardiovasculares constituem, assim, uma grande causa de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Os progressos terapêuticos e preventivos vieram permitir que um maior número de sobreviventes, grande parte deles assistidos pelos seus médicos de família, tenha uma maior esperança de vida, devido ao controlo dos factores de risco o que leva à redução da recorrência de novos acidentes coronários agudos (*Carrageta M., 2009*).

A patogénese mais encontrada nas doenças cardiovasculares é a aterosclerose, que passou a ser considerada como um modelo de doença crónico-degenerativa e, exclusivamente de pacientes de idade avançada, para um modelo de doença inflamatória crónica subclínica, presente já na infância. É uma doença oriunda da disfunção endotelial. O endotélio vascular regula a homeostase vascular e provoca alterações funcionais adaptativas causadas pela libertação de várias substâncias com actividades pró e anticoagulantes, capazes de promover a adesão de moléculas com acções vasoactivas. A homeostase vascular é o resultado da regulação dinâmica dessas funções. O óxido nítrico (NO) é a principal substância com acção protectora ao endotélio (*Hayden M.S. e Ghosh S.,2004*).

A perda da acção protectora do endotélio pode ocorrer na presença de factores inflamatórios, com aumento da propensão à vasoconstricção, trombose, inflamação e proliferação celular na parede do vaso.

Os factores que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose são o tabagismo, diabetes, hipercolestoremia e hipertensão arterial (HTA), aumento da agregação plaquetária, diminuição das células endoteliais vasculares e o aumento da proliferação de células lisas. Os leucócitos, monócitos e macrófagos estão presentes na lesão aterosclerótica, sugerindo reacção inflamatória no seu desenvolvimento (*Chinetti G. et al, 2006*).

Na presença da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox), de agente infeccioso na parede vascular ou lesão tecidual (necrose ou isquemia), os leucócitos são activados. Uma vez activados, iniciam a produção de diferentes mediadores solúveis: factor necrose tumoral alfa (TNF - α), interferão gama (IFN - γ), interleucina-6 (IL-6). A IL-6 estimula os hepatócitos a produzirem o ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para produção de proteínas de fase aguda, como o fibrinogénio, a proteína C reactiva e a proteína amilóide sérica A (*Glass C.K. e Ogawa S., 2006*). Tem sido demonstrado que a aterosclerose não é simplesmente uma doença de depósito de lípidios e que a inflamação tem papel fundamental na iniciação, progressão e destabilização do ateroma.¹

A inflamação é uma resposta benéfica a infecções e/ou lesões tecidulares que, em última análise, é responsável pelo restabelecimento da homeostasia das funções tecidulares. Caracteriza-se pelo recrutamento de leucócitos circulantes, para os tecidos infectados ou lesionados, através do endotélio vascular. Devido à sua localização “estratégica”, as células endoteliais tem um papel central na organização do tráfego de leucócitos entre o sangue e os tecidos adjacentes. Quando activadas, as células endoteliais expressam uma série de genes pró-inflamatórios que codificam para diferentes citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Estas proteínas são directamente responsáveis pela activação de leucócitos, quimiotaxia e migração trans-endotelial, respectivamente. Embora essenciais no recrutamento dos leucócitos, a expressão destes genes têm de ser finamente regulada. Quando tal não acontece, a activação desregulada das células endoteliais pode induzir morte por apoptose.

¹ Placas compostas, especialmente, de lípidos e tecido fibroso que provocam uma progressiva diminuição do diâmetro do vaso, podendo obstruí-lo totalmente e, possivelmente, provocar isquemias teciduais. O processo de formação do ateroma é complexo. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) penetram na parede do vaso, atravessam o endotélio, chegam à camada íntima da parede e são fagocitadas

O estudo dos mecanismos que regulam a expressão de genes pro-inflamatórios é muito importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogénese das doenças inflamatórias, como a aterosclerose.

Como um factor de transcrição da resposta inflamatória tem-se o factor nuclear kappa B (NFkB) que está envolvido na regulação dos genes da resposta inflamatória, na apoptose, na proliferação celular e no aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (*Winther M.P. et al, 2005*). Muitos estudos apontam a presença desse factor activado na placa aterosclerótica, nas células musculares lisas, nas células endoteliais e nos macrófagos (*Winther M.P. et al, 2005*). Além do NFkB, outros factores de transcrição como o receptor activador da proliferação de peroxissoma (PPAR) e o receptor do fígado X (LXR), que regulam a expressão de genes, que controlam o metabolismo de lipídios e a lipoproteínase a homeostase da glicose (*Chinetti G. et al, 2006*), também actuam na predisposição à aterosclerose. Recentemente discute-se a participação desses factores de transcrição também na inflamação (*Glass C.K. e Ogawa S., 2006*).

1.1. Doença coronária

O coração é o motor do nosso corpo capaz de bombear o sangue a todos os pontos do nosso organismo, através das artérias coronárias. O seu correcto funcionamento depende do ritmo, da elasticidade e sua agilidade. É o ritmo demasiado alquebrado que é causador da doença coronária que afecta milhões de pessoas em todo o mundo (*Giannini S.D., 2000*).

O “sistema vascular” (sistema circulatório) é complexo, porém os vasos sanguíneos individuais estão entre as estruturas teciduais mais simples do organismo. Um vaso sanguíneo é formado por três tipos celulares: células endoteliais que formam a túnica íntima, células musculares lisas que compõem a túnica média, tecido conjuntivo e fibras colagénicas e elásticas constituem a a túnica adventícia (*Montenegro M.R., 1999; Ross R., 1999*).

Quando se considera a incrível complexidade dos sistemas do corpo humano, juntamente com o vasto número de possíveis fontes de doenças e de morte, parece incrível que a vida de tantos indivíduos dependa em última análise do bom estado de duas artérias: as coronárias (*Montenegro M.R., 1999; Ross R., 1999*).

São duas as artérias coronárias responsáveis pela condução do sangue: artéria coronária direita e artéria coronária esquerda. Esta última, por sua vez, compreende duas artérias secundárias muito importantes: a artéria descendente anterior e a artéria circunflexa. Cada uma destas artérias

transporta o sangue a um território determinado do coração. Quando as artérias coronárias não apresentam alteração, não existem obstáculos à passagem de sangue no seu interior. Por outro lado, quando estas se obstruem, existirão zonas no coração que não serão irrigadas o suficiente (Montenegro M.R., 1999; Ross R., 1999).

A extrema importância das artérias coronárias deve-se ao facto de serem a única fonte de suprimento sanguíneo do miocárdio. Qualquer alteração significativa no fluxo sanguíneo, através destes vasos, pode prejudicar toda a função do miocárdio, com sérias consequências, incluindo a morte súbita (Montenegro M.R., 1999; Ross R., 1999).

Esta disfunção coronária pode manifestar-se de duas formas: angina de peito ou enfarte do miocárdio. A obstrução parcial e temporal do fluxo sanguíneo no músculo cardíaco manifesta-se em angina de peito, ao passo que, uma obstrução total e prolongada do fluxo conduz ao enfarte do miocárdio. Numa grande percentagem dos casos, a angina de peito precede o aparecimento do enfarte de miocárdio.

Numa situação de angina de peito, é característico o aparecimento de dor torácica ou de dor no lado esquerdo do peito de intensidade variável, podendo estender-se ao pescoço, mandíbula e braços, principalmente. Em situações de exercício físico é normal que ocorra sobrecarga no funcionamento cardíaco logo, nas situações de doença coronária as necessidades de compensar o esforço não são correspondidas, o que provoca a referida dor (Montenegro M.R., 1999; Ross R., 1999).

O enfarte do miocárdio define-se como “a morte de um determinado território do coração” em consequência da interrupção aguda e prolongada do fluxo sanguíneo. O seu sintoma principal é o aparecimento de dor de características similares às da angina de peito, mas de maior duração (Montenegro M.R., 1999; Ross R., 1999).

1.2. Célula endotelial e o endotélio

A célula endotelial é a unidade do endotélio que, na sua integridade estrutural e funcional, compõe uma monocamada pavimentosa localizada entre o sangue circulante e a camada média dos vasos, posição estratégica para a manutenção da homeostasia. O endotélio reveste todo o sistema vascular desde o coração, as grandes artérias, os capilares e toda a rede venosa e linfática. Anatomicamente, devido à privilegiada extensão, tem a capacidade de detectar mínimas alterações e, através de imensa rede de transmissão de dados, controla activamente o tónus

vascular, a coagulação, a trombólise, a remodelação vascular e a resposta inflamatória e imune. Funcionalmente, o seu conjunto comporta-se como um órgão de impacto a quase todas as doenças, sendo o primeiro a reagir (*Furchgott R.F. e Zawadzki J.V., 1980*).

As modificações são detectadas pelo endotélio em qualquer local do organismo e as informações são transmitidas por meio de comunicações intercelulares para todas as outras células endoteliais que participam local ou sistemicamente, dependendo da repercussão da agressão. Considera-se a célula endotelial o mais perfeito sensor biológico existente (*Nascimento C.A. et al, 2003*). O endotélio normal é um órgão multifuncional versátil, além da manutenção da barreira à permeabilidade, tem inúmeras propriedades sintéticas e metabólicas que interpretam e respondem a estímulos físicos e químicos. As principais propriedades e funções da célula endotelial são: elaboração de anticoagulantes e de moléculas antitrombóticas (prostaciclina, trombomodulina, factor tecidual activador do plasminogénio, moléculas semelhantes à heparina); elaboração de moléculas protrombóticas [factor de von Willebrand (Factor VIIIa), factor tecidual, inibidor do activador do plasminogénio]; produção de matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos); modulação do fluxo sanguíneo e da reactividade vascular [vasoconstritores - endotelinas, enzima conversora da angiotensina (ACE), vasodilatadores - NO/factor de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), prostaciclina]; regulação da inflamação e da imunidade [interleucinas (IL-1, IL- 6, IL-8)]; moléculas de aderência [moléculas de adesão celular vascular (VCAMs), moléculas de adesão intercelular (ICAMs), integrinas e selectinas, antigénios de histocompatibilidade]; regulação do crescimento celular [estimuladores do crescimento - factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factor estimulador de colónias (CSF), factor de crescimento de fibroblastos (FGF) e inibidores do crescimento-heparina, factor beta de transformação do crescimento (TGF- β)]; LDLox (*Luz P.L. e Favarato D., 2003*).

1.3. Aterosclerose

A aterosclerose humana é um processo lento, multifactorial, sistémico, progressivo (*Hackam G.D. e Anand S.S., 2003*), determinado por respostas celulares e moleculares, altamente específicas, às agressões da parede arterial (*Eldika N. et al, 2004; Da Luz P.I. e Uint L., 2003*).

Este processo caracteriza-se pelo estreitamento dos vasos que suprem o coração em decorrência do espessamento da camada interna da artéria devido ao acumulação de placas de ateroma (*Allsen, P.E. et al, 2000; Barbenti, V..J., 2003*).

Observações fisiopatológicas em seres humanos e animais levantam a hipótese de que a aterosclerose é resultante de uma resposta do organismo à injúria tecidual com enfoque para a disfunção endotelial (há desequilíbrio na produção de substâncias pelo endotélio e um aumento de substâncias vasoconstrictoras, protrombogénicas, pró-inflamatórias e proliferativas) (Luz P.L. e Favarato D., 2003).

Sendo assim, aterosclerose acomete lentamente, por intermédio de disfunção endotelial, inflamação, proliferação celular e alteração da matriz extracelular (Dzau V.J. et al, 2002) a todos os territórios arteriais, com destaque para a aorta e seus ramos principais, como as artérias carótidas, renais, ilíacas e femorais, assim como o leito coronário ao longo da vida dos indivíduos. Estágios iniciais da doença aterosclerótica desenvolvem-se na infância de maneira silenciosa e progressiva. Estrias gordurosas, provavelmente a lesão mais precoce da aterosclerose, aparecem na aorta e nas artérias carótidas, independente da etnia, género ou ambiente (Strong J.P., 1992; Berenson G.S. et al, 1992; Ross R., 1986; Schoen F., 1996; Montenegro M., 2002) e são observadas nas artérias coronárias e cerebrais na adolescência (Strong J.P., 1992). As primeiras manifestações clínicas aparecem, geralmente no adulto (Ross R. e Harker L., 1976) sob a forma de complicações vasculares, como angina de peito e enfarte agudo do miocárdio (EAM) por doença arterial coronariana (DAC), de acidentes vasculares encefálicos e de aneurismas, entre as mais comuns (Sternby N.H. et al, 1999). As doenças consequentes às complicações vasculares da aterosclerose são hoje a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos, sendo responsáveis por mais de 50% dos óbitos em centros urbanos industrializados (Banning M., 2000).

Relatos da Organização Mundial de Saúde estimam que até o ano 2020 a aterosclerose será a causa de 40% das mortes de todo planeta (World Health Organization, 1996).

A aterosclerose resulta da inter-relação multifactorial e complexa entre endotélio vascular, lipídios, macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas, modulada pela presença de uma série de factores de risco, alguns com importante determinante genético e outros basicamente ambientais. Do primeiro grupo citam-se: as hiperlipidemias e a hipercolesterolemia familiar (Assmann G. et al, 1999), HTA (MacMahon S. et al, 1990; Collins R. et al 1990), diabetes mellitus, síndrome metabólica (Hayden J.M. e Reaven P.D., 2000), história familiar de DAC (Goldbourt U. e Neufeld H.N., 1986), hiperhomocisteinemia (Gerhard G.T. e Duell P.B., 1999); do segundo grupo constam: tabagismo (U.S. Department of Health and Human services, 1989), alimentação rica em colesterol e gorduras saturadas (Assmann G. et al, 1999) e agentes infecciosos (Hu H. et al, 1999).

Apesar, de um conjunto de factores de risco clássicos e emergentes (marcadores inflamatórios²; marcadores hemostáticos/trombóticos³; factores plaquetários⁴) estarem correlacionados na patogenia da doença aterosclerótica, as LDL têm ocupado, como já foi referido, um papel importante na etiologia da doença aterosclerótica. Esta doença é a principal representante dos processos patológicos cardiovasculares ligados ao envelhecimento (*Hazzard W.R., 1989*), uma vez que, se manifesta em indivíduos adultos, cuja incidência aumenta exponencialmente a partir dos 45 anos de idade. No entanto, alguns estudos detectaram a prevalência de placas ateroscleróticas superior a 40% nas autópsias de adultos jovens, sugerindo que o processo aterosclerótico ocorra precocemente (*McGill H.C. et al, 2000*). Além disso, Napoli et al (*Napoli C. et al, 1997*) postulam que a aterosclerose pode ter início na fase fetal, intra-uterina (podendo ser potencializada por hipercolesterolemia materna), progredir lentamente na adolescência e apresentar manifestações clínicas na idade adulta. Países como a Groenlândia, Islândia e Japão têm baixa prevalência de aterosclerose, principalmente entre os esquimós, sugerindo uma forte relação com o estilo de vida, dieta e composição genética dos indivíduos (*Bang H.O. et al, 1976; Bang H.O., 1990*).

O conhecimento da fisiopatologia desta doença tem evoluído desde o século passado, quando, em 1970, a ideia da existência de relação directa entre lípidos e aterosclerose dominava o pensamento médico, devido a estudos experimentais e clínicos, demonstrando forte relação entre hiperlipidemia e formação de ateroma (*Ross R. e Harker L., 1976*). Entretanto, actualmente, as evidências científicas demonstram que os mecanismos envolvidos na génese da doença aterosclerótica são extremamente complexos e envolvem a interacção de componentes genéticos, ambientais e resposta inflamatória (*Hackam G.D. e Anand S.S., 2003; Libby P., 2002; Stein O. et al, 2002; Hulthe J. e Fagerberg B., 2002*).

1.3.1 A placa aterosclerótica e a sua fisiopatologia

Estudos clínicos e experimentais desenvolvidos nas últimas décadas atestam o papel central do colesterol na formação e desenvolvimento iniciais da aterogénese, na sua evolução, nas complicações e nos desfechos clínicos (*Assmann G. et al, 1999*).

² Proteína C Reactiva

³ Fibrinogénio, factor V, VII e VIII

⁴ Tamanho e volume plaquetário, agregação plaquetária

A maior concentração do colesterol circula no plasma sob a forma de moléculas de LDL. As partículas de LDL possuem um núcleo lipofílico formado de ésteres de colesterol e triglicerídeos. A sua superfície polar é constituída por colesterol não esterificado e fosfolipídios, os quais estão envolvidos num polipeptídeo que é a apolipoproteína B-100 (apoB). Parte considerável de seu conteúdo lipídico é representado por ácidos gordos poliinsaturados (Keaney J.F., 2000). As moléculas de LDL circulantes atravessam o endotélio por difusão passiva ao nível das junções intercelulares. A entrada da LDL na parede vascular é directamente proporcional à sua concentração plasmática. Quando ocorre a disfunção endotelial, por diminuição ou perda das propriedades vasodilatadoras, resulta um aumento da permeabilidade às lipoproteínas (Ross R. e Glomset J.A., 1976). Logo abaixo do endotélio, acontece retenção de LDL no fluído íntimal, situação determinante para o desenvolvimento da aterosclerose (Pentikainen M.O. et al, 2000). Neste espaço, a LDL sofre modificações químicas e enzimáticas que incluem oxidação, lipólise, proteólise e agregação da sua molécula, transformando-se em LDL “modificada”. Bem diferente da LDL nativa, a LDL modificada é aterogénica, determinando uma série de respostas inflamatórias, que precedem a formação e o desenvolvimento da placa (Steinberg D. e Witztum J.L., 1990).

A oxidação é uma das mais significativas modificações da LDL e ocorre quando ela é exposta aos resíduos oxidativos, como os radicais livres de oxigénio, do metabolismo celular do endotélio, de macrófagos e células musculares lisas (Lusis A.J., 2000).

Inicialmente, a oxidação restringe-se ao conteúdo lipídico, dando origem à LDL minimamente modificada - (Figura I).

Em sequência, os ácidos gordos decompõem-se, gerando cetonas e aldeídos reactivos, os quais, interagindo com grupos lisina e histidina da apoB, geram aductos lipoprotéicos, alterando a carga eléctrica, a densidade e as propriedades eletroforéticas da molécula de LDL (Masuda J. e Ross R., 1990). A oxidação da LDL é um processo complexo e todos os seus componentes, quer protéico, quer lipídico, são, em maior ou menor escala, atingidos de forma variável. Assim, não existe uma só partícula bioquimicamente definível de LDLox, mas um amplo espectro de lipídios, fragmentos polipeptídios e formas mistas oxidadas, diferentes tanto na conformação estrutural quanto funcionalmente (Krieger M., 1997). A LDLox apresenta carga eléctrica negativa e deixa de ser reconhecida pelo seu receptor celular típico. Passa, então, a ser reconhecida pelos chamados receptores de varredura ou receptores scavenger, moléculas de superfície presentes, entre outros, nos macrófagos e nas células musculares lisas (Goldstein J.L. et al, 1979; Witztum J.L. e Steinberg D., 1991).

A LDLox tem acção quimiotáctica para monócitos e linfócitos T circulantes (Libby P., 2000). Por activação do factor nuclear NFkB a LDLox induz transcrição génica e consequente expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial (Collins T. e Cybulsky M.I., 2001). A selectina-P, a selectina-E e a molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) são mediadoras do rolamento e fixação dos leucócitos circulantes ao endotélio (Johnson - Tiddey R.R. et al, 1994). Uma vez aderidos, migram, por diapedese, para a íntima sob a acção de quimiocinas como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (Yla – Herttuala S. et al, 1991). As quimiocinas são produzidas por células endoteliais em resposta a mediadores inflamatórios como o interferão gama (IFN- γ) e por forças locais de cisalhamento entre o endotélio e o sangue circulante. Os monócitos juntos e co-localizados com LDLox no subendotélio são activados e transformam-se em macrófagos. Nesse processo toma parte fundamental o factor estimulador de colónias de macrófagos (M-CSF), citocina produzida por macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas sob estímulo da LDLox. Os macrófagos activados expressam, na sua superfície, receptores de varredura como: CD36, CD68 (macrossialina), LOX-1, receptor acetilado do LDL (SR-A) e receptores toll-like (TL) (Steinberg D. e Lewis A., 1997) A interação entre LDLox e seu receptor promove a endocitose da partícula e sua degradação lisossomal. A expressão e a activação dos receptores de varredura são reguladas pelo factor de transcrição nuclear Receptor Activador da Proliferação de Peroxissoma gama (PPAR- γ), cujos ligantes são a própria LDLox e citocinas como o factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IFN- γ (Nagy L. et al, 1998). Com o acumulação progressivo de ésteres de colesterol no seu interior, os macrófagos transformam-se em células espumosas, reconhecidas como precursoras do processo aterosclerótico (Libby P., 2000). Os receptores de varredura não são regulados pelo conteúdo de LDLox intracelular. Ocorre, então, um depósito maciço de colesterol no citoplasma das células espumosas que, uma vez iniciado, tende a amplificar-se por si mesmo. Contudo a LDLox em excesso é citotóxica e, assim, as células espumosas necrosam e libertam o seu conteúdo para o espaço intersticial. A acumulação de detritos e de colesterol extracelulares forma o núcleo do ateroma. Macrófagos activados e linfócitos T libertam factores de crescimento como interleucina-1 que induzem a proliferação e a migração de células musculares lisas da túnica média para o subendotélio (Ross R., 1993). Estas células digerem lipídios extracelulares por fagocitose e contribuem para o aumento do núcleo da lesão. Além disso, diferenciam-se em fibroblastos, produzindo macromoléculas da matriz extracelular como colagénio, elastina e proteoglicanos. O colagénio cria uma capa fibrosa ao redor dos depósitos lipídicos que ficam restritos à parede arterial, formando as chamadas estrias gordurosas. Essas placas lipofibrosas caracterizam-se por um núcleo necrótico, conteúdo

crecente de cristais de colesterol, matriz extracelular, células inflamatórias e células musculares lisas, recobertas por uma capa fibrosa. O conteúdo necrótico da lesão é representado por macrófagos, células espumosas, células musculares lisas que se desintegram, quer por efeito citotóxico directo do seu componente lipídico, quer por apoptose induzida por citocinas produzidas localmente. Com a evolução, as placas ateroscleróticas podem protuberar para o lume vascular, causar remodelamento arterial, ulcerar e/ou calcificar (Ross R., 1993).

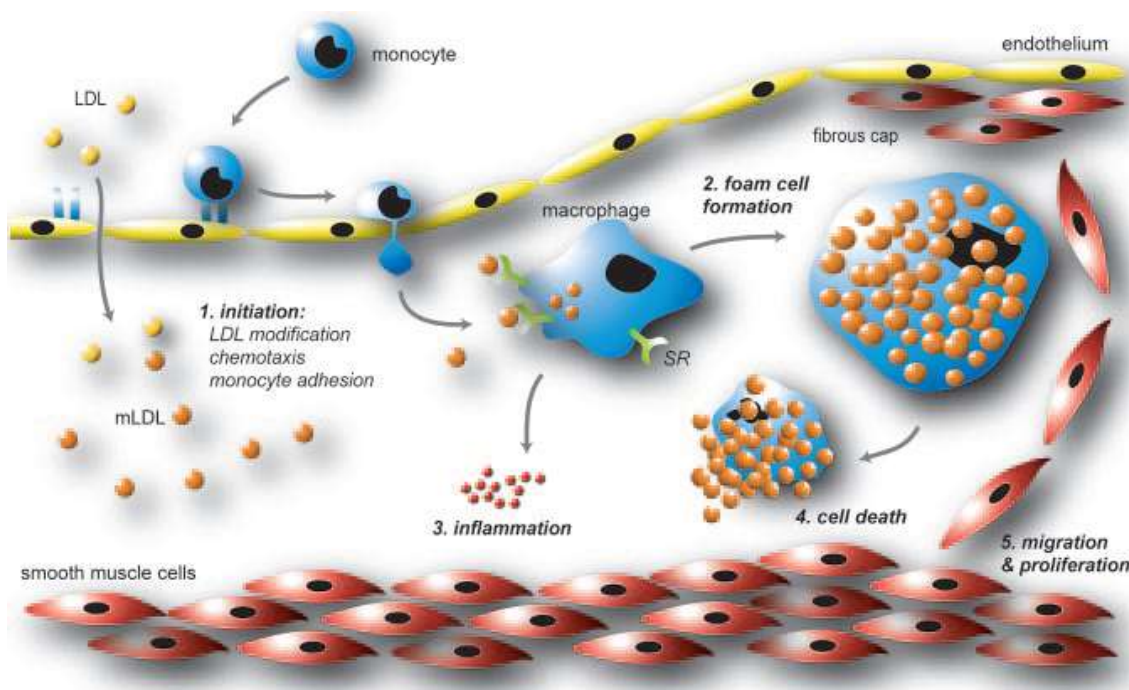


Figura I - Esquema representativo da aterosclerose que indica os diferentes tipos de células envolvidas no processo

Este é potencialmente afectado pela activação do NFkB. O início da aterosclerose é caracterizada pela formação das LDL modificadas, seguida pela activação subsequente de células endoteliais e secreção de quimiocinas. A migração dos monócitos ocorre, através da camada endotelial, onde se diferenciam em macrófagos, resultando na formação de células de espuma. O processo é acompanhado de respostas inflamatórias. Mais tarde, ocorre a formação de uma cápsula fibrótica, proliferação e migração das células musculares lisas e morte celular, dando origem a um núcleo necrótico (Winther M. et al, 2005).

Estudos histopatológicos revelam que placas vulneráveis apresentam uma fina capa de colagénio recobrendo um núcleo com grande acumulação de colesterol livre e esterificado na matriz extracelular, alta densidade de macrófagos, células espumosas e linfócitos T (Guyton J.R. e Klemp K.F., 1996). A placa aterosclerótica torna-se instável quando sua capa fibrosa fractura e expõe o conteúdo altamente trombogénico do seu núcleo ao sangue circulante. O conteúdo subcapsular,

que é rico em colagénio e em factor tecidual, quando expostos à circulação, promove adesão e activação plaquetária, activação da cascata de coagulação e trombose (Virmani R. et al, 2002). A perda de continuidade da capa fibrosa pode ocorrer por erosão superficial, por hemorragia intraplaca decorrente de neoangiogénese íntima e por ruptura. A ruptura da capa fibrosa é o mecanismo mais comum da instabilidade da placa e dá início aos processos hemostáticos que conduzem à formação de trombos intravasculares e síndromes agudas. Ocorre mais frequentemente nas suas margens, ou seja, nos sítios de junção com a parede arterial. Nesse local, as placas vulneráveis são particularmente ricas em macrófagos e linfócitos T activados, apresentando poucas células musculares lisas e pequena quantidade de colagénio (Shah P.K., 2003). Constatou-se que a secreção de citocinas pelas células T modula todo processo inflamatório (Hansson G.K. et al, 1989; Ross R., 1993). Assim, surgiram hipóteses de que respostas imunológicas, moduladas por auto-anticorpos e/ou imunocomplexos, em resposta às propriedades antigénicas da placa aterosclerótica e dos seus componentes, poderiam ser o gatilho para a instabilidade de lesões vulneráveis (Heistad D.D., 2003; Fuster V. et al, 1990; Guyton J.R. e Klemp K.F., 1996; Virmani R. et al, 2002; Shah P.K., 2003; Jonasson L. et al, 1989).

1.4. Factores de risco associados à aterosclerose

Factor de risco é qualquer traço, característica ou alteração que possa predizer a probabilidade de um indivíduo manifestar uma determinada doença. São também factores que activam o envelhecimento por aceleração da doença crónica degenerativa acarretando uma diminuição da expectativa de vida. O melhor conhecimento dos factores de risco tem sido uma das causas de aumento de expectativa de vida. Estudos epidemiológicos têm revelado diversos factores de risco genético – ambientais importantes associados à aterosclerose. Uma vez que, esta doença é postulada como uma doença progressiva caracterizada pela acumulação de lípidos, elementos fibrosos e inflamatórios, especificamente de resposta à injúria endotelial vascular, toda esta situação pode resultar da interacção de várias forças, incluindo anormalidades metabólicas e nutricionais, tais como hiperlipidemias (**Tabela I**), forças mecânicas associadas como, a HTA (**Tabela I**), toxinas exógenas como aquelas encontradas no tabaco (**Tabela I**), proteínas anormalmente glicosiladas associadas com a diabetes mellitus (**Tabela I**), lípidos ou proteínas modificadas oxidativamente e, possivelmente, infecções virais e bacterianas (**Esquema I**) (Hackam G.D. e Anand S.S., 2003; Stein O. et al, 2002; Hulthe J. e Fagerber B., 2002; Braunwald E., 1998).

Existem outros três factores de risco que também se encontram associados à doença aterosclerótica, nos quais não é possível intervir, que é a idade (**Tabela I**), género (**Tabela I**) e genética (antecedentes familiares).

A homocisteína, processos inflamatórios e radicais livres, também têm sido classificados como factor de risco, apresentando funções importantes nos diversos processos fisiológicos da doença aterosclerótica.

Esquema I- Eventos iniciais na formação de lesão aterosclerótica
(*Gottlieb M.G.V. et al, 2005*)

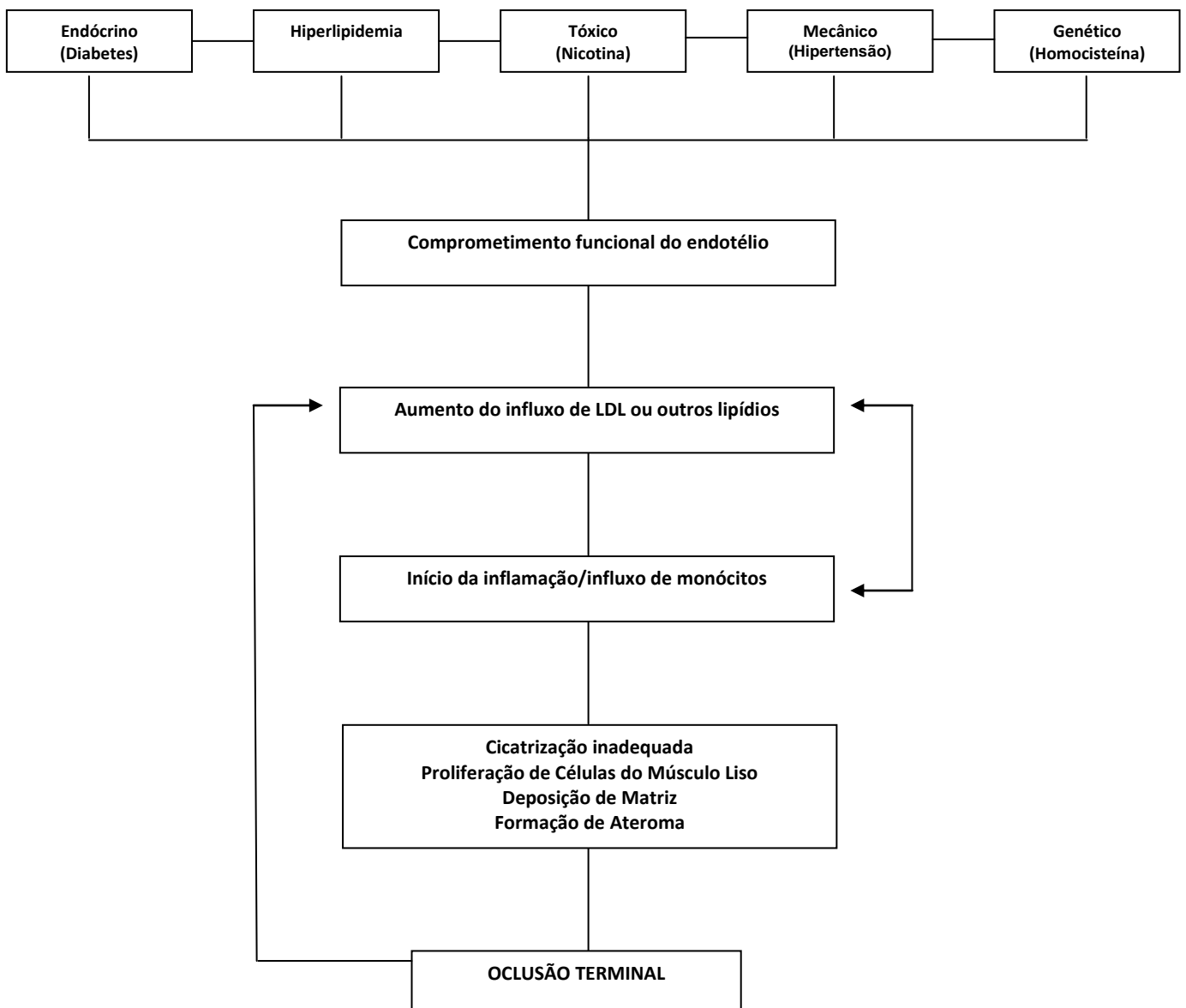


Tabela I – Factores de risco envolvidos na aterosclerose

Hipertensão arterial	Tabagismo
<p>Deve ser enfatizado que a HTA, por si só, não é aterogénica. Em estudos, onde foram utilizados animais de laboratório com níveis normais de colesterol, a HTA não induziu aterosclerose (Falk E. e Fuster V., 2001). Entretanto, tem sido demonstrado que esta pode acelerar o processo aterosclerótico. A HTA pode promover a aterogénese por um efeito directo na arquitetura vascular. Artérias expostas à hipertensão aumentam a permeabilidade vascular, permitem a migração das macromoléculas, incluindo as lipoproteínas, na camada íntima. Já as células musculares lisas residem no subendotélio arterial e não são expostas a ponto de stress devido à sua localização medial na parede arterial (Xu C. et al, 2001).</p> <p style="text-align: center;">Idade</p> <p>As doenças degenerativas são processos que necessitam de tempo para se instalarem; assim, o raciocínio clínico deve ser que as pessoas com mais idade apresentam, com maior frequência, os sinais e sintomas de aterosclerose. Para homens acima dos 50 anos a prevalência aumenta e evolução similar é vista também em mulheres (Reid H.L. et al, 1976).</p>	<p>O tabagismo tem sido associado ao aumento da incidência de EAM, morte súbita e acidente vascular encefálico. Existem evidências entre o hábito de fumar e as doenças arteriais. A nicotina promove hiperlipidemia, através da estimulação da lipólise, aumenta o LDL e diminui a lipoproteína de alta densidade (HDL). Promove um aumento do tónus vascular, submetendo o vaso, algumas vezes, a um maior stress, causa edema nas células endoteliais, afecta as células musculares lisas, convertendo-as de um fenótipo contráctil num fenótipo sintético (Olsson A.G. e Molgaard J., 1990). Os gases oxidantes do fumo do cigarro resultam em altos níveis de LDLox, o que confere um risco aumentado de aterosclerose observado nos pacientes consumistas. O dano endotelial secundário ao tabagismo tem sido bem documentado (Olsson A.G. e Molgaard J., 1990). Foi demonstrado que o fumo pode exercer actividade acumulativa e irreversível sobre as artérias, pela medida do espessamento das paredes da artéria carótida. Num período de três anos, foi mostrado que, num fumador, ocorria um aumento de 50% na progressão da aterosclerose, sendo de 25% nos ex-fumadores e de 20% em fumadores não passivos (Olsson A.G. e Molgaard J., 1990; Hawkins R.I., 1972).</p>
Género	Hipercolesterolemia
<p>O processo de aterosclerose aparece com mais frequência entre os homens em idade mais precoce do que nas mulheres com actividade ovárica plena. A partir do climatério a estatística iguala-se entre os dois géneros. Isto deve-se, porque o colesterol é utilizado pelo organismo da mulher para a produção da hormona estrogénica; assim, a hipercolesterolemia, na maioria das mulheres, só atinge nível aterogénico após o climatério (Reid H.L. et al, 1976).</p>	<p>Existe uma grande evidência epidemiológica e de estudos intervencionistas que demonstram a importância do alto nível de colesterol na formação de placas ateroscleróticas. A lipoproteína LDL é a que contém a maior concentração de colesterol (60-70% do colesterol sérico total) (Parthasarathy S. et al, 1992).</p>
Diabetes Mellitus	
<p>A diabetes mellitus pode promover a aterosclerose, pois 75% das hospitalizações de diabéticos estão relacionadas a complicações cardiovasculares. Estes doentes apresentam alterações significativas no perfil lipídico e a HTA é duas vezes mais prevalente nesses pacientes. Há consenso de que a aterosclerose é mais acelerada e difusa em diabéticos e que o mecanismo responsável é multifactorial (American D.A., 1990). Em pacientes com níveis elevados de glicose (não-diabéticos), mantêm o risco elevado de desenvolver aterosclerose (Wilson P.W.F. e Kannel W.B., 1992). Tem sido demonstrado que a LDL glicosilada aumenta a formação de células espumosas encontradas na fase inicial da aterosclerose. Alguns dados demonstram que mecanismos imunes também têm papel importante no desenvolvimento de aterosclerose em paciente diabético. Lipoproteínas modificadas dão início à formação de auto-anticorpos que interagem com LDLox e, esses complexos, englobados pelos macrófagos, estimulam a libertação de citocinas e factores de crescimento que levarão à progressão da formação da placa. Além de afectar as células musculares lisas, a hiperglicemia afecta também os componentes da matriz extracelular. Em pacientes com diabetes, a membrana basal, normalmente uma estrutura amorfa, composta de colágeno tipo IV, glicoproteínas e proteoglicanos está espessa, podendo atingir a estabilidade da parede do vaso (Lopes V.M. e Virella G., 1992).</p>	

Autópsias realizadas em crianças a partir dos dois anos e em indivíduos jovens falecidos, por acidentes traumáticos, revelam a existência de lesões ateroscleróticas (estrias lipídicas e placas fibróticas) na aorta e nas coronárias, numa extensão crescente com a idade (Bereson G.S. et al, 1998). Regista-se nesses estudos uma forte correlação entre factor de risco de patologia cardiovascular e a extensão das lesões arteriais. Os principais factores de risco associados às referidas lesões são o excesso de peso/obesidade, a tensão arterial elevada para a idade e um perfil lipídico adverso (colesterol total, LDL e triglicéridos totais superiores ao percentil 95 e colesterol das HDL inferior ao percentil 5) (Bereson G.S. et al, 1998; Strong J.P. et al, 1992). A reconhecida estabilidade relativa dos referidos factores de risco, ao longo da idade pediátrica, até à idade adulta, assim como, o início da agressão vascular, desde os primeiros tempos de vida, ajudam a perceber o estabelecimento e desenvolvimento das lesões vasculares. Assim, com todas estas situações é possível o reconhecimento da aterosclerose como doença de raízes pediátricas, cuja prevenção deve iniciar-se desde a vida fetal e nascimento.

1.5. Polimorfismos genéticos na procura de novos factores de risco

A predisposição genética para a doença aterosclerótica envolve múltiplos genes, dos quais apenas se conhece o papel de uma minoria. Menos conhecido é ainda o modo como ocorre a interacção gene-gene e a interacção gene-ambiente. Nalgumas famílias a doença é maioritariamente explicada por um único gene major (doença monogénica), de que é excelente exemplo a hipercolesterolemia familiar.

Múltiplos factores genéticos têm sido identificados como determinantes do risco de doença aterosclerótica. Estimam-se que mais de 400 genes possam estar envolvidos na regulação de processos tais como a função endotelial, a coagulação, a inflamação e o metabolismo dos aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono (Funke H. e Assmann G., 1999). Destes processos, o metabolismo das lipoproteínas é provavelmente o que melhor se conhece estando identificados muitos genes nele envolvidos, alguns dos quais fortemente relacionados com a aterosclerose ou com a doença cardiovascular (Doevendans P.A. et al, 2001).

Esta multiplicidade de factores ilustra a complexidade da relação genética entre a aterosclerose e HTA, bem como, a dificuldade em identificar, por um lado, os factores genéticos de risco e, por outro lado, estabelecer valores preditivos de risco de fenótipos intermédios de doença.

a) Factores genéticos

É amplamente reconhecido que a história familiar de doença cardiovascular está associada na criança a um risco aumentado de desenvolvimento de doença e das suas sequelas clínicas futuras. Estudos em gémeos revelaram um risco de doença mais idêntico nos monozigóticos comparativamente aos dizigóticos. Em estudos com crianças adoptadas demonstraram que o risco está mais dependente de factores genéticos do que de factores ambientais. Contudo, os mecanismos pelos quais uma história familiar de doença cardiovascular aumenta o risco de doença, são ainda em grande parte desconhecidos (Guerra A., 2008).

A tabela que se segue ilustra alguns dos polimorfismos genéticos já identificados como potenciais factores de risco na aterosclerose (Tabela II).

Tabela II– Polimorfismos genéticos como factores de risco na aterosclerose

Metabolismo lipídico	<ul style="list-style-type: none">○ Receptor LDL○ Lipase da lipoproteína○ Apolipoproteína E (Apo E)○ Apolipoproteína B (Apo B)
Regulação da tensão arterial	<ul style="list-style-type: none">○ Angiotensinogénio○ Inibidor da enzima conversora da angiotensina○ Receptor da angiotensina II (A1166C), tipo 1
Metabolismo da homocisteína	<ul style="list-style-type: none">○ Cistationina beta-sintetase○ Metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR)
Trombose	<ul style="list-style-type: none">○ Factor II (Protrombina)○ Factor V (Factor V Leiden)○ Factor VII
Fibrinólise	<ul style="list-style-type: none">○ Inibidor 1 do activador do plasminogénio○ Fibrinogénio
Função plaquetária	<ul style="list-style-type: none">○ Glicoproteína IIIa
Função endotelial/ resposta inflamatória	<ul style="list-style-type: none">○ Citocinas e metaloproteases○ Óxido nítrico sintetase endotelial○ Molécula de adesão leucocitária endotelial

2. Factor nuclear de transcrição NFkB

Durante a última década, têm ocorrido grandes avanços na descoberta dos mecanismos de activação e desactivação dos genes. De particular interesse está o grupo de proteínas, factores de transcrição, que desempenham papéis fundamentais na regulação e expressão dos genes. Em virtude da sua capacidade para interagir com sequências específicas do ácido desoxirribonucléico (ADN), que são únicas para cada factor de transcrição, nas regiões reguladoras dos genes, os factores de transcrição servem para modificar não só a magnitude da expressão dos genes, como também a especificidade do sinal. Esta especificidade está determinada, em parte, pela presença ou ausência de uma zona de união na região promotora do gene alvo. Os factores de transcrição não funcionam isolados. Pelo contrário, formam canais reguladores mediante os quais alguns factores interagem para regular a transcrição génica. Incluindo as combinações sinérgicas, os factores de transcrição não são os únicos responsáveis pela regulação génica. Nesse sentido, são muito importantes os sinais extracelulares que originam modificações na união do ADN e os domínios de transactivação dos factores de transcrição. A fosforilação, que se desencadeia por sinais bioquímicos dos receptores das superfícies celulares, é um meio comum para alterar a função dos factores de transcrição (*Papavavassilio A.G., 1995; Rosenthal N., 1994*).

Como um importante factor de transcrição na resposta inflamatória tem-se o NFkB. Descoberto em 1986, o NFkB, é um factor nuclear que, uma vez activado, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve k das moléculas de anticorpo das células B (kB) (*Sen R. e Baltimore D., 1986*).

O número de genes descritos que são regulados por NFkB é superior a 160 (**Tabela III**), ao passo que, o número de factores que se sabem induzir a activação via NFkB é ainda mais elevado (*Winther M. et al, 2005*). O NFkB é um factor de transcrição usado extensamente na regulação da expressão génica, que desempenha um papel fundamental em muitas respostas celulares às alterações ambientais. A sua activação conduz a uma expressão coordenada de vários genes que codificam proteínas, citocinas, moléculas de adesão e enzimas, assim como, NO sintetase, COX2 e factor tecidual, implicados na iniciação e permanência da resposta *inflamatória* (*Bauerle P.A. e Baltimore D., 1986; Barnes P.J. e Karin M., 1997*). O número de mediadores que participam na aterosclerose e em outros processos vasculares que podem activar o NFkB está a crescer. Muitos destes indutores do NFkB e genes regulados por este factor nuclear, têm sido implicados directa ou indirectamente, na aterosclerose (*Bauerle P.A. e Baltimore D., 1986; Barnes P.J. e Karin M., 1997*).

Tabela III – Genes regulados pelo factor de transcrição NFkB
(Ahn K. e Aggarwall B.,2005)

Citocinas/Quimiocinas	<ul style="list-style-type: none">○ Interleucinas - 2,6,8,9,10,11,13,15○ Interleucinas α,β○ Interferão γ○ Linfotóxina α, β
Moléculas de adesão celular	<ul style="list-style-type: none">○ ICAM - 1○ E- selectina○ VCAM-1○ Fibronectina○ MCP-1○ P- selectina
Enzimas	<ul style="list-style-type: none">○ Colagenase 1○ Transglutaminase
Reguladores da apoptose	<ul style="list-style-type: none">○ TRAF-1○ TRAF-2○ Caspase-11○ Bcl -2
Vírus	<ul style="list-style-type: none">○ Hepatite B○ Imunodeficiência Humana- 1 (HIV-1)○ Citomegalovirus○ Epstein -Barr
Imunoreceptores	<ul style="list-style-type: none">○ CD 40,48,83,137,154○ Cadeia leve da Imunoglobulina k○ MHC classe I○ Complemento B
Genes de resposta ao stress	<ul style="list-style-type: none">○ Angiotensina II○ COX 2○ Citocromo P 450○ Fosfolipase A2

NFkB é um complexo protéico, heterodimérico, composto por diferentes combinações de membros de factores de transcrição da família Rel. Factores de transcrição da família Rel/NFkB estão envolvidos no stress induzido, respostas inflamatórias. Em adição a isto, estas moléculas têm um papel importante no desenvolvimento de determinadas células hematopoiéticas, queranócitos e estruturas de órgãos linfóides. Muito recentemente, membros da família do NFkB foram implicados na progressão de neoplasias e na formação de sinapses neuronais. O NFkB é também um importante regulador nas decisões das células, assim como, na morte celular programada (apoptose) e controlo de proliferação (*Egido J. et al, 2000*).

Em estudos *in vitro* com cultivo de células endoteliais, células musculares lisas vasculares e células mononucleares demonstraram que LDLox, TNF α , Ang II, trombina, factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF), proteoglicanos e stress oxidativo activam o NFkB, levando à transcrição de genes regulados, como MCP-1, ICAM-1, VCAM-1. Tem-se demonstrado recentemente a presença de NFkB nas lesões ateroscleróticas experimentais humanas, estando o grau de activação de NFkB correlacionado com o grau de progressão da *aterosclerose* (*Egido J. et al, 2000*).

Obviamente, que devido ao papel que NFkB desempenha, numa ampla variedade de doenças, os inibidores de NFkB são extensivamente procurados (**Tabela IV**). Diferentes passos no percurso da activação do NFkB estão orientados de forma a ser possível o bloqueio deste factor de transcrição.

Tabela IV– Lista de inibidores do NFkB
(Ahn K. e Aggarwall B.,2005)

Agentes anti-inflamatórios	<ul style="list-style-type: none">○ Aspirina○ Ibuprofeno○ Flavenóides
Inibidores IKK	<ul style="list-style-type: none">○ AS602868○ DTD○ E3330
Vitaminas	<ul style="list-style-type: none">○ Vitamina C○ Vitamina D○ Vitamina E
Inibidores proteases/proteossomas	<ul style="list-style-type: none">○ Ciclosporina A○ BTEE○ APNE
Citocinas e Hormonas	<ul style="list-style-type: none">○ Glucocorticóides○ Estrogéneo○ Hormonas de crescimento

2.1 Estrutura NFkB

O NFkB é o nome geral de uma família de factores composto por homo e heterodímeros de cinco membros da família Rel, a qual inclui, NFkB1 (p50), NFkB2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel (Rel). Hetero e homo-dimerização das proteínas de NFkB exibem distintas e diversas especificidades de ligação (p50/RelA, p50/c-Rel, p52/c-Rel, p65/c-Rel, RelA/RelA, p50/p50, p52/p52, RelB/p50 e RelB/p52). Todas as proteínas da família Rel contêm uma região N – terminal conservada, denominada de RHD (Rel Homology Domain). Parte do N-terminal do RHD contém domínios de ligação ao DNA, onde o domínio de dimerização está localizado na região C-terminal do RHD. Na parte final do C-terminal do RHD existe o NLS (Nuclear Localization signal), que é essencial para o transporte de complexos activos de NFkB para o núcleo.

NFkB1 e RelA foram as primeiras proteínas do NFkB a ser identificadas. No seu N-terminal encontram-se 300 aminoácidos de alta similaridade à oncoproteína v-Rel. As proteínas Rel/ NFkB podem ser divididas em dois grupos: as combinações RelA (p65), RelB e c-Rel que contêm potentes TDs (domínios de transactivação) com sequências no C-terminal do RHD e p50 e p52 que não possuem TDs, logo não podem actuar como activadores transcricionais (*Zhang G.L. e Ghosh S., 2001*). Os TDs possuem um grande número de serinas abundantes e aminoácidos hidrofóbicos que são essenciais para activação da transactivação. O NFkB1 e NFkB2 produzem os precursores p105 e p100, respectivamente. Em conjunto, NFkB1 e seu precursor p105 são submetidos a proteólise pelo proteossoma celular que remove o C-terminal do IkB para gerar p50. O NFkB2 e seu precursor P100 podem ser processados para remover o C-terminal do IkB, como, pode permitir a participação activa do N-terminal P52 para funcionar no regulamento transcricional (*Lernbecher et al, 1993*).

Os dímeros do NFkB encontram-se sequestrados no citosol das células não estimuladas, via ligações não covalentes com a classe de proteínas inibitórias, denominadas de IKBs. Até à data, foram sete os IKBs identificados: IkB-alpha, IkB-beta, IkB-gamma, IkB-epsilon, BCL3, p100 e p105 (*Zhang G.L. e Ghosh S., 2001*). Todas estas proteínas inibitórias contêm múltiplas cópias de sequências de 30-33 aminoácidos, denominadas de repetições ankyrina que medeiam a associação entre IkB e dímeros de NFkB. Estas repetições interagem com a região RHD das proteínas NFkB e, por isso, o NLS previne a translocação nuclear. Sinais que induzem a actividade do NFkB causam a fosforilação dos IKBs, a sua dissociação e consequente degradação, seguida de uma activação do complexo NFkB. O complexo NFkB activado é translocado para o núcleo, liga-se ao DNA através do kB à zona 5'GGGRNNYYCC 3' – ou 5'HGGARNYYCC 3' (onde H é A (adenina), C (citosina) ou T (timina); R é A ou G (guanina) purina e Y é C ou T piridimina, induzindo a expressão do gene (*Silverman N. e Maniatis T., 2001*) (**Figura II**). A degradação das proteínas IKB permite às moléculas do NFkB translocarem-se para o núcleo. Esta degradação é realizada pelo proteossoma, mas só depois da fosforilação do IKB pelo IKK (I kB kinase complex). O complexo IKK é composto por três subunidades: IKK - α (IKK1), IKK - β (IKK2) e o modelador essencial NFkB (NEMO IKK- γ). O IKK1 e IKK2 têm actividade cinase, embora IKK2 apresente actividade de cinase mais dominante envolvida na fosforilação do IKB, enquanto IKK1, mostre parcial redundância na activação clássica do NFkB. NEMO não apresenta actividade cinase, mas é necessária para mediar a estimulação da activação do NFkB. O IKK - α é a cinase IKB predominante. O IKB fosforilado é reconhecido pelo complexo deubiquitina ligase que medeia a poli-ubiquitinação do IKB e consequente degradação

proteossomal (Figura II). Em contraste, o IKK- α , medeia a fosforilação dependente do processo de p100, resultando na geração do p52.

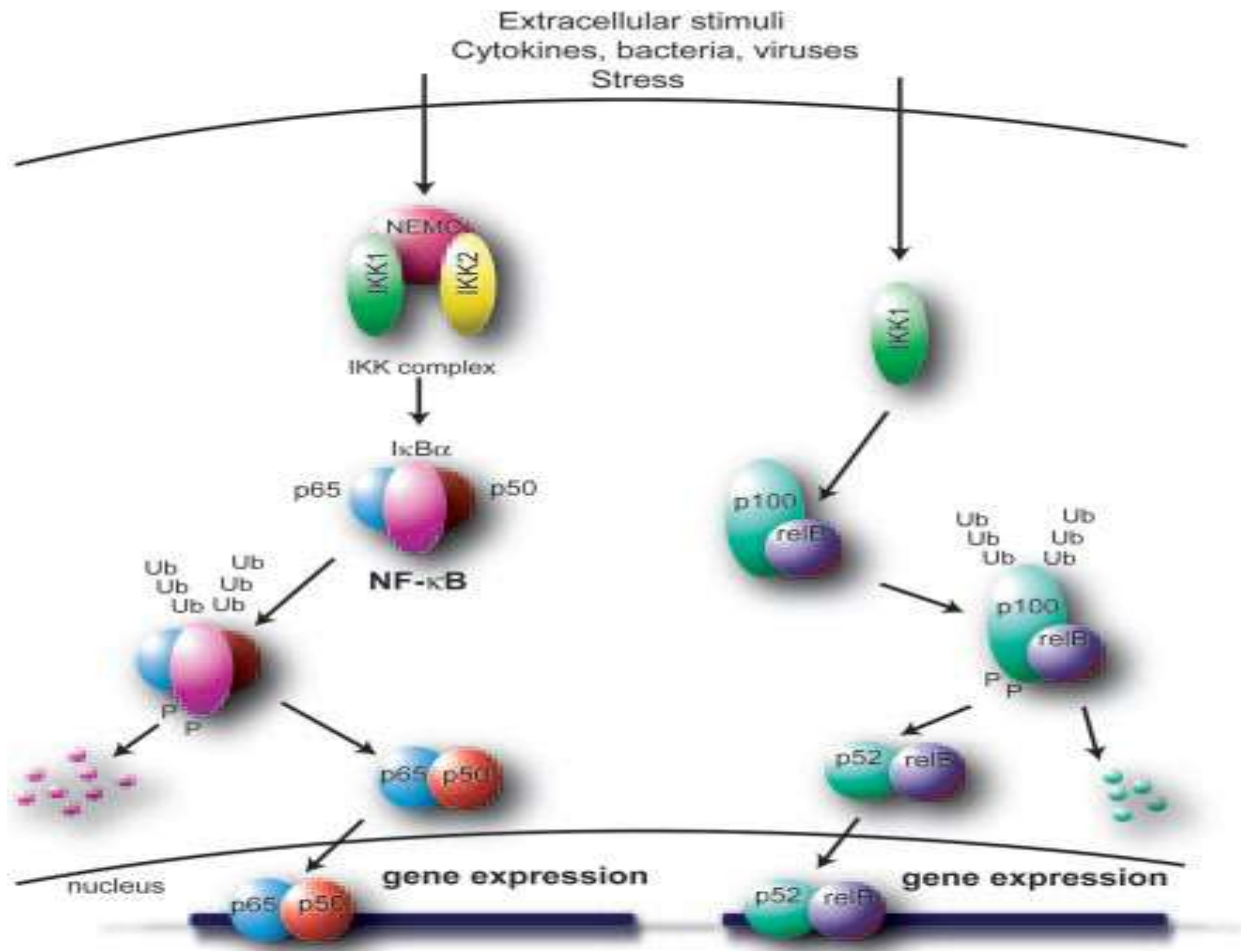


Figura II - Activação NFkB.As duas cascatas da sua activação

Activação da via clássica NFkB (esquerda) envolve a activação do complexo IKK com a subsequente degradação do I κ B- α e translocação nuclear do dímero NFkB. A activação da via alternativa NFkB(direita) é mediada através IKK1, resultando na proteólise de P100 para P52, havendo transferência nuclear do dímero relB-P52. Ub indica ubiquitinação (Winther M. et al, 2005).

2.2.NFkB: Propriedades aterogénicas

O papel importante do factor NFkB na aterosclerose encontra-se baseado apenas em estudos descritivos. Há diversos anos atrás, foi demonstrada a activação do NFkB em lesões ateroscleróticas humanas (*Brand K. et al, 1996*). Através da utilização de um anticorpo específico foi possível haver reconhecimento do p65 fosforilado, tendo-se observado NFkB activado em células musculares lisas, macrófagos e células endoteliais. Para além disto, foi demonstrado que hipercolesterolemia é capaz de induzir a activação do NFkB na parede do vaso de modelos suínos para aterosclerose. (*Wilson S.H. et al, 2000*).

Utilizando ratos, Hajra et al (2000) mostraram que há regiões juntas propensas a desenvolver aterosclerose e com um aumento dos níveis de componentes do NFkB, o que também é indicativo da sua influência na aterosclerose. A prova directa que o NFkB pode ser um factor determinante no início da aterogénese, ainda está em falta.

O primeiro passo na aterosclerose caracteriza-se com a modificação da LDL na parede do vaso, levando a uma inflamação local que resulta na libertação de factores quimiotácticos e na expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Estes processos levam à atracção de monócitos ao local onde a lesão se desenvolverá. O NFkB pode estar implicado no início de várias etapas. Em primeiro, várias enzimas demonstraram ser importantes no início da modificação da LDL e na formação de mediadores inflamatórios lipídicos, incluindo fosfolipase A2, (*Ivandic B. et al, 1999*), 5-lipoxigenase, 12-lipoxigenase, (*Zhao L. e Funk C.D., 2004*) e COX2 (*Burleigh M.E. et al, 2002*) que são regulados pelo NFkB. Em segundo lugar, MCP-1 é uma quimiocina crucial para a atracção de monócitos, no início do desenvolvimento da lesão (*Gu L. et al, 1998; Aiello R.J. et al, 2005*) que também é regulado pelo NFkB. Em terceiro lugar, tem sido demonstrado que NFkB regula a expressão de várias moléculas de adesão em resposta a estímulos inflamatórios, onde estão incluídos a P-selectina, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, todos implicados no desenvolvimento de aterosclerose em modelos de rato (*Cybulsky M.I. et al, 2001; Collins R.G. et al, 2000; Johnson R.C. et al, 1997*).

A importância potencial do NFkB nas células endoteliais foi ainda sublinhada pelas experiências efectuadas, tendo sido demonstrado que as células endoteliais presentes na aorta estão mais propensas ao desenvolvimento da aterosclerose, tendo sido revelados níveis mais elevados de diferentes componentes do sistema NFkB, em comparação com regiões menos propensas (*Hajra L. et al, 2000*). Adicionalmente, nas regiões altamente propensas para o desenvolvimento da aterosclerose, a activação do factor NFkB foi conseguido depois de ocorrer uma activação com

lipopolissacarídeos (LPS) ou através de uma alimentação com alto teor de gordura para induzir a aterosclerose em ratos.

A activação do NFkB nas células endoteliais durante o início da aterogénese ou em outras células durante fases posteriores deste processo pode ser alcançado através de padrões complexos de indução por estímulos muito diferentes (LDL minimamente modificada, diabetes mellitus, etc) (Collins T. e Cybulsky M.I., 2001). A interacção das plaquetas com o endotélio pode contribuir, também, para a aterogénese. Foi mostrado recentemente, em modelos de rato que a aterosclerose é fortemente activada quando ocorre aumento de plaquetas circulantes (Huo Y. et al, 2003). Já foram efectuadas demonstrações em que a interacção de células endoteliais com plaquetas activadas pode induzir ICAM-1 (Gawaz M. et al, 1998), MCP-1 (Gawaz M. et al, 2002) e E-selectina (Yu G. et al, 2004), através de mecanismos dependentes do NFkB. Estes dados mostram que as diferentes etapas iniciais da aterosclerose, assim como, a modificação lipídica, quimiotaxia e processos de adesão poderão ser afectadas pelo NFkB. Futuras experiências utilizando células específicas de modelos de knockout para o NFkB poderão esclarecer os mecanismos de regulação desses processos nas diferentes células na aterogénese.

2.3. Dados experimentais obtidos in vivo

Muitos dos genes que participam na resposta inflamatória aguda, que são fundamentais para o processo aterogénico, podem ser potencialmente activados por NFkB. Tem-se demonstrado recentemente a presença de NFkB no núcleo de macrófagos, células musculares lisas, células endoteliais das lesões ateroscleróticas humanas (Kaltschmidt C. et al, 1996) e o grau de activação do NFkB está correlacionado com o grau de progressão da lesão aterosclerótica. Num modelo avançado de aterosclerose, induzida nas artérias femorais de coelhos mediante dissecação endotelial e dieta aterogénica (Liao F. et al, 1993), encontrou-se um aumento de NFkB nas células musculares lisas vasculares e macrófagos e as subunidades p50 e p65 de NFkB, como componentes desta actividade. Também se expressaram MCP-1 nos vasos lesionados de forma simultânea com a infiltração de macrófagos na neoíntima. Também se observa uma activação do NFkB na aorta e fígado, ou seja, nos tecidos que estão expostos à hipercolesterolemia sem lesão local, o que indica o papel importante do colesterol circulante (Bustos C. et al, 1998). Estes dados estão em concordância com os resultados obtidos por Liao et al (Liao et al, 1993), o que evidencia uma relação entre hiperlipidemia e a ruptura da placa. Deve-se destacar que os inibidores de ACE (quinapril e avortastina) reduziram a activação do NFkB, a expressão de MCP-1 e os macrófagos,

em vasos lesados, o que indica os efeitos clínicos benéficos destes fármacos nas coronariopatias (*Hernández Presa M.A. et al, 1997; Bustos C. et al, 1998*).

Também se tem considerado a possível participação do NFkB nas etapas que se produzem depois da isquemia e reperfusão. Durante a reperfusão miocárdica, a adesão dos polimorfonucleares, que afecta ICAM-1, pode originar o agravamento e prolongamento da lesão por reperfusão. Em corações isolados submetidos a isquemia (15 minutos), encontra-se a activação de NFkB e expressão do RNAm de ICAM-1, depois de 30 minutos de reperfusão até aos 240 minutos. A adesão de polimorfonucleares, dependendo de ICAM-1, também aumenta 2,5 vezes em comparação com a adesão de polimorfonucleares obtida durante a reperfusão aguda. Outros dados indicam que a isquemia da reperfusão nos corações isolados pode produzir secreção de TNF α , activação de NFkB e sem uma sobre-regulação de ICAM-1 e adesão de polimorfonucleares (*Kupatt C. et al, 1999*).

Num artigo recente, Ritchie (*Ritchie M.E., 1998*) sugere a hipótese de que a activação de NFkB nas células mononucleares circulantes poderia ser um marcador da actividade das coronaropatias. Este autor estudou consecutivamente 102 pacientes sem EAM que iam submeter-se a cateterização cardíaca. As análises demonstraram que 17 de 19 pacientes com angina instável tinham uma activação considerável de NFkB. Por outro lado, apesar de haver um número significativo de pacientes com coronaropatias graves (69%), só 2 dos 83 pacientes sem angina instável apresentavam uma activação considerável de NFkB. De acordo com o autor, a activação de NFkB em pacientes com angina instável persistiu durante menos de 24 horas e não se observou naqueles que apresentaram mais de 24 horas depois do EAM. Estes dados indicam que a activação do NFkB é um episódio fundamental e poderia, portanto, considerar-se como um marcador na coronaropatia. Devem realizar-se outros estudos para confirmar e ampliar estas observações iniciais.

Contudo, deve destacar-se que o NFkB circulante está elevado em patologias como diabetes e em doentes com sépsis (*Hofmann M.A. et al, 1999; Bohrer H. et al, 1997*).

2.4. Doenças relacionadas com a activação do NFkB

São inúmeras as doenças com capacidade de activar o factor de transcrição NFkB. Neste grande grupo estão incluídas: cancro, diabetes mellitus, alergia, artrite reumatóide, doença de Crohn, doenças cardiovasculares, aterosclerose, doença de Alzheimer, distrofia muscular, hipertrofia cardíaca, hipercolesterolemia, isquemia e reperfusão, angina de peito, doença renal, doenças digestivas, doenças de pele, incontinência pigmentar, apendicite, pancreatite, peritonite, sépsis, doença celíaca, apnéia do sono, autoimunidade, lúpus eritematoso, doenças de stress psicossocial, doenças neuropatológicas, polineuropatia amilóide familiar, doença de Parkinson, doença Huntington's e doença da retina. A activação de NFkB tem sido associada com o processo de envelhecimento (Ahn K. e Aggarwall B., 2005).

O factor NFkB foi detectado na maioria dos tipos de células tumorais, incluindo cancro do esófago, laringe, faringe, tiróide, pulmão, bexiga, mama, ovário, próstata, insuficiência renal, cólon, linfoma não-Hodgkin, leucemia de células T, mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda (Shishodia S. e Aggarwall B.B., 2004; Garg, A. e Aggarwall B.B., 2002). NF-κB pode mediar transformação, proliferação, invasão e angiogénese das células tumorais. Quimioresistência e radioresistência também têm sido ligados a activação NFkB. A enzima COX-2 expressada na maioria dos tumores é também regulada por NFkB. O VEGF e moléculas de adesão exigidos para a angiogénese e metástases são também regulados pela NFkB.

Muitos genes inflamatórios relevantes para a patogénese da aterosclerose são regulados pelo NFkB, a sua forma activada está presente nas placas ateroscleróticas. NFkB demonstrou ser activado na aterosclerose e miocardite, em associação com angina, durante rejeição transplante, após isquemia/reperfusão, em insuficiência cardíaca congestiva (ICC) na cardiomiopatia dilatada e choque térmico (Ahn K. e Aggarwall B., 2005).

Asma brônquica, é uma das doenças crónicas mais comuns na sociedade moderna, mas apesar da disponibilidade de medicamentos ser altamente eficaz, existem provas a sugerirem que a sua incidência está a aumentar. A asma envolve uma expressão persistente de um vasto conjunto de genes que contêm um local de reconhecimento para NFkB, que desempenha um papel central na iniciação e perpetuação da inflamação alérgica (Ahn K. e Aggarwall B., 2005).

Diversos relatos sugerem que o peptídeo β amilóide pode activar o NFkB nos neurónios, indicando um possível mecanismo pelo qual amilóide pode actuar durante a patogénese da doença de Alzheimer. A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crónica caracterizada pela persistência conjunta de edema e destruição progressiva da cartilagem e osso. NFkB desempenha

um papel essencial na activação transcricional de TNF e IL-1. Juntos, formam um ciclo positivo regulador que pode ampliar e manter o processo de doença reumatóide (Ahn K. e Aggarwall B., 2005).

2.5. Polimorfismos genéticos

Dentro de uma espécie, os cromossomas homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossoma (loci) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada numa frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (Balasubramanian S.P. et al, 2004).

Polimorfismos genéticos são variações genéticas que podem ocorrer em sequências codificadoras e não-codificadoras, levando a alterações qualitativas e/ou quantitativas de proteínas (Lodish H. et al, 2002). Estas variações na sequência de DNA podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. A frequência de alelos heterozigóticos para o polimorfismo genético ocorre em mais de 2% da população. Algumas dessas alterações ocorrem em sequências não codificantes do gene, que na maioria dos casos não terão efeito nas suas funções; outras ocorrerão em sequências codificantes, podendo levar à produção de proteínas defeituosas (Lodish H. et al, 2002).

Polimorfismos podem actuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos, associados a outros genes localizados na região cromossómica próxima a eles (linkage). Desta forma, se um gene próximo a um marcador causa uma doença, todos os indivíduos afectados na família recebem tanto o marcador como o gene causador da doença (Balasubramanian S.P. et al, 2004).

Os polimorfismos também são responsáveis pela diversidade humana. De outro modo, estes podem influenciar directamente sobre factor de risco, associados a doenças comuns, como é descrito nos estudos envolvendo a estrutura genética das apolipoproteínas (Kaprio J. et al, 1991; Syvanen A.C., 2001). Embora o determinante genético para uma determinada patologia seja identificado através de uma mutação com herança mendeliana simples, os determinantes para a idade de início da doença e a variabilidade clínica existente entre indivíduos com a mesma mutação ainda são ignorados (Wiench M. et al, 2001). Uma explicação possível seria que factores ambientais, risco ou protecção, uma segunda mutação ou polimorfismo estariam interferindo na evolução da doença (Balasubramanian S.P. et al, 200; McGarr S.E. et al, 2005; Huang S.C. et al, 2003).

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

Devido à importância do NFkB nas reacções inflamatórias, polimorfismos genéticos que afectem a sua função, podem estar associados à presença, ou não, da aterosclerose e enfermidades coronárias, como por exemplo, polimorfismos de genes que inibem a actividade do NFkB. Como exemplo tem-se o IKBA, sendo o objectivo deste trabalho estudar a possibilidade de associação do polimorfismo de um único nucleótido (SNP) na região 3'UTR (G/A) do gene IκB-alfa (3'UTR-IKBA).

3. Material e Métodos

3.1 Amostras Biológicas Humanas

Para amostragem deste estudo foram seleccionadas 36 utentes da Consulta Externa da “Doença Coronária” e como amostra normal 21 pessoas com idades superior a 65 anos (sem história de Doença Coronária) da Consulta Externa de “Trombose e Hemostase”, no Centro Hospitalar do Alto Ave, EPE (CHAA). Foram colhidas amostras de sangue periférico em tubos com anticoagulante EDTA (etilenodiaminotetra cético).

Após prévia consulta com Cardiologista, o Técnico Análises Clínicas e Saúde Pública (TACSP), submeteu os utentes, após consentimento informado, a um questionário que segue o modelo em anexo (anexo 1). Este estava direccionado na obtenção de dados importantes, factores de risco do utente, tendo sido confirmados todos eles através do processo clínico.

Todos os 36 utentes da Consulta Externa da “Doença Coronária” realizaram diversos exames, entre os quais, angiografia, cateterismo cardíaco e coronariografia para ser possível a confirmação da doença coronária, obtendo-se também a informação do número e grau de vasos lesados.

O volume desta amostragem inclui pessoas com idade mais avançada de forma a evitar o englobamento de jovens que mais tarde poderiam desenvolver a doença coronária. Este facto, também dificultou um pouco, a obtenção de informação fidedigna, uma vez que, a confusão em perceber e responder correctamente às questões colocadas era iminente. Devido a este facto, as amostras acabaram por ser apenas caracterizadas pelo género e idade, não sendo possível inquirir e validar os restantes factores de risco.

3.2.Processamento das amostras biológicas

3.2.1.Isolamento de DNA genómico

Todas as amostras de sangue periférico colhidas foram submetidas à extracção de DNA genómico pela adaptação do método não enzimático, descrito por Debomoy K. et al.

A quantificação e qualidade do DNA genómico extraído foi conseguida através da técnica de electroforese em gel de agarose a uma concentração de 0,48%, com brometo de etídio, numa

voltagem média de 48-50 milampères (mA), havendo comparação com padrão HyperLadder II (*Bioline*®), constituído por pesos moleculares conhecidos. Para serem quantificadas as amostras, o gel de agarose foi submetido a raios ultravioleta (UV), através do transiluminador de UV (*GelVue UV transilluminator*).

3.2.2. Análise do polimorfismo do padrão dos fragmentos de restrição (PCR-RFLPs)

A determinação do genótipo do polimorfismo 3'UTR-IkB-A, foi realizada através de uma PCR-RFLP. Foi amplificado um fragmento de 424 pares de base (pb) a partir de 100ng de DNA genómico.

A mistura da reacção contém o DNA alvo, 10µg/ml de primers (*SIGMA*®), 1µl de DNA polimerase termoestável (*Bioline*®), 10µg/ml de desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (*Bioline*®). Na primeira etapa, ocorre a desnaturação, durante 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 59°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, e por último 10 minutos a 72°C. Os primers utilizados (*SIGMA*®), foram IkBA 3 sense **5'GGCTGAAAGAACATGGACTTG3'** e IkBA 3 antisense **5'GTACACCATTACAGGAGGG 3'**.

Para quantificação dos produtos de PCR amplificados, foram realizadas electroforeses (*Consort E132*) em géis de agarose, a uma concentração de 1,5%, com brometo de etídio, para uma voltagem média de 45mA. O gel foi carregado com 2,5 µl de padrão HyperLadder II (*Bioline*®) e 5µl de produto. Posteriormente, 500ng de produto foram tratados com a enzima de restrição Hae III, durante 16h a 37°C, sendo inactivada, posteriormente, com uma incubação de 20 minutos a 80°C. Finalmente, para a determinação do polimorfismo, realizava-se uma electroforese em gel de agarose a 3%, visualizando-se, um fragmento de 424pb no caso do alelo A e dos fragmentos de 306 e 118pb, para o alelo G.

3.2.3. Equilíbrio Hardy e Weinberg e avaliação da associação genética

A lei de equilíbrio de Hardy e Weinberg é um modelo que prevê a relação que deve existir entre as frequências alélicas e frequências genotípicas numa população com características ideais. Nestas circunstâncias, para um locus dialélico, com os alelos A e a, numa determinada população e geração mostram frequências génicas de p para o alelo A e de q para o alelo a, onde $p + q = 1$. Os gametas que se produzem em ambos sexos vão levar esses alelos, com a mesma frequência e, formarão zigotos com diferentes genótipos nas seguintes frequências:

Tabela V – Genótipo resultante do cruzamento dos gametas masculino e feminino

	Espermatozóides		
		A(p)	a(q)
Óvulos	A (p)	p^2	pq
	a(q)	pq	q^2

Os genótipos resultantes aparecerão, assim, na próxima geração com as seguintes proporções: AA (p^2); Aa ($2pq$) e aa (q^2).

A forma mais fácil para testar o equilíbrio Hardy-Weinberg é baseado no teste qui-quadrado. O número de graus de liberdade é calculado com o número de genótipos menos o número de alelos. Testou-se essa hipótese nos pacientes e controlo.

Por outro lado, realizou-se uma comparação da frequência dos alelos de um SNP em dois grupos de indivíduos: aqueles em que foram diagnosticados DAC ou os que apresentam algum factor de risco e o grupo controlo, indivíduos não afectados pela doença ou por algum factor de risco a avaliar. Uma maior frequência de um alelo ou de um genótipo entre os casos comparados com o grupo controlo, indica que a presença desse alelo ou genótipo pode aumentar o risco de apresentar a doença.

Para a análise de associação entre o genótipo e caso ou controlo, fez-se um teste de hipótese de não associação com uma tabela de contingência 2x3 e de 2x2 que contém as frequências de cada um dos 3 genótipos e dos 2 alelos, no grupo de pacientes e controlo. Utilizou-se, em concreto, o contraste qui-quadrado de Pearson (com 2 ou 1 grau de liberdade) e com uma significância de $p \leq 0,05$. O que se fez, neste caso, foi comparar os valores observados de cada genótipo com os valores esperados, assumindo que o grupo caso e o controlo têm frequências fenotípicas idênticas.

4. Resultados

A doença arterial coronária é uma doença multifactorial, que envolve genes, factores modificáveis e não modificáveis que interagindo, faz com que o indivíduo desenvolva ou não a doença. Uma vez que, em diversas doenças inflamatórias (doença de Crohn, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico, etc) há a presença activa do factor de transcrição NFkB, o interesse em estudá-lo na doença aterosclerótica, assim como, os agentes moduladores da sua actividade, faz todo o sentido, uma vez que, se trata de uma doença inflamatória capaz de afectar milhares de pessoas, numa idade cada vez mais precoce.

Neste estudo preliminar de possível associação genética, avaliou-se 36 indivíduos diagnosticados com DAC, nos quais foi determinada a presença, ou não, de factores de risco já descritos na literatura (**Tabela VI**).

Observa-se que, 78% da amostra são indivíduos do género masculino. Aproximadamente 83,8% apresentam dislipidémia e cerca de 40,5% apresenta história familiar de DAC. No entanto, é importante salientar que esta última percentagem poderá na realidade ser superior, uma vez que, aproximadamente, 59,5% dos indivíduos desconhece antecedentes familiares.

Um dos factores de risco mais relevante é a idade, principalmente quando se avalia algum factor genético, já que há estudos (*António G, 2008*) que indicam que este factor apresenta influência nos indivíduos novos e que a DAC nos idosos tem uma relação directa com a senescência do próprio endotélio. Assim, ao analisar os dados, por faixas etárias (≤ 45 , 45-65 e ≥ 65 anos de idade) em relação aos factores de risco, verifica-se que os dados obtidos não são semelhantes no que respeita à hipertensão, uma vez que, na faixa etária compreendida entre 45-65 anos de idade o número de hipertensos é superior (90%) em relação aos indivíduos com faixa etária ≥ 65 anos (65,2%).

A dislipidémia está presente de forma idêntica, aproximadamente 90%, entre os 45-65 e 87% na idade ≥ 65 anos. A percentagem de indivíduos fumadores diminui substancialmente ao longo da idade e a percentagem de indivíduos diabéticos apresenta-se de forma irregular, manifestando-se em maior número, 50%, entre os 45 e 65 anos de idade.

Quanto à história familiar verifica-se que é inversamente proporcional à idade, havendo uma percentagem significativamente superior nos indivíduos que desenvolveram a DAC com idade ≤ 65 anos. No entanto, salienta-se que na análise posterior dos resultados teve-se em conta apenas dois grupos: indivíduos com idade ≤ 65 anos e os que apresentam uma idade superior a 65 anos, uma vez que, apenas existem 2 indivíduos com idade inferior a 45 anos.

Tabela VI - Relação entre os factores de risco e faixas etárias em indivíduos com DAC

	Total N = 36	≤ 45 anos N= 2	>45 - < 65 N = 10	≥ 65 anos N = 24
Idade	58,1 ±	37 ±	49,3 ±	65,5 ±
Diagnóstico (X	12,3	4,7	6,3	7,4
± S.D.)				
Homens (%)	78,4	100	100	65,2
Fumadores (%)	56,8	100	90	34,8
Hipertensão	67,6	0	90	65,2
(%)				
Diabetes (%)	37,9	0	50	39,1
Dislipidémia	83,8	50	90	87
(%)				
História				
Familiar				
Sim (%)	40,5	100	70	21,7
Não conhece	59,5	0	30	78,3
(%)				

4.1. Análise do polimorfismo 3'UTR-IkBA

Um SNP na região 3'-UTR do gene IkB-alfa (G/A) foi genotipado mediante PCR-RFLP. Assim, se a amostra a analisar é de um indivíduo homocigótico para o alelo A, apenas se observa um fragmento de 424pb, se é homocigótico para o alelo G, obtém-se dois fragmentos, um de 306 e outro de 118pb. Por fim, se se estudar um indivíduo heterocigótico, é de esperar ter os três tipos de fragmentos. Como se verifica na **figura III**, os produtos são facilmente diferenciados quando submetidos a uma electroforese, em gel de agarose a 3%.

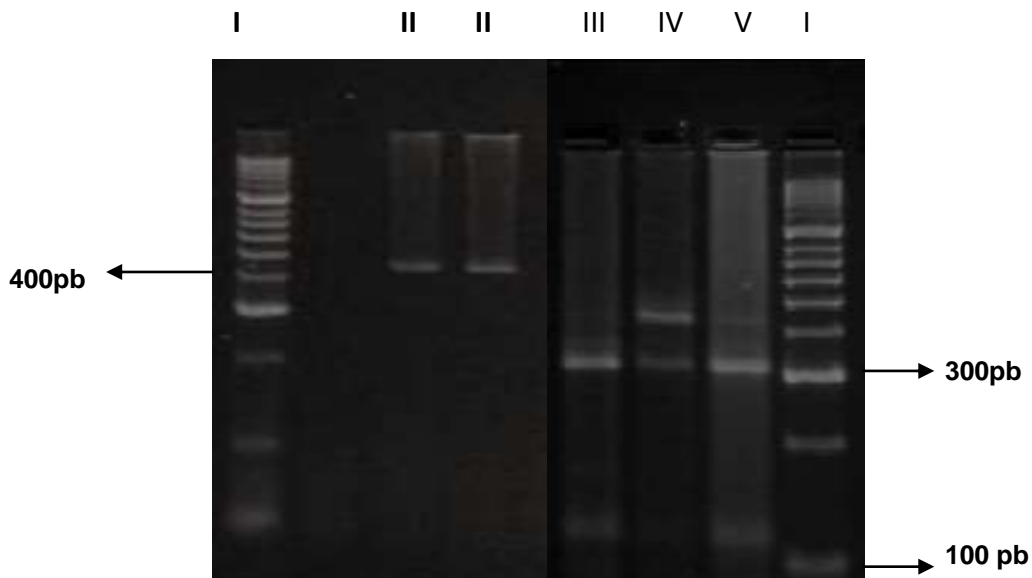


Figura III - Eletroforese de produtos de PCR - RFLP em gel de agarose a 3%

(I) Padrão HyperLadder II, fragmentos com pesos moleculares conhecidos.

(II) Produto resultante da digestão com enzima restrição (HaeIII) com 1 fragmento de 424pb, genótipo A/A.

(III) Produto resultante da digestão com enzima restrição (HaeIII) com 2 Fragmentos: 306 pb e 118pb, genótipo G/G.

(IV) Produto resultante da digestão com enzima restrição (HaeIII) com 3 Fragmentos: um de 424 pb, 306 pb e outro com 118pb, genótipo A/G.

(V) Produto resultante da digestão com enzima restrição (HaeIII) com 2 fragmentos: 306 pb e 118pb, genótipo G/G.

(VI) Produto resultante da digestão com enzima restrição (HaeIII) com 2 Fragmentos: 306 pb e 118pb, genótipo A/G.

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

Para determinar a possível associação do polimorfismo 3'UTR- IkBA com a DAC, foram utilizados como amostra controlo 21 indivíduos com idade superior aos 65 anos e sem história de doença (Tabela VII). Em ambas as amostras as frequências genotípicas e alélicas observadas são compatíveis com o equilíbrio Hardy-Weinberg. A frequência do genótipo A/A nos doentes (72,2%) é superior em relação aos indivíduos controlo ou normais (57,1%), verificando-se também um maior número de indivíduos normais com genótipo G/G (19,1 %) em relação aos doentes (11,1 %). Em relação às frequências alélicas A e G, repara-se, que o alelo A nos doentes apresenta 80,6% e nos normais 69%, ao passo que, o alelo G nos doentes tem um valor mais baixo, 19,4%, em comparação com grupo normal, 31%.

No entanto, em ambos os casos, as diferentes frequências observadas não são estatisticamente significativas (qui-quadrado 0,50 para genótipo e 0,33 para o alelo).

Tabela VII- Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo 3'UTR – IkB-A

3'UTR –IkBA Genótipo/Alelos	Doentes N=36	Normais N=21
A/A (%)	72,2	57,1
A/G (%)	16,7	23,8
G/G (%)	11,1	19,1
A (%)	80,6	69
G (%)	19,4	31

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

Os factores genéticos podem ter uma grande influência no aparecimento precoce da DAC, pelo que as frequências fenotípicas do polimorfismo a estudar, nos doentes, podem variar dependendo da faixa etária. Na **tabela VIII** pode-se observar que, no grupo com idade <65anos , a percentagem de homozigotia para A/A (66,6%) fica próxima da faixa etária ≥65 anos (75%).

O alelo G apresenta maior percentagem em idades <65anos de 25,1% e de 16,7% em idades ≥65 anos. Neste caso, as diferenças encontradas não são estatisticamente significativas, sendo o valor do qui-quadrado para as frequências genotípicas de 0,47 e de 0,86 para os alelos.

Tabela VIII - Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR- IKB-A em indivíduos com DAC, segundo a idade

3'UTR – IKBA Genótipo/Alelos	Total N=36	< 65anos N=12	≥65 anos N=24
A/A (%)	72,2	66,6	75
A/G (%)	16,7	16,7	16,7
G/G (%)	11,1	16,7	8,3
A (%)	80,6	74,9	83,3
G(%)	19,4	25,1	16,7

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

Também se propôs analisar os pacientes com DAC e a possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFKIA com os factores de risco: hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo e diabetes mellitus. Na **tabela IX**, verifica-se que as frequências alélicas são semelhantes, sendo o qui-quadrado de 0,87, entre os doentes, com e sem hipertensão. Além disso, as diferenças nas frequências genóticas A/G e G/G, não são estatisticamente significativas (qui-quadrado 0,35).

Tabela IX - Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR - IkB-A em indivíduos com DAC, segundo a HTA

3'UTR – IKBA Genótipo/Alelos	HTA (N=36)	
	Sim (N=24)	Não (N=11)
A/A (%)	70,8	72,7
A/G (%)	20,8	9,1
G/G (%)	8,4	18,2
A (%)	81,2	77,2
G(%)	18,8	22,8

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

Em relação ao factor de risco dislipidemia, na tabela X, verifica-se também diferenças nas frequências genóticas para o polimorfismo 3'UTR-IkA, mas não são estatisticamente significativas (qui-quadrado de 0,45). Resultados que se podem ver muito afectados pelo pequeno número de indivíduos sem dislipidemia, onde apenas 4 foram analisados.

Tabela X- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR-IkA em indivíduos com DAC, segundo a dislipidemia

3'UTR – IKBA Genótipo/Alelos	Dislipidemia (N=36)	
	Sim (N=32)	Não (N=4)
A/A (%)	71,9	50
A/G (%)	15,6	25
G/G (%)	12,5	25
A (%)	79,7	62,5
G(%)	20,3	37,5

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

Não foi possível, verificar uma associação nos doentes de DAC e fumadores e um dos genótipos ou alelos do SNP estudado (**Tabela XI**). Sendo o valor de qui-quadrado de 0,91 para as frequências genotípicas e de 0,78 em relação aos alelos.

Tabela XI- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR-IkB-A em indivíduos com DAC, segundo tabagismo

3'UTR –IKBA Genótipo/Alelos	Tabagismo (N=36)	
	Sim (N=20)	Não (N=16)
A/A (%)	75	75
A/G (%)	15	18,8
G/G (%)	10	6,2
A (%)	82,5	84,4
G(%)	17,5	15,6

Possível associação do polimorfismo 3'UTR-NFkBIA na Doença Arterial Coronária

Com os dados exibidos na tabela XII relativamente, ao último factor de risco estudado, diabetes mellitus, não foi possível rejeitar a hipótese de independência entre os genótipos do polimorfismo 3'UTR-IKBA e doentes diabéticos com DAC (qui-quadrado 0,03). Nem tão pouco, em relação à distribuição de alelos, com um qui-quadrado de 0,14.

Tabela XII- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 3'UTR-IkB-A em indivíduos com DAC, segundo diabetes mellitus

3'UTR –IKBA Genótipo/Alelos	<u>Diabetes Mellitus (N=36)</u>	
	Sim (N=14)	Não (N=22)
A/A (%)	85,7	63,6
A/G (%)	14,3	18,2
G/G (%)	0	18,2
A (%)	92,9	72,7
G(%)	7,1	27,3

5- Discussão e conclusão

A aterosclerose é uma doença inflamatória, caracterizada pela acumulação de macrófagos (células espumosas) nas paredes dos vasos, acompanhada pela produção de uma vasta gama de quimiocinas, citocinas e de factores de crescimento . Todos estes factores regulam a diferenciação e emigração das células residentes e, eventualmente, acabam por influenciar o desenvolvimento da placa. Um dos principais reguladores da inflamação é o factor de transcrição NFkB que, tem sido considerado como um factor pró-aterogénico, porque apresenta um papel importante na regulação de muitos genes pró-inflamatórios ligados à aterosclerose (*Winther M. et al 2005*).

Tem-se demonstrado recentemente a presença de NFkB em lesões ateroscleróticas experimentais e humanas e, o grau de activação do NFkB correlaciona-se com o grau de progressão da aterosclerose. Existem indicações de que NFkB activado nas células mononucleares circulantes, é um marcador potencial na actividade nas artérias coronárias danificadas. Estudos “in vivo” e “in vitro” indicam que NFkB desempenha um papel importante na proliferação de células musculares lisas vasculares (*Egido J. et al, 2000*). Assim, mutações neste gene ou em genes codificantes de proteínas reguladoras da actividade de NFkB, poderiam ter influência no desenvolvimento da DAC.

Neste aspecto, não é fácil encontrar dados relativos a estudos que avaliem a relação de polimorfismos genéticos, relativos ao NFkB e, os seus reguladores com os factores de risco (idade, hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo e diabetes mellitus) na aterosclerose. Daí o interesse em iniciar um estudo de associação genética. Um dos grandes obstáculos presentes na realização deste estudo é a procura de um “grupo controlo”, já que não é possível verificar se existem vasos lesados. Teria de existir, para este estudo, um grupo controlo maior de pessoas saudáveis, constituído por indivíduos da mesma idade, género, peso, que não apresentassem factores de risco modificáveis, assim como, não apresentassem vasos lesados. Assim, neste estudo foram utilizados como grupo controlo indivíduos idosos (> de 65 anos) a quem nunca foi diagnosticada a DAC, de modo que, a possível existência de vasos lesados ficará mais relacionada com o envelhecimento natural e não patológico.

Um outro problema na realização deste estudo, foi o número de doentes avaliados, já que não foi muito fácil obter a colaboração dos diferentes Centros Hospitalares. Assim, apesar de não se

obter dados conclusivos, os resultados indicam que na população Portuguesa não há uma associação directa entre o polimorfismo 3'UTR-IKBA e o desenvolvimento de doença arterial coronária.

A dificuldade em encontrar um bom grupo controlo, fez com que se decidisse avaliar nos próprios doentes uma possível associação entre o polimorfismo estudado e alguns factores de risco pesquisados, como a idade de desenvolvimento da doença, tabagismo, dislipidemia, hipertensão e diabetes. Em nenhum dos casos, o teste qui-quadrado permitiu verificar uma possível associação. Mas, convém voltar a salientar a possível influência do número de indivíduos analisados com os resultados obtidos.

A participação do componente genético na população com doença coronariana é desconhecida. Na prática clínica, a investigação do provável componente hereditário, influenciando o desenvolvimento da aterosclerose, faz-se basicamente pela presença de doença coronariana precoce nos pais, isto é, diagnóstico de doença coronariana no pai com menos de 55 anos e na mãe com menos de 65 anos, ou irmãos com doença coronariana. Essa análise apesar de importante é pouco sensível e não considera a existência, isolada ou associada, nesses pacientes, de outros potenciais factores de risco que possam influenciar significativamente no desenvolvimento de um quadro coronariano isquémico ou mesmo um episódio tromboembólico periférico.

Pela complexidade envolvida no processo da aterosclerose, os genes inicialmente estudados foram aqueles fortemente relacionados com os principais factores de risco para a doença coronariana, em especial a hipertensão arterial sistémica e as dislipidemias. O primeiro polimorfismo relacionado da doença coronariana foi o polimorfismo da apolipoproteína E responsável por importantes alterações no perfil lipídico (*Davignon J. et al, 1988*). Contudo, estudos dos polimorfismos genéticos na população com doença coronariana mostraram resultados contraditórios (*Samani N.J. et al, 1996; Wilson P.W.F. et al, 1996; Mansur A.P., 1998*). Da mesma forma, os polimorfismos dos factores da coagulação que, teoricamente, teriam uma participação importante no processo da trombogénese em pacientes jovens com doença coronariana têm resultados contraditórios (*Redondo M. et al, 1999*). Essa divergência está provavelmente relacionada a estudos metodologicamente inadequados sendo as principais críticas o número reduzido de pacientes e a ausência de um painel de polimorfismos (*Siscovick D.S., et al, 1997*).

A regra tem sido a análise de polimorfismos isolados (*Mansur A.P. et al*) e em muitos estudos ausência de uma análise multivariada que defina marcadores genéticos que contribuam independentemente para o desenvolvimento da doença coronariana (*Sun G.W. et al, 1996*). Para evitar estudos com número reduzido de pacientes e erros estatísticos do tipo b (poder do teste > 0,80) é fundamental a participação de vários centros de pesquisa. A característica multicêntrica favorece, não somente no aumento da população do estudo, como também evita análises de populações isoladas que podem não se encontrar em equilíbrio com Hardy-Weinberg (*Laan M. e Paabo S., 1997; McKeigue P.M., 1997*).

A associação de um ou mais polimorfismos genéticos com a doença aterosclerótica deve ser baseada em estudos com número de pacientes e metodologia adequados. Os polimorfismos analisados devem ter significado biológico e os seus produtos genéticos devem ter uma actividade fisiológica fortemente relacionada aos principais factores de risco, em especial à dislipidemia, hipertensão arterial e diabetes mellitus ou ainda com o processo da aterogénese ou trombogénese.

Da mesma forma, o uso de estratégias de análise, tais como, análise de pares em irmãos ou parentes e painel de polimorfismos, melhora a identificação dos polimorfismos genéticos associados com a doença aterosclerótica.

6 - Referências bibliográficas

- Ahn K, Aggarwall B. Transcription factor NFκB: A sensor for smoke and stress Signals. *Ann.N.Y Acad. Sci.*1056:218-233(2005).
- Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol.* 2005; 23(14): 3175-85.
- Allsen PE, Harrison JM, Vance B. Exercício e qualidade de vida. Barueri: Manole, 2000.
- American Diabetes Association. Managing diabetes in the 1990s. Alexandria: The Association; 1989.
- António G. Factores de risco cardiovascular na infância de doença com expressão clínica na idade adulta. *Acta Pediatr Port.* 2008;39 (1): 23-9.
- Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:1819-24.
- Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol.*2004; 30(6):593-601.
- Bang HO, Dyerberg J, Hjoorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand.* 1976; 200: 69-73.
- Bang HO. Dietary fish oils in the prevention and management of cardiovascular and other diseases. *Compr Ther.* 1990; 16:31-5.
- Banning M. The pathogenesis of atherosclerosis. Geneve: World Health Organization. 2000. P.1-18.

-
- Barbanti VJ. Dicionário de educação física e esporte. 2. ed. Barueri: Manole,2003.
 - Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor KB. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997; 336:1066-1071.
 - Bauerle PA, Baltimore D. NFkB: Ten years after. *Cell.* 1986; 87:13-20.
 - Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med.* 1998; 338:1650-6.
 - Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Srinivasan SR, Webber LS, et al. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol.* 1992; 70:851-8.
 - Bohrer H, Qui F, Zimmermann T, Zhang Y, Jilmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martín E, Nawroth PP. Role of NfκappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest.* 1997; 100: 972-985.
 - Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 1996; 97:1715–1722.
 - Braunwald E. Atlas de doenças cardiovasculares. Porto Alegre: Artmed. 1998.
 - Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor deficient mice. *Circulation.* 2002; 105:1816 –1823.
 - Bustos C, Hernández Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardio.* 1998; 32: 2057-2064.

-
- Carrageta M. Fundação Portuguesa de Cardiologia. 2009.
 - Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol trafficking by PPAR α and LXR. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 6):1128-31.
 - Collins R, Peto R, MacMahon S, Herbert P, Fiebach NH, Eberlein KA, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2: Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet*. 1990;335:827-38.
 - Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. 2000; 191:189–194.
 - Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001; 107:255-61.
 - Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107:1255–1262.
 - Da Luz PL, Uint L, Endotélio na Aterosclerose; interações celulares e vasomotricidade. Em *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*. (Ed) Da Luz PL, Laurindo FRL, Chagas ACP. Editora Atheneu. 2003; 133-160.
 - Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 1-21.
 - Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJP. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2001; 80:161-72.

-
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.*2002; 8:1249-56.
 - Egido J, Presa M, Tuñón J, Colio L, Ortego M, Suzuki Y, Plaza J, Guijarro C. El factor de transcripción KB (NFκB) y las enfermedades cardiovasculares. *Cardiovascular risk factors.*2000;Vol.9:Nº2.
 - Eldika N, Yerra L, Chi DS, Krishnaswamy G. Atherosclerosis as an inflammatory disease: implications for therapy. *Front Biosci.* 2004; 9:2764-77.
 - Falk E, Fuster V. Atherogenesis and its determinants. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, Roberts R, King III SB, Welens HJJ, editors. *Hurst's the Heart.* 10th ed. New York: McGraw Hill; 2001. p.1078-9.
 - Funke H, Assmann G. Strategies for the assessment of genetic coronary artery disease risk. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10:285–91.
 - Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373.
 - Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. *Circulation.* 1990; 82: 1147-59.
 - Garg, A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-κB as a target for cancer drug development. *Leukemia.* 2002; 16: 1053–1068.
 - Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation.* 1998; 98:1164–1171.

-
- Gawaz M, Page S, Massberg S, Nothdurfter C, Weber M, Fisher C, Ungerer M, Brand K. Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I kappa B kinase complex activation. *Thromb Haemost.* 2002; 88:307–314.
 - Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10:417-28.
 - Giannini SD. História natural da aterosclerose. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2000;10 (6): 677-85.
 - Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(1):44-55.
 - Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1986; 6:357-77.
 - Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76:333-7.
 - Gottlieb MG, Bonardi G, Moriguchi EH. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Artigo de Revisão. Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, jul./set. 2005.*
 - Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998; 2:275–281.
 - Guerra A. Factores de risco cardiovascular na infância. *Acta Pediatr Port* 2008;39 (1):23-9.
 - Guyton JR, Klemp KF. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16:4-11.

-
- Hackam GD, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003; 290:932-40.
 - Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:9052 – 9057.
 - Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1989; 9:567-78.
 - Hawkins RI. Smoking, platelets, an thrombosis. *Nature*.1972; 236:450-2.
 - Hayden JM, Reaven PD. Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Curr Opin Lipidol*.2000; 11:519-28. História familiar de DAC.
 - Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-Kappa B. *Genes Dev*. 2004; 18(18):2195-224.
 - Hazzard WR. Atherosclerosis and aging: a scenario in flux. *Am J Cardiol*. 1989;63:20H-24H.
 - Heistad DD. Unstable coronary-artery plaques. *N Engl J Med*.2003; 349:2285-87.
 - Hernández Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, accelerated atherosclerosis. *Circulation*. 1997; 95: 1532-1541.
 - Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Kjhalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappa B. *Diabetologia*. 1999; 42: 222-232.

-
- Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest*. 1999; 103:747-5.
 - Huang SC, Torres-Cruz J, Pack SD, Koch CA, Vortmeyer AO, Mannan P, et al. Amplification and overexpression of mutant RET in multiple endocrine neoplasia type 2-associated medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(1):459-63.
 - Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:1162 -7.
 - Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littma DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*. 2003;9:61– 67.
 - Ivandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, Fogelman AM, Grass DS, Swanson ME, de Beer MC, de Beer F, Lusis AJ. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1.Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.1999;19:1284 – 1290.
 - Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, Wagner DD. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest*. 1997; 99:1037–1043.
 - Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques: coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol*. 1994; 144:952-61.
 - Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*.1989; 9:567-78.

-
- Kaltschmidt C, Bauerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor NF- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1715-1722.
 - Kaprio J, Ferrell RE, Kottke BA, Kamboh MI, Sing CF. Effects of polymorphisms in apolipoproteins E, A-IV, and H on quantitative traits related to risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11(5):1330-48.
 - Keaney JF Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med.* 2000; 21:99-166.
 - Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol.* 1997; 8:275-80.
 - Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly RA, Becker BF. Tumor necrosis factor- α contributes to ischemia and reperfusion induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res.* 1999; 84: 392-400.
 - Laan M, Paabo S. Demographic history and linkage disequilibrium in human populations. *Nat Genet.* 1997; 17: 435-8.
 - Lernbecher et al., 1993. *Nature*, 365:767-770.
 - Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Susus AJ. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 1993; 91: 2572-2579.
 - Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000;247:349-58.
 - Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.*2002; 420:868-74.
 - Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader HB, editor. *Biologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Revinter. 2002. p.255-93.

-
- Lopes-Virella M, Virella G. Immune mechanism of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1992;41:86-91.
 - Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407:233-41.
 - Luz PL, Favarato D. A disfunção endotelial como índice prognóstico e alvo terapêutico. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, organizadores. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu. 2003. P.203-20.
 - MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1: Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*. 1990; 335:765-74.
 - Mansur AP, Annicchino-Bizzacchi J, Favarato D, Avakian SD, César LAM, Ramires JAF. Angiotensin-converting enzyme and apolipoproteins genes polymorphism and different syndromes of coronary disease. *Clin Cardiol* (no prelo).
 - Mansur AP. Análise dos genótipos das apolipoproteínas AI, B, E, enzima conversora da angiotensina e dos fenótipos de Lewis nos pacientes com síndromes coronárias estável e instável (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo.1998: 190p.
 - Masuda J, Ross R. Atherogenesis during low levelhypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streakconversion of fibrous plaque. *Arteriosclerosis*. 1990; 10(2):178-87.
 - McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(2): 98-109.
 - McGill Jr HC, McMahan CA, Zieske AW, et al.Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation*. 2000; 102:374-9.
 - McKeigue PM. Mapping genes underlying ethnic differences in disease risk by linkage disequilibrium in recently admixed populations. *Am J Hum Genet* .1997; 60: 188-96.

-
- Montenegro M. Estrutura da parede vascular. In: Maffei F, Lastoria S, Yoshida W, Rollo H, editores. Doenças vasculares periféricas. Rio de Janeiro: Medsi. 2002. p. 179-91.
 - Montenegro MR. Atherosclerosis morphology and pathogenesis. ARBS Annu Rev Biomed Sci. 1999; 1:133-44.
 - Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . Cell. 1998;93:229-40.
 - Napoli C, D'Armiento PF, Mancini PF, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J Clin Invest. 1997; 100: 2680-90.
 - Nascimento CA, Patriarca G, Heimann JC. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, organizadores. Endotélio e doenças cardiovasculares. São Paulo: Atheneu. 2003. p.1-51.
 - Olsson AG, Molgaard J. Relations between smoking, food intake and plasma lipoproteins. Adv Exp Med Biol. 1990; 273:237-43.
 - Papavasiliou AG. Transcription factors. N Engl J Med. 1995; 332: 45-47.
 - Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low-density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis. Annu Rev Med. 1992; 43:219-55.
 - Pentikainen MO, Oomi K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Modified LDL – trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. J Intern Med. 2000; 247:359-70.
 - Redondo M, Watzke HH, Stucki B, et al. Coagulation factors II, V, VII, and X, prothrombin gene 20210G→A transition, and factor V Leiden in coronary artery disease: high factor V clotting activity is an independent risk factor for myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19: 1020-5.

-
- Reid HL, Dormandy JA, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy TL. Impaired red cell deformability in peripheral vascular disease. *Lancet*. 1976; 1:666-8.
 - Ritchie ME. Nuclear factor-kB is Selectively and Markedly Activated in Humans With Unstable Angina Pectoris. *Circulation*. 1998;98:1707-1713.
 - Rosenthal N. Regulation of gene expression *N Engl J Med* 1994; 331: 931-933.
 - Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295:369-77.
 - Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*. 1976; 193:1094-100.
 - Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340 (2):115-26.
 - Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med*. 1986; 314:488-500.
 - Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362:801-9.
 - Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation*. 1996; 94: 708-12.
 - Schoen F. Vasos sanguíneos. In: Cotran R, Kumar V, Robbins S, Schoen F, editores. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.414-56.
 - Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-16.
 - Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41:15s-22s.

-
- Shishodia, S., Aggarwall B.B. Nuclear factor-kappaB activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion angiogenesis and metastasis of cancer. *Cancer Treat. Res.* 2004; 119: 139–173.
 - Silverman N, Maniatis, T. NF-kB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Dev.*, 2001, 15:2321-2342.
 - Siscovick DS, Schwartz SM, Rosendaal FR, Psaty BM. Thrombosis in the young: effect of atherosclerotic risk factors on the risk of myocardial infarction associated with prothrombotic factors. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 7-12.
 - Stein O, Thiery J, Stein Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atherosclerosis.* 2002; 160:1-10.
 - Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. *JAMA.* 1990;264:3047-52.
 - Steinberg D., Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 1997; 95:1062-71.
 - Sternby NH, Fernandez-Britto JE, Nordet P. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PBDAY Study), 1986-96. *Bull World Health Organ.*1999; 77:250-7.
 - Strong JP, Malcom GT, Newman WP 3rd, Oalman MC. Early lesions of atherosclerosis in childhood and youth: natural history and risk factors. *J Am Coll Nutr.* 1992; 11(Suppl):51S-4S.
 - Strong JP. Atherosclerotic lesions. Natural history, risk factors, and topography. *Arch Pathol Lab Med.* 1992; 116(12):1268-75.
 - Sun GW, Shook TL, Kay GL. Inappropriate use of bivariable analysis to screen risk factors for use in multivariable analysis. *J Clin Epidemiol.* 1996; 49: 907-16.

-
- Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet.*2001; 2(12):930-42.
 - U.S. Department of Health and Human Services. Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. DHHS Publication No.(CDC).1989; 89-8411.
 - Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol.* 2002; 15:439-46.
 - Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, Wloch J, Oczko M, Jarzab B. The genetic background of medullary thyroid carcinoma in young patients. *Folia Histochem Cytobiol.*2001; 39(suppl 2):163-4.
 - Wilson PWF, Kannel WB. Epidemiology of hyperglycemia and atherosclerosis. In: Ruderman NB, Williamson J, Brownlee M, editors. *Hyperglycemia, diabetes and vascular disease.* New York: Oxford Press 1992. p.21-9.
 - Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-5.
 - Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, Holmes DR Jr, Carlson PJ, Lerman A. Activated nuclear factor-kappaB is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2000; 148: 23–30.
 - Winther MP, Kanters E, Krall G, Hofker MH. NFkB signaling in Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:904-914.
 - Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor-kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(5):904-14.

-
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991; 88:1785-92.
 - World Health Organization. Division of Epidemiological Surveillance and Health Situation and Trend Assessment Global Health. Situation analysis and projections: a preliminary result of a health futures study in support of health for all. Geneva: The Organization; 1996. P.1950-2025.
 - Xu C, Lee S, Singh TM, Sho E, Li X, Sho M, et al. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J Vasc Surg.* 2001; 33:570-8.
 - Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:5252-6.
 - Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, Sachais BS. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF- κ B dependent manner. *Blood.* 2004.
 - Zhang GL, Ghosh S. Toll-like receptor mediated.NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest.* 2001 Jan; 107(1):13-9.
 - Zhao L, Funk CD. Lipoxygenase pathways in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; 14:191–195.

