

**MARCELO FERRAZ SAMPAIO**

**Função endotelial em adultos  
jovens com infarto do miocárdio.  
Influências ambientais e genéticas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Michel Batlouni

**São Paulo  
2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sampaio, Marcelo Ferraz

**Função endotelial em adultos jovens com infarto do miocárdio. Influências ambientais e genéticas** / Marcelo Ferraz Sampaio. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Michel Batlouni.

Descritores: 1.ENDOTÉLIO/fisiopatologia 2.VASODILATAÇÃO/fisiologia  
3.FATORES DEPENDENTES DO ENDOTÉLIO/análise  
4.VASODILATAÇÃO/genética 5.ÓXIDO NÍTRICO/genética 6.ARTÉRIA  
BRAQUIAL/ultrasonografia

USP/FM/SBD-296/05

“O homem que nasceu com um talento que estava destinado a usar, encontra sua maior felicidade ao usá-lo.”

Goethe

## DEDICATÓRIAS

A minha esposa Mônica, verdadeira companheira. Nesta fase da minha vida soube me poupar dos problemas e estimular-me nos momentos mais difíceis. Reclamou muito a minha ausência e isso só me envaidece. Reafirmo a você meu amor eterno.

Aos meus filhos Pedro, Julia e Felipe. Vocês são o que tenho de mais precioso. Neste período nosso tempo foi escasso, entretanto ao ver o trabalho concluído e ao mesmo tempo sentir falta de uma convivência maior, vejo o quanto vocês são importantes para mim.

A minha mãe Maria Helena, um exemplo de bondade e dedicação a família, sempre disposta a ajudar em qualquer momento e circunstância. Essa tese nos uniu mais.

Ao meu pai Roberval, o responsável por me ensinar os valores morais e de caráter que um homem digno deve ter. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Michel Batlouni, o mestre dos mestres. Sua orientação esteve presente em todas as fases desta tese, com carinho e dedicação máxima refletindo o enorme conhecimento que possui. É motivo de orgulho ter sido seu assistente e seu pupilo.

Agradeço ao Prof. Mario Hirata, o melhor exemplo do verdadeiro cientista. Ensinou-me o difícil caminho da biologia molecular com simplicidade e serenidade. A realização desta tese não seria possível sem o seu auxílio.

Agradeço ao Dr. Dikran Armaganijam, acima de tudo um amigo que sempre me incentivou ao doutorado e colaborou de forma decisiva na fase de qualificação desta tese.

Agradeço aos Profs. Drs. José Eduardo de Souza e Leopoldo Soares Piegas, responsáveis pela direção do Instituto Dante Pazzanese e que sempre me apoiaram durante a conclusão desta pesquisa. Aproveito este momento para prestar homenagens a todos os médicos e funcionários dessa instituição que orgulhosamente faço parte.

Agradeço ao Dr. Mohamed Saleh, que realizou os exames de ultra-som. Em um determinado instante, ofereceu de forma espontânea a realização dos exames nos fins de semana e feriado. Serei eternamente grato.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Laurindo, pelas sugestões e idéias e por enriquecedoras discussões científicas. Agradeço à Biomédica Laura Brandizzi que realizou todas as dosagens do nitrato, com dedicação, competência e precisão, além de revelar profundo conhecimento e interesse sobre o tema.

Agradeço de forma especial a minha secretária Fabiana, que trabalhou de forma árdua e muitas vezes sob enorme pressão, mas que soube com paciência e competência conduzir toda a execução deste trabalho.

Agradeço a Dra. Mellany Mansur Di Biasi e ao Dr. Luiz Alberto Piva Mattos que com amizade e dedicação contribuíram nas diversas fases desta tese.

Agradeço ao Sr. Wilson Medeiros, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis e, mesmo não sendo da área médica, soube com inteligência e raciocínio criar interessantes sugestões.

Agradeço aos Srs. Flávio T. Bernardes e Flávia C. Bernardes, Nívea e Eduardo do laboratório central do Instituto Dante Pazzanese, Fabiana e Edílson do laboratório de biologia molecular da USP, D. Helena e Camila da biblioteca e estatística do Instituto Dante Pazzanese.

Essa tese foi realizada no Instituto Dante Pazzanese e no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da USP em uma intensa convivência harmoniosa refletindo o respeito que essas duas instituições guardam entre si e que tão dignifica a cardiologia nacional.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Endotélio .....	2
1.2 Aterosclerose e endotélio.....	6
1.3 Aterosclerose e genética.....	10
1.4 Biodisponibilidade do óxido nítrico .....	15
1.5 Infarto do miocárdio em jovens: Um modelo de estudo .....	21
1.6 Avaliação da função endotelial.....	25
1.6.1 Avaliação bioquímica e genética .....	25
1.6.2 Métodos de imagem .....	32
2. OBJETIVOS.....	36
3. MÉTODOS.....	38
3.1 CASUÍSTICA.....	39
3.1.1 Características dos pacientes.....	39
3.1.2 Critérios de exclusão .....	40
3.1.3 Características do grupo controle.....	40
3.1.4 Fatores de risco cardiovascular .....	41
3.2 MÉTODOS .....	43
3.2.1 Coleta de dados clínicos.....	43
3.2.2 Avaliação laboratorial .....	44
3.2.3 Cinecoronariografia .....	47
3.2.4 Nitrato .....	48
3.2.5 Avaliação dos polimorfismos genéticos .....	50
3.2.6 Ultra-som de artéria braquial .....	54
3.3 Resumo do protocolo .....	60
3.4 Aspectos Éticos.....	61
3.5 Estatística.....	62
3.5.1 Análise Descritiva .....	62
3.5.2 Análise Inferencial .....	62

4. RESULTADOS.....	64
4.1 Dados demográficos .....	65
4.1.1 Hábitos e qualidade de vida .....	67
4.1.2 Fatores de risco.....	67
4.1.3 Dados Bioquímicos.....	69
4.1.4 Análise de subgrupos .....	71
4.1.5 Infarto agudo do miocárdio .....	73
4.1.6 Cineangiocoronariografia.....	73
4.1.7 Reatividade Vascular.....	75
4.1.8 Dosagem de nitrato .....	78
4.1.9 Genótipos .....	80
4.1.10 Polimorfismo do fibrinogênio (-148C/T e -455 G/A).....	85
4.1.11 Polimorfismo do PAI-1 .....	87
4.1.12 Equilíbrio de Hardy–Weinberg.....	88
4.1.13 Resultados adicionais da análise genética.....	89
5. DISCUSSÃO.....	98
5.1 Fatores de risco .....	99
5.2 Características do infarto .....	105
5.3 Cineangiocoronariografia .....	105
5.4 Endotélio .....	107
5.5 Genética.....	113
5.6 Dosagem de nitrato.....	122
5.7 Limitações .....	126
CONCLUSÕES.....	128
REFERÊNCIAS .....	130



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA	dimetil arginina assimétrica
APO A1	apolipoproteína A1
APO B	apolipoproteína B
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
AVC	acidente vascular cerebral
BH4	Tetrahidrobiopterina
CKMB	enzima creatinofosfoquinase fração miocárdica
DAC	doença arterial coronária
DNA	ácido desóxiribonucléico
ECA	enzimas de conversão da angiotensina
EDHF	fator de hiperpolarização derivado do endotélio
EDRF	fator relaxante derivado do endotélio
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
G	guanosina
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
GTP	trifosfato de guanosina
IAM	infarto agudo do miocárdio
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IECA	inibidor da enzima de conversão de angiotensina
IK- $\beta$ alpha	inibidor do fator nuclear K $\beta$
IMC	índice de massa corpórea
INCOR	Instituto do Coração
INOS	óxido nítrico sintase induzida
LDL	lipoproteínas de baixa densidade

NADPH	Fosfato dinucleotídeo de adenina nicotinamida
NFK $\beta$	fator nuclear K $\beta$
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	nitrito
NO <sub>3</sub>	nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCRus	proteína C reativa ultra sensível
PDAY	Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PROCAM	Prospective Cardiovascular Munster
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
SERPIN	Serine proteinase inhibitor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNPs	single nucleotide polymorphisms
TGF- $\beta$	Fator beta ed transformação do crescimento
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual
US	ultra som
VCAM	Molécula de adesão da célula vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VFM	vasodilatação fluxo mediado
VMN	vasodilatação mediada por nitrato

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática da síntese do óxido nítrico (NO)....3
- Figura 2** – Modelo representativo do mecanismo pelo qual um polimorfismo comum influencia a suscetibilidade a uma afecção complexa como a aterosclerose..... 14
- Figura 3** – Esquema representativo do gene da eNOS, ilustrando os polimorfismos relacionados com aterosclerose ..... 16
- Figura 4** – Fotografia de todo o conjunto utilizado para análise do nitrato ..49
- Figura 5** – Paciente com transdutor posicionado para realização do exame de reatividade vascular .....56
- Figura 6** – Representação esquematizada do protocolo do grupo IAM (E) e controle (D). ..... 60
- Figura 7** – Resultado do exame de reatividade vascular de paciente grupo IAM com vasodilatação  $\geq 10\%$ ..... 76
- Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene da eNOS GLU298ASP.....80
- Figura 9** – Fotografia da eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene da eNOS T786C .....82
- Figura 10** – Reprodução de fragmentos dos diferentes genótipos do polimorfismo do gene da eNOS íntron 4. ....83
- Figura 11** – Fotografia da eletroforese em gel de agarose dos polimorfismos do gene do fibrinogênio .....85
- Figura 12** – Fotografia do perfil de separação dos fragmentos por sistema de eletroforese do polimorfismo do gene do PAI-1.....87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Genótipos e respectivos alelos relacionados com os polimorfismos da eNOS .....	16
<b>Tabela 2</b> – Distribuição dos pacientes de acordo com faixas etárias nos grupos IAM e controle .....	66
<b>Tabela 3</b> – Dados demográficos dos grupos IAM e controle .....	66
<b>Tabela 4</b> – Hábitos e qualidade de vida nos grupos IAM e controle .....	67
<b>Tabela 5</b> – Fatores de risco nos grupos controle e IAM .....	68
<b>Tabela 6</b> – Dados bioquímicos e hematológicos dos grupos controle e IAM .....	70
<b>Tabela 7</b> – Variáveis que apresentaram diferença significativa entre os grupos de brancos e outras raças.....	71
<b>Tabela 8</b> – Variáveis que apresentaram diferença significativa entre homens e mulheres .....	72
<b>Tabela 9</b> – Variáveis com diferença significativa em relação à presença de lesões discretas e moderadas/graves à cinecoronariografia .....	75
<b>Tabela 10</b> – Associação de tabagismo e do PAI-1 com a resposta à vasodilatação fluxo mediada.....	77
<b>Tabela 11</b> – Valores de nitrato nos grupos IAM e controle .....	78
<b>Tabela 12</b> – Valores de nitrato e vasodilatação mediada por fluxo .....	79
<b>Tabela 13</b> – Genótipos do polimorfismo GLU298asp nos grupos controle e IAM .....	81
<b>Tabela 14</b> – Genótipos do polimorfismo T786C nos grupos controle e IAM .....	83
<b>Tabela 15</b> – Genótipos do polimorfismo íntron 4 nos grupos controle e IAM .....	84
<b>Tabela 16</b> – Genótipos do polimorfismo fibrinogênio -148 C/T (FIBR HIND) nos grupos controle e IAM .....	86
<b>Tabela 17</b> - Genótipos do polimorfismo do fibrinogênio –455 G/A (FIBR HAE) nos grupos controle e IAM .....	86

<b>Tabela 18</b> – Genótipos do polimorfismo (-6754G/5G) do PAI-1 .....	86
<b>Tabela 19</b> – Equilíbrio de HARDY-WEINBERG para os polimorfismos da eNOS .....	88
<b>Tabela 20</b> – Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos do fibrinogênio e do PAI-1 .....	89
<b>Tabela 21</b> – Associação do polimorfismo -455 G/A com trigliceridemia no grupo IAM .....	90
<b>Tabela 22</b> – Comparação das variáveis categóricas com o genótipo - 148 C/T (FIBR HIND) no grupo controle .....	91
<b>Tabela 23</b> – Comparação das variáveis categóricas com o genótipo - 148 C/T (FIBR HIND) no grupo IAM .....	92
<b>Tabela 24</b> – Associação do polimorfismo GLU298ASP com níveis de glicose.....	93
<b>Tabela 25</b> – Associação do polimorfismo GLU298ASP com diabetes.....	93
<b>Tabela 26</b> – Associação entre GLU298ASP E T786C – Grupo controle .....	94
<b>Tabela 27</b> – Associação entre GLU298ASP E T786C no grupo IAM .....	94
<b>Tabela 28</b> – Associação entre o genótipo TT e hipertensão arterial.....	95
<b>Tabela 29</b> – Resultados das análises de regressão logística multivariadas sobre a influência dos polimorfismos T786C E GLU298ASP na variável de interesse hipertensão arterial – grupo IAM .....	97

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Distribuição das lesões nas artérias descendente anterior, circunflexa e coronária direita de acordo com a magnitude.....74
- Gráfico 2** – Comparação dos valores da dilatação mediada por fluxo (VMF) e da dilatação mediada por nitratos (VMN), entre os grupos IAM e controle.....76
- Gráfico 3** – Gráfico de dispersão entre valores de nitrato e vasodilatação.....79

## RESUMO

Sampaio MF. *Função endotelial em adultos jovens com infarto do miocárdio. Influências ambientais e genéticas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2005. 160p.

**Fundamento** - A disfunção endotelial é elemento chave na aterogênese e precipitação das síndromes coronárias agudas. A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) é expressão de um endotélio disfuncional. Entretanto, o exato mecanismo desta redução ainda não está totalmente elucidado. Postula-se que a alteração na biodisponibilidade local de NO se deva à sua menor geração, devido à diminuição da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), à destruição aumentada do NO antes de exercer suas ações, ou à reduzida sensibilidade das células alvo ao NO. Para testar essas hipóteses o modelo estudado foi o infarto agudo do miocárdio (IAM) em pacientes jovens, abaixo de 40 anos, que apresenta várias características favoráveis à realização da investigação e que são comuns na maioria dos trabalhos da literatura: forte associação com fatores de risco que causam disfunção endotelial e presença de doença aterosclerótica coronária. Vários métodos podem avaliar a função endotelial, porém atualmente o mais empregado é o ultra-som de artéria braquial, por ser não invasivo e de simples execução. **Objetivos** - Os objetivos deste estudo foram: a) avaliar a função endotelial em um grupo de pacientes com IAM prévio e correlacioná-la com a produção de nitrato; b) avaliar a importância das influências ambientais (fatores de risco) e genéticas (polimorfismo da óxido nítrico sintase endotelial, fibrinogênio e PAI-1) na função endotelial desses pacientes. **Métodos** - Foram estudados 128 pacientes com idade  $\leq 40$  anos, ( $m = 34,4$ ), IAM documentado, e submetidos a cineangiocoronariocardiografia (grupo IAM) e 121 indivíduos saudáveis, com idade média de 34,5 anos e teste ergométrico normal (grupo controle). Os participantes de ambos os grupos foram submetidos à entrevista, exame físico e avaliação bioquímica e genética. A avaliação genética consistiu na pesquisa de três polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial (GLU298ASP, íntron 4, T786C), dois polimorfismos do fibrinogênio (fibr HIND, fibr HAE) e o polimorfismo do PAI-1 (4G/5G). Todos realizaram ultra-som de artéria braquial, método de escolha para a avaliação da função endotelial. Considerou-se resposta normal, vasodilatação  $\geq 10\%$  em relação ao diâmetro do vaso antes da aplicação do estímulo mecânico (torniquete pneumático). Durante o exame de ultra-som foi coletada amostra sanguínea para a dosagem de nitrato sérico, um metabólito do óxido nítrico. **Resultados** - O grupo IAM, em comparação com o grupo controle, apresentou diferenças significantes em relação à incidência de tabagismo, hipertensão arterial, obesidade, dislipidemias (aumento de LDL-c e triglicérides), diabetes mellitus, antecedentes familiares e PAI-1 elevado. Não houve diferença em relação à PCRus entre os dois grupos. Os dados cineangiocoronariográficos mostraram que a maioria dos

pacientes (64,7%) apresentava lesões moderadas a graves, com um contingente maior de pacientes uniarteriais (46,4%). A presença ou não de lesões à cinecoronariografia não influenciou os resultados da reatividade vascular e da pesquisa genética. Os resultados da reatividade vascular avaliada pelo US de artéria braquial mostraram menor vasodilatação mediada por fluxo nos pacientes do grupo IAM em relação ao grupo controle: 45,3% vs 14,9% com resposta abaixo de 10%. Dentre todos os fatores de risco e variáveis laboratoriais estavam alterados no grupo IAM em relação ao grupo controle de forma significativa, os únicos que mostraram correlação com a redução da vasodilatação foram a presença de tabagismo (64,7% com vasodilatação < 10%) e os valores do PAI-1 ( $18,1 \pm 11,1$  U/ml vs  $11,6 \pm 10,0$  U/ml,  $p < 0,001$ ), respectivamente. A dosagem de nitrato mostrou valores mais altos no grupo IAM em comparação com o grupo controle (20,2 vs 17,3  $\mu$ /mol,  $p = 0,006$ ). Em relação aos polimorfismos pesquisados não houve diferenças significantes entre os dois grupos (IAM e controle).

**Conclusões** - 1) Pacientes jovens com IAM prévio, apresentaram disfunção endotelial avaliada pelo U.S de artéria braquial, sem correlação com os níveis de nitrato sanguíneo. 2) Dos fatores de risco presentes no grupo IAM, correlacionaram-se com a disfunção endotelial a elevação do PAI-1 e o tabagismo. 3) Fatores genéticos, avaliados pelos polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial, fibrinogênio e PAI-1, não se correlacionaram com disfunção endotelial.

Descritores: 1. ENDOTÉLIO/fisiopatologia 2. VASODILATAÇÃO/fisiologia  
3. FATORES DEPENDENTES DO ENDOTÉLIO/análise  
4. VASODILATAÇÃO/genética 5. ÓXIDO NÍTRICO/genética 6. ARTÉRIA BRAQUIAL/ultrasonografia



## SUMMARY

Sampaio MF. *Endothelium function in young adults with myocardial infarction. Environmental and genetic influences* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2005. 160p.

**Background** - The endothelial dysfunction is the key element of atherogenesis and precipitation of acute coronary syndromes. The nitrous oxide (NO) bioavailability reduction is the expression of a dysfunctional endothelium. However, the exact mechanism of such a reduction has not been completely elucidated yet. It is assumed that the local nitrous oxid bioavailability change is due to its lesser generation, due to a reduction of endothelial nitrous oxide syntethase expression (eNOS) and greater destruction before any action, or due to target cells reduced sensitivity to NO. In order to test this hypothesis the studied model was the acute Myocardial Infarction in young patients under 40 years of age that presents many suitable characteristics to the investigation accomplishment and are quite common in the great majority of papers in literature: strong association with risk factors that cause endothelial dysfunction and presence of atherosclerotic coronary disease. Various methods can be used to evaluate the endothelial function, however today the most used is the ultra-sound of the brachial artery because it is non invasive and quite easy and simple to use. **Objectives** - The study's objectives were: a) evaluate the endothelial function in a patient group with previous Myocardial Infarction and correlation to nitrate production; b) evaluate the essentials of environment (risk factors), genetic (endothelial syntethase nitrous oxide polymorphism, fibrinogen and PAI-1) and endothelial function in selected patients. **Methods** - 128 patients with ages  $\leq 40$  years, (m = 34,4), with documented Myocardial infarction, and who had undergone angio coronary ventriculography and 121 healthy subjects, with an average age of 34,5 years showing a normal ergometric test (control group). Subjects from both groups were interviewed, underwent physical examination and biochemical, lipid and genetic evaluation. The genetic evaluation consisted of studying three endothelial nitrous oxid syntethase polymorphisms (GLU298ASP, íntron 4, T786C), two fibrinogen polymorphisms (fibr HIND, fibr HAE) and the PAI-1 polymorphism (4G/5G). All underwent ultra-sound of the brachial artery, method of choice for evaluation of endothelial function. Vasodilation  $\geq 10\%$  was considered normal response related to vascular diameter before applying the mechanical stimulus (pneumatic tourniquet). Blood samples were collected for serum nitrate and nitrous oxide metabolite dosage during the ultra-sound. **Results** - The Myocardial Infarction group in comparison with the control group showed significant differences related to smoking, high blood pressure, obesity, dyslipidemias (LDL-c and triglycerides enhancement), diabetes mellitus, familiar background and elevated PAI-1. There were no differences related to PCRus between the two groups. The coronary graphics data showed that the majority of patients (64,7%) showed moderate to severe lesions, with a greater number of patients with one artery

only (46,4%). The presence or absence of lesions at the coronary graphics did not influence the vascular reactivity and the genetic research results. The results for the vascular reactivity evaluated with ultra sound of the brachial artery showed minor vasodilation mediated by flow in the Myocardial Infarction patients group versus the control group: 45,3% vs. 14,9% with response under 10%. Among the risk factors and laboratory variables altered in the Myocardial Infarction group in comparison to the control group the only showing significant correlation with vasodilation reduction were smoking (64,7% with vasodilatation < 10%) and the PAI-1 values ( $18,1 \pm 11,1$  U/ml vs  $11,6 \pm 10,0$  U/ml,  $p < 0,001$ ), respectively. The nitrate dosage showed much larger values in the Myocardial Infarction group when compared to the control group (20,2 vs. 17,3 M/MQ,  $p = 0,006$ ). Polymorphisms research did not show significant differences between the groups (Myocardial Infarction and control). **Conclusion** - 1) Young patients with previous Myocardial Infarction showed endothelium dysfunction evaluated with ultra sound of the brachial artery, with no correlation to nitrates blood level. 2) Two risk factors in the Myocardial Infarction group were correlated with endothelial dysfunction, elevation of PAI-1 and smoking. 3) Genetic influences evaluated by endothelial nitrous oxid syntethase polymorphisms, fibrinogen and PAI-1 were not correlated to endothelial dysfunction.

Describers: 1. ENDOTHELIUM/physiopatology 2. VASODILATATION/physiology  
3. ENDOTHELIUM FACTORS/diagnostic 4. VASODILATATION/genetic  
5. NITRIC OXIDE/genetic 6. BRACHIAL ARTERY/ultrasonographic

---

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Endotélio

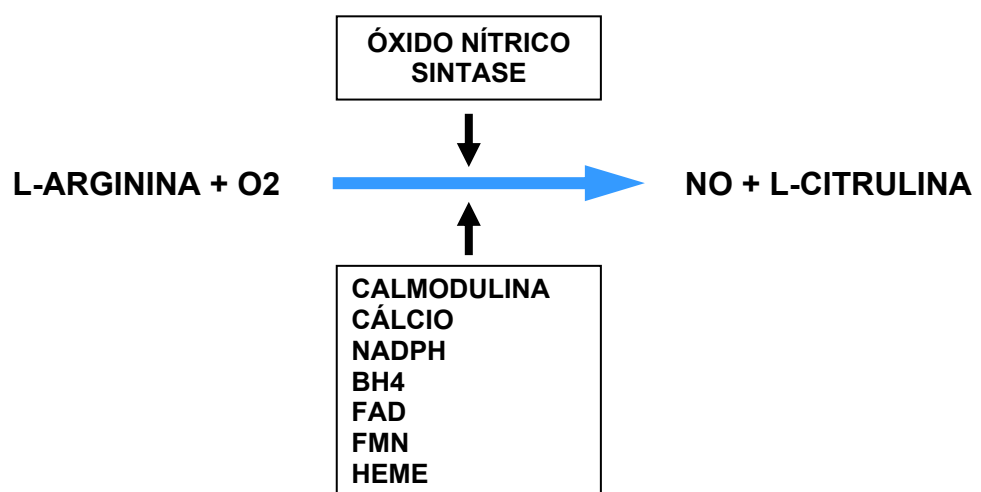
O endotélio é uma monocamada de células que recobre todo o leito vascular do organismo humano, formando uma barreira física entre os componentes do sangue e os tecidos. Algumas características peculiares do endotélio, como o de ser considerado a maior glândula do corpo, com peso de aproximadamente 3 Kg e superfície de 800 a 1000 m<sup>2</sup>, já indicam que as funções do endotélio extrapolam a propriedade de funcionar apenas como barreira física. O endotélio constitui também barreira metabólica, degradando substâncias e impedindo sua atuação nas camadas mais profundas do vaso. Além disso, a célula endotelial controla ativamente o tônus vascular, a coagulação, a trombólise e a remodelação vascular, bem como respostas inflamatórias e imunes.

São numerosas as substâncias produzidas pelo endotélio, induzindo a uma grande pluridade funcional, com participação ativa em diversos processos patológicos. O endotélio produz substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico; vasoconstritoras, como a endotelina; antitrombóticas, como o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e a proteína C; pró-trombóticas, como o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1); antiproliferativas, como o fator beta de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ); proliferativas, como angiotensinogênio II; marcadores inflamatórios, como as moléculas de adesão selectinas, molécula de adesão intercelular (ICAM),

molécula de adesão da célula vascular (VCAM) e fatores envolvidos na angiogênese, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

Dentre essas substâncias destaca-se o óxido nítrico (NO). Desde os estudos pioneiros de Furchgott e Zawadzki, em 1980<sup>(1)</sup>, tem sido demonstrada sua importância na patogênese de diversas doenças cardiovasculares, especialmente a aterosclerose. Além disso, o NO possui propriedades que podem ser protetoras, como a antioxidante, regulatórias, como a regulação do tônus vasomotor, e deletérias, como sua participação na indução da peroxidação lipídica<sup>(2,3,4)</sup>.

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, que reage com o oxigênio molecular na presença de calmodulina, cálcio, NADPH e tetrahydrobiopterina (BH 4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e heme como co-fatores. Esta reação enzimática que sintetiza o produto final biologicamente ativo, NO, e o aminoácido biologicamente inativo, L-citrulina, é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Figura 1).



**Figura 1** – Representação esquemática da síntese do óxido nítrico (NO)

NADPH - fosfato dinucleotídeo de adenina nicotinamida; BH<sub>4</sub> – tetrahydrobiopterina; FAD – flavina adenina dinucleotídeo; FMN – flavina mononucleotídeo

Existem três isoformas distintas de NOS identificadas, produtos de três genes diferentes, com diferente localização, regulação, propriedade catalítica e sensibilidade a inibidores, e com 51 a 57% de homologia entre as isoformas humanas. Das três isoformas de NOS conhecidas, uma é induzida e duas são constitutivas, neuronal e endotelial<sup>(5)</sup>.

A isoforma I ou óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) constitutiva é encontrada em neurônios, células epiteliais, sistema nervoso central e periférico, nervos não adrenérgicos e não colinérgicos, mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético, órgão sexual masculino, células  $\beta$  pancreáticas. A nNOS é cálcio-calmodulina dependente e regula a transmissão sináptica no sistema nervoso central, ativa a regulação central da pressão sanguínea, o relaxamento do músculo liso e a vasodilatação periférica. Também atua regulando o fluxo sanguíneo cerebral local e está envolvida na elaboração da memória.

A isoforma II ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS), estimulada por citocinas e lipopolissacárides, é induzível em uma variedade de células e tecidos: macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, endotélio, células musculares lisas, células Kupfer e hepatócitos. A iNOS independe do cálcio para sua ação e habitualmente não é expressa, sendo necessária a presença de determinados estímulos para sua produção.

A isoforma III, ou óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) constitutiva, é a isoforma predominante. Está presente nas células endoteliais, plaquetas e no cérebro. É responsável pela biossíntese e secreção contínua de NO na microcirculação, já que as células endoteliais a expressam de modo

constitutivo. A eNOS pode ser ativada por três mecanismos regulatórios: aumento da concentração citosólica de cálcio, fosforilação do aminoácido serina na posição 1177 e pela via de esfingolipídicos.

O NO pode ser oxidante ou redutor, dependendo do meio em que se encontre. É rapidamente degradado pelo oxigênio e sua oxidação produz nitrito e nitrato. O óxido nítrico, em presença de oxigênio, é oxidado para nitrito (NO<sub>2</sub>) *in vitro*. E, na circulação sanguínea, em presença da hemoglobina, é oxidado até nitrato (NO<sub>3</sub>). O nitrito/nitrato pode sofrer ação de substâncias redutoras presentes na membrana celular e ser convertido de volta a óxido nítrico<sup>(5)</sup>.

Os primeiros estudos sobre a função endotelial demonstraram que, para a acetilcolina exercer sua ação relaxante em modelo de aorta de coelho, era necessário que o endotélio da preparação estivesse íntegro<sup>(5)</sup>. Estabeleceu-se então a importância de uma substância vasorelaxante liberada pelo endotélio, que recebeu o nome de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Estudos posteriores demonstraram que o EDRF compartilha propriedades químicas e biológicas com o óxido nítrico, sugerindo que a vasodilatação induzida pelo EDRF poderia ser atribuída a esse composto<sup>(6)</sup>.

O óxido nítrico é um gás com meia-vida muito curta (entre 6 e 10 segundos), e grande capacidade de difusão ao citosol da célula muscular lisa adjacente. Ligando-se ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel forma um produto que, ativado, catalisa a conversão do trifosfato de guanossina (GTP) em monofosfato de guanossina cíclico (GMPc). O GMPc ativa uma proteína da família das quinases G, que promove uma cascata de respostas

em nível de transcrição e tradução, culminando com o seqüestro de cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático através de canais de cálcio tipo L. Isto acarreta redução de cálcio citoplasmático, com relaxamento da musculatura lisa e conseqüente vasodilatação. Recentes estudos evidenciaram que o EDRF/NO não age somente como vasodilatador local, mas também tem a capacidade de modular funções nervosas e endócrinas, como a liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas e a inibição da liberação de renina<sup>(7)</sup>.

## 1.2 Aterosclerose e endotélio

A aterosclerose é uma doença sistêmica, de início precoce e progressão silente. O estudo de Framingham demonstrou que em 62% dos homens e em 46% das mulheres a apresentação inicial da doença arterial coronária (DAC) foi o infarto agudo do miocárdio (IAM) ou a morte súbita<sup>(8)</sup>.

O endotélio é elemento chave na aterogênese. Numerosos trabalhos, em animais e no homem, indicam a disfunção endotelial como o marco inicial da aterosclerose<sup>(9,10)</sup>. O modelo vigente que melhor explica a aterogênese está baseado na hipótese da “resposta à injúria”. De acordo com essa hipótese, a injúria ao endotélio por alterações locais do fluxo sanguíneo em determinados sítios da árvore arterial, associada com fatores sistêmicos como dislipidemia, hiperglicemia, tabagismo e hipertensão arterial, desencadeiam uma cascata de eventos que levam em



última análise ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica<sup>(11)</sup>. A disfunção endotelial é o passo inicial que facilita a entrada de lipídeos e células inflamatórias (monócitos e células T) na parede arterial. Posteriormente, a secreção de citocinas e fatores de crescimento induzem à migração intimal e proliferação das células musculares lisas que participam decisivamente na formação da placa aterosclerótica. Em lesões mais avançadas, há a ruptura da placa, ocasionando trombose e gerando uma síndrome coronária aguda. O modelo descrito sugere que a aterosclerose seja resposta fibroproliferativa. Entretanto, o reconhecimento do papel importante exercido pelos diversos leucócitos, citocinas e fatores de crescimento no desenvolvimento da lesão, bem como as recentes evidências da presença de infecções crônicas nesse processo, como as clamídias, geraram o conceito de que a aterosclerose também pode ser considerada uma doença inflamatória<sup>(12)</sup>.

A relação da lesão endotelial com o processo da aterosclerose torna-se clara com a compreensão do papel das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas. O endotélio participa diretamente do processo de oxidação das LDL. As LDL oxidadas podem induzir as células vasculares locais a produzir citocinas que promovem o recrutamento de monócitos e sua migração através da parede arterial. Além disso, as LDL oxidadas ligam-se a receptores específicos, designados receptores removedores, na superfície dos macrófagos, onde elas são “ingeridas” e contribuem à formação das células espumosas. Uma vez formadas, as LDL oxidadas exercem uma série de efeitos pró-ateroscleróticos, como a indução do acúmulo de colesterol nos

macrófagos e o estímulo à produção endotelial de moléculas de adesão dos leucócitos, citocinas e fatores de crescimento, que podem afetar a função endotelial, regular a proliferação de células musculares lisas, além de participar da degradação do colágeno e da trombose. Outra influência prejudicial das LDL oxidadas na função endotelial é sua capacidade de reduzir a vasodilatação endotélio dependente, por inibição da atividade de óxido nítrico sintase e conseqüente redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).

O óxido nítrico, além de suas propriedades vasodilatadoras, possui outras importantes, como a inibição das LDL, redução da adesão e ativação de leucócitos, da migração de monócitos, da ativação de células endoteliais por citocinas. Sua ação inibitória sobre as citocinas permite a estabilização da  $I\kappa\text{-}\beta\alpha$ , que inibe o fator nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), limitando assim o processo inflamatório nas células da parede vascular. O óxido nítrico também inibe a adesão e a agregação plaquetária e a proliferação da musculatura lisa vascular<sup>(13,14)</sup>. Essas propriedades, juntamente com a regulação do tônus vasomotor, são fundamentais para inibir a instalação ou o desenvolvimento do processo aterosclerótico.

A capacidade das células endoteliais sintetizarem substâncias vasoconstritoras como o tromboxano e a endotelina-1 influencia a aterogênese. A endotelina-1 é o mais potente agente vasoconstritor, sendo que sua secreção é induzida por diversas substâncias, destacando-se a trombina, interleucina-1, TGF $\beta$ -1, produtos derivados de plaquetas e neuro-hormônios, como vasopressina e catecolaminas. Todo

o processo de síntese da endotelina-1 está localizado no endotélio. As células endoteliais sintetizam o pró-hormônio endotelina-grande e expressam a enzima conversora de endotelina, além de expressar também receptores específicos para endotelina. A endotelina-1 ativa a adesão de leucócitos, a quimiotaxia de monócitos e a proliferação de células musculares lisas, aumentando também a captação de LDL oxidada pelas células endoteliais. Em estudo de Lerman et al, a endotelina-1 exibiu correlação com o número de vasos acometidos por aterosclerose, podendo vir a constituir-se em um marcador do grau de acometimento vascular por aterosclerose <sup>(15)</sup>.

Uma característica particular do endotélio que pode ser de grande importância no processo aterosclerótico é o fato que as células endoteliais crescem obrigatoriamente em uma monocamada, impedindo que as células endoteliais distantes de um sítio de injúria possam participar do processo de reparação da superfície desprovida de endotélio. Em outras palavras, apenas as células na margem de uma injúria podem participar da resposta reparadora. Assim, se um sítio anatômico particular é repetidamente comprometido em um período prolongado, e se as células endoteliais que o regeneram perdem sua capacidade de replicação, as células que se localizam distalmente a este sítio podem não ter capacidade de participar do processo, simplesmente devido ao fato de não atingirem a região comprometida para realizar a replicação. Além disso, as células endoteliais regeneradas que repõem o endotélio desnudado podem não apresentar função normal e responderem de forma diferente do endotélio intacto a fatores vasoativos.

### 1.3 Aterosclerose e genética

Segundo Collins, suas observações após o projeto genoma, o permitem afirmar que “virtualmente todas as doenças, à exceção de alguns traumas, possuem um componente hereditário” <sup>(16)</sup>. Desde 1887, William Osler fazia referências à tendência familiar significativa da doença arterial coronária (DAC) <sup>(16)</sup>. A DAC tem concordância em gemelaridade em 15% a 25% dos gêmeos dizigóticos e em 39% a 48% dos monozigóticos <sup>(17)</sup>.

Atualmente, sabe-se que a predisposição familiar para aterosclerose e cardiopatia isquêmica é poligênica e, na maioria das situações, está relacionada a outros fatores de risco, como hipertensão, diabetes, tabagismo, dislipidemias, fatores trombogênicos e processos infecciosos. As pesquisas genéticas atuais estão direcionadas sobretudo ao estudo de alterações genômicas, pontuais ou não, e que, isoladamente ou em conjunto com outros fatores genéticos ou ambientais, levam a modificações fenotípicas associadas à progressão ou instabilidade da aterosclerose.

A natureza e o número de genes envolvidos no desenvolvimento da DAC não se encontram totalmente elucidados. Estima-se que mais de 400 genes estejam implicados na regulação do processo aterosclerótico, envolvendo função endotelial, coagulação, inflamação e metabolismo das gorduras e carboidratos<sup>(18)</sup>. O metabolismo das lipoproteínas é provavelmente o melhor compreendido. Muitos genes envolvidos nesse processo foram identificados, alguns dos quais fortemente relacionados à DAC. Apesar de um único defeito genético causar a hipercolesterolemia

familiar e esta se manifestar como DAC prematura, a forma mais clássica da doença é heterogênea, de início tardio, com herança não explícita, resultante da interação de uma grande variedade de fatores de risco ambientais com um ou mais genes suscetíveis<sup>(19)</sup>.

As doenças cardiovasculares podem ser abordadas pela genética, baseando-se primordialmente na relação estreita entre o DNA (portador do código genético), o RNA (mensageiro entre o núcleo e o citoplasma, transferindo o código genético) e as proteínas (produto genético final). Cada gene (DNA) contém o código para uma ou mais proteínas relacionadas. Em adição ao código contido no DNA, cada gene tem uma seqüência regulatória que controla seu nível de expressão. É a parte regulatória de cada gene que deve ser ativada para iniciar a produção do RNA (transcrição). A expressão dos genes em diferentes tipos celulares depende da interação da seqüência de DNA regulatória dos vários genes com as proteínas nucleares. Essas proteínas regulatórias, designadas fatores de transcrição, podem reconhecer a seqüência regulatória no DNA e modular o nível de transcrição<sup>(20)</sup>.

Muitas técnicas são usadas em biologia molecular na tentativa de identificar diferenças genéticas entre os indivíduos que podem estar relacionadas à expressão fenotípica de algumas doenças. Os termos “polimorfismos” e “mutação” são utilizados para referir-se a uma série de variações genéticas. Se a variação da seqüência de um gene não é incomum (maior que 1% da população) definimos como polimorfismo. Se a diferença é menos comum, o termo usado é variante genética. Uma vez

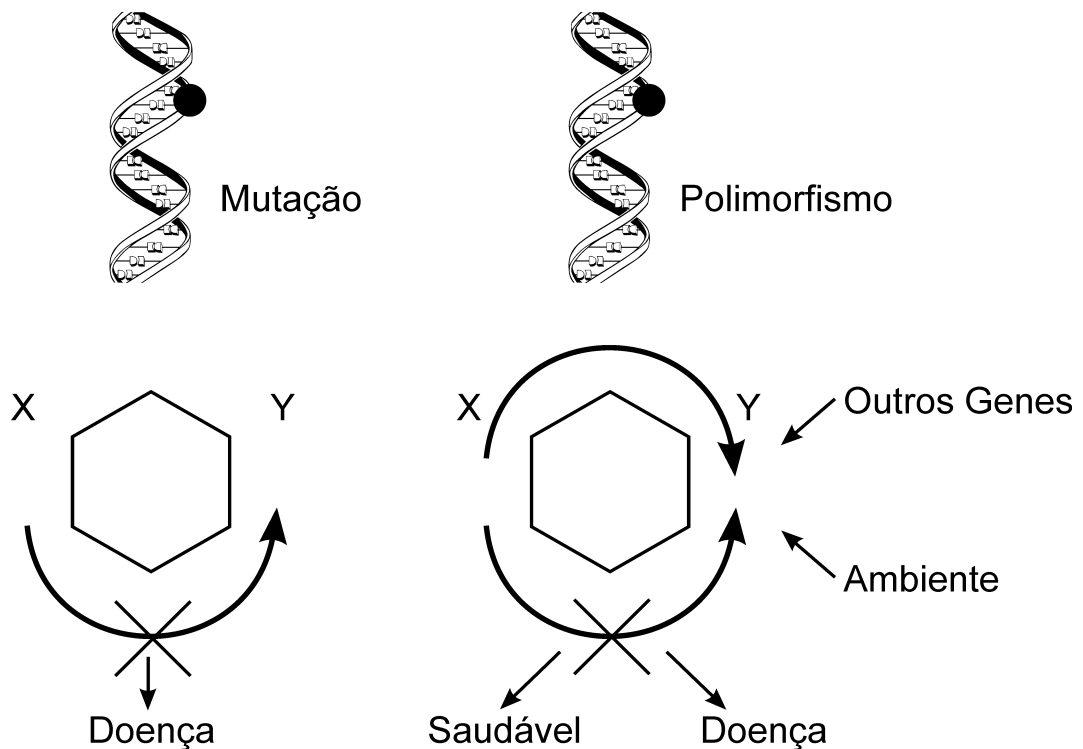
demonstrado que uma determinada alteração na seqüência do DNA é a causa da doença, ela é referida como mutação. Estima-se que um polimorfismo em um único nucleotídeo (pontual) ocorre em cada 1000 pares de bases no DNA. Muitas destas alterações parecem estar posicionadas em seqüências do DNA que não são codificadas, as quais correspondem a 90% do total do DNA. Assim, apenas uma minoria dos polimorfismos pontuais pode ser detectada dentro dos genes. Os polimorfismos únicos presentes nas seqüências de DNA que são codificadas podem produzir alterações se o código genético for modificado, ocasionando uma substituição do aminoácido. Devido à redundância da cadeia genética, determinados polimorfismos não resultam em qualquer efeito<sup>(21)</sup>.

Alguns polimorfismos, posicionados tanto em seqüências regulatórias como nos íntrons, podem afetar a regulação da transcrição. Muitos polimorfismos aumentam o nível de transcrição, enquanto outros o reduzem. Os polimorfismos localizados fora da região codificadora estão associados a aumento dos níveis de proteína e de sua atividade<sup>(20,21)</sup>.

Para testar o envolvimento de um polimorfismo em um único nucleotídeo (SNP), em uma doença ou condição específica, comparamos as freqüências dos alelos (genes alelos são os que atuam no mesmo caráter e estão presentes nos cromossomos homólogos) em indivíduos afetados e não afetados (ou casos e controles). Estes estudos para aterosclerose e seus fatores de risco apresentam infelizmente resultados inconsistentes, pois não conhecemos todos os SNPs. Além disso, uma

variante polimórfica em um único nucleotídeo pode estar associada com a aterosclerose, não porque seja causa biológica, mas porque se correlaciona estatisticamente com a variante causal. Esta possibilidade é plausível porque alelos em diferentes “locus” são às vezes encontrados juntos em frequências maiores ou menores do que normalmente esperadas. Em genética populacional, este padrão não randômico é chamado de equilíbrio de ligação (“linkage disequilibrium”). A ligação genética explica porque dois genes (ou loci) que apresentam localização muito próxima em determinado cromossomo, permanecem durante a duplicação neste mesmo cromossomo<sup>(22)</sup>.

Existe um modelo clássico para entender a base genética da aterosclerose e a DAC (Figura 2). Nesse modelo, uma variação comum da seqüência do DNA (polimorfismo) é o responsável por diferenças na expressão ou atividade de um “produto genético” relevante no desenvolvimento da aterosclerose (p.ex: uma enzima que converte um substrato X no produto Y). Diferenças geneticamente determinadas na atividade da enzima podem ser totalmente compatíveis com um padrão saudável; entretanto, na presença de fatores ambientais adversos (p.ex: fumo ou dieta hipergordurosa) ou na presença de outros polimorfismos em locais adicionais, a aterosclerose pode desenvolver-se<sup>(23)</sup>.

**Alteração genética única****Doença complexa**

**Figura 2** - Modelo representativo do mecanismo pelo qual um polimorfismo comum influencia a suscetibilidade a uma afecção complexa como a aterosclerose. Nos distúrbios genéticos únicos (painel à esquerda) mutações raras no gene resultam em significativos distúrbios na função da proteína codificada, sendo necessárias e suficientes para resultar em doença. Em contraste, em doença complexa (painel à direita) polimorfismos comuns causam alterações sutis na expressão ou atividade da proteína codificada, que pode ser compatível com um padrão saudável; entretanto, na presença de fatores ambientais adversos ou influências genéticas leva ao desenvolvimento da doença.



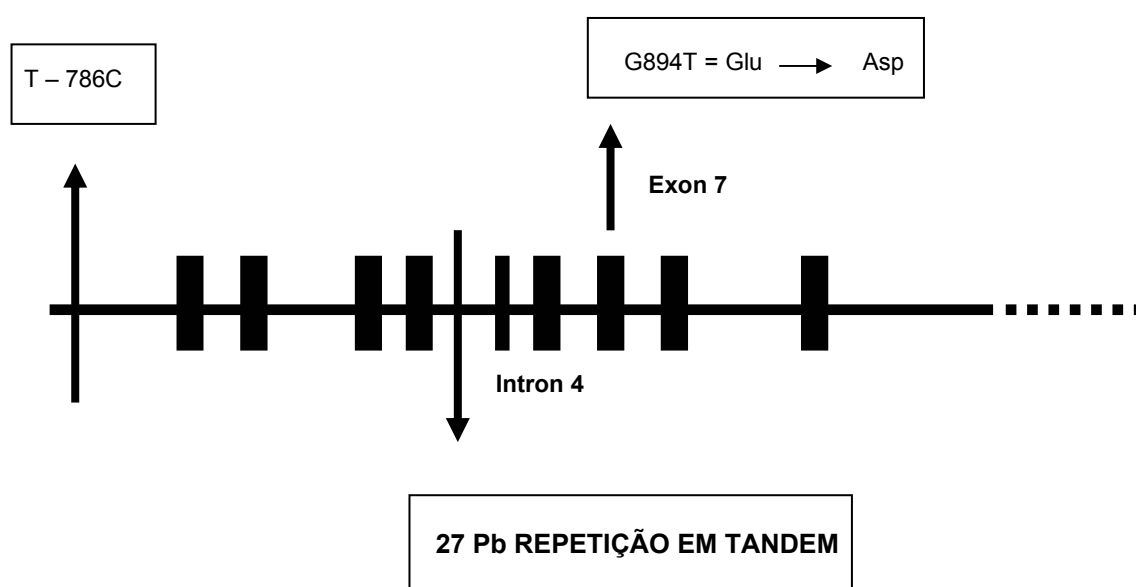
## 1.4 Biodisponibilidade do óxido nítrico

Apesar da estreita vinculação entre endotélio e aterosclerose, ainda não está claro qual o mecanismo preciso que induz à reduzida biodisponibilidade local do óxido nítrico. As hipóteses formuladas são: (1) geração reduzida de NO; (2) destruição aumentada de NO; (3) ação reduzida do NO.

A *geração reduzida de NO* pode ocorrer por diminuição na produção ou atividade deficiente da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Essas alterações na eNOS podem ser devidas a modificações genotípicas. O gene da eNOS consiste de 26 éxons e 25 íntrons e está localizado no braço longo do cromossomo 7q35-36 e é sede de diversos polimorfismos, que podem afetar a produção normal da eNOS. Muitos desses polimorfismos já foram descritos<sup>(5,24)</sup>.

Na região promotora já foram encontrados os polimorfismos de única base, T-1468 A, A-922G e T-786C. Dentro dos genes existem polimorfismos pontuais no íntron 2, IVS2 + 42G > A (G561A), íntron 11, IVS11 + 174 A > G (A3185G); íntron 12, IVS 12 + 52G > T (G3411T), íntron 18, IVS18 + 27 A > C (A27C), íntron 22, IVS 22 + 15 A > G (A6007 G), E íntron 23, IVS23 + 11 G > T (G624T). Repetições em tandem são encontradas no íntron 2 e 8 (32pb repetições), íntron 4 (27pb repetições), e íntron 13, IVS 12 + 81 (AC) 17-44. Algumas dessas variações são comuns, podendo estar presentes em diferentes etnias. Polimorfismos nos exons incluem o 5172C > T (C74T), no exon 6 (substituição de base que codifica o mesmo aminoácido) e 5557G > T (G894T) no exon 7<sup>(24)</sup>.

Os polimorfismos mais comumente relacionados com a aterosclerose e suas manifestações clínicas são o GLU298ASP, T-786C e o intron 4 (Figura 3 e Tabela 1).



**Figura 3** – Esquema representativo do gene da eNOS, ilustrando os polimorfismos relacionados com aterosclerose

**Tabela 1** – Genótipos e respectivos alelos relacionados com os polimorfismos da eNOS

Polimorfismo	Genótipo	Alelo
G897T	TT TG GG	T
T-786C	CC TC TT	C
Intron 4a/4b	4a/4a 4a/4b 4b/4b	4a

O polimorfismo GLU298ASP (G894T) é um dos polimorfismos mais estudados da eNOS. Caracteriza-se pela substituição do aminoácido glutamato pelo aspartato, na posição aminoácídica 298 da estrutura protéica da enzima, o que corresponde, no gene, à substituição de uma guanossina por uma tirosina, na posição 894 do exon 7 (G894T). Tesouro e col. demonstraram que esta mutação poderia afetar a suscetibilidade da eNOS à clivagem, embora ainda o mecanismo não seja completamente conhecido<sup>(25)</sup>. Haydock mostrou que a ocorrência do alelo homozigótico Asp 298TT é significativamente maior nos pacientes com doença coronária angiograficamente comprovada quando comparados ao grupo controle<sup>(26)</sup>.

Kugiyama em 1998, mostrou associação positiva entre o polimorfismo GLU298Asp e espasmo arterial coronário, em estudo realizado em 113 pacientes com espasmo coronário (diagnosticado por injeção intracoronária de acetilcolina) e em 100 indivíduos controle<sup>(27)</sup>. Outros trabalhos mostraram associação entre polimorfismo GLU298Asp e hipertensão arterial<sup>(28)</sup>.

Hingorani, em um primeiro estudo, avaliou 298 pacientes com lesões significativas à cineangiocoronariografia e 138 indivíduos saudáveis e, posteriormente, 249 pacientes com infarto do miocárdio em adultos jovens e 183 controles. Foi observado aumento de homozigotos para a variante Asp298 em pacientes com doença arterial coronária detectada pela cinecoronariografia e em pacientes adultos jovens com IAM, quando comparados aos respectivos grupos controles<sup>(26)</sup>.

Apesar de muitos trabalhos apresentarem associação entre o polimorfismo GLU298Asp e doenças cardiovasculares, outros estudos

mostraram resultados contraditórios, indicando que pesquisas ainda devem ser realizadas para avaliar o real impacto do polimorfismo G894T no exon 7 do gene da eNOS nas doenças cardiovasculares em diferentes populações, bem como a interação do mesmo com outras variações genéticas e fatores ambientais<sup>(29,30)</sup>.

Um outro polimorfismo da eNOS associado ao risco cardiovascular aumentado situa-se na região 5 “flanqueada” do gene da eNOS. O polimorfismo T-786 → C resulta em redução significativa da atividade do promotor do gene da eNOS. Segundo Nakayama, o polimorfismo T-786 → C está associado com IAM, especialmente em pacientes sem doença angiograficamente documentada, ocorrência comum em pacientes jovens com IAM<sup>(30a)</sup>. Outros estudos, como o ECTIM e o Australiano, não demonstraram associação positiva entre esse polimorfismo e o risco de DAC<sup>(29,31)</sup>.

Os estudos sobre o polimorfismo do intron-4, como os demais, também apresentaram resultados contraditórios. A maioria desses estudos mostrou que pacientes portadores do alelo 4a, os quais possuem quatro cópias em vez de cinco da repetição de 27 pares de base, são mais propensos a desenvolver DAC<sup>(32)</sup>.

Wang demonstrou que o alelo 4a constitui fator de risco tabagismo-dependente para DAC obstrutiva em caucasianos<sup>(33)</sup>. Ichihara e col encontraram o mesmo alelo associado a IAM na população japonesa, achado confirmado pelos estudos de Hooper e col nos afro-americanos<sup>(34,35)</sup>. Ao contrário, Sigusch não encontrou associação significativa entre doença

coronária e o polimorfismo do intron 4<sup>(36)</sup>. Além dos resultados conflitantes entre a ocorrência de DAC e o polimorfismo do intron 4, resultados contraditórios a respeito do fenótipo resultante do homocigoto 4a foram relatados, sendo que alguns estudos mostraram aumento da atividade enzimática da eNOS nos pacientes com alelo 4a<sup>(37)</sup>.

Uma outra causa de geração reduzida de NO é a deficiência do substrato L- arginina que pode ocorrer por uma série de mecanismos: competição com outros aminoácidos (p. ex. glutamina); inibição da L- arginina pela LDL oxidada; alterações da atividade de enzimas que sintetizam a L-arginina (L-arginina sintase); aumento da atividade de enzimas que degradam a L-arginina, como a arginase; formação durante o estresse oxidativo da dimetil arginina assimétrica (ADMA), um falso substrato, que pode competir com a L-arginina, acarretando uma redução significativa da produção de óxido nítrico<sup>(38)</sup>.

A geração reduzida de NO pode ocorrer também devido à deficiência dos co-fatores imprescindíveis para a concretização da reação da L-arginina com o oxigênio, como o cálcio e a tetrahydrobiopterina (BH4). O aumento do cálcio intracelular promove a ligação da calmodulina à eNOS, favorecendo sua ativação. A BH4 é um co-fator essencial para a atividade catalítica das três isoformas da NOS e um importante determinante da produção de NO em ambientes fisiológicos e patológicos<sup>(39)</sup>.

*A destruição aumentada de NO* é devida em geral a um processo que se inicia pela deficiência dos co-fatores necessários à produção do NO, como o cálcio e BH4. O papel desses co-fatores é efetuar de forma

adequada a transferência de elétrons durante a catálise enzimática da síntese de NO, impedindo que estes elétrons possam ser capturados pelo oxigênio molecular, gerando o radical superóxido (p. ex.  $O_2 + \text{elétron} \rightarrow O_2^-$ ), fenômeno este conhecido por desacoplamento da eNOS. O radical superóxido formado nesta situação pode gerar o intermediário tóxico peroxinitrito, um dos responsáveis pela destruição aumentada de NO.

A ação reduzida do NO pode ocorrer por diversos mecanismos:

1) Alteração no acoplamento entre o receptor da membrana e o NO, dificultando sua liberação; 2) Comprometimento da difusão. Na presença de lesões ateroscleróticas que provoquem o espessamento da camada neoíntima, o NO teria dificuldade em atingir as células-alvo. 3) Reduzida sensibilidade das células-alvo ao NO. Em placas ateroscleróticas avançadas que atingem a camada média, ou em distúrbios específicos desta camada (aterosclerose de Monckberg) as células musculares lisas podem ser afetadas a ponto de, em presença de níveis normais de NO, não conseguirem uma vasodilatação eficaz.

Evidências diversas indicam que a disfunção endotelial participa ativamente na indução da aterosclerose; entretanto, os mecanismos que expressam esta disfunção durante a aterogênese não são totalmente conhecidos. Pesquisas nessa área podem contribuir para elucidar esse importante elo fisiopatológico.

## 1.5 Infarto do miocárdio em jovens: Um modelo de estudo

Em 1908, Fremont e Smith relataram, pela primeira vez, a ocorrência de placas ateroscleróticas em necrópsias de adolescentes e adultos jovens<sup>(40)</sup>. Posteriormente, Glindy e col, em 1937, descreveram 100 casos de infarto agudo do miocárdio (IAM) em jovens, durante três anos de observação<sup>(41)</sup>. A aterosclerose em jovens foi descrita em outros estudos de necrópsia realizados em grandes guerras. Destacam-se os trabalhos de French e Dock (1944) na Segunda Guerra Mundial, que incluíram 80 necrópsias de soldados entre 20 e 36 anos e cujos laudos apontaram o IAM como “causa mortis”<sup>(42)</sup>; e os de Enos (1955), que relatou o resultado das necrópsias de soldados americanos mortos na Guerra da Coréia<sup>(43)</sup>. Informações similares, confirmando a existência de doença aterosclerótica coronária (DAC) em indivíduos jovens, foram obtidas de estudos necrópsicos dos soldados mortos na Guerra do Vietnã<sup>(44)</sup>. Em 1970, Welch publicou os primeiros casos de lesões coronárias à cinecoronariografia, nesse grupo etário<sup>(45)</sup>.

A ocorrência de IAM em pacientes abaixo de 40 anos é rara. No estudo Framingham, a incidência em 10 anos foi 12,9/1000 em homens de 30 a 34 anos e 5,2/1000 em mulheres de 35 a 44 anos. Homens e mulheres de 55 a 64 anos apresentaram incidência de IAM cerca de 8 a 9 vezes maior<sup>(46)</sup>. Globalmente, cerca de 4% dos pacientes com IAM situam-se na faixa etária abaixo de 40 anos<sup>(47)</sup>. Em nosso meio, 4549 pacientes com menos de 45 anos de idade foram internados devido a IAM, no ano 2000<sup>(48)</sup>.

A causa mais comum de IAM nos jovens é a aterosclerose<sup>(49)</sup>. Admite-se que seja uma forma especial de aterosclerose, com progressão mais rápida, formação de placas ateroscleróticas em curto período de tempo e com alto grau de complexidade (placa rota, placa complicada, ou ambas)<sup>(50,51)</sup>.

Recentes estudos histopatológicos evidenciaram que em pacientes jovens com IAM as placas ateroscleróticas são constituídas por grande quantidade de células espumosas ricas em lípidos com pequena quantidade de matriz extracelular e de cálcio<sup>(50,52)</sup>. Os resultados anatomopatológicos do estudo PDAY evidenciaram que muitas das pequenas placas de localização proximal na artéria descendente anterior eram, na realidade, lesões avançadas tipo V (segundo a classificação da American Heart Association). Essas observações sugerem que, embora essas pequenas placas não provocassem estreitamento significativo do lúmen, eram potencialmente danosas devido à presença de um centro necrótico próximo à superfície luminal, especialmente nos “ombros” das placas. Admite-se que são os componentes da placa, mais do que seu tamanho, que determinam o fenômeno da trombose<sup>(53)</sup>.

No *Bogalusa Heart Study* foram encontradas estrias gordurosas em cerca de 50% dos indivíduos entre 2 e 15 anos de idade e em cerca de 85% entre 21 e 39 anos. Em relação à placa fibrosa na coronária, a prevalência foi de 8% entre 2 e 15 anos e 69% entre 26 e 39 anos<sup>(54)</sup>. No estudo de Tuzcu<sup>(55)</sup>, que utilizou dados do ultra-som intracoronário, observou-se presença de aterosclerose em 28% dos indivíduos abaixo de 30 anos e em 17% dos menores de 20 anos.



Em relação à avaliação angiográfica, o IAM em jovens apresenta uma alta taxa de lesões uniarteriais. No estudo CASS, essa taxa foi 39% em pacientes abaixo de 35 anos<sup>(56)</sup>. O IAM em jovens também se caracteriza por associar-se a alta taxa de artérias coronárias angiograficamente normais; 9% a 17% em idade inferior a 35 anos, comparados com 0% a 4% em pacientes com idade > 65 anos<sup>(57)</sup>. As possíveis causas de IAM em jovens com coronárias normais são: vasoespasmos (p.ex.: usuários de cocaína); hiperagregação plaquetária; trombose com recanalização (p.ex.: êmbolo coronário de válvula mitral reumática); vasculite (lupus eritematoso sistêmico, periarterite nodosa); anormalidades congênitas (origem anômala da coronária esquerda do tronco da artéria pulmonar, artéria coronária originada do seio esquerdo de Valsalva, coronária direita ou esquerda única<sup>(58)</sup>); trauma de tórax, doença miocárdica (p.ex.: miocardiopatia hipertrófica); endocardite infecciosa (alta incidência de infarto em jovens na Rússia)<sup>(59)</sup>.

Do ponto de vista epidemiológico, o IAM em jovens ocorre mais freqüentemente no sexo masculino. No estudo de Framingham, IAM foi detectado clinicamente em 0,6/1000 homens e em 0,2/1000 mulheres com idade inferior a 45 anos e em nenhum caso entre 30 e 39 anos<sup>(47)</sup>. O IAM em jovens ocorre mais comumente em indivíduos da raça branca, mesmo em países nos quais outras raças predominam<sup>(49)</sup>.

Os fatores de risco mais comumente envolvidos na gênese do IAM neste subgrupo de pacientes são:

- a) Tabagismo. É o principal fator de risco em jovens com IAM, presente em cerca de 80% dos casos.

- b) Antecedentes familiares. Presentes em 50% dos casos sugerem fortemente um componente genético no desenvolvimento da DAC nessa faixa etária, com risco aumentado em cerca de 10 vezes<sup>(60)</sup>.
- c) Dislipidemias. A hipercolesterolemia é um dos fatores de risco mais comum nos pacientes jovens com IAM (25% a 89%). As formas de apresentação mais relevantes são a hipercolesterolemia familiar, hipertrigliceridemia, elevação de lipoproteínas contendo apo B, diminuição do HDL-C (1) e aumento da LP (a)<sup>(61)</sup>.
- d) Hipertensão arterial. A prevalência de hipertensão arterial em pacientes jovens com IAM é relativamente pequena, cerca de 25% dos casos<sup>(60,62)</sup>. Talvez a hipertensão arterial não seja um fator de risco importante nessa faixa etária devido a sua curta duração, ou seja, tempo insuficiente para o desenvolvimento da aterosclerose.
- e) Diabetes Melito. A ocorrência de diabetes nesses pacientes é desprezível, porém quando presente agrava o prognóstico<sup>(62)</sup>.

O quadro clínico de IAM em jovens caracteriza-se por : 1) baixa ocorrência de angina típica ou atípica prévia (25%); 2) maior proporção de IAM inferior; 3) baixa prevalência de infarto não Q (12%); 4) boa evolução intra-hospitalar, com menores taxas de complicação e de mortalidade. A explicação mais plausível para a tendência a melhor prognóstico do IAM em jovens seria a alta taxa de coronárias normais ou de doença uniarterial<sup>(63)</sup>.

A observação destes dados permite supor que o IAM abaixo de 40 anos possa ser uma entidade especial com características demográficas

(sexo masculino) e fatores de risco (tabagismo e antecedentes familiares) bem definidos e que se repetem, no tocante às proporções, nos diversos trabalhos sobre o tema.

Além disso, a grande associação do IAM em jovens com coronárias angiograficamente normais e lesões uniarteriais permite inferir que graus variáveis de disfunção endotelial possam estar presentes de forma única ou associada na gênese da ocorrência do evento, sugerindo este tipo de IAM como modelo de estudo para a disfunção endotelial.

## **1.6 Avaliação da função endotelial**

### **1.6.1 Avaliação bioquímica e genética**

Diversos métodos podem avaliar a integridade do endotélio vascular. Entre os métodos de pesquisa científica, destacam-se os sistemas de cultura de células endoteliais e sua interação com estímulos bioquímicos, farmacológicos e físicos. O cultivo de células endoteliais pode fornecer informações sobre as substâncias produzidas pelas mesmas com recursos da biologia molecular, como a determinação da expressão de proteínas e RNA mensageiro<sup>(64)</sup>.

Entre os mecanismos de avaliação mais estudados atualmente encontram-se as dosagens de NO, as de L-citrulina e as da variação porcentual de nitrito/nitrato após sobrecarga de L-arginina. A labilidade do

NO, com meia-vida curta, torna difícil sua medida direta. Uma possibilidade de medida do NO é a utilização da ressonância paramagnética eletrônica (EPR), pois sendo o NO paramagnético, liga-se com alta afinidade a uma variedade de quelantes metálicos e metaloproteínas<sup>(65)</sup>. Logo, é mais fácil do ponto de vista prático a dosagem de substâncias correlatas, nitrito e nitrato. O nitrito sérico é estável por várias horas, podendo ser quantificado na circulação pela cromatografia de troca de ânions de alta performance. A amostra sanguínea necessita preparação especial para minimizar a conversão de nitrito a nitrato, que ocorre no sangue em alta frequência (a concentração basal de nitrito no sangue é baixa e a de nitrato, 100 vezes maior). Por esse motivo, atualmente é grande o interesse pela dosagem de nitrato em amostras sanguíneas. O nitrato é um dos produtos da reação do óxido nítrico com a oxihemoglobina e o ânion superóxido. A dosagem do nitrito/nitrato sérico reflete a produção constitutiva endotelial de óxido nítrico. Entretanto, uma limitação prática refere-se à grande variação nos níveis basais entre indivíduos, podendo ser influenciada inclusive pela dieta<sup>(66)</sup>.

Por outro lado, diversos marcadores circulantes de inflamação vascular e disfunção endotelial têm sido estudados recentemente. A associação entre as moléculas de adesão celular (P-selectina, L-selectina, E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e PECAM - 1), integrinas e proteína C reativa ultra sensível, (PCRus) e a disfunção endotelial foi descrita de forma significativa em estudos populacionais, permitindo inferir que eles possam constituir-se em marcadores de lesão ou disfunção endotelial<sup>(67,68)</sup>.

O fibrinogênio, apesar de ser uma glicoproteína produzida pelo fígado e não diretamente pelo endotélio pode, por sua participação no processo

trombótico e como reagente de fase aguda, influenciar de forma significativa a função endotelial. O fibrinogênio aumenta a coagulação sanguínea, a viscosidade plasmática e a agregação plaquetária, sendo que estas funções são controladas diretamente pelo endotélio. Além disso, exerce ação sobre a parede vascular, favorecendo o depósito de fibrina e afetando as funções das células endoteliais pela redução da síntese de prostaciclina e estimulando a migração e a multiplicação das células musculares lisas<sup>(69)</sup>.

Uma outra evidência que vincula o fibrinogênio ao endotélio é sua associação com fatores de risco para DAC que influenciam as funções endoteliais, como o tabagismo e o LDL-c, sendo que atualmente o fibrinogênio é considerado um dos elementos de ligação entre fatores ambientais e o risco de DAC<sup>(70)</sup>. O próprio endotélio disfuncional em situações de injúria ou infecção pode gerar uma reação de fase aguda com subsequente liberação de citocinas e aumento dos níveis de fibrinogênio. Por todas estas características o fibrinogênio pode ser considerado um marcador de disfunção endotelial.

Diversos estudos mostraram a associação entre os níveis de fibrinogênio e ocorrência de DAC. O *Leigh Clinical Research Unit*, mostrou, em 297 homens seguidos por 7 anos, que o fibrinogênio plasmático foi o mais forte indicador independente de oclusão coronária futura<sup>(71)</sup>. O *Northerwick Park Heart Study* evidenciou altos níveis plasmáticos de fibrinogênio em pacientes com um evento cardiovascular fatal ou não fatal<sup>(72)</sup>. O estudo de Goterborg demonstrou correlação entre níveis altos de fibrinogênio e a incidência de doença arterial coronária e AVC<sup>(73)</sup>. O estudo

de Framingham também mostrou correlação entre níveis elevados de fibrinogênio e manifestações clínicas da aterosclerose, como IAM e AVC<sup>(74)</sup>. Além disso, observou-se nesse estudo que o aumento do fibrinogênio ocorria com frequência associado ao diabetes, hipertensão arterial e ao tabagismo. De outra parte, cerca de 50% dos tabagistas com doença arterial coronária apresentavam níveis elevados de fibrinogênio plasmático.

O estudo *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) avaliou 14.477 adultos com idade entre 45 a 64 anos seguidos por 5,2 anos. O fibrinogênio elevado esteve associado com um risco relativo para DAC de 1,48 para o homem e de 1,21 para a mulher<sup>(75)</sup>. O estudo *Prospective Cardiovascular Munster* (PROCAM) acompanhou 2.116 homens saudáveis, sendo que a incidência de eventos coronários foi 2,4 vezes maior no subgrupo com níveis maiores de fibrinogênio<sup>(76)</sup>. Recente meta-análise mostrou que o risco relativo de eventos cardiovasculares futuros é 1,8 vezes maior em pacientes no tercil superior de concentração do fibrinogênio<sup>(77)</sup>.

Estudos demonstraram que mais de 50% das variações do fibrinogênio são geneticamente determinadas, ocorrendo elevação como resposta à inflamação, infecções, traumas e estresse emocional<sup>(78)</sup>.

O fibrinogênio é composto por três pares de cadeias chamadas alfa, beta e gama, codificadas por três diferentes genes agrupados no braço longo do cromossomo 4q23-32. O passo limitante na expressão do fibrinogênio é a expressão da cadeia  $\beta$ . Pelo estudo de polimorfismo, identificaram-se algumas alterações na região promotora  $\beta$ . O polimorfismo mais estudado refere-se a uma substituição do nucleotídeo guanosina (G)

por uma adenosina (A) na região do par de base -455, anterior ao sítio de início da transcrição (G/A -455. HAE III). Recentes estudos demonstraram que indivíduos portadores do alelo -455A possuem concentrações aumentadas de fibrinogênio plasmático como resposta ao estímulo de fase aguda<sup>(79)</sup>. Um outro polimorfismo do fibrinogênio de substituição é o C148T (HIND III). Este polimorfismo, caracterizado pela substituição de uma citosina por uma timina, encontra-se na posição do par de base -148, anterior ao códon da cadeia  $\beta$  do fibrinogênio e está em completo “desequilíbrio de ligação” com o polimorfismo G455A<sup>(80)</sup>.

A associação destes dois polimorfismos com risco vascular aumentado permanece controversa. A presença do alelo T no polimorfismo C148T (HIND III) associou-se com a magnitude da aterosclerose avaliada angiograficamente em pacientes após IAM<sup>(81)</sup>. O genótipo AA do polimorfismo G455A HAE III associou-se com o risco de doença coronária em diabéticos chineses<sup>(82)</sup>. Entretanto, dois outros estudos, o Dinamarquês e o de Edinburg, não mostraram associação significativa desses polimorfismos com doença arterial coronária<sup>(83,84)</sup>.

A disfunção endotelial também pode ser avaliada pela dosagem de outros marcadores plasmáticos séricos, como: fator de von Willebrand, endotelina-1, nitritos, demetilargina assimétrica (ADMA), substância amilóide-1 e PAI-1. A dosagem do PAI-1 tem sido incluída em vários estudos como indicador de dano à célula endotelial e medida de disfunção endotelial. O PAI-1 é uma glicoproteína de 50 KDa da família SERPIN, encontrada no plasma, nas plaquetas, em células endoteliais, hepatócitos e

células da musculatura lisa, mas não está claro qual desses tipos celulares é o principal responsável pela secreção do PAI-1 no plasma “in vivo”. O PAI-1 existe nas formas nativa e inativa no plasma, sendo a forma ativa um complexo estável com a vitronectina, a qual se acredita protegê-lo da oxidação. Seu principal papel “in vivo” é como um rápido inibidor do ativador do plasminogenio tecidual (tPA), o maior ativador proteolítico do plasminogênio. Recentemente, o PAI-1 foi identificado como um componente da matriz extracelular<sup>(85)</sup>. Além de seu papel na fibrinólise, também está envolvido na remodelação tissular e migração celular. O PAI-1, liberado pelo endotélio a partir de estímulos como a angiotensina II e a endotelina, encontra-se aumentado em situações clínicas que cursam com disfunção endotelial. Os níveis de PAI-1 correlacionam diretamente com os níveis de triglicérides, obesidade e resistência à insulina. Expressão aumentada do PAI-1 já foi demonstrada, inclusive em placas ateroscleróticas<sup>(86)</sup>. O PAI-1 encontra-se expresso mais frequentemente em placas fibróticas e calcificadas, além de aumentar sua concentração à medida que as lesões ateroscleróticas se tornem mais avançadas<sup>(87)</sup>. O estudo PRIME, prospectivo, que avaliou 10.500 homens, mostrou haver associação do PAI-1 com o risco de desenvolver IAM<sup>(88)</sup>. Hamsten, em 1987, encontrou associação entre as concentrações plasmáticas de PAI-1 e o risco de desenvolver um segundo IAM, bem como níveis aumentados de PAI-1 em pacientes jovens com IAM<sup>(89)</sup>. Um estudo com pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio mostrou que aqueles com oclusão dos enxertos dentro de 10 dias apresentaram valores significativamente mais



altos de PAI-1 em relação àqueles sem oclusão<sup>(90)</sup>. Outros trabalhos demonstraram haver associação entre elevação do PAI-1 e angina, doença arterial coronária grave e isquemia recorrente<sup>(91)</sup>.

A medida direta da atividade do PAI-1 é difícil na prática clínica e requer utilização de anticoagulantes especiais e técnicas precisas de flebotomia, a fim de evitar a degranulação das plaquetas, fonte rica de PAI-1. Além disso, o PAI-1 apresenta grande variação circadiana.

Em relação à pesquisa genética, sabe-se que o PAI-1 é codificado por um único gene de aproximadamente 12 kb, localizado no braço longo do cromossomo 7 e é composto de 9 éxons e 8 íntrons<sup>(92)</sup>. Nove diferentes polimorfismos foram descritos no gene do PAI-1, os quais têm sido estudados como potenciais marcadores de sua atividade fisiológica. Entre os polimorfismos estudados encontram-se: um fragmento 3', utilizando a enzima de restrição HIND III, uma seqüência repetitiva CA intrônica (íntron 4) e, o mais importante, um polimorfismo 4G/5G inserção/deleção 675 pares de base, situados 5' acima do sítio de transcrição da área promotora do PAI-1<sup>(93)</sup>. Este polimorfismo é caracterizado por uma deleção "produzindo um alelo com uma seqüência de 4 guanosinas (4G) ou uma inserção produzindo um alelo com 5 guanosinas (5G)". O alelo 4G foi caracterizado como possuindo um promotor com maior atividade sob a estimulação de citocinas e associado com atividade plasmática de PAI-1 maior do que para o alelo 5G<sup>(94)</sup>. Estudos *in vitro* sugerem que o alelo 5G, mas não o alelo 4G, contém um sítio importante para a ligação de uma proteína DNA ligante que poderia estar atuando como repressor transcricional<sup>(93)</sup>.

Estudos clínicos têm demonstrado associação entre o polimorfismo 4G/5G e a atividade plasmática do PAI-1, nos quais o alelo 4G está associado com altos níveis de PAI-1 e hipofibrinólise. Alguns trabalhos mostraram maior prevalência do alelo 4G em pacientes com infarto do miocárdio e idade inferior a 45 anos, em relação ao grupo controle<sup>(94a)</sup>.

### **1.6.2 Métodos de imagem**

A vasodilatação é a mais importante função endotelial, podendo ser avaliada de forma direta e invasiva, na qual a função endotelial é medida como resposta vasomotora a estímulos farmacológicos ou físicos, como a acetilcolina, metacolina, bradicinina, serotonina, substância P e estresse de cisalhamento. Essa resposta vasodilatadora endotélio-dependente pode ser utilizada como parâmetro da biodisponibilidade de NO<sup>(95)</sup>. Esse método invasivo pode ser realizado por intermédio da angiografia coronária quantitativa ou pela pletismografia da artéria braquial. A angiografia coronária quantitativa é técnica bem estabelecida para a avaliação do diâmetro arterial em resposta a concentrações crescentes de acetilcolina intracoronária. Vários estudos atestaram a eficácia deste método. Ludmer e col. demonstraram, em seu estudo pioneiro, que a injeção de acetilcolina intracoronária provocava vasodilatação epicárdica em pacientes com artérias coronárias angiograficamente normais; entretanto, em presença de doença aterosclerótica comprovada, ou na ausência de lesões coronárias visíveis à angiografia mas com fatores de risco cardiovasculares clássicos,

ocorria vasoconstrição anormal<sup>(96)</sup>. A pletismografia arterial, também por ser método invasivo, não é comumente aplicada, estando restrita à pesquisa científica.

Os métodos de avaliação indireta são a pletismografia venosa, por intermédio da veia dorsal da mão (método minimamente invasivo), ou pela avaliação da hiperemia reativa ou vasodilatação fluxo mediada (VFM), utilizando de forma não invasiva a tomografia por emissão de pósitron após estímulo com adenosina ou dipiridamol ou, mais comumente, o ultra-som de alta resolução da artéria braquial. A VFM é um fenômeno que expressa a capacidade de um vaso dilatar-se em resposta a um aumento do fluxo ou, mais precisamente, ao estresse de cisalhamento. O principal mediador da VFM é o NO derivado do endotélio. Este método baseia-se em princípios da fisiologia endotelial, com sua capacidade sensora e efetora de diversos estímulos físicos e químicos. A célula endotelial, através de receptores de membrana e mecanismo de transdução do sinal em resposta a esses estímulos pode sofrer uma série de modificações em sua fisiologia. Uma dessas modificações é a abertura dos canais de potássio cálcio-ativados em resposta ao estresse de cisalhamento. Isto acarreta hiperpolarização da célula endotelial com conseqüente aumento do cálcio intracelular. O aumento do cálcio intracelular ativa a eNOS que libera NO e acarreta relaxamento do músculo liso vascular subjacente, resultando vasodilatação e aumento do diâmetro arterial<sup>(97,98)</sup>.

Na prática, o ultra-som realiza medidas sucessivas do diâmetro da artéria braquial em resposta ao aumento de fluxo por hiperemia reativa ou

nitrito sublingual. A hiperemia reativa é obtida por oclusão da artéria braquial por um breve período (1 a 5 min) com liberação de mediadores vasodilatadores como a adenosina, íons H<sup>+</sup> e EDHF (fator de hiperpolarização derivado do endotélio) no tecido isquêmico. Ao ocorrer a interrupção da oclusão com restauração do fluxo arterial, existe uma hiperemia (fluxo sanguíneo 100% a 300% superior ao fluxo basal), com aumento do estresse de cisalhamento que desencadeia a resposta endotelial. A utilização de vasodilatadores independentes do endotélio, como a nitroglicerina, permite estabelecer que a redução da vasodilatação fluxo mediada ocorre por disfunção endotelial, e não por disfunção do músculo liso vascular<sup>(99)</sup>.

Vários estudos em pacientes com aterosclerose ou com fatores de risco demonstraram que a disfunção endotelial ocorre não somente na circulação coronária mas também na circulação periférica, indicando que a disfunção endotelial é generalizada e sistêmica. A VFM da artéria braquial foi avaliada em pacientes com fatores de risco cardiovascular e mostrou-se anormal em pacientes hipertensos, diabéticos, dislipidêmicos e tabagistas, com ou sem doença aterosclerótica documentada<sup>(14)</sup>, havendo correlação positiva entre a função endotelial da artéria braquial e a da artéria coronária nos pacientes que se submeteram aos dois testes<sup>(14)</sup>.

A disfunção endotelial avaliada pelo ultra-som de artéria braquial tem a capacidade de prever eventos cardiovasculares. Os eventos cardiovasculares, incluindo revascularização percutânea e cirúrgica, ocorrem mais freqüentemente em pacientes com VFM alterada (<10%) comparados com os pacientes com VFM preservada (≥10%). Esses achados foram comprovados por Neunteuff e col, que estudaram pacientes com angina de

peito submetidos a cineangiocoronariografia e que foram seguidos por cinco anos com ultra-som de artéria braquial<sup>(100)</sup>.

Em síntese, diversos métodos podem ser empregados para avaliação da função endotelial, mas o ultra-som de artéria braquial vem ganhando destaque progressivamente, por ser não invasivo, de fácil aplicação e grande reprodutibilidade.

---

## **2. OBJETIVOS**

---

- 1) Avaliar a função endotelial em um grupo de pacientes com IAM prévio, idade abaixo de 40 anos e correlacioná-la com a produção de nitrato.
  
- 2) Avaliar a importância das influências ambientais (fatores de risco) e genéticas (polimorfismo da óxido nítrico sintase endotelial) na função endotelial desses pacientes.

---

## **3. MÉTODOS**

---



## 3.1 CASUÍSTICA

### 3.1.1 Características dos pacientes

Foram incluídos 128 pacientes com idade abaixo de 40 anos, de ambos os sexos, que haviam apresentado IAM há pelo menos dois meses antes do início do estudo.

O diagnóstico de IAM foi estabelecido somente quando os três critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde em 1959<sup>(101)</sup> estivessem presentes simultaneamente: a) clínicos: relato de dor, de localização torácica anterior, em aperto, peso ou queimação, com duração superior a 20 minutos; b) eletrocardiográficos: supradesnivelamento do segmento ST  $\geq$  1mm, a 0,02 segundos após o ponto J e que evolui para formação de onda Q (infarto Q) patológica (duração  $>$  0,03s e amplitude  $>$  3 mm), ou infradesnivelamento do segmento ST e/ou alterações das ondas T que não evoluem para formação de ondas Q patológicas (infarto não Q). Estas alterações eletrocardiográficas deveriam estar presentes em pelo menos duas derivações contíguas do eletrocardiograma convencional, incluindo V7 e V8. De acordo com a localização das ondas Q, o infarto foi classificado como anterior (VI-V4),

lateral (D1, aVL e/ou V5-V6) ou inferior (DII, DIII, aVF). O IAM lateral foi incluído no grupo anterior e o dorsal (onda R em V1-V2 maior que 40 milivolts) foi incluído como inferior; c) critérios enzimicos: valores elevados (pelo menos o dobro do valor de referência) da enzima creatinofosfoquinase fração miocárdica (CKMB)<sup>(60)</sup>.

### **3.1.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentassem qualquer das seguintes condições: 1) insuficiência renal crônica; 2) insuficiência hepática; 3) doenças inflamatórias; 4) angina instável; 5) distúrbio endócrino; 6) neoplasia; 7) colagenose; 8) doenças hematológicas; 9) uso de anticoagulantes orais; 10) doença vascular periférica comprovada; 11) hipercolesterolemia familiar conhecida ou presente em membros da família. Excluíram-se também os pacientes que antes do IAM apresentassem as seguintes cardiopatias: 1) miocardiopatia, incluindo doença de Chagas; 2) valvopatia; 3) doença congênita; 4) pericardiopatia

### **3.1.3 Características do grupo controle**

O grupo controle foi constituído por 121 indivíduos jovens de ambos os sexos, que não apresentavam história ou evidencia de doença clínica atual. A doença arterial coronária foi afastada por um teste ergométrico considerado totalmente dentro da normalidade.

### 3.1.4 Fatores de risco cardiovascular

No grupo dos pacientes com infarto abaixo de 40 anos (grupo IAM), os seguintes fatores de risco clássicos para doença arterial coronária foram avaliados: diabetes, hipertensão arterial, tabagismo, antecedentes familiares, dislipidemias, obesidade. Os valores para estabelecimento desses fatores de risco foram:

- 1) Hipertensão arterial sistêmica - De acordo com os dados das IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial<sup>(102)</sup> foram considerados hipertensos os pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva ou que apresentavam história de pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg, utilizando-se como referência a média de avaliações em pelo menos três dias diferentes.
- 2) Diabetes Melito - Duas medidas de glicose plasmática de jejum  $\geq 126$  mg/dl em dois dias distintos, ou portadores de sintomas clássicos de diabetes associados a glicemia  $\geq 200$  mg/dl, ou pacientes recebendo terapia com insulina ou hipoglicemiante oral.
- 3) Dislipidemias - De acordo com as III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Dislipidemias<sup>(103)</sup>, os seguintes valores foram adotados:
  - a) Hipercolesterolemia: colesterol total  $> 240$  mg/dl
  - b) LDL colesterol elevado:  $> 160$  mg/dl
  - c) HDL colesterol baixo:  $< 40$  mg/dl
  - d) Hipertrigliceridemia: triglicérides  $> 200$  mg/dl

- 4) História familiar para doença coronária precoce - Pacientes com relato de doença coronária em pais ou irmãos, abaixo dos 55 anos em homens, ou de 65 anos em mulheres.
- 5) Tabagismo - Fumantes ativos ou com abstinência de tabaco há menos de três anos antes do IAM foram considerados tabagistas, pois trabalhos populacionais envolvendo mais de 1000 pacientes constataram que três anos após cessar o tabagismo o risco para infarto ou óbito era similar aos do que nunca fumaram<sup>(60)</sup>. Pacientes que nunca fumaram ou fumaram por um período inferior a um mês foram definidos como não tabagistas. Os pacientes foram considerados tabagistas se fumassem pelo menos 5 cigarros/dia.
- 6) Obesidade - O critério de obesidade foi adotado com base no índice de massa corpórea para todos os participantes do estudo. O índice de massa corpórea foi calculado dividindo o peso em kilogramas pelo quadrado da altura em metros. Sobrepeso foi definido como índice de massa corpórea (IMC)  $> 25,0 \text{ Kg/m}^2$  e obesidade como IMC  $> 30,0 \text{ Kg/m}^2$ , para homens e mulheres.
- 7) Uso de drogas - A utilização de cocaína foi classificada como crônica, ocasional ou ausente, ao tempo da ocorrência do infarto.
- 8) Etilismo - Os pacientes foram considerados etilistas se o consumo diário de etanol fosse maior que 80 g (i.e, 1 litro de vinho, 6 "latas" de cerveja, 3 doses de aguardente ou whisky).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Coleta de dados clínicos

Os pacientes provenientes de nossa unidade coronária e os encaminhados de outras Instituições, que preenchessem os critérios de inclusão, foram entrevistados após a alta hospitalar (média dois meses). Todos estavam clinicamente estáveis, sem indicação atual para angioplastia ou cirurgia de revascularização e em uso de aspirina. A utilização de medicamentos comuns a pacientes após IAM, como beta-bloqueadores, inibidores da enzima de conversão, estatinas, antagonistas dos canais de cálcio e nitratos ficava a critério do médico de cada paciente. Entretanto, a utilização de nitrato, estatina e IECA foi suspensa quatro semanas antes da realização dos exames laboratoriais e do ultra-som de artéria braquial.

O conceito de “estresse” foi apresentado durante a entrevista inicial e solicitado aos integrantes da pesquisa que se auto definissem sobre este quesito.

Todos os dados clínicos foram coletados exclusivamente pelo autor da pesquisa. As informações foram obtidas por meio de anamnese clássica, seguida pela realização de exame físico completo e eletrocardiograma no dia da consulta. A pressão arterial foi medida no braço direito, com o paciente sentado e tranquilo, em três vezes consecutivas, com intervalos de 5 minutos. O peso foi determinado com roupas leves, sem sapatos, utilizando balança mecânica Filizola modelo 31 e a altura mensurada com um antropômetro de 1,92 m. O índice de massa corpórea foi calculado com base na fórmula: peso dividido pelo quadrado da altura.

### 3.2.2 Avaliação laboratorial

A coleta sanguínea foi realizada por punção da veia antecubital, entre 8 h e 9:30 h, após 10 minutos de repouso em posição sentada. Ao todo foram colhidas 6 amostras de sangue periférico para os ensaios hemostáticos, hematológicos, dosagens bioquímicas e extração do DNA. Todos os participantes encontravam-se em jejum de 12 h, período no qual os fumantes foram orientados a não fumar e não ingerirem bebidas alcoólicas até 24 h antes.

Os estudos metabólicos foram realizados em média entre dois a três meses após o evento agudo. Nenhum paciente estava em uso de fármacos hipolipemiantes há pelo menos quatro semanas, mas todos receberam orientação dietética na primeira visita.

#### Perfil Bioquímico

Os pacientes foram submetidos a coleta de sangue periférico, no qual foram analisadas as seguintes variáveis sanguíneas: glicose, uréia/creatinina, hemograma completo com plaquetas, ácido úrico, proteína C reativa, T3, T4, TSH, fibrinogênio, coagulograma e PAI-1 e perfil lipídico (colesterol total e frações, triglicérides e apolipoproteína B).

A contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas, dosagem de hemoglobina, cálculo do hematócrito, índices hematimétricos, percentual de linfócitos e valor absoluto de linfócitos foram obtidos por métodos automatizados, com leitura no aparelho Counter modelo T.980. O ácido úrico

e a proteína C reativa ultra-sensível foram avaliados pelo método enzimático, automatizado com analisador tipo Hitachi 912 (Roche Diagnostic). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por método manual, através da leitura de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Romanowsky, com corantes May-Grunwald e Giemsa.

As determinações do fibrinogênio foram realizadas por método de fotometria, protocolado para o aparelho Electra-modelo 1400C.

Após a colheita da amostra com citrato, o plasma foi separado por centrifugação a 3000 rpm, por 20 min e uma alíquota foi mantida em congelador, para posterior determinação da concentração plasmática do PAI-1. As concentrações de PAI-1 foram determinadas pelo método imunoenzimático ELISA (Spectrolyse PAI-1, Biopool, Umea, Sweden), de acordo com o protocolo de instrução fornecido pela empresa.

As determinações do perfil lipídico: colesterol (CHOD-PAP), triglicérides (GPO-PAP), HDL-colesterol (HDL-CPLUS) foram realizadas por métodos enzimáticos automatizados, com leitura no aparelho Hitachi-modelo 912. O LDL-c foi calculado pela fórmula de Friedwald ( $LDL = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$ ), onde  $VLDL = \text{triglicérides}/5$ . A fórmula só foi aplicável quando o valor de triglicérides fosse menor que 400 mg/dl. Nos casos de triglicérides acima de 400 mg/dl o LDL foi obtido pelo método do anti-soro policlonal enzimático.

As dosagens de apo A1 (apoproteína A1) e apo B (apoproteína B) foram realizadas por métodos imunoturbidimétricos automatizados, com leitura no aparelho Hitachi-modelo 912.

## **Materiais Descartáveis**

Foram utilizados tubos tipo Eppendorf de 0,2 mL , 0,5 mL, 1,5 mL, criotubos de 2 mL, ponteiros descartáveis de 100 a 1000 $\mu$ L (utramico, com e sem filtro para aerosol), recipiente para descarte de ponteiros, suporte para tubos de microcentrífuga, luvas descartáveis, tubos com e sem os anticoagulantes para coleta das amostras e sistema para coleta a vácuo.

## **Reagentes**

O triton X-100, cloreto de sódio, cloreto de potássio, etanol absoluto, isopropanol, clorofórmio, fenol, ácido acético glacial, azul de bromofenol foram adquiridos da MERCK S.A. (Ind. Química, R.J., Brasil); cloreto de magnésio da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), hidróxido de sódio, SDS, ácido bórico, EDTA, Tris (hidroximetil) aminometano ultrapuro, agarose ultra-pura, enzimas de restrição MOBOL, Bs, Hae III, Hind III (Sinapse – Fermentas), marcadores moleculares de tamanho molecular de DNA de 100 bp e 1Kb, da Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A); Taq DNA polimerase, solução de dNTPs (dATTP, dCTP, dGTP e dTTP), e brometo de etídeo da Amershan Pharmacia Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia). Os diferentes iniciadores (oligonucleotídeos específicos) foram adquiridos da Genco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A), papel térmico de alto contraste – Apha Innotech Coropration.



## Equipamentos

Espectrofotômetro UV para quantificação de ácidos nucleicos Gene Quant da Pharmacia (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia); sistema de eletroforese horizontal com cuba submarina, fonte de eletroforese da Pharmacia, termociclador automatizado PTC 200 DMA Engine – MJ Research; freezer upright Ultra-low, temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, Ohio, EUA); forno de microondas; fluxo laminar (Vec, Brasil); centrífuga clínica Celm (Brasil), microcentrífuga Eppendorf refrigerada modelo 5804 (Eppendorf, Alemanha); banhos de água; jogo de miropipetas Gilson de 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$ ; balança analítica – Marte e semi-analítica, pHmetro, Oaklon, Sistema de análise de imagem modelo Alpha Innotech Corporation, aparelho para ensaios bioquímicos Hitachi, modelo 912, para ensaios hemostáticos: TP, TTPA e fibrinogênio – Electra – Modelo 1400C, Lp(a) – Behring Turbitimer, para ensaios hematológicos – Counter modelo T.980.; transiluminador UV (Pharmacia);

### 3.2.3 Cinecoronariografia

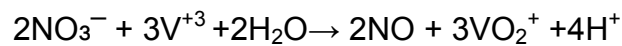
Todos os pacientes deveriam ter realizado cinecoronariografia após o IAM. Na fase aguda, como procedimento necessário à realização de angioplastia primária. Na grande maioria, porém, a cinecoronariografia foi realizada na fase crônica (11 a 100 dias, média 42 dias, após o IAM). Doença coronária angiograficamente grave foi definida como redução de no mínimo 70% do diâmetro interno de artéria coronária principal (direita, descendente anterior ou circunflexa), ou redução maior ou igual a 50% do diâmetro interno

do tronco da coronária esquerda. Pacientes foram classificados como tendo 1, 2 ou 3 artérias principais com lesões ateroscleróticas. Doença coronária angiograficamente moderada foi definida como estenose de 31% a 69% de alguns segmentos das artérias coronárias principais, 70% a 100% de ramos secundários ou 30% a 49% do tronco de coronária esquerda. Doença coronária angiograficamente mínima foi definida como obstruções coronárias menores que as da doença coronária moderada. Artérias coronárias angiograficamente normais não apresentavam estenoses apreciáveis. As análises das estenoses foram realizadas no final da diástole, em projeções nas quais a lesão era mais acentuada<sup>(52)</sup>. Todas as cinecoronariografias foram avaliadas por um hemodinamicista experiente, sem conhecimento prévio das características clínicas ou bioquímicas dos pacientes.

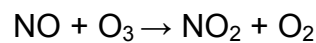
#### 3.2.4 Nitrato

Os efeitos dos polimorfismos estudados *in vivo* na geração de NO não podem ser medidos diretamente, devido ao fato que a maior parte do NO endógeno se oxida rapidamente para nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e é eventualmente convertida para nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), a forma estável predominante. Em conjunto, estes compostos têm sido usados para refletir a produção de NO endógeno correlacionada com o polimorfismo da eNOS. O NO reage com a oxihemoglobina e o ânion superóxido para formar nitrato. O nitrato é o maior produto oxidativo do NO em algumas culturas de células de animais e humanos. As concentrações séricas de nitrato foram determinadas por um analisador de nitrato (modelo 280 Nitric Oxide Analyzer- NOA™) da *Sievers Instruments* (Figura 2). As amostras sanguíneas foram coletadas

até 5 minutos após a desinsuflação do torniquete pneumático, e analisadas nesse aparelho, que mediu a concentração de nitrato produzido após estresse de cisalhamento. Para medir a concentração de nitrato, o cloreto de vanádio III em ácido clorídrico foi usado para converter nitrato em óxido nítrico de acordo com a reação.



Posteriormente, o óxido nítrico gerado foi quantificado por reação de quimiluminescência entre o óxido nítrico e o ozônio, de acordo com a reação.



**Figura 4** – Fotografia de todo o conjunto utilizado para análise do nitrato

### 3.2.5 Avaliação dos polimorfismos genéticos

#### Extração do DNA das células sanguíneas periféricas

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina descrito por Salazar *et al.*<sup>(104)</sup> As amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 1000 µL do Tampão Tris-1 (Tris-HCl 10mM pH=8,0, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 2mM pH=8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl 10mM pH=8,0, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 2mM pH=8,0, NaCl 0,4M) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl 5M. O DNA presente no sobrenadante foi purificado por precipitação com etanol absoluto, lavado com etanol a 70% e finalmente dissolvido em 50µL do tampão TE (Tris-HCl 10mM e 1mM EDTA, pH=8,0) e mantido a -4°C. A integridade das amostras de DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. A quantificação e análise da pureza das amostras de DNA extraídos foram realizadas por espectrofotometria em GLU298ASP após diluição das amostras em tampão TE<sup>(105)</sup>.

#### Análise do Polimorfismo GLU298ASP do Gene da eNOS

A variação G894T presente no exon 7 do gene da eNOS foi analisada através de amplificação da região do DNA que flanqueia o polimorfismo, seguida de restrição enzimática específica (PCR-RFLP), utilizando-se DNA isolado de leucócitos periféricos. Os iniciadores e as condições de reação

para a PCR foram padronizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo<sup>(106)</sup>.

O produto da PCR (340 pb) foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Mbol*. Após a digestão, o alelo G foi representado por fragmentos de 254 pb, 86 pb, e o alelo T foi representado por fragmentos de 145 pb, 109 pb, e 86 pb.

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio e identificados, sob luz ultravioleta, por um padrão de peso molecular de DNA. Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo: G/G, T/G, T/T.

### **Análise do polimorfismo T786C do promotor do gene da eNOS**

A variação T786C presente na região promotora do gene da eNOS foi analisada por amplificação da região do DNA que flanqueia o polimorfismo, seguido de restrição enzimática específica (PCR-RFLP), utilizando-se DNA isolado de leucócitos periféricos. Os iniciadores e as condições de reação para a PCR foram baseados no método descrito por Alvarez *et al.*<sup>(107)</sup>, com modificação na seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, sendo *sense*: 5'atggcacagaactacaaacccc 3'e *anti-sense* 5'ggggacacaaaagagcagga 3'. Para um volume final de reação de 50 µL pipetou-se o tampão da PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> a 2,0 mmol/L) com 200 µM de cada deoxinucleotídeo (dNTPs), 200 nM de cada iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e 2 µL do DNA genômico, acertando-se o volume com água MilliQ estéril. A reação de amplificação foi realizada com programa de:

incubação inicial de 98°C por 3 min, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 57°C e 1 min a 72°C, e polimerização final de 10 min a 72°C.

O produto da PCR (262 pb) foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Msp* I; após a digestão, o alelo T foi representado por fragmentos de 185 pb e 77 pb, e o alelo C foi representado por fragmentos de 135 pb, 50 pb, e 77 pb.

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio e identificados, sob luz ultravioleta, por meio de um padrão de peso molecular de DNA. Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo: T/T, C/T, C/C.

#### **Análise do polimorfismo de repetição em tandem (27 pb) no íntrom 4 do gene da eNOS**

O polimorfismo de repetição seqüencial (tandem) no íntrom 4 do gene da eNOS caracteriza-se por repetições seqüenciais de 27 pares de base que podem variar quanto ao número de repetições entre 4 e 5. A presença de 4 repetições (menor alelo, ou deleção A) define o genótipo 4A e possui 393 pb, enquanto a presença de 5 repetições (maior alelo, ou inserção B) representa o genótipo 4B possuindo 420 pb. Os iniciadores e as condições de reação para a PCR foram descritos por Yoon, *et al.*<sup>(108)</sup>. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio e identificados, sob luz ultravioleta, por meio de um padrão de peso molecular de DNA. Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo: 4A/4A, 4A/4B, 4B/4B.

### **Análise dos polimorfismos -148C/T (fibr Hind) e -455G/A (fibr Hae) do gene do $\beta$ -fibrinogênio**

Os genótipos -148C/T e -455G/A foram analisados pela amplificação da região do DNA que flanqueia os polimorfismos, seguido de restrição enzimática específica (PCR-RFLP), utilizando-se DNA isolado de leucócitos periféricos. Os iniciadores e as condições de reação para a PCR foram descritos por Margaglione, *et al.*<sup>(109)</sup>.

Para a análise do polimorfismo -148C/T, o produto da PCR (1300 pb) foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III, produzindo fragmentos de 834 pb, 272 pb e 194 pb para o alelo C e de 834 pb e 466 pb para o alelo T. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, e identificados sob luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio. Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo: C/C, C/T e T/T.

Para a análise do polimorfismo -455G/A, o produto da PCR (1300 pb), foi digerido com a enzima de restrição *Hae* III, produzindo fragmentos de 342 pb, 383 pb e 575 pb para o alelo G e de 342 pb e 938 pb para o alelo A. Os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, sob luz ultravioleta, e identificados através de um padrão de peso molecular de DNA. Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo: G/G, G/A e A/A.

### **Análise do polimorfismo 4G/5G do gene do PAI-1**

O genótipo 4G/5G do promotor do gene do PAI-1 foi analisado por meio da amplificação da região do DNA que flanqueia o polimorfismo, seguido de restrição enzimática específica (PCR-RFLP), utilizando-se DNA isolado de leucócitos periféricos. Os iniciadores e as condições de reação para a PCR foram descritos por Dooggen *et al.*<sup>(110)</sup>.

O produto da PCR (163 pb) foi submetido à digestão com a enzima de restrição *BsLI*-1. Após a digestão, o alelo 4G foi representado por fragmentos de 107 pb e 56 pb, e o alelo 5G foi representado por fragmentos de 74 pb, 56 pb e 34 pb. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corados com prata e identificados por um padrão de peso molecular de DNA. Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo: 4G/4G, 4G/5G, 5G/5G.

### **3.2.6 Ultra-som de artéria braquial**

O ultra-som de artéria braquial foi o método escolhido para a avaliação não invasiva da função endotelial. Este método encontra-se estabelecido e padronizado de acordo com Guidelines for the ultra sound assesment of endothelial dependent flow mediated vasodilatation of the braquial artery<sup>(98)</sup>.

Todos os integrantes do grupo IAM e do grupo controle realizaram o ultra-som. Os pacientes foram informados previamente sobre algumas condições que poderiam afetar os resultados do exame e solicitados a



observá-las. As mulheres foram estudadas entre o segundo e o sétimo dia do ciclo menstrual, quando os níveis de estrógeno são mais baixos, afetando menos a função endotelial. Os pacientes deveriam estar em jejum de 12 h, sem fumar nesse período, sem fazer uso de café e vitamina C na véspera do exame e sem terem realizado exercício prévio na véspera. Foram orientados a no dia do exame não ingerirem as seguintes águas: Prata (garrafa), Lindoya Genuína, Serra Negra, Lindoya Verão, que possuem as maiores concentrações de nitrato a saber: 1,1 mg/l, 2,76 mg/l, 3,97 mg/l e 8,2 mg/l respectivamente. Medicamentos suscetíveis de afetarem a função endotelial foram suspensos em tempo hábil. As estatinas foram suspensas em média quatro semanas antes da realização do exame, pois estudos experimentais demonstraram que elas podem aumentar a expressão da eNOS e sua atividade *in vitro* e *in vivo* pela estabilização do RNA mensageiro. Os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ECA) e os nitratos também foram suspensos 4 semanas antes do exame. A luminosidade da sala foi controlada, com temperatura ajustada em 22 graus. Para a realização do exame o paciente permaneceu em posição supina por 15 minutos antes e até o final do mesmo.

Utilizou-se o aparelho de ultra-som GE – SYSTEM FIVE, com transdutor linear de 7,5 – 12 MHz. A frequência cardíaca foi monitorada continuamente por um monitor de três derivações eletrocardiográficas e a pressão arterial foi medida por esfigmomanômetro no braço contralateral.



**Figura 5** – Paciente com transdutor posicionado para realização do exame de reatividade vascular

O braço não dominante foi posicionado em um ângulo-braço tronco de aproximadamente  $80^\circ$ , com o antebraço distal em repouso e imobilizado por uma espuma de suporte envolvendo o membro. A artéria braquial foi identificada no seu terço médio acima da prega do cotovelo. O vaso foi explorado dentro de uma secção longitudinal, e o centro identificado pela imagem mais clara entre a parede anterior e posterior, sendo o Doppler posicionado a  $60^\circ$ , em relação ao centro do vaso. A análise foi feita por imagem bidimensional, cujas medidas eram adquiridas em pelo menos quatro ciclos cardíacos e coincidiam com a onda R do ECG.

A variabilidade entre as medidas do diâmetro arterial deveria ser menor que 2% entre dois observadores e de 1% intra-observador, o que realmente ocorreu.

Para a obtenção da imagem da artéria braquial e seu fluxo, foi utilizado ainda o “*power Doppler*”, um recurso de *software* disponível em nosso aparelho que ajudou a identificar a artéria braquial, tornando o método mais simples e seguro de ser realizado.

Todos os exames foram realizados por um único ecocardiografista com extensa experiência no método e sem conhecimento prévio das características clínicas dos integrantes da pesquisa.

A avaliação do fluxo endotélio-dependente foi conseguida por meio de um estímulo na artéria braquial, com um torniquete pneumático desenvolvido especialmente para este estudo e que foi possível utilizar em qualquer paciente, independente da largura do braço. O torniquete era posicionado dois cm acima da flexura do braço e insuflado até 50 mmHg acima da pressão arterial sistólica de cada paciente. A insuflação permanecia por cinco minutos, tempo suficiente para induzir hiperemia reativa e vasodilatação dependente do endotélio promovida pelo estresse de cisalhamento. Posteriormente, analisaram-se as velocidades de fluxo e o diâmetro da artéria braquial a cada 20 segundos a fim de determinar o pico máximo de vasodilatação e calcular a vasodilatação fluxo mediada (VFM). A VFM da artéria braquial, resultante da hiperemia reativa pós-isquêmica induzida pela deflação do manguito, fornece uma

medida da vasodilatação endotélio dependente mediada pelo NO. As medidas da imagem da artéria braquial eram realizadas e comparadas com as medidas basais.

Após um período de repouso de 10 minutos, quando o diâmetro da artéria braquial retornava aos níveis basais, uma segunda medida era registrada. Esta foi seguida pela administração de nitrato sublingual (dinitrato de isossorbida) em todos os participantes que não apresentassem hipotensão ou bradicardia significativa. A utilização de nitrato sublingual induz vasodilatação endotélio independente, mediada pelo nitrato (VMN). Nesta fase, eram obtidas medidas de maneira similar às anteriores. Após a administração de nitrato, a pressão arterial do paciente era monitorada, e o paciente permanecia na mesma posição por alguns minutos a fim de evitar hipotensão postural.

AS VMF e VMN foram expressas em porcentagem de alteração do diâmetro da artéria braquial pós estímulo em relação ao diâmetro basal, de acordo com a fórmula:

$$\text{VMF ou VMN} = \frac{(\text{Diâmetro após insuflação} - \text{Diâmetro basal}) \times 10}{\text{Diâmetro basal}}$$

Foram considerados normais valores da VMF e da VMN correspondentes a aumento de no mínimo 10%, em relação ao basal.

Em síntese, para avaliação da reatividade vascular utilizou-se o ultra-som de artéria braquial esquerda com medidas do seu diâmetro em sístole e diástole, dividida em 3 fases:

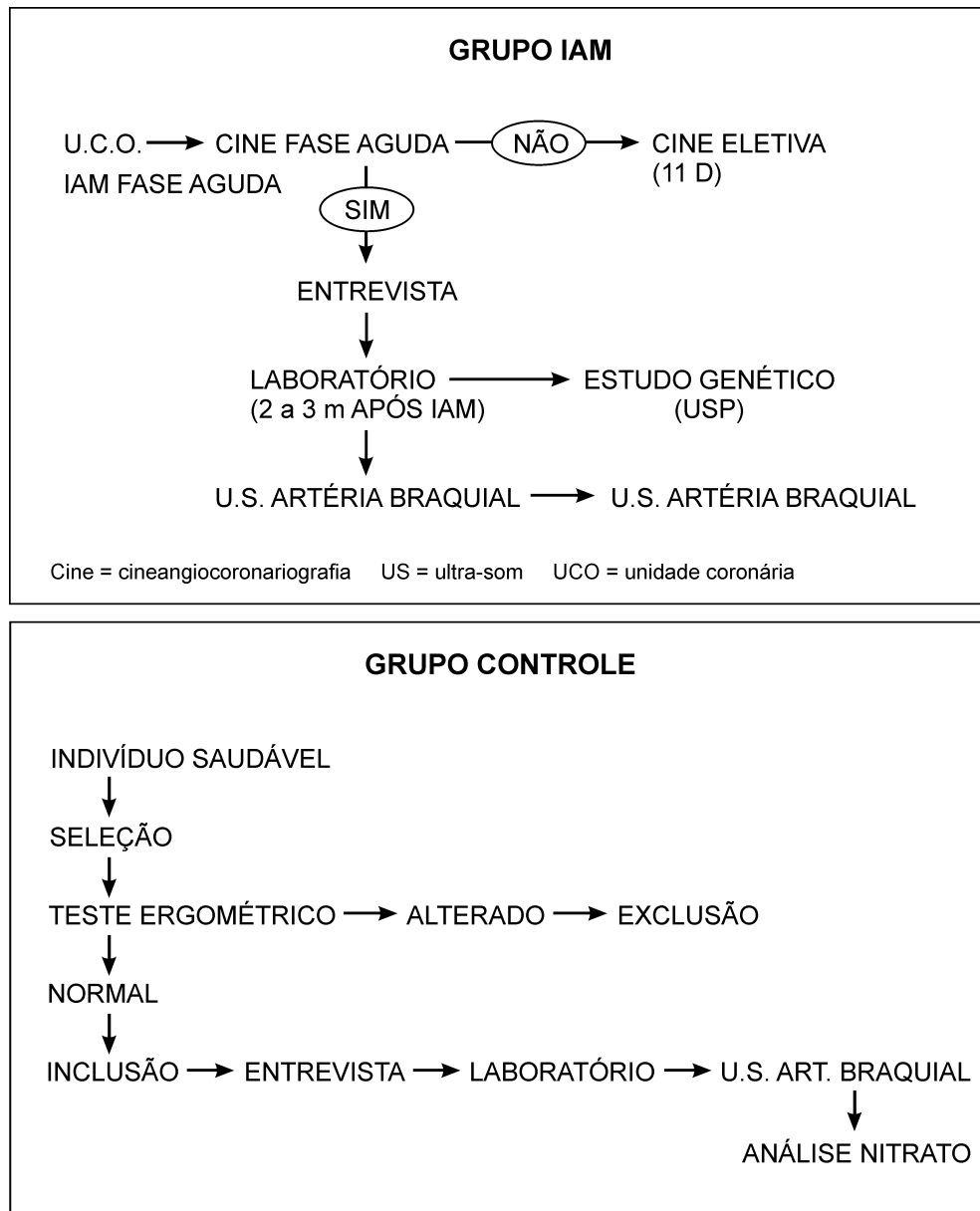
Fase 1 - repouso

Fase 2 - hiperemia reativa (vasodilatação endotélio-dependente), medida após insuflação de esfignomanômetro especialmente desenvolvido para esta finalidade.

Fase 3 - estímulo farmacológico (vasodilatação endotélio-independente), medida após administração de 5 mg de dinitrato de isossorbida sublingual.

Entre a fase 1 (repouso) e após a fase 2, foram feitas duas coletas de amostra sanguínea para dosagem plasmática dos nitratos totais.

### 3.3 Resumo do protocolo



**Figura 6** – Representação esquematizada do protocolo do grupo IAM (E) e controle (D).

As entrevistas foram realizadas no Ambulatório de Coronária, com os pacientes e indivíduos do grupo controle regularmente matriculados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Posteriormente, os integrantes da pesquisa eram agendados para comparecer em outro dia para coleta de exames sanguíneos, parte dos quais era processada no Laboratório Bioquímico Central do IDPC e os demais no Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para as avaliações dos polimorfismos genéticos. Um terceiro dia de comparecimento era agendado para a realização do ultrassom de artéria braquial no setor de Ecocardiografia do IDPC, onde nova coleta de sangue era realizada para dosagem de nitrato durante o exame. Esse material era enviado para o Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (INCOR)

### **3.4 Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e da Faculdade de Medicina da USP.

Os indivíduos do grupo IAM e do grupo controle foram informados de maneira clara sobre os objetivos e importância da pesquisa desenvolvida neste trabalho. No dia da primeira entrevista todos assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, conforme determina a resolução número 196, de 13 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

## **3.5 Estatística**

### **3.5.1 Análise Descritiva**

Com o objetivo apenas de caracterizar a amostra estudada, apresentamos, em forma de tabelas ou gráficos, as frequências relativas (porcentuais) e absolutas (N) das classes de cada variável qualitativa. Para as variáveis quantitativas, foram utilizadas médias e medianas para resumir as informações, e desvios-padrão, mínimo e máximo, para indicar a variabilidade dos dados. As variáveis com distribuição assimétrica ou sem distribuição normal foram transformadas em logaritmo (log 10).

### **3.5.2 Análise Inferencial**

Para comparar as distribuições de frequência das variáveis qualitativas foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson<sup>(111)</sup>. O teste exato de Fisher foi utilizado nas situações em que os valores esperados foram inferiores a 5.

Com relação às variáveis quantitativas, o objetivo foi verificar se as médias eram semelhantes para as diferentes categorias das variáveis qualitativas. Antes dos testes de comparações de médias, foi realizada uma análise para testar a hipótese de que os dados seguiam uma distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>(112)</sup>. Utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney<sup>(113)</sup>, quando o objetivo foi testar a hipótese de que duas populações têm a mesma distribuição e o teste não paramétrico de



Kruskal-Wallis<sup>(113)</sup> quando comparamos mais de duas populações. No teste de Kruskal-Wallis, para as variáveis cujo valor do teste foi significativo ( $p < 0,05$ ), fez-se análise de comparações múltiplas, com a finalidade de determinar em quais pares de grupos se encontrava a diferença.

No caso de comparação de duas variáveis quantitativas, foi utilizada a correlação de Pearson<sup>(111)</sup>.

Para comparação das variáveis numéricas entre os grupos foi utilizado o teste t de Student. Para comparação entre 3 grupos de genótipos foi utilizada a Análise de Variância Simples (*One-way ANOVA*), seguida de teste de comparação múltipla de Tukey. Para analisar a relação entre duas variáveis numéricas foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

Para analisar a relação conjunta entre as diversas variáveis de interesse e os dois grupos foi utilizada a Análise de Regressão Logística Multivariada, com critério *Stepwise* de seleção de variáveis.

A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi avaliada em relação a qualquer desvio do equilíbrio Hardy – Wenberg por intermédio do teste Qui-quadrado.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05.

Foram usados na elaboração do relatório técnico os softwares: MS Office Excel versão 2000 para o gerenciamento do banco de dados; SPSS for Windows versão 10.0 – Statistical Package for the Social Science. Para a execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos, tabelas e redação usamos o MS OFFICE Word versão 2000.

---

## **4. RESULTADOS**

---

O grupo IAM foi constituído por 128 pacientes consecutivos, com idade  $\leq 40$  anos, incluídos no período de 07/2001 a 11/2003. Esse número correspondeu a 9,18% do total de IAM atendidos em nossa Instituição nesse período. Para constituição do grupo controle foram recrutados inicialmente 139 indivíduos presumivelmente saudáveis, funcionários do departamento de manutenção, trabalhadores que prestam serviço à Instituição, ou acompanhantes de pacientes. Todos foram submetidos a teste ergométrico, que resultou normal em 121 deles, os quais formaram o grupo controle.

#### **4.1 Dados demográficos**

Idade, sexo e raça foram similares nos dois grupos. A idade do grupo IAM variou de 17 a 40 anos, média  $34,4 \pm 4,8$  anos. No grupo controle, a idade variou de 17 a 45 anos, média  $34,5 \pm 4,9$  anos. A distribuição dos pacientes no grupo IAM e dos indivíduos do grupo controle de acordo com a faixa etária acha-se expressa na tabela 2. No grupo IAM, 86 pacientes (67,2%) eram do sexo masculino e no grupo controle, 87 indivíduos (71,9%). Em relação à cor, 65,4% no grupo IAM eram brancos e 70,0% no grupo controle. Pacientes de outras raças corresponderam a 34,6% no grupo IAM e a 30,0% no grupo controle.

Os pacientes do grupo IAM apresentaram peso maior e estatura menor do que os indivíduos do grupo controle, com IMC de  $27,5 \pm 4,3 \text{ kg/m}^2$  e  $23,7 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$  respectivamente ( $p < 0,001$ ) (Tabela 3).

**Tabela 2** – Distribuição dos pacientes de acordo com faixas etárias nos grupos IAM e controle

<b>Idade anos</b>	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>TOTAL</b>
17-20	13 (10,7%)	2 (1,6%)	15
21-30	33 (27,3%)	19 (14,8%)	52
31-40	48 (39,7%)	107 (83,6%)	155
41-45	27 (22,3%)	0 (0,0)	27
<b>TOTAL</b>	<b>121</b>	<b>128</b>	<b>249</b>

**Tabela 3** – Dados demográficos dos grupos IAM e controle

		<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>p</b>
<b>Idade (anos)</b>		$34,5 \pm 4,9$	$34,4 \pm 4,8$	0,714
<b>Sexo</b>	Masculino	71,9%	67,2%	0,420
	Feminino	28,1%	32,8%	
<b>Cor</b>	Branca	70,1%	65,3%	0,598
	Negra	8,5%	6,3%	
	Parda	20,5%	27,6%	
	Amarela	9,0%	8,0%	
<b>Peso (Kg)</b>		$69,2 \pm 12,4$	$76,5 \pm 15,8$	<0,001
<b>Altura (m)</b>		$1,71 \pm 6,08$	$1,66 \pm 0,10$	<0,001
<b>IMC(Kg/m<sup>2</sup>)</b>		$23,7 \pm 3,4$	$27,5 \pm 4,3$	<0,001

#### 4.1.1 Hábitos e qualidade de vida

O grupo controle era formado por indivíduos com prática regular de atividade física (no mínimo 5 vezes por semana com 1 h de duração) e que apresentavam um menor consumo de bebida alcoólica (frequência maior que 2 vezes por semana) que o grupo IAM. O resultado da pesquisa sobre a auto avaliação da presença de estresse mostrou um contingente maior de “estressados” no grupo IAM (Tabela 4).

**Tabela 4 – Hábitos e qualidade de vida nos grupos IAM e controle**

	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>p</b>
<b>Atividade física</b>	93,4 %	39,4 %	< 0,001
<b>Consumo de bebida alcoólica</b>	21,5 %	37,8 %	< 0,005
<b>Estresse</b>	29,7 %	75,4 %	< 0,001

#### 4.1.2 Fatores de risco

Os pacientes do grupo IAM apresentaram fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de doença aterosclerótica, com exceção de 6 casos. O tabagismo esteve presente em 81,2% dos casos, diabetes melito em 10,2%, hipertensão arterial em 49,2%, LDL-c alto em 23,4% , obesidade em 31,2% e antecedentes familiares para DAC em 48,4% dos pacientes. Quarenta e quatro pacientes (34,4%) apresentaram dois fatores de risco, 37

pacientes (28,9%) três, 16 pacientes (12,5%), quatro e 6 pacientes (4,7%), cinco fatores de risco.

O uso de cocaína (7,1%) foi relatado apenas no grupo IAM. Entretanto, nenhum paciente a utilizou no dia do IAM ou nos dias precedentes imediatos.

Os integrantes do grupo controle apresentaram baixa incidência de fatores de risco, a saber: tabagismo, 6,7%, diabetes melito, 0%, hipertensão arterial, 0,83%, LDL-c alto, 10,7%, obesidade, 6% e antecedentes familiares, 13,3%.

Os dados referentes aos principais fatores de risco nos grupos controle e IAM acham-se expressos na tabela 5:

**Tabela 5 – Fatores de risco nos grupos controle e IAM**

	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>p</b>
<b>Tabagismo</b>	6,7%	81,2%	< 0,0001
<b>Hipertensão</b>	0,83%	49,2%	< 0,0001
<b>LDL-colesterol alto</b>	10,7%	23,4%	< 0,0001
<b>Diabetes</b>	0%	10,2%	< 0,0001
<b>Antecedentes familiares</b>	13,3%	48,4%	< 0,016
<b>Obesidade</b>	6%	31,2%	< 0,0001

### 4.1.3 Dados Bioquímicos

Em relação aos lípides, os pacientes do grupo IAM apresentaram concentrações plasmáticas de colesterol total maiores que as dos indivíduos do grupo controle ( $210,7 \pm 51,3$  mg/dl vs  $185,8 \pm 42,9$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ). As concentrações plasmáticas de LDL-c foram maiores no grupo IAM ( $130,4 \pm 41,7$  mg/dl vs  $111,1 \pm 37,0$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ). As concentrações plasmáticas de HDL-c foram menores no grupo IAM ( $45,1 \pm 13,0$  mg/dl) que no grupo controle ( $55,2 \pm 14,6$ ;  $p < 0,0001$ ), as concentrações de apo A1 foram menores no grupo IAM ( $125,2 \pm 25,9$  mg/dl) que no grupo controle ( $145,5 \pm 25,3$ ;  $p < 0,0001$ ), enquanto as de triglicérides foram maiores no grupo IAM ( $179,8 \pm 104,4$  mg/dl vs  $95,5 \pm 45,4$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ). Além disso, os pacientes do grupo IAM apresentaram concentrações de apo A1 ( $125,2 \pm 25,9$  mg/dl) menores que no grupo controle ( $145,5 \pm 25,3$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ) e concentrações de apo B maiores ( $106,3 \pm 26,6$  vs  $85,9 \pm 22,6$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ) (Tabela 4).

Os pacientes do grupo IAM apresentaram maiores valores de glicemia de jejum ( $110,4 \pm 51,6$  mg/dl) que os do grupo controle ( $91,3 \pm 9,7$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ). Resultados similares foram encontrados para o ácido úrico ( $6,2 \pm 1,8$  mg/dl vs  $5,2 \pm 1,3$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ) e para o número de leucócitos no hemograma ( $7.300 \pm 2.100$  n/m<sup>3</sup> vs  $6.300 \pm 1720$  n/m<sup>3</sup>;  $p < 0,0001$ ) (Tabela 6).

As médias dos valores do PAI-1 foram  $18,5 \pm 11,1$  U/ml no grupo IAM e  $7,7 \pm 6,7$  U/ml no grupo controle; ( $p = 0,0001$ ). As médias da concentração

plasmática de fibrinogênio foram para o grupo IAM  $317,6 \pm 87,3$  mg/dl e para o grupo controle ( $270,2 \pm 70,8$  mg/dl;  $p < 0,0001$ ) (Tabela 6).

Em relação à proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) não houve diferença significativa entre os dois grupos (grupo IAM  $0,37 \pm 0,58$  mg/dl e grupo controle  $0,47 \pm 1,65$  mg/dl;  $p = 0,397$ ).

**Tabela 6** – Dados bioquímicos e hematológicos dos grupos controle e IAM

	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>p</b>
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	$185,8 \pm 42,9$	$210,7 \pm 51,3$	$< 0,0001$
<b>HDL (mg/dl)</b>	$55,2 \pm 14,6$	$45,1 \pm 13,0$	$< 0,0001$
<b>Apo A 1 (mg/dl)</b>	$145,5 \pm 25,3$	$125,2 \pm 25,9$	$< 0,0001$
<b>LDL-C (mg/dl)</b>	$111,1 \pm 37,0$	$130,4 \pm 41,7$	$< 0,0001$
<b>Apo B (mg/dl)</b>	$85,9 \pm 22,6$	$106,3 \pm 26,6$	$< 0,0001$
<b>Triglicérides (mg/dl)</b>	$95,5 \pm 45,4$	$179,8 \pm 104,4$	$< 0,0001$
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	$91,3 \pm 9,7$	$110,4 \pm 51,6$	$< 0,0001$
<b>Acido Úrico (mg/dl)</b>	$5,2 \pm 1,3$	$6,2 \pm 1,8$	$< 0,0001$
<b>Leucócitos (n/mm<sup>3</sup>)</b>	$6270 \pm 1,720$	$7.320 \pm 2.120$	$< 0,0001$
<b>PAI-1 (U/ml)</b>	$7,7 \pm 6,7$	$18,5 \pm 11,1$	$< 0,0001$
<b>Fibrinogênio (mg/dl)</b>	$270,2 \pm 70,8$	$317,6 \pm 87,3$	$< 0,0001$
<b>PCRus (mg/dl)</b>	$0,47 \pm 1,65$	$0,37 \pm 0,58$	$= 0,397$



#### 4.1.4 Análise de subgrupos

Na análise de subgrupos, a única variável que se correlacionou de forma significativa com PAI-1 elevado, IMC alto, níveis sanguíneos mais elevados de glicose, ácido úrico, triglicérides, apo B, fibrinogênio e níveis sanguíneos mais baixos de apo A, foi a presença de HDL-c baixo. O perfil dos pacientes com HDL-c baixo evidenciou um contingente maior do sexo masculino (78,5%,  $p < 0,01$ ), de tabagistas (63,5%,  $p < 0,001$ ) e estressados (64,5%,  $p < 0,003$ )

Realizamos concomitantemente análises das variáveis quantitativas (HDL-c, LDL-c, apo A, e outras) de acordo com as diferentes raças e também em relação ao sexo. Analisamos separadamente os participantes da pesquisa em dois grupos (brancos e outras raças) as únicas variáveis que apresentaram diferença significativa foram colesterol total e altura mais elevados no grupo dos brancos (Tabela 7)

**Tabela 7** – Variáveis que apresentaram diferença significativa entre os grupos de brancos e outras raças

Variável	Brancos	Outras raças	p
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	202,9 ± 48,8	190,8 ± 49,6	< 0,0426
<b>Altura (m)</b>	1,7 ± 0,09	1,6 ± 0,10	< 0,0125

A análise das variáveis de acordo com o sexo evidenciou maiores valores de triglicérides e menores valores de HDL-c, apo A1 e fibrinogênio nos homens (Tabela 8).

**Tabela 8 –** Variáveis que apresentaram diferença significativa entre homens e mulheres

Variável	SEXO		p
	Masculino	Feminino	
Triglicérides (mg/dl)	148,8 ± 97,1	119,2 ± 25,6	< 0,0256
HDL-C (mg/dl)	48,3 ± 14,2	53,6 ± 15,2	< 0,066
APO A 1 (mg/dl)	132,4 ± 25,7	141,00 ± 30,6	< 0,0280
Fibrinogênio (mg/dl)	284,9 ± 75,4	317,9 ± 95,00	< 0,0101

Pacientes fumantes apresentaram concentrações de fibrinogênio maiores que os não fumantes ( $321,4 \pm 88,7$ mg/dl vs  $272,6 \pm 71,5$  mg/dl ( $p < 0,0001$ )). A mesma análise em relação à presença do tabagismo foi realizada para a média dos valores do PAI-1, que não diferiram entre fumantes e não fumantes ( $18,8 \pm 10,9$  U/ml vs  $16,6 \pm 12,1$  U/ml; respectivamente ( $p = 0,06$ )).

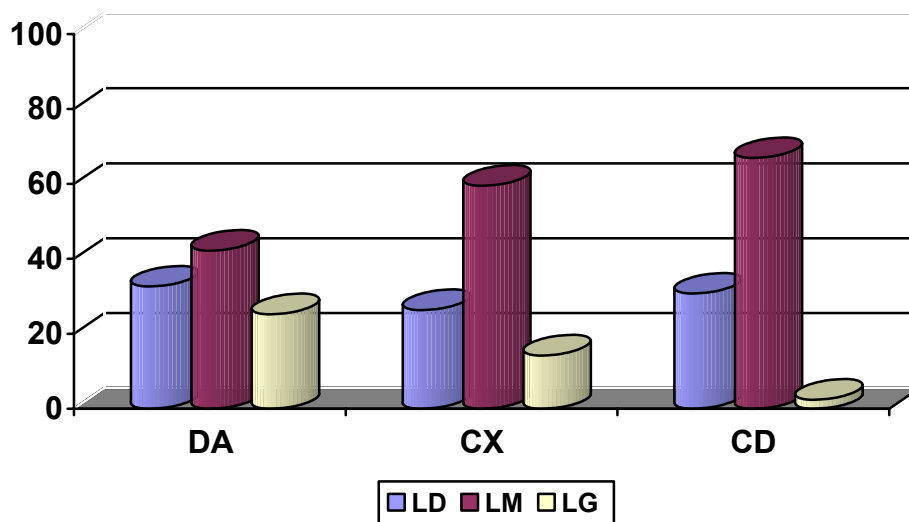
#### 4.1.5 Infarto agudo do miocárdio

Os pacientes do grupo IAM apresentaram angina prévia ao evento agudo em 29,0% dos casos, ou seja, em 71,0% o IAM foi a primeira manifestação de doença arterial coronária. O infarto foi de localização anterior em 73 pacientes (57%) e inferior em 55 pacientes (43%). O ECG inicial do IAM mostrou elevação do segmento ST em 125 pacientes (97,7%) e ausência de supradesnível em 3 pacientes (2,3%).

#### 4.1.6 Cineangiocoronariografia

O estudo hemodinâmico após o IAM foi realizado em todos os pacientes, com exceção de um que se recusou a realizá-lo. O estudo cinecoronariográfico mostrou que 24 (18,8%) apresentavam coronárias normais, 21 (16,5%), lesões discretas (<30%) e o restante, lesões moderadas a graves. Os subgrupos coronárias normais e lesões discretas foram considerados em conjunto. A distribuição das lesões moderadas/graves revelou 59 (46,4%) pacientes com lesões uniarteriais; 16 (12,6%) pacientes com lesões biarteriais e 7 (5,5%) pacientes com lesões triarteriais. Nenhum paciente apresentava lesão de tronco. A distribuição das lesões de acordo com a magnitude acha-se exposta no Gráfico I. Noventa e quatro pacientes (73,4%), apresentaram alteração da contratilidade regional conseqüente ao infarto. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo após o IAM variou de 27,4% a 75%, média de 55,4%  $\pm$  10,5%.

**Gráfico 1** – Distribuição das lesões nas artérias descendente anterior, circunflexa e coronária direita de acordo com a magnitude



	DA	CX	CD
(LD) Normal + mínima	32,6%	26,3%	30,7%
LM	42,2%	59,5%	66,9%
LG	25,2%	14,2%	2,4%

LD = lesão discreta LM = lesão moderada LG = lesão grave

A análise da topografia das lesões moderadas e graves mostrou que 91% tinham localização proximal.

Realizamos uma análise de subgrupos em relação à presença de lesões discretas (normal + mínima) versus lesões moderadas/graves, a fim de estabelecer se os pacientes com aterosclerose significativa à cineangiocoronariografia apresentavam perfil metabólico, genotípico, ou disfunção endotelial vinculada à presença de lesões obstrutivas. Estes

pacientes apresentavam valores de colesterol total, LDL-c, apo B e fibrinogênio mais elevados em relação ao grupo de lesões discretas (Tabela 9).

**Tabela 9 –** Variáveis com diferença significativa em relação à presença de lesões discretas e moderadas/graves à cinecoronariografia

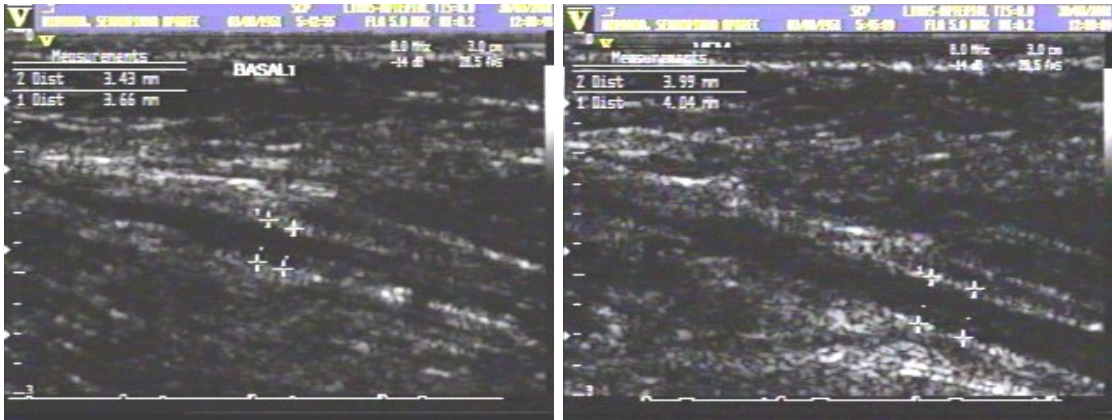
	<b>Lesão Discreta</b>	<b>Lesão &gt; 30%</b>	<b>p</b>
<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>	195,8 ± 43,8	219,2 ± 53,7	0,007
<b>LDL-c (mg/dl)</b>	120,1 ± 42,8	136,7 ± 40,2	0,02
<b>apo B (mg/dl)</b>	96,9 ± 25,3	111,9 ± 25,8	0,002
<b>Fibrinogênio (mg/dl)</b>	294,9 ± 81,5	330,9 ± 88,0	0,02

Os pacientes com lesão > 30% não apresentaram diferenças genotípicas para os 3 polimorfismos estudados da eNOS (GLU298ASP, T786C, intron 4) e também para os polimorfismos do PAI-1 e fibrinogênio, em relação aos pacientes com lesões discretas. Não houve também diferença significativa em relação à capacidade de vasodilatação e aos valores de nitrato entre os dois grupos.

#### **4.1.7 Reatividade Vascular**

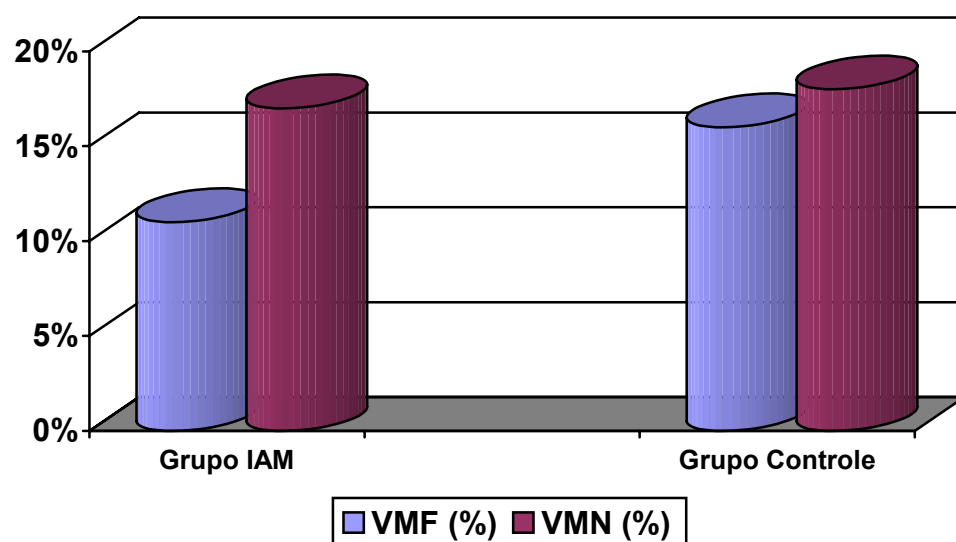
Os resultados da reatividade vascular avaliada pelo ultra-som de artéria braquial mostraram menor vasodilatação mediada por fluxo nos pacientes do grupo IAM em relação ao grupo controle: 45,3% versus 14,9%

com resposta abaixo de 10%. Os valores médios dos percentuais de vasodilatação foram para o grupo IAM  $11 \pm 0,08\%$  e para o grupo controle  $16 \pm 0,08\%$  ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 7** – Resultado do exame de reatividade vascular de paciente grupo IAM com vasodilatação  $\geq 10\%$

**Gráfico 2** – Comparação dos valores da dilatação mediada por fluxo (VMF) e da dilatação mediada por nitratos (VMN), entre os grupos IAM e controle



A vasodilatação mediada por nitrato maior ou igual a 10% foi observada em 88% dos pacientes do grupo IAM e em 94% do grupo controle ( $p = 0,124$ ). Os valores médios do percentual de vasodilatação mediada por nitrato foram  $17 \pm 0,07\%$  para o grupo IAM e  $18 \pm 0,07\%$  para o grupo controle ( $p = 0,188$ ).

Dentre todos os fatores de risco e variáveis laboratoriais que estavam alterados no grupo IAM em relação ao grupo controle de forma significativa, os únicos que mostraram correlação com a redução da vasodilatação foram a presença de tabagismo e os valores do PAI-1 (Tabela 10).

**Tabela 10** – Associação de tabagismo e do PAI-1 com a resposta à vasodilatação fluxo mediada

VARIÁVEL	Vasodilatação fluxo mediada		p
	< 10%	≥ 10%	
Tabagismo	64,7%	35,3%	< 0,001
PAI-1 (U/ml)	$18,1 \pm 11,1$	$11,6 \pm 10,0$	< 0,001

#### 4.1.8 Dosagem de nitrato

A dosagem de nitrato mostrou valores mais altos no grupo IAM em comparação com o grupo controle (Tabela 11)

**Tabela 11** – Valores de nitrato nos grupos IAM e controle

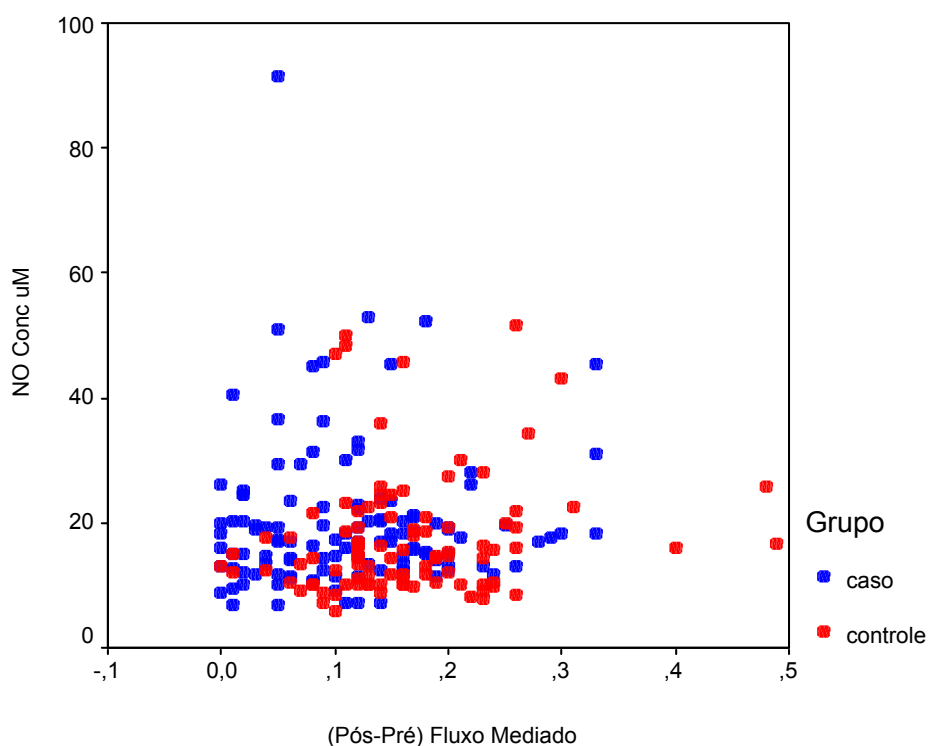
	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Grupo Controle (µmol)</b>	17,3	9,7	6,0	51,5
<b>Grupo IAM (µmol)</b>	20,2	11,8	6,7	91,6
				p = 0,006

A análise de subgrupos em relação aos valores de nitrato demonstrou não haver diferença significativa entre as concentrações de nitrato e a magnitude da vasodilatação no grupo IAM, ou seja, os valores de nitrato estavam elevados no grupo IAM independente da presença ou não de vasodilatação. Em relação aos indivíduos do grupo controle, os resultados menores de vasodilatação foram observados nos que apresentavam valores mais baixos de nitrato. (Tabela 12)



**Tabela 12** – Valores de nitrato e vasodilatação mediada por fluxo

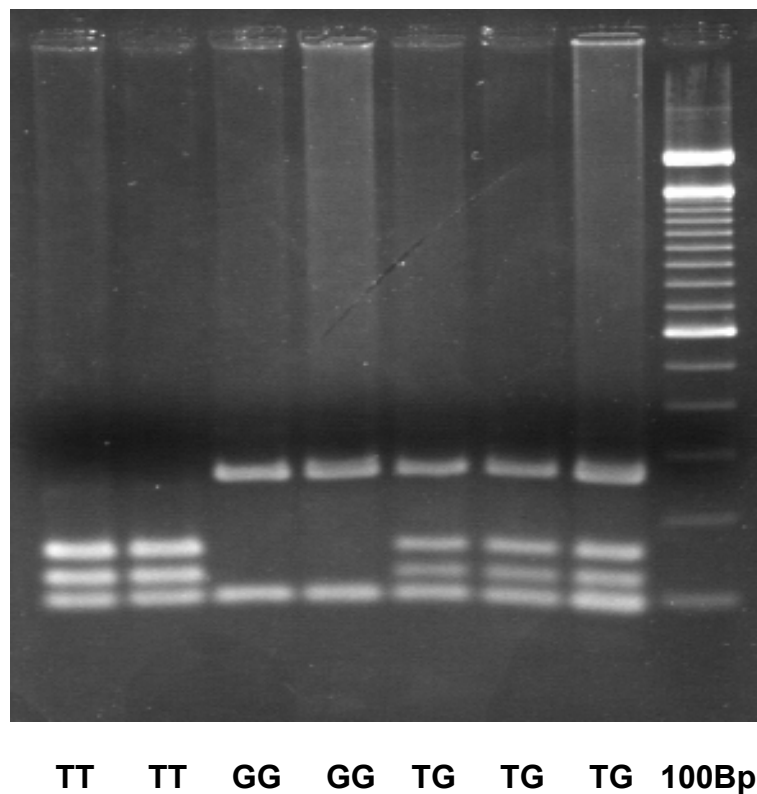
		NO ( $\mu\text{Mol}$ )					
Grupo	Vasodilatação	Média	Mediana	Desvio	MIN	MAX	p
Controle	< 10%	12,8	12,3	3,9	7,2	21,7	0,03
	$\geq$ 10%	18,4	15,7	10,3	6,0	51,5	
IAM	< 10%	20,9	17,1	14,1	6,7	91,6	0,784
	$\geq$ 10%	19,5	17,6	9,5	7,2	52,8	

**Gráfico 3** – Gráfico de dispersão entre valores de nitrato e vasodilatação

#### 4.1.9 Genótipos

##### GLU298ASP

Na figura 8 podemos observar fragmentos dos genótipos do polimorfismo GLU298ASP pela PCR- RFLP



**Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose a 1, 5% após coloração com brometo de etídio, sob luz ultra violeta. Os fragmentos visibilizados na posição 1, 2 caracterizam o genótipo do polimorfismo TT na posição 2, 3 caracterizam o genótipo GG, e nas posições 5, 6 e 7 caracterizam o genótipo heterozigoto TG do gene da eNOS GLU298ASP e a posição M mostra uma referencia de fragmentos de DNA (100bp)

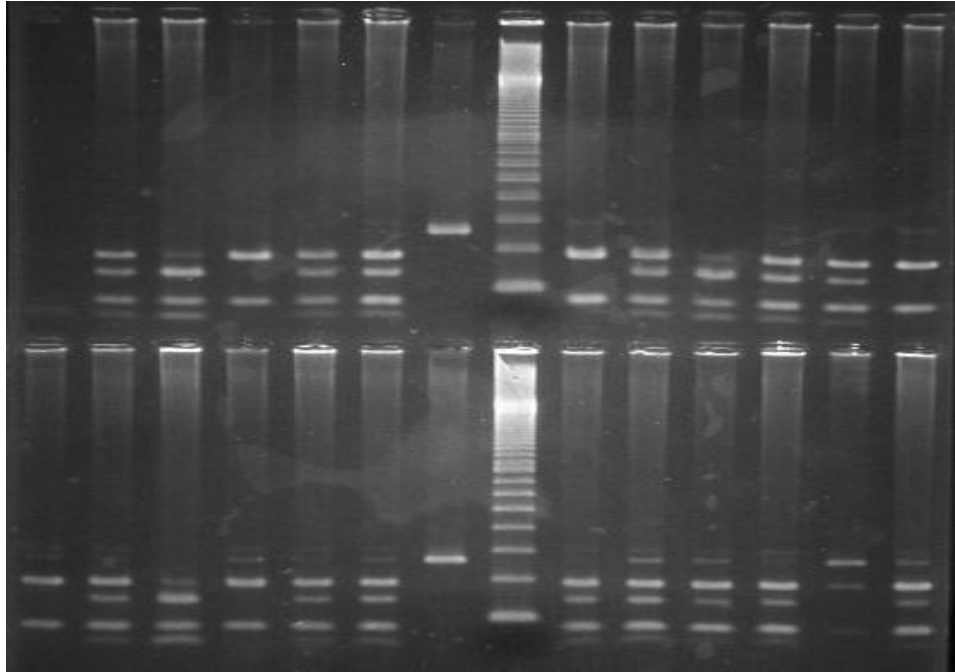
Os resultados relacionados aos genótipos do polimorfismo da óxido nítrico sintase endotelial GLU298ASP não mostraram diferença significativa entre os grupos IAM e controle (Tabela 13).

**Tabela 13** – Genótipos do polimorfismo GLU298ASP nos grupos controle e IAM

	<b>Genótipos</b>	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>p</b>
	GG	52 (50,0%)	56 (48,7%)	
<b>GLU298ASP</b>	GT	45 (43,3%)	46 (40,0%)	0,494
	TT	7 (6,7%)	13 (11,3%)	

## T786C

A figura 9 ilustra um exemplo de fotografia do gel de agarose com os perfis de fragmentos de restrição dos genótipos do polimorfismo T786C.



**Figura 9** – Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1,5% após coloração com brometo de etídio, sob luz ultra violeta. Os fragmentos visibilizados no painel superior nas posições 1 a 14 caracterizam o genótipo do polimorfismo T786C: controle negativo, CT, CC, TT, CT, CT, controle, padrão molecular de 100 bp, TT, CT, CC, CT,CT,TT

No painel inferior as posições de 1 a 14 caracterizam o genótipo TT, CT, CC, TT, CT, CT, controle, padrão molecular de 100 bp, CT, CT, CT, CT, TT, CT respectivamente.

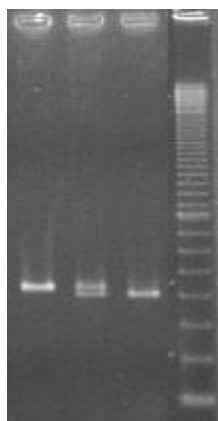
Em relação ao polimorfismo T786C houve diferenças significantes entre os grupos, com maior freqüência do genótipo TT entre os integrantes do grupo IAM (Tabela 14).

**Tabela 14** – Genótipos do polimorfismo T786C nos grupos controle e IAM

	Genótipos	Grupo controle	Grupo IAM	p
T786C	TT	42 (40,4%)	63 (54,8%)	0,033
	CT	61 (58,6%)	50 (43,5%)	
	CC	1 (0,96%)	2 (1,74%)	

#### Íntron 4

Na figura 10 estão ilustrados os fragmentos do genótipo do íntron 4.



**Figura 10** – Reprodução de fragmentos dos diferentes genótipos do polimorfismo do íntron 4. Na primeira coluna a presença do padrão 4b/4b (inserção 27 pb), na segunda coluna o genótipo 4a/4b, na terceira coluna o genótipo 4a/4a (deleção 27 pb)

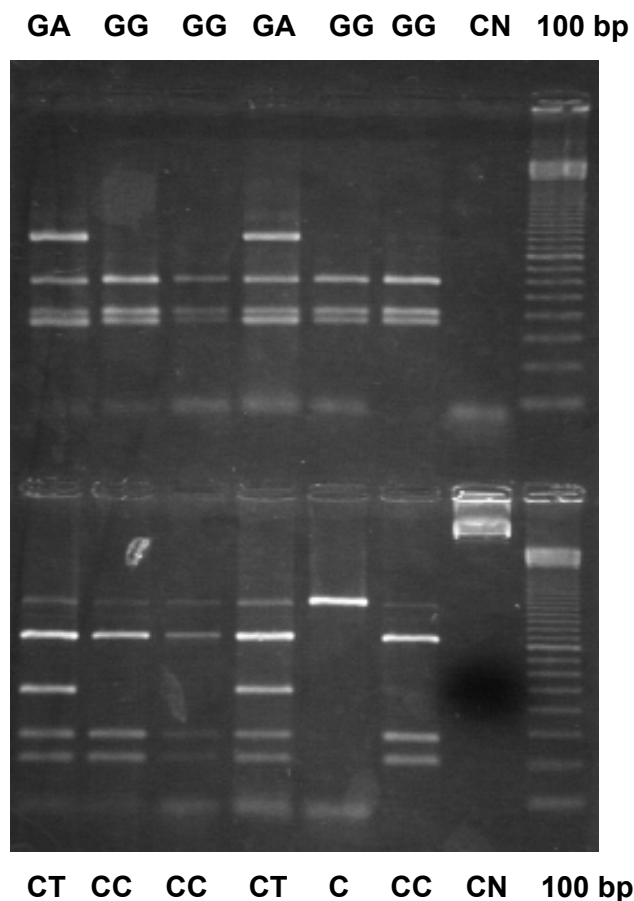
O polimorfismo do íntron 4 não apresentou diferença significativa entre os grupos (Tabela 15)

**Tabela 15** – Genótipos do polimorfismo íntron 4 nos grupos controle e IAM

	<b>Genótipos</b>	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>p</b>
Intron 4	4A/4A	4 (3,9%)	4 (3,5%)	0,600
	4A/4B	32 (31,1%)	29 (25,2%)	
	4B/4B	67 (65,0%)	82 (71,3%)	

Devido às diferenças significativas das dosagens de fibrinogênio e PAI-1 entre os grupos IAM e controle determinamos os polimorfismos associados ao fibrinogênio (-148C/T e -455 G/A) e ao PAI-1 (- 6754G/5G) (Figuras 11 e 12), os quais não mostraram resultados diferentes entre os grupos. (Tabelas 16 - 17 - 18)

#### 4.1.10 Polimorfismo do fibrinogênio (-148C/T e -455 G/A)



**Figura 11** – Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1,5% após coloração com brometo de etídio, sob luz ultra violeta. Os fragmentos são visibilizados em dois painéis : superior e inferior. No painel superior observam-se os fragmentos relacionados com o polimorfismo do gene do fibrinogênio para a enzima HaeIII; na posição 1 a 8 encontram-se os genótipos GA, GG, GG, GA, GG, GG, branco, padrão molecular de 100 bp, respectivamente. No painel inferior caracteriza-se o polimorfismo do gene do fibrinogênio para a enzima Hind III; nas posições 1 a 8 os genótipos CT, CC, CC, CT, controle, CC, branco, padrão molecular de 100 bp, respectivamente.

**Tabela 16 –** Genótipos do polimorfismo fibrinogênio -148 C/T (FIBR HIND) nos grupos controle e IAM

	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>P</b>
CC	75 (72,1%)	81 (70,5%)	
CT	26 (25,0%)	32 (27,8%)	0,776
TT	3 (2,9%)	2 (1,7%)	

**Tabela 17 -** Genótipos do polimorfismo do fibrinogênio –455 G/A (FIBR HAE) nos grupos controle e IAM

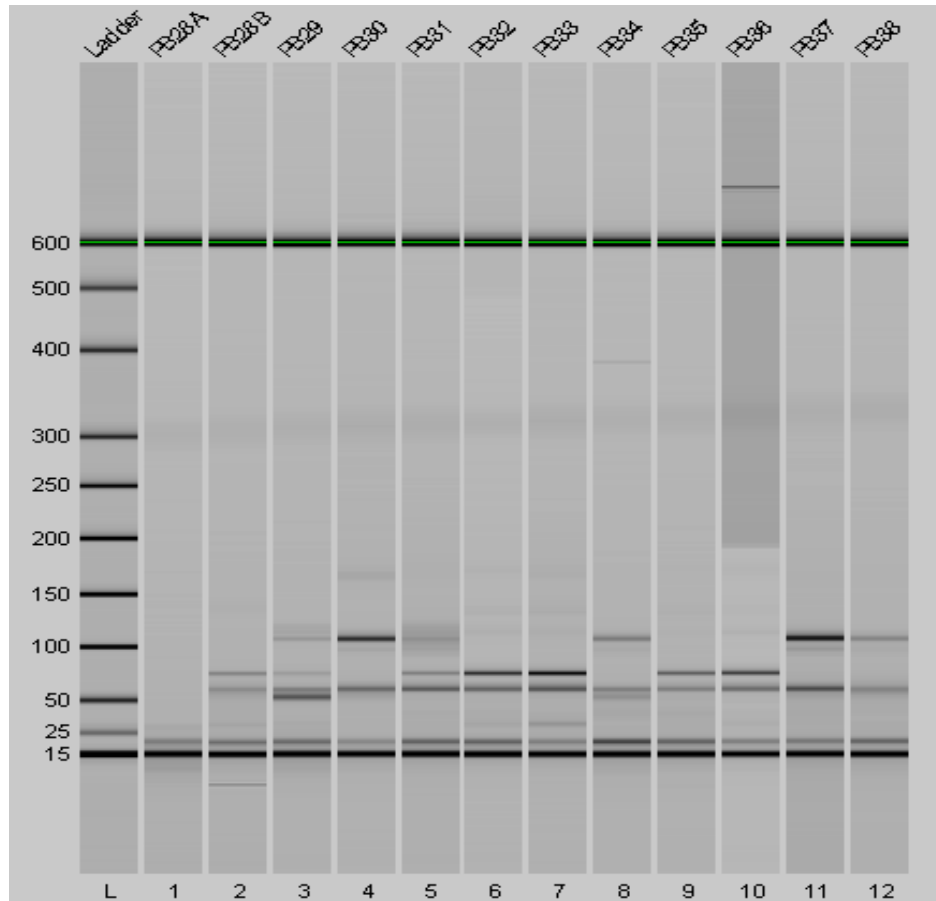
	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>P</b>
AA	2 (1,9%)	2 (1,7%)	
GA	26 (25,0%)	27 (23,5%)	0,953
GG	76 (73,1%)	86 (74,8%)	

**Tabela 18 –** Genótipos do polimorfismo (-6754G/5G) do PAI-1

	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo IAM</b>	<b>P</b>
4G/4G	16 (15,4%)	23 (20,0%)	
4G/5G	45 (43,3%)	47 (40,9%)	0,738
5G/5G	43 (41,3%)	45 (39,1%)	



#### 4.1.11 Polimorfismo do PAI-1



**Figura 12** – Fotografia do perfil de separação dos fragmentos por sistema de eletroforese em micro capilar da *Agilent 2100 Bioanalyzer* utilizando kit *LabChip*, para análise de fragmentos de DNA de até 500 pb. Os perfís de separação dos fragmentos de polimorfismo do gene do PAI estão mostrados nas posições de 1 a 12 e caracterizam os genótipos: controle, 5g/5g, 4g/5g, 4g/4g, 5g/5g, 5g/5g, 5g/5g, 4g/5g, 5g/5g, 5g/5g, 4g/4g, 4g/4g, respectivamente; a posição L mostra uma referência de fragmentos de DNA

#### 4.1.12 Equilíbrio de Hardy–Weinberg

Ao analisarmos a distribuição de genótipos para os três polimorfismos estudados da eNOS (GLU298ASP, T786C e íntron 4) verificamos que as frequências observadas tanto para o grupo controle como para o grupo IAM estão em equilíbrio de Hardy–Weinberg, indicando que a população estudada compõe um modelo representativo e que os resultados podem ser seguramente comparados com os de outras populações (Tabela 19 ).

**Tabela 19** – Equilíbrio de HARDY-WEINBERG para os polimorfismos da eNOS

<b>Polimorfismo da eNOS</b>	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo IAM</b>
GLU298ASP	0,4657	0,5630
T786C	0,5342	1,6981
ÍNTRON 4	0,0054	0,5003

A distribuição dos genótipos para os dois polimorfismos do fibrinogênio estudados (-455 G/A e -148 C/T), tanto para o grupo controle como para o grupo IAM, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como a distribuição dos genótipos para o polimorfismo do PAI-1 -6754 4G/5G (Tabela 20).

**Tabela 20** – Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos do fibrinogênio e do PAI-1

	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo IAM</b>
-148 C/T	0,1645	0,3333
-455 G/A	0,0051	0,0169
PAI -1	0,5402	2,6415

#### 4.1.13 Resultados adicionais da análise genética

##### **Análises descritiva e comparativa das variáveis numéricas com os polimorfismos do fibrinogênio**

Adicionalmente, comparamos as variáveis numéricas estudadas (p. ex: glicose, triglicérides) com os genótipos do polimorfismo -455 G/A (fibr Hae) e -148 C/T (fibr Hind). Assinale-se que os genótipos obtidos desses polimorfismos, para efeito de análise estatística, foram agrupados de acordo com o alelo mutante. Assim, para o polimorfismo -455 G/A (fibr Hae) as variáveis numéricas foram comparadas entre os genótipos (GG vs GA + AA) e para o polimorfismo -148 C/T (fibr Hind) entre os genótipos (CC vs CT + TT).

### Polimorfismo -455 G/A (fibr Hae)

Para esse polimorfismo, a única variável que mostrou correlação significativa foi a trigliceridemia que se associou com os genótipos (GA + AA) no grupo IAM, (Tabela 21)

**Tabela 21** – Associação do polimorfismo -455 G/A com trigliceridemia no grupo IAM

Polimorfismo – 455 G/A	Trigliceridemia	p
“GG”	170,9 ± 101,2	0,047
“GA + AA”	211,0 ± 112,7	

### Polimorfismo -148 C/T (FIBR HIND)

Não encontramos para esse polimorfismo nenhum resultado significativo entre as variáveis numéricas e os genótipos (CC vs CT + TT).

### **Análises descritiva e comparativa das variáveis categóricas com os polimorfismos do fibrinogênio.**

Em relação às variáveis categóricas estudadas realizamos também comparações relacionadas ao polimorfismo -455 G/A (fibr Hae) e -148 (fibr Hind).

#### **Polimorfismo -455 G/A (fibr Hae)**

A comparação das diversas variáveis categóricas com os genótipos (GG vs GA + AA) não mostrou nenhuma associação significativa.

#### **Polimorfismo -148 C/T (fibr Hind)**

A comparação das variáveis categóricas com os genótipos -148 C/T Fibr Hind (CC vs CT + TT) mostrou associação significativa com o polimorfismo -455 G/A (fibr Hae), tanto no grupo IAM quanto no grupo controle. Os resultados dessas comparações acham-se expressas nas tabelas 22 e 23.

**Tabela 22** – Comparação das variáveis categóricas com o genótipo -148 C/T (FIBR HIND) no grupo controle

<b>-455 G/A</b>	<b>-148 C/T</b>		<b>P</b>
	<b>CC</b>	<b>CT/TT</b>	
AA/GA	0 (0,0%)	28 (96,5%)	
GG	75 (100,0%)	1 (3,4%)	< 0,01

**Tabela 23** – Comparação das variáveis categóricas com o genótipo -148 C/T (FIBR HIND) no grupo IAM

<b>-455 G/A</b>	<b>-148 C/T</b>		<b>P</b>
	<b>CC</b>	<b>CT/TT</b>	
AA/GA	0 (0,00%)	29 (85,2%)	< 0,001
GG	81 (100,0%)	5 (14,7%)	

### **Polimorfismo do PAI-1**

As variáveis numéricas não mostraram correlação significativa com os genótipos do PAI-1 (4g/4g + 4g/5g vs 5g/5g) para os grupos controle e IAM. A mesma falta de correlação significativa foi observada entre os genótipos do PAI-1 e as variáveis categóricas.

### Polimorfismo da eNOS GLU298ASP

Para o polimorfismo GLU298ASP foram comparadas as variáveis numéricas (p. ex: glicose, triglicérides) e os genótipos (GG vs GT + TT) para o grupo controle e IAM, separadamente. A única variável numérica que mostrou correlação foi a glicose com a combinação (GT + TT) no grupo IAM tabela 24.

**Tabela 24** – Associação do polimorfismo GLU298ASP com níveis de glicose

Polimorfismo	Glicose (média)	P
GLU298ASP (GG)	101,7 ± 33,2 (mg/dl)	0,049
GLU298ASP (GT + TT)	119,9 ± 66,1 (mg/dl)	

Em relação às variáveis categóricas (p. ex: tabagismo, polimorfismo) houve associação significativa com a presença de diabetes no grupo IAM conforme exposto na tabela 25.

**Tabela 25** – Associação do polimorfismo GLU298ASP com diabetes.

Diabetes	Genótipo		P
	GG	GT/TT	
NÃO	54 (96,4%)	49 (83,0%)	0,019
SIM	2 (3,6%)	10 (17,0%)	

A associação entre o polimorfismo da eNOS, GLU298ASP e o T786C foi significativa, tanto no grupo controle como IAM (Tabelas 26 e 27).

**Tabela 26 – Associação entre GLU298ASP E T786C – Grupo controle**

<b>GLU298ASP</b>			
<b>T786C</b>	<b>GG</b>	<b>GT/TT</b>	<b>P</b>
TT	27 (51,9%)	15 (28,8%)	0,016
CT/CC	25 (49,1%)	37 (71,2%)	

**Tabela 27 – Associação entre GLU298ASP E T786C no grupo IAM**

<b>GLU298ASP</b>			
<b>T786C</b>	<b>GG</b>	<b>GT/TT</b>	<b>P</b>
TT	40 (71,4%)	22 (37,3%)	< 0,001
CT/CC	16 (28,6%)	37 (62,7%)	



### Polimorfismo da eNOS T786C

Em relação ao polimorfismo T786C nenhuma variável numérica mostrou correlação significativa com qualquer genótipo. Entretanto em relação as variáveis categóricas houve correlação positiva entre a presença de hipertensão e genótipos “TT” (Tabela 28).

**Tabela 28** – Associação entre o genótipo TT e hipertensão arterial

Polimorfismo eNOS T786C			
Hipertensão	TT	CT/CC	P
NÃO	27 (43,0%)	33 (63,3%)	0,028
SIM	36 (57,0%)	19 (36,7%)	

### Polimorfismo eNOS intron 4

A análise comparativa das variáveis numéricas e os genótipos do polimorfismo intron 4 (4b/4b vs 4A/4A + 4A/4b) não mostrou nenhuma correlação significativa. As comparações das variáveis categóricas entre os genótipos do polimorfismo do intron 4 (4b/4b vs 4A/4A + 4A/4b) para controles e pacientes não evidenciaram nenhuma correlação significativa.

#### 4.1.14 Regressão Logística

Os genótipos do polimorfismo GLU298ASP, T786C e intron 4 foram analisados com as variáveis dependentes vasodilatação fluxo mediada, vasodilatação nitrato mediada, valores de nitrato e presença de hipertensão.

Os resultados das análises de regressão logística mostraram correlação significativa dos haplótipos e a presença de hipertensão no grupo IAM. Os pacientes com polimorfismo T786C e com haplótipos TT e GLU298ASP com haplótipos GG possuem 9,8 vezes mais risco (IC95% 1,12-85,65) de apresentar hipertensão que os com haplótipo CT e TT, respectivamente. Pela análise de alelos, obteve-se correlação significativa com a presença de hipertensão no grupo IAM. Os pacientes sem o alelo “C” do polimorfismo T786C e com o alelo “G” do GLU298ASP têm, respectivamente 2,2 vezes (IC95%: 1.02 – 4.64) e 6,6 vezes mais risco de apresentar hipertensão que os com alelo “C” do T786C e sem alelo “G” do GLU298ASP (Tabela 29).

**Tabela 29** – Resultados das análises de regressão logística multivariadas sobre a influência dos polimorfismos T786C E GLU298ASP na variável de interesse hipertensão arterial – grupo IAM

Variável Dependente	Variável Independente	Níveis de Comparação (n)	P-Valor	O.R	IC 95% O.R.
Hipertensão=S (n = 115)	Haplótipos T786C/GLU298ASP	TT e GG (ref) (40)	-----	1,00	-----
		TT e GT (20)	0,460	1,52	0,50 – 4,61
		TT e TT (3)	0,480	0,41	0,03 – 4,89
		CT e GG (16)	0,241	0,49	0,15 – 1,61
		CT e GT (25)	0,583	0,76	0,28 – 2,06
		CT e TT (9)	0,040	0,10	0,01 – 0,90
		CC e GT (1)	0,991	0,00	0,00 – 999,0
		CC e TT (1)	0,991	0,00	0,00 – 999,0
Hipertensão=S (n = 115)	Alelos T786C/GLU298ASP	Alelo C/ Não Alelo C	0.045	0.46	0.22 – 0.98
		Alelo T/ Não Alelo T	0.987	999.0	0.00 – 999.0
		Alelo G/ Não Alelo G	0.023	6.55	1.30 – 32.90
		Alelo T/ Não Alelo T	0.662	1.19	0.55 – 2.60

As análises de regressão logística entre Intron 4 e GLU298ASP com as variáveis vasodilatação fluxo mediada, vasodilatação nitrato mediada e nível sérico de nitrato, nos grupos controle e IAM não mostraram relação significativa dos haplótipos e nem dos alelos com as variáveis dependentes estudadas.

---

## **5. DISCUSSÃO**

---

Os dados demográficos do grupo IAM mostraram maior proporção do sexo masculino, achado comum na maioria das publicações sobre IAM em jovens<sup>(114)</sup>. Outro dado comum à literatura é a maior prevalência de brancos (65%), apesar da grande miscigenação racial existente em nosso país<sup>(62)</sup>. Em nossa casuística, o grupo de jovens com IAM apresentou estatura mais baixa que a do grupo controle, resultado singular também observado por WALKER<sup>(115)</sup>.

## **5.1 Fatores de risco**

Em relação aos fatores de risco, a grande maioria (95%) dos pacientes apresentou pelo menos um fator de risco considerado clássico (obesidade, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, LDL-c alto, antecedentes familiares). Resultado semelhante foi encontrado em outros estudos<sup>(116,117,118)</sup>. Entretanto, Nixon e Cheiltlen não observaram número relevante de pacientes jovens com IAM e fatores de risco convencionais, sugerindo outras condições que não a aterosclerose como causa do infarto<sup>(119,120)</sup>.

Os dados do Bogalusa Heart Study evidenciaram que índice de massa corpórea, pressão arterial, concentração sérica de colesterol total, triglicérides, LDL colesterol e HDL colesterol associaram-se fortemente com a extensão das lesões arteriais coronárias. Nesse estudo, pacientes com 0, 1, 2 e 3 ou 4 fatores de risco apresentaram, respectivamente, 1,3%, 2,5%, 7,9% e 11% de superfície intimal coberta com estrias gordurosas nas coronárias<sup>(121)</sup>. Estudos epidemiológicos têm estabelecido que fatores de risco múltiplos aumentam a probabilidade de eventos cardiovasculares, vez que podem interagir e influenciar a morbidade e a mortalidade<sup>(121)</sup>. Além disso, o escore de fator de risco em um dado paciente mostrou-se preditor independente de disfunção endotelial<sup>(122)</sup>.

A frequência de 81,2% de pacientes tabagistas no grupo IAM foi similar à observada na maioria dos estudos, que apontam o tabagismo como o principal fator de risco em adultos jovens<sup>(49,62,63,123,124)</sup>. Hipertensão arterial foi detectada em 49,2% dos pacientes do grupo IAM. A literatura não aponta a hipertensão arterial como fator de risco relevante no IAM em jovens<sup>(63,117,125,126)</sup>. Esses trabalhos referem que a hipertensão arterial, para induzir à aterosclerose, necessitaria tempo de ocorrência maior do que a observada em pacientes jovens com IAM. Entretanto, em nosso meio, Conti et al relataram resultados similares aos encontrados neste trabalho, sugerindo que a hipertensão arterial possa ser fator de risco relevante para a população jovem brasileira<sup>(60)</sup>.

A presença de antecedentes familiares para DAC precoce, em 48,4% dos pacientes, é similar à encontrada nas séries de Uhl e Hoit, indicando um

forte componente genético para ocorrência de IAM em jovens<sup>(63,116)</sup>. Entretanto, nos estudos de Wolfe e Gohlke, antecedentes familiares não constituíram fator de risco significante<sup>(127,128)</sup>. A baixa prevalência de diabéticos (10,2%), em relação aos outros fatores de risco neste estudo, é achado habitual na maioria dos estudos da literatura mundial; entretanto, é maior que a prevalência na população geral brasileira, em torno de 7,5%<sup>(129)</sup>. É relevante o fato que os pacientes do grupo IAM apresentaram maiores valores de glicemia em jejum.

Finalmente, merecem destaque os fatores de risco relacionados aos lípidos. Os resultados deste estudo mostraram no grupo IAM, em comparação com o grupo controle, valores mais altos de LDL-c, apo B e triglicérides e valores mais baixos de HDL-c e apo A. A participação da LDL na gênese da DAC prematura é controversa. Alguns estudos mostraram que a maioria dos pacientes jovens com IAM apresentava LDL-c alto, correlacionando os valores com a gravidade da aterosclerose<sup>(130,131,132,133,134)</sup>, enquanto outros mostraram o inverso<sup>(135)</sup>. É provável que maiores valores de LDL-c não tenham sido encontrados em nossa casuística pela exclusão dos pacientes jovens com IAM e hipercolesterolemia familiar conhecida. A apo B plasmática, que reflete o número de partículas de VLDL e LDL no plasma, parece ser o melhor preditor de extensão da DAC<sup>(136)</sup>.

A ocorrência de maiores valores de triglicérides neste estudo está de acordo com vários trabalhos da literatura<sup>(52,137,138,139,140)</sup>. É possível que a hipertrigliceridemia tenha papel importante na gênese do IAM em jovens. Triglicérides podem atuar diretamente na parede arterial, propiciando a

formação de lesões ateroscleróticas e influenciar o metabolismo e a composição das LDL (LDL densas e pequenas estão freqüentemente associadas à hipertrigliceridemia). Além disso, triglicérides podem atuar na fissura da placa, onde funcionam como substrato para reações com radicais livres envolvendo o “core” lipídico central, e levar à formação de trombo pela indução de estado pró-coagulante, observado em pacientes hipertrigliceridêmicos<sup>(141,142,143)</sup>.

Níveis baixos de HDL-c constituem fator de risco preponderante no IAM em jovens, principalmente quando associados a hipertrigliceridemia<sup>(144,145)</sup>. Níveis plasmáticos baixos de HDL-c e de apolipoproteína AI e AII contribuem fortemente para a discriminação entre jovens com e sem IAM, o que foi confirmado em nossa casuística.

Neste estudo, o grupo IAM apresentou valores mais altos para o PAI-1 e fibrinogênio que o grupo controle. PAI-1 elevado foi considerado em muitos trabalhos fator de risco para doença coronária e para IAM, especialmente em pacientes jovens<sup>(146,147)</sup>. As concentrações plasmáticas do PAI-1, refletem a ação de fatores ambientais e genéticos. Entre os fatores ambientais que estiveram presentes em nosso estudo e que poderiam influenciar as concentrações de PAI-1, destacam-se: tabagismo, índice de massa corpórea, níveis séricos de triglicérides e colesterol. O PAI-1 é utilizado como indicador de disfunção endotelial na medida em que seu aumento possa ocorrer pelo dano ao endotélio. Entretanto, existe consenso que o aumento do PAI-1 pode não ser específico para célula endotelial, pois pode aumentar devido a células não endoteliais, ou influenciado por outros estados patológicos<sup>(148)</sup>.



Em relação ao fibrinogênio, uma série de fatores ambientais, presentes no grupo IAM, influenciam sua concentração plasmática: índice de massa corpórea, concentrações plasmáticas de LDL colesterol, tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial. Atividade física e aumento do HDL-colesterol podem reduzir as concentrações de fibrinogênio. Vários estudos epidemiológicos correlacionaram o fibrinogênio com a DAC, como o Lough Clinical Unit, o Northerick, o de Goteborg, de Framingham e os estudos ARIC e PROCAM<sup>(71,72,73,74,149,150)</sup>. O fibrinogênio, além de ser fator de risco maior e independente para doença coronária, está associado com os tradicionais fatores de risco cardiovascular, sugerindo que o aumento do mesmo pode ser o mecanismo pelo qual tais fatores exerçam seu papel. Alguns estudos correlacionaram o aumento do fibrinogênio com o tabagismo, pois cerca de 50% dos tabagistas com doença arterial coronária apresentavam concentrações elevadas de fibrinogênio plasmático<sup>(88,151)</sup>. Merece destaque que neste trabalho a concentração plasmática de fibrinogênio esteve associada com lesões maiores que 30% observáveis à cineangiocoronariografia.

Pelos dados expostos, pode-se admitir que os pacientes do grupo IAM estivessem sob risco trombótico aumentado, pois apresentavam aumento das concentrações plasmáticas de PAI-1 e fibrinogênio, provavelmente influenciados pelo tabagismo, que também induz ativação anormal das plaquetas circulantes, favorecendo a ocorrência de trombose e/ou vasoespasmos coronários<sup>(152)</sup>. Presume-se que o efeito do tabagismo no nível plasmático de PAI-1 se relacione com sua influência nos triglicérides e na resistência à insulina, visto que existe relação entre essas variáveis.

Quando decidimos estudar pacientes jovens com IAM, a suposição inicial era que constituíssem grupo com número reduzido de fatores de risco convencionais para DAC, pois a maioria deles é tempo dependente. Entretanto, os dados deste trabalho e os da literatura apontam para significativa presença de fatores de risco, sugerindo que o IAM em jovens seja manifestação precoce de processo aterosclerótico. Além disso, tais características dos pacientes jovens com IAM (presença freqüente de tabagismo, LDL-c alto, apo B alta, HDL-c baixo, apo A baixa, PAI-1 elevado e fibrinogênio alto), permitiriam supor que a possibilidade de agressão ao endotélio, com graus variáveis de disfunção endotelial, fosse muito alta.

A presença significativa de fatores de risco clássicos no grupo IAM como hipertensão, tabagismo, obesidade, diabetes, níveis maiores de glicemia, aliado a um perfil lipídico alterado (colesterol total alto, LDL-c alto, HDL-c baixo, apo A1 baixa, apo B alta, hipertrigliceridemia) sugere fortemente uma síndrome pluri metabólica. Apesar de não ter sido avaliada neste estudo, existe associação forte entre óxido nítrico, disfunção endotelial e resistência à insulina. O estímulo de incorporação de glicose pelo músculo esquelético e pelo tecido adiposo pode ser dependente do óxido nítrico, enquanto a presença da óxido nítrico sintase induzível é fundamental para o desenvolvimento da resistência a insulina<sup>(153)</sup>. A insulina exerce uma significativa ação antiinflamatória e o estado de resistência à insulina está associado com o estresse oxidativo, geração aumentada de espécies reativas de oxigênio e redução da biodisponibilidade do óxido nítrico acarretando disfunção endotelial<sup>(154)</sup>.

## 5.2 Características do infarto

A grande maioria dos pacientes (71%) não apresentou angina prévia ao infarto, característica essa também encontrada em outros estudos, confirmando a observação que nos indivíduos jovens o IAM é a primeira manifestação de doença coronária<sup>(63,125)</sup>.

Nesta casuística, o IAM anterior foi discretamente mais prevalente que o IAM inferior. Este resultado está de acordo com o estudo de Branco et al, porém em divergência com o de Hoit, que encontrou maior proporção de IAM inferior (63, 155). A análise do ECG evidenciou que o IAM com supra desnivelamento do ST é nitidamente mais freqüente que o IAM sem essa característica (97,7% X 2,3%). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura<sup>(63)</sup>.

## 5.3 Cineangiocoronariografia

Os achados cinecoronariográficos freqüentes de artérias normais ou com lesões mínimas são comuns na maioria dos estudos que avaliaram jovens com IAM<sup>(49,63,156,157,158)</sup>. A alta taxa de coronárias normais ou com lesões mínimas talvez seja a principal responsável pela baixa manifestação de angina prévia ao infarto. As possíveis explicações para o IAM com coronárias normais são o vasoespasma e/ou a formação de trombo, fenômenos suscetíveis de ocorrer em pacientes tabagistas com PAI-1 e fibrinogênio elevados. Destaque-

se o fato de que doentes com artérias coronárias angiograficamente normais podem ter anomalias coronárias não detectáveis pelo método, e que poderiam predispor ao espasmo e/ou trombose com lise posterior do trombo<sup>(155)</sup>. Além disso, deve-se realçar que a angiografia pode não ter conseguido detectar lesões precoces devido ao remodelamento existente nessas lesões, com preservação do lúmen do vaso<sup>(55)</sup>.

Apesar da alta incidência de coronárias normais na população jovem com IAM, que diverge da observada na população geral (3%), vários estudos evidenciaram predomínio de pacientes com aterosclerose significativa à cineangiocoronariografia<sup>(49,125)</sup>. Em geral, as lesões coronárias discretas nesses estudos eram complexas e proximais, o que pode explicar sua rápida progressão (placa rota, placa complicada ou ambas), mais do que um processo gradual. Estes dados estão de acordo com os deste estudo, que mostraram para as lesões moderadas ou graves localização proximal em 91% dos casos.

A maior frequência das lesões na artéria descendente anterior, seguida da coronária direita, foi similar à observada em outros estudos<sup>(155)</sup>. Em nenhum paciente foi encontrada lesão de tronco, resultado comum também na literatura mundial<sup>(127)</sup>.

O achado de disfunção ventricular esquerda sistólica importante em vários pacientes, apesar de se tratar na maioria dos casos de lesões uniarteriais, resultou provavelmente de sua localização proximal em vaso importante.

## 5.4 Endotélio

Os pacientes do grupo IAM apresentaram redução significativa da capacidade vasodilatadora observada no ultra-som de artéria braquial, em comparação com o grupo controle, sem diferença em relação à vasodilatação mediada por nitrato, denotando uma função íntegra da camada muscular em ambos os grupos. Esses resultados indicam a presença de disfunção endotelial.

Ressalte-se que em alguns trabalhos, como o de Zhang os pacientes com aterosclerose coronária apresentaram redução da capacidade vasodilatadora fluxo-mediada e também após estímulo com nitrato (VMN), denotando disfunção associada da camada muscular, que pode ser explicada pelo próprio processo de aterosclerose, a qual acarretaria alterações da arquitetura e remodelamento funcional da parede vascular<sup>(55,178)</sup>. Entretanto, este resultado não foi por nós observado. A maioria dos pacientes deste estudo apresentava aterosclerose (81,2%). Disfunção endotelial acentuada foi observada tanto em pacientes com lesões coronárias importantes como discretas. Pode-se especular a existência, neste estudo, de associação entre disfunção endotelial, redução da capacidade vasodilatadora e ocorrência do IAM. Por outro lado, o próprio IAM está associado com piora da função vasodilatadora, tanto na região do infarto, como no miocárdio perfundido por artérias normais<sup>(159)</sup>. Esses resultados sugerem associação entre disfunção endotelial, aterosclerose e IAM em jovens.

Todos os fatores de risco clássicos para doença cardiovascular associam-se a disfunção endotelial. Alteração vasomotora do endotélio foi encontrada na hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes melito, história familiar precoce para DAC e tabagismo.

A disfunção endotelial presente na hipercolesterolemia envolve aumento na degradação do NO, diminuição da síntese de NO, e aumento na produção do ânion superóxido induzido pela hipercolesterolemia. Além da ação específica sobre o sistema da síntese de NO<sup>(160)</sup>, as LDL oxidadas podem exercer efeitos diretos no sistema de sinalização do NO, envolvendo proteína quinase C e proteína G, bem como levar a aumento da apoptose endotelial e diminuição da densidade capilar no miocárdio, podendo causar disfunção miocárdica por queda da reserva de fluxo coronário<sup>(14,160)</sup>. Além disso, existem mecanismos específicos pelos quais o colesterol e espécies reativas de oxigênio regulam a formação da cavéola, a expressão da eNOS e as interações caveolina-eNOS, que podem modular a função endotelial<sup>(161)</sup>.

O HDL-c melhora e reverte a disfunção endotelial por diversas propriedades, principalmente antioxidante, cuja importância é realçada pela observação de que a geração de ânion superóxido parece ser o principal mecanismo da disfunção endotelial<sup>(162)</sup>. O HDL-c não somente restaura o comprometimento da síntese de NO nas células endoteliais expostas aos lípidos aterogênicos, como atua diretamente nas plaquetas, induzindo a síntese endógena de NO. Relação inversa entre HDL-c e fator von Willebrand também foi observada, sugerindo que a inibição da expressão desse importante fator de adesão e agregação plaquetárias contribua para o menor risco trombótico em pacientes com HDL-c elevado<sup>(163)</sup>.

Em cultura de células, LDL-c e LDL glicada reduzem a formação de tPA e aumentam a geração de PAI-1, determinando aumento do risco trombótico. O HDL-c reverte esse efeito, restaurando a expressão normal de tPA e PAI-1. Além disso, o HDL-c reduz a atividade inflamatória via inibição do NFkB e diminuição do estímulo apoptótico induzido pela LDL oxidada, e favorece a neo-endotelização<sup>(164)</sup>. No trabalho de Lupatteli, a dilatação mediada pelo fluxo avaliada pelo ultra-som mostrou-se comprometida nos pacientes com HDL-c < 40 mg/dl, que se revelou preditor independente da disfunção endotelial em análise de regressão múltipla<sup>(165)</sup>. Um outro estudo demonstrou que o HDL-c pode doar colesterol à cavéola endotelial, prevenindo a translocação da enzima óxido nítrico sintase endotelial e sua perda de sensibilidade induzida pela LDL<sup>(164)</sup>.

A hipertrigliceridemia também pode afetar a função endotelial. Os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial em pacientes com aumento dos triglicérides podem relacionar-se diretamente com o aumento da concentração plasmática da dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno do NO. De fato, homens jovens com hipertrigliceridemia apresentaram disfunção endotelial avaliada pelo ultra-som de artéria braquial, e essa disfunção associou-se a maiores níveis plasmáticos de ADMA<sup>(166)</sup>.

A hipertensão arterial reduz a vasodilatação endotélio dependente. Essa condição, freqüente no grupo IAM, pode acarretar diminuição da produção basal ou da liberação de NO, provavelmente devido à deficiência de L-arginina, redução da função de receptores muscarínicos,

anormalidades dos sinais de transdução e inativação do NO por espécies reativas de oxigênio<sup>(167,168)</sup>.

Outro aspecto relevante do grupo IAM foi a presença de antecedentes familiares positivos para DAC precoce. Em estudos com ultra-som de artéria braquial, a presença desse fator de risco mostrou-se preditor de resposta vasomotora endotélio dependente anormal<sup>(169)</sup>.

Entre os fatores de risco, o resultado mais expressivo relacionou-se ao tabagismo. O tabagismo leva à disfunção endotelial por múltiplas causas. No fumante, há denudação endotelial e descamação das células endoteliais. As ações da nicotina sobre o endotélio vascular podem estar relacionadas à expressão funcional de receptores nicotínicos de acetilcolina. A nicotina, atuando nesses receptores, modularia a mobilidade, configuração, proliferação e diferenciação celular, assim como a liberação de fatores de crescimento, entre os quais o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator mitogênico tecidual, envolvidos no controle do tônus vasomotor e trombogenicidade. A nicotina reduz a síntese de prostaciclina pelo endotélio sem afetar a síntese de tromboxano A<sub>2</sub>. O desequilíbrio na relação prostaciclina/tromboxano leva a predomínio do efeito do tromboxano nas artérias coronárias e, finalmente, à redução da produção de NO.

Em vários estudos, o tabagismo associou-se à redução da vasodilatação endotélio dependente, tanto na artéria braquial como nas coronárias<sup>(170,171,172)</sup>. Entretanto, outros estudos não mostraram relação entre tabagismo e redução da vasodilatação e da produção de óxido nítrico<sup>(173,174,175,176)</sup>. A mesma controvérsia existe em relação à expressão da



eNOS com o tabagismo<sup>(177,178,179,180)</sup>. Em nossa casuística, os tabagistas apresentaram vasodilatação reduzida em comparação com os não tabagistas (64,7% X 35,3% dos casos;  $p < 0,001$ ).

A dosagem da proteína C reativa não mostrou diferença significativa entre os grupos. Esse resultado encontra-se em desacordo com a literatura, haja vista que hoje a PCR é considerada um marcador de disfunção endotelial. Estudos recentes mostraram que a PCR, além de marcador de inflamação, pode contribuir diretamente para a disfunção endotelial, pois a exposição dessas células à PCR diminui a produção endotelial de NO e reduz a expressão da eNOS, por diminuir a estabilidade do RNAm<sup>(181)</sup>. Como no grupo IAM haviam vários fatores de risco que cursam com disfunção endotelial, era de se esperar que a PCR estivesse mais aumentada nesse grupo, o que não ocorreu. Uma das possíveis explicações é a grande variabilidade dos métodos de análise, além de ter sido utilizada uma única avaliação.

A presença de PAI-1 elevado correlacionou-se de forma significativa com a redução da vasodilatação. Neste estudo, os pacientes com vasodilatação  $\leq 10\%$  ao US apresentaram valores médios de PAI-1 de  $18,1 \pm 11,1$  U/ml, enquanto em aqueles com resposta vasodilatadora normal os valores de PAI-1 foram de  $11,6 \pm 10,0$  U/ml ( $p < 0,001$ ). Uma das possíveis explicações para esse fenômeno é o fato de o PAI-1 ser uma proteína de fase aguda, que pode aumentar como resposta à inflamação ou à injúria. Diversas citocinas inflamatórias, como a interleucina-1, TNF $\alpha$ -2 e TGF $\beta$ , podem estimular a produção de PAI-1. Por outro lado, o próprio

PAI-1 pode estimular a síntese de citocinas. A outra explicação para a associação entre PAI-1 elevado e redução da vasodilatação dependente do endotélio engloba conceitos fisiopatológicos que poderiam ser responsáveis pela própria gênese do IAM em jovens. Postula-se que a aterosclerose, bem como os fatores de risco associados, induziriam graus variáveis de disfunção endotelial nas artérias coronárias. A presença de endotélio disfuncional acarretaria desequilíbrio na capacidade fibrinolítica da circulação coronária, com redução da liberação de tPA e elevação das concentrações plasmáticas de PAI-1. Esse conceito foi considerado no estudo de Newby et al que mostrou forte associação entre ruptura da placa, tabagismo e redução da capacidade fibrinolítica local, indicando haver uma ligação entre fibrinólise endógena, disfunção endotelial e aterotrombose na circulação coronária<sup>(182)</sup>.

Assim como no estudo de Jambrik e Suwaidi não houve em nossa casuística associação entre disfunção endotelial e extensão e magnitude das lesões coronárias documentadas angiograficamente<sup>(183,184)</sup>.

Estudos diversos apontaram que a disfunção endotelial aumenta com a idade<sup>(185)</sup>. De outra parte, Sorensen et al., mostraram que a disfunção endotelial na artéria braquial e na coronária foi mais significativa em adultos jovens que em faixas etárias mais elevadas<sup>(186)</sup>. Tais achados, associados com os resultados deste estudo, sugerem que o ultra-som de artéria braquial poderia identificar indivíduos jovens assintomáticos sob risco de DAC complicada, levando à adoção de estratégias preventivas primárias<sup>(187)</sup>.

## 5.5 Genética

A aterosclerose é uma doença poligênica na qual há interação de fatores herdados e ambientais. Determinados polimorfismos genéticos podem estar associados com a doença em algumas populações, mas não em outras. Vários estudos já tentaram correlacionar a aterosclerose com fatores genéticos. Entretanto, a maioria correlacionou a presença ou não de aterosclerose com diversos polimorfismos de genes que regulam a aterogênese, com resultados inconsistentes. A falta de correlação entre o polimorfismo e os fenótipos pode ser explicada pela participação de outras influências vasoativas<sup>(18,23,29)</sup>.

A escolha de um grupo de adultos jovens com IAM para avaliar a influência de fatores genéticos na DAC baseou-se em algumas premissas: 1) os fatores de risco clássicos estão menos presentes, ou tiveram menos tempo para atuar nesse grupo, tornando os estudos genéticos mais consistentes; 2) a presença do IAM pode facilitar a percepção de alterações genéticas que não se manifestariam em condições normais, tornando-se porém aparentes sob o estresse do IAM; 3) diversos estudos que avaliaram a função endotelial no IAM em jovens concluíram que a disfunção endotelial constitui a causa básica desse evento<sup>(188,189)</sup>.

A escolha da eNOS como gene candidato baseou-se em algumas evidências: 1) Nos vasos acometidos por aterosclerose a vasodilatação dependente do endotélio está comprometida. 2) Essa vasodilatação deficiente pode em parte ser atribuída à redução da atividade da eNOS.

3) A eNOS apresenta pelo menos 11 polimorfismos descritos, sendo que 3 deles (GLU298ASP, T786C e intron. 4) estão correlacionados com a DAC e seus fatores de risco. Em consequência, esses polimorfismos funcionais em um gene candidato devem ser alvos primários de estudos epidemiológicos de possível associação com risco de doença aterotrombótica vascular.

Esperar-se-ia, portanto, que variações genéticas da eNOS estivessem presentes de forma significativa em nossa casuística. Entretanto, os resultados, não demonstram para os 3 tipos de polimorfismos de óxido nítrico sintase endotelial avaliados (GLU298ASP, - T786C, intron-4) qualquer diferença significativa entre o grupo IAM e o grupo controle, ressalte o fato que para o polimorfismo T786C houve um maior contingente do genótipo TT (normal) no grupo IAM.

Na literatura, o polimorfismo GLU298ASP foi o que mais se associou com a DAC, o IAM e a disfunção endotelial, muito embora sem resultados conclusivos<sup>(190)</sup>. A substituição do resíduo 298 de glutamato por aspartato no exon 7 foi descrita como responsável pela redução da atividade da eNOS, e pela reduzida geração de óxido nítrico vascular, uma vez que a eNOS é mais suscetível à clivagem em indivíduos homocigotos para essa variante. Recentemente, meta-análise de 26 estudos envolvendo 23028 indivíduos mostrou que os homocigotos para o alelo ASP 298 apresentavam risco moderado para DAC (31%)<sup>(190)</sup>. Ademais, outros estudos, bem planejados forneceram resultados opostos, confirmando nossos achados. No estudo GENICA Rossi et al não encontraram associação entre o polimorfismo GLU298ASP e a presença de coronariopatia definida angiograficamente<sup>(191)</sup>.

Os resultados negativos da associação desse polimorfismo com a DAC poderiam ser explicados por duas hipóteses: 1) a troca de glutamato por aspartato é provavelmente conservadora; 2) os estudos que analisaram a constante de Michaelis (KM) e a velocidade máxima limitante (V max) para as enzimas recombinantes ASP298 e GLU298 não mostraram diferenças significantes<sup>(23)</sup>.

Em relação à associação do polimorfismo GLU298ASP com disfunção endotelial, também existem resultados controversos. Neste estudo não encontramos, pela análise de subgrupos, diferenças em relação à capacidade de vasodilatação da artéria braquial e os diferentes genótipos avaliados do polimorfismo GLU298ASP. Colombo em 2002, demonstrou a presença de disfunção endotelial em indivíduos homocigóticos para o alelo ASP298<sup>(192)</sup>. Entretanto, Leeson et al no mesmo ano, não encontraram diferenças na vasodilatação fluxo mediada do antebraço entre todos os genótipos do polimorfismo GLU298ASP<sup>(193)</sup>. Por outro lado, em homens, o tabagismo associou-se com vasodilatação fluxo mediada atenuada, em presença dessa mutação, mas não em portadores do alelo normal<sup>(193)</sup>. Estes dados sugerem que o polimorfismo GLU298ASP exerce influência na função endotelial em presença de co-fatores ambientais, como valores aumentados de espécies reativas de oxigênio.

Em nosso estudo, a análise de subgrupos não mostrou incidência aumentada de homocigotos TT em pacientes tabagistas.

O alelo T do polimorfismo GLU298ASP mostrou correlação positiva com níveis aumentados de glicose e com a presença de diabetes. Esses

resultados não têm similaridade na literatura e divergem dos resultados do estudo ATTICA, que não mostrou associação do polimorfismo GLU298ASP com diabetes, porém com fibrinogênio, leucocitose e LDL-c<sup>(154,195)</sup>. A explicação mais razoável para este achado pode ser a interação do polimorfismo GLU298ASP com fatores ambientais e hábitos dietéticos comprovada em outros estudos<sup>(193)</sup>.

Nosso estudo também sugere que o polimorfismo GLU298ASP não deva exercer um efeito preponderante no controle pressórico, pois as análises de regressão logística multivariadas para avaliar a influência do GLU298ASP sobre a hipertensão arterial mostrou que os portadores do alelo G, e não do alelo T, têm 6,6 vezes mais risco de apresentar hipertensão.

Como resultado expressivo encontramos associação do polimorfismo GLU298ASP e T786C no grupo IAM e também no grupo controle (o genótipo “GG” DO GLU298ASP associado ao genótipo “TT” do T786C e os haplótipos “GT/TT” associados a “CT/CC”). Esse resultado está em concordância com os estudos de Rossi et al em 2003, que apontaram significante ligação entre esses dois polimorfismos e em desacordo com os estudos de Yoshimura em 2000 e de Granath et al em 2001, que evidenciaram ausência de associação entre os vários polimorfismos da eNOS e doença coronária precoce na população australiana branca<sup>(32,191,195)</sup>.

Em relação ao polimorfismo T786C ocorreram nesse estudo os resultados mais contraditórios com a literatura, pois evidenciamos no grupo IAM uma frequência maior de homozigotos TT em comparação com o grupo controle (59,1% vs 40,4%;  $p = 0,02$ ), ao passo que diversos estudos

mostraram associação entre o alelo C e a DAC. O polimorfismo T786C está localizado na região do promotor, a mais importante na regulação da transcrição do gene da eNOS. Estudos genéticos demonstraram que esse polimorfismo reduz em até 50% a taxa de transcrição da eNOS, em condições basais e em resposta à hipóxia e isto foi associado com a diminuição dos níveis de nitrito/nitrato<sup>(196)</sup>. Estes efeitos provavelmente se devam ao fato que o alelo mutante C pode ligar-se à proteína de replicação A1, que atua como uma proteína repressora do gene. Esse polimorfismo foi relacionado com resposta vasomotora coronária alterada, principalmente em artérias coronárias sem estenose em pacientes com vasoespasmos<sup>(30a)</sup>. Além disso, o polimorfismo T786C foi o que mais se associou com disfunção endotelial, pois o elemento responsivo ao *shear stress* foi identificado em uma região próxima do promotor da Enos<sup>(197)</sup>. Essas características, somadas ao expressivo contingente de pacientes com coronárias normais ou com lesões mínimas (35,4%) presente em nosso estudo, indicavam à primeira vista que o polimorfismo T786C poderia ser o responsável pela disfunção endotelial com reduzida produção de NO. Entretanto, os resultados mostraram a presença de disfunção endotelial no grupo IAM com valores anormalmente altos de nitratos e falta de correlação com os polimorfismos da eNOS, inclusive com incidência maior de homozigotos normais “TT” no grupo IAM.

Estes resultados podem ser explicados por diversos fatores: 1) A associação do polimorfismo T786C com a produção reduzida de NO e com a indução e perpetuação da DAC é inconsistente e biologicamente irrelevante,

como demonstraram numerosos estudos. 2) As maiores proporções de pacientes com o genótipo TT no grupo IAM dever-se-ia à maior proporção de negros e mulatos presentes nesse grupo. Haja vista que estudos que avaliaram os efeitos da etnia sobre os polimorfismos da eNOS revelaram que os negros e asiáticos apresentam menor frequência de variantes polimórficas do T786C, com incidência maior do genótipo TT<sup>(198)</sup>.

Associações conflitantes entre variante do intron 4 e atividade do NO foram descritas. Alguns relatos apontaram que os portadores desta variante apresentavam baixo nível de NO plasmático e expressão protéica diminuída, o que não foi observado em outros estudos<sup>(33,37)</sup>. Em pessoas saudáveis portadoras do alelo 4a a concentração de NO é maior, indicando até um fator protetor<sup>(199)</sup>. Como essa variante é intrônica, não é provável que seja funcional, mas poderia agir como um marcador em desequilíbrio com outras variantes funcionais dentro de regiões regulatórias do gene da eNOS. De qualquer forma, também não encontramos diferença significativa desse polimorfismo entre o grupo IAM e o grupo controle.

A análise dos resultados dos polimorfismos -455 G/A (fibr hae III) e -148 C/T (fibr hind) não evidenciaram diferenças significantes em relação aos dois grupos estudados; entretanto, a concentração plasmática de fibrinogênio foi maior no grupo IAM. Alguns estudos correlacionaram o polimorfismo -455 G/A (fibr hae) e -148 C/T (fibr hind) com o nível plasmático de fibrinogênio, porém é controversa a associação destes polimorfismos com a DAC<sup>(200,201)</sup>. Recente meta-análise mostrou associação positiva entre a frequência do polimorfismo -455 G/A (fibr hae) e IAM<sup>(202)</sup>. No



estudo ECTIM, por outro lado, nenhuma associação entre eles foi encontrada<sup>(88)</sup>. A significância da mutação -148 C/T na determinação do risco cardiovascular também permanece não esclarecida. A presença do alelo T tem sido associada com a magnitude das lesões ateroscleróticas na angiografia de pacientes após IAM. Por outro lado, um grande estudo na Dinamarca falhou em demonstrar associação entre esse genótipo do promotor do beta-fibrinogênio e risco de coronariopatia, o mesmo ocorrendo com o estudo ECTIM, e mais recentemente com o grupo Leiden<sup>(83,88,203)</sup>.

As comparações entre as variáveis numéricas e os genótipos do polimorfismo -455 G/A (fibr hae) mostraram valores mais altos de triglicérides (211 mg/dl vs 170,9 mg/dl) nos pacientes do grupo IAM com os genótipos GA + AA. Estes resultados foram também reproduzidos por IZAR et al em 2003, que mostraram associação entre o alelo A e o aumento de triglicérides<sup>(204)</sup>. Kain et al em 2002, não encontraram diferenças entre a associação de fatores de risco convencionais e níveis de fibrinogênio, exceto para triglicérides, com associação positiva em indivíduos brancos, e negativa em asiáticos<sup>(205)</sup>.

Existem relatos de associação entre fibrinogênio e tabagismo. Em nossa casuística, os pacientes tabagistas do grupo IAM apresentaram valores mais altos de fibrinogênio do que os não tabagistas. Houve, além disso, associação significativa entre os genótipos do polimorfismo -148 C/T (fibr hind) e os genótipos do -455 G/A (fibr hae), em ambos os grupos. Esse resultado é corroborado pelos estudos de "*linkage disequilibrium*", que demonstraram existir *linkage* para os cinco polimorfismos do fibrinogênio nos

três genes codificantes dos três pares de cadeias polipeptídicas (alfa, beta, gama). Vários artigos confirmaram que o polimorfismo –148 C/T encontra-se em completa ligação com o –455 G/A. A associação neste estudo do genótipo do –148 C/T (CC) e do genótipo do –455 G/A (GG), tanto no grupo IAM como no controle, pode significar que esta associação não tenha relação direta com o IAM, mas talvez possa estar vinculada a outras condições ou fatores de risco<sup>(206)</sup>.

A aparente falta de correlação desses polimorfismos (–455 G/A e –148 C/T) com os valores plasmáticos aumentados de fibrinogênio pode ser explicada pelo fato de que tais polimorfismos não tenham atuação direta, sendo meramente marcadores funcionais. Estima-se que somente 50% da variação dos valores de fibrinogênio sejam decorrentes de polimorfismos genéticos, enquanto 25% da variação individual do nível de fibrinogênio são atribuíveis aos fatores de risco clássicos da DAC<sup>(169)</sup>. Desde que a síntese da proteína do beta-fibrinogênio nos hepatócitos parece ser a etapa limitante na produção, mesmo pequenas mudanças na taxa de transcrição do beta-gene e, portanto, na velocidade de síntese da beta proteína, provavelmente afetaria os valores plasmáticos de fibrinogênio. Outra possibilidade é que hormônios, ou outros fatores gênero específicos, modulem o aumento do fibrinogênio decorrente do genótipo, por estímulo da síntese hepática, ou por diminuição de sua depuração. Encontra-se hoje bem estabelecida a forte associação do tabagismo com a concentração plasmática de fibrinogênio, associação esta maior que a encontrada para qualquer um dos polimorfismos<sup>(151)</sup>.

Uma das explicações possíveis para o aumento do fibrinogênio observado em nosso estudo, sem alterações genóticas polimórficas, seria o fato de que o gene do fibrinogênio se situa próximo à seqüência da interleucina-6. O tabagismo induziria uma injúria inflamatória com aumento da interleucina-6, que por sua vez aumentaria a transcrição do fibrinogênio. Sendo assim, o fibrinogênio apenas refletiria a inflamação que ocorre na aterosclerose ao invés de ser um fator causal. Neste modelo, a concentração plasmática de fibrinogênio seria resultante da interação entre variação genética, fatores demográficos e fatores ambientais, como o hábito de fumar.

Os resultados deste estudo mostraram concentrações plasmáticas de PAI-1 elevadas no grupo IAM, sem correlação com o polimorfismo do PAI-1, 4G/5G, que não mostrou distribuição genotípicas diferentes entre os dois grupos. O padrão 4G (deleção) relacionou-se à maior atividade de transcrição (PAI-1 RNAm) quando comparado ao padrão 5G (inserção), indicando nível plasmático da proteína PAI-1 e de sua atividade mais elevados em indivíduos homozigotos para o alelo 4G (deleção), quando comparados a indivíduos homozigotos para o alelo 5G (inserção). Outros estudos não confirmaram esta associação, sugerindo que esse polimorfismo não seja de importância funcional na regulação do gene do PAI-1 <sup>(207)</sup>.

A associação do polimorfismo 4G/5G com doença coronária também é controversa. Meta-análise envolvendo a maioria dos estudos nessa área favorece uma relação fraca, porém significativa, entre o genótipo do PAI-1 e IAM <sup>(208)</sup>. Os estudos com associação mais forte vincularam esse

polimorfismo com o IAM em jovens, com coronariopatas tabagistas e com os portadores de DAC de alto risco<sup>(209)</sup>. Em nosso estudo, duas dessas condições estiveram presentes: IAM em jovens e tabagismo. Entretanto, a maioria dos pacientes apresentava lesões uniarteriais (46,4%) e não haviam lesões de tronco. Nosso estudo, portanto, não contribuiu para elucidação dessa controvérsia.

## 5.6 Dosagem de nitrato

As dosagens de nitrato nos grupos IAM e controle revelaram os resultados mais intrigantes e surpreendentes desta pesquisa. Esperava-se que a redução da vasodilatação evidenciada no grupo IAM estivesse linearmente associada com menores valores de nitrato, como ocorreu no grupo controle. À primeira vista parece lógico que, à medida que não encontramos diferenças entre os polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial, refletindo provavelmente expressão e atividade normal desta enzima, a produção basal de óxido nítrico e, em última análise, a concentração de nitrato estivesse normal e não aumentada, em relação ao grupo controle. Além disso, como admitir produção aumentada de nitrato nos pacientes com IAM deste estudo, que exibiram um perfil amplo de fatores de risco sabidamente causadores de disfunção endotelial? As possíveis explicações para este resultado são:

1) *Outros fatores geradores.* É possível que os pacientes com IAM que exibem múltiplos fatores de risco apresentem uma atividade inflamatória aumentada. Um provável mecanismo pelo qual a inflamação piora a função endotelial é através das citocinas que induzem a expressão da iNOS na parede do vaso, com grande liberação de NO, geração do ânion superóxido e dano endotelial<sup>(210)</sup>. A ativação da iNOS está associada com uma produção  $10^2$  a  $10^3$  maior de NO que a da eNOS<sup>(211)</sup>. Um alto fluxo de óxido nítrico proveniente da iNOS pode favorecer a formação de peroxinitrito, um poderoso oxidante gerado pela reação do óxido nítrico com o ânion superóxido, e a produção de nitrotirosina, que está associada e presente na placa de ateroma<sup>(212)</sup>.

O estudo Xi-Lin Niui forneceu evidências que a influência da iNOS na progressão da aterosclerose é pequena, porém pode levar à instabilidade da placa, devido a acentuado decréscimo no conteúdo do colágeno extracelular, observado nas lesões induzidas pela iNOS<sup>(212)</sup>.

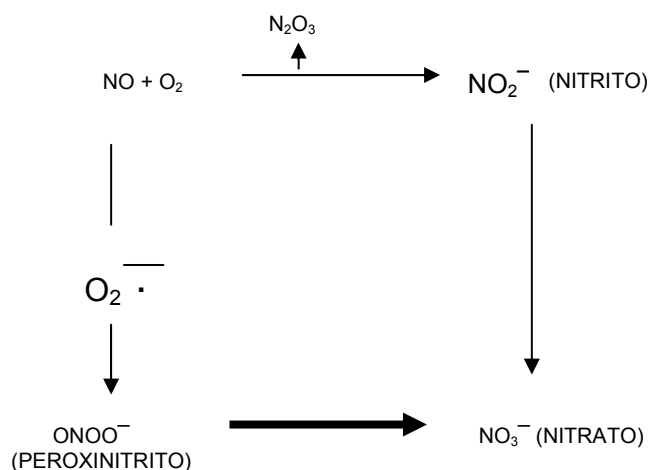
Outra fonte geradora de NO poderiam ser as plaquetas. Está provado que as plaquetas geram NO<sup>(213)</sup>. No grupo IAM é grande a participação de fatores de risco trombogênicos acarretando de forma circunstancial graus variáveis de ativação plaquetária.

As células mononucleares também produzem óxido nítrico por uma óxido nítrico sintase tipo eNOS-símile, sugerindo que alterações na expressão da eNOS possam induzir produção aumentada de NO por estas células<sup>(214)</sup>.

Uma outra possibilidade é a geração não enzimica de NO. Em pH fisiológico, o NO é oxidado espontaneamente a nitrito e nitrato de modo

irreversível. Em pH ácido, entretanto, pode ocorrer redução do nitrito, gerando NO por via não enzimática. Uma das condições em que esse processo pode ocorrer é em presença de isquemia celular, situação compatível com a da coleta de NO em nosso experimento<sup>(215)</sup>.

2) *Desacoplamento da óxido nítrico sintase*. Por questões ambientais ou genéticas ainda não esclarecidas pacientes com IAM podem ter deficiências ou perdas importantes de co-fatores essenciais para a síntese de óxido nítrico, como a tetrahydrobiopterina, BH4, acarretando um aumento da captação de elétrons pelo oxigênio e formação do radical superóxido. O próprio radical superóxido pode destruir o óxido nítrico formado, aumentando a concentração de seus metabólitos no plasma, principalmente o nitrato. As espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, podem ativar o sistema renina-angiotensina vascular, liberar fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, substâncias ligadas à quimiotaxia e moléculas de adesão. Recentes estudos demonstraram aumento da produção de superóxido no sangue em associação com disfunção endotelial e fatores de risco para DAC<sup>(216)</sup>. O radical superóxido pode propiciar a formação do peroxinitrito e, conforme a equação, pode gerar nitrato conforme a equação:



Além disso, a formação de peroxinitrito pode acarretar alterações sustentadas e tardias no programa genético, com modificações estruturais e funcionais do vaso e prejuízo de sua capacidade vasodilatadora. Finalmente, estudos de intervenção que utilizaram a vitamina C, demonstraram melhora da capacidade vasodilatadora em pacientes que apresentaram evento cardiovascular, sugerindo que o estresse oxidativo possa ser importante mecanismo gerador de disfunção endotelial<sup>(217)</sup>.

3) *Hiper-resposta compensatória à resposta vasodilatadora* deficiente observada no grupo IAM, causada por disfunção endotelial devida aos fatores de risco presentes, talvez possa estimular as células endoteliais remanescentes e íntegras a aumentarem a expressão gênica da óxido nítrico sintase endotelial, com conseqüente aumento do NO, como forma de compensar a resposta deficiente de um determinado número de células lesadas.

4) *Resposta celular deficiente à ação do NO*. É provável que falhas em receptores e ou defeitos de sinalização do NO, acarretem deficiência de responsividade dos tecidos, devido à falta de sensibilidade das células-alvo ao óxido nítrico, impedindo uma vasodilatação eficaz. Estudos recentes em voluntários sadios têm documentado que, mesmo em breves períodos, a exposição a endotoxinas ou outros produtos compromete o relaxamento endotélio dependente por alguns dias, fenômeno este chamado de “*stunning*” endotelial<sup>(218,219)</sup>.

5) A determinação de nitrato pode não refletir a produção de óxido nítrico.

## 5.7 Limitações

O número pequeno de pacientes pode ter influenciado a ausência de correlação entre polimorfismos genéticos e DAC. Diversos trabalhos com casuística pequena não mostraram correlação significativa entre polimorfismos genéticos e DAC, ao contrário de estudos que utilizaram o mesmo protocolo, porém envolvendo casuísticas maiores.

Outra limitação foi a grande diferença existente entre os grupos IAM e controle do ponto de vista clínico e de hábitos de vida, principalmente em relação ao exercício físico. O exercício físico promove aumento da expressão do gene da eNOS, que influencia positivamente a função endotelial, podendo ser fator determinante nos resultados<sup>(220)</sup>.

A presença de disfunção endotelial evidente pelo ultra-som de artéria braquial pode não refletir adequadamente a presença de disfunção endotelial coronária. Estudos como o de Herooka demonstraram divergência de efeitos da L-arginina sobre os leitos da artéria braquial e coronária, sugerindo que mecanismos diferentes contribuiriam para a disfunção endotelial<sup>(221)</sup>.

Não foi possível em nosso estudo avaliar a participação racial nos resultados. Pacientes da raça negra possuem um risco aumentado de desenvolver hipertensão e doença vascular quando comparados com pacientes brancos, e a própria disfunção endotelial pode ser o responsável por esse risco aumentado. Isto fica evidente quando consideramos que independente do sexo, jovens negros saudáveis apresentam redução



significante da capacidade vasodilatadora da artéria braquial comparada com a de jovens brancos saudáveis. Apesar dessas influências e a possível formação de viés, incluímos jovens negros em ambos os grupos, pois acreditamos que isto refletiria melhor o perfil miscigenado da população brasileira.

---

## **CONCLUSÕES**

---

Os resultados desse estudo permitem concluir que:

- 1) Pacientes jovens com IAM prévio, apresentaram disfunção endotelial avaliada pelo ultra-som da artéria braquial, sem correlação com os níveis de nitrato sanguíneo.
- 2) Dos fatores de risco presentes no grupo IAM, os únicos que se correlacionaram com disfunção endotelial foram tabagismo e elevação do PAI-1.
- 3) Fatores genéticos, avaliados pelos polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial, fibrinogênio e PAI-1, não se correlacionaram com disfunção endotelial.

---

## **REFERÊNCIAS**

---

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 1980;288(5789):373-6.
2. Plante GE. Vascular response to stress in health and disease. **Metabolism** 2002; 51(6 Suppl 1):25-30. Review.
3. Brovkovich V, Dobrucki LW, Brovkovich S, Dobrucki I, Do Nascimento CA, Burewicz A, Malinski T. Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. **J Physiol Pharmacol** 1999;50(4):575-86.
4. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. **J Biol Chem** 1998;273(40):25804-8.
5. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J** 2001;357(Pt 3):593-615. Review.
6. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is **Nitric Oxide Proc Natl Acad Sci U S A**. 1987;84(24):9265-9.
7. Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. **J Clin Invest** 1997;100(2):264-9.

8. Murabito JM, Evans JC, Larson MG, Levy D. Prognosis after the onset of coronary heart disease. An investigation of differences in outcome between the sexes according to initial coronary disease presentation. ***Circulation*** 1993; 88(6):2548-55.
9. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. ***Arterioscler Thromb*** 1994;14(5):753-9.
10. Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. ***Arterioscler Thromb*** 1994;14(5):746-52.
11. Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. ***Clin Chem*** 1998;44(8 Pt 2):1799-808. Review.
12. Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. ***J Am Coll Cardiol*** 1998;31(6):1217-25. Review.
13. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. ***J Vasc Res*** 1994;31(3):131-43. Review.
14. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. ***Am J Cardiol*** 2002;90(10C):40L-48L. Review.
15. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced ***Atherosclerosis N Engl J Med*** 1991;325(14):997-1001.

16. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. **Science** 1998; 282(5389):682-9.
17. Uterman G. Coronary heart disease: principles and practice of medical genetics. In: Emery AE, Rimoin DL. Methodology in medical genetics. 2<sup>nd</sup> ed. Bethesda: Churchill Livingstone; 1990.
18. Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJ. Molecular genetics and gene expression in **Atherosclerosis Int J Cardiol** 2001;80(2-3):161-72. Review.
19. Goldstein JL, Brown MS. The metabolic basis of inherited disease. 5th ed. New York: McGraw Hill; 1983. **Familial hypercholesterolaemia**; p.672-12.
20. Chien KR. **Molecular basis of cardiovascular disease**: a companion to Braunwald's heart disease. Philadelphia: WB Saunders; 1999.
21. Sing CF, Moll PP. Genetics of atherosclerosis. **Annu Rev Genet** 1990;24:171-87. Review.
22. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science** 1996;273(5281):1516-7.
23. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. **Atherosclerosis** 2000; 154(3):521-7. Review.
24. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **J Biol Chem** 1993;268(23):17478-88.

25. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000;97(6):2832-5.
26. Haydock S , Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation** 1999;100(14):1515-20.
27. Kugiyama K, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Yoshimura M, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. **Hum Genet** 1998;103(1):65-9.
28. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension** 1998;32(1):3-8.
29. Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Soubrier F, Cambien F. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. **Eur J Clin Invest** 1999;29(4):284-90.
30. Cai H, Wilcken DE, Wang XL. The Glu-298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. **J Mol Med** 1999;77(6):511-4.



- 
- 30a. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Mizuno Y, Harada E, Nakamura S, Ito T, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol* 2000;86(6):628-34.
31. Sim AS, Wang J, Wilcken D, Wang XL. MspI polymorphism in the promoter of the human endothelial constitutive NO synthase gene in Australian Caucasian population. *Mol Genet Metab* 1998;65(1):62.
32. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk* 2001;8(4):235-41.
33. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996;2(1):41-5.
34. Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N, Yokota M. Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol* 1998;81(1):83-6.
35. Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* 1999;116(4):880-6.

36. Sigusch HH, Surber R, Lehmann MH, Surber S, Weber J, Henke A, Reinhardt D, Hoffmann A, Figulla HR. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease. **Scand J Clin Lab Invest** 2000;60(3):229-35.
37. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. **Biochem Biophys Res Commun** 1998; 245(1):190-3.
38. Cooke JP, Oka RK. Atherogenesis and the arginine hypothesis. **Curr Atheroscler Rep** 2001;3(3):252-9. Review.
39. Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. **J Clin Invest** 1998;101(7):1530-7.
40. Fremont-Smith F. Arteriosclerosis in the young. **Am J Med Sci** 1908; 135:199-207.
41. Glendy RE, Levine AS, White PD. Coronary disease in youth. **JAMA** 1937; 109:1775.
42. French AJ, Dock W. Fatal coronary arteriosclerosis in young soldiers. **JAMA** 1944; 124:1233.
43. Enos WF Jr, Beyer JC, Holmes RH. Pathogenesis of coronary disease in American soldiers killed in Korea. **J Am Med Assoc** 1955;158:912-4.
44. McNamara JJ, Molot MA, Stremple JF, Cutting RT. Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. **JAMA**. 1971 May 17; 216(7):1185-7.

45. Welch CC, Proudfit WL, Sones FM Jr, Shirey EK, Sheldon WC, Razavi M. Cinecoronary arteriography in young men. **Circulation** 1970;42(4):647-52.
46. Kannel WB, Abbott RD. Incidence and prognosis of unrecognized myocardial infarction. An update on the Framingham study. **N Engl J Med** 1984;311(18):1144-7.
47. Zimmerman FH, Cameron A, Fisher LD, Ng G. Myocardial infarction in young adults: angiographic characterization, risk factors and prognosis (Coronary Artery Surgery Study Registry). **J Am Coll Cardiol** 1995;26(3):654-61.
48. DATASUS – Banco de dados. Disponível em <http://www.datasus.gov.br/cg1/tabeci.exe?sih/rvbr.def>. Acesso em 26 de julho de 2001.
49. Glover MU, Kuber MT, Warren SE, Vieweg WV. Myocardial infarction before age 36: risk factor and arteriographic analysis. **Am J Cardiol** 1982; 49(7):1600-3.
50. Dollar AL, Kragel AH, Fernicola DJ, Waclawiw MA, Roberts WC. Composition of atherosclerotic plaques in coronary arteries in women less than 40 years of age with fatal coronary artery disease and implications for plaque reversibility. **Am J Cardiol** 1991;67(15):1223-7.
51. Gertz SD, Malekzadeh S, Dollar AL, Kragel AH, Roberts WC. Composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in patients greater than or equal to 90 years of age. **Am J Cardiol** 1991;67(15):1228-33.
52. Chen L, Chester M, Kaski JC. Clinical factors and angiographic features associated with premature coronary artery disease. **Chest** 1995;108(2):364-9.

- 
53. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation** 1994;89(5):2462-78. Review.
54. Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Srinivasan SR, Webber LS, Dalferes ER Jr, Strong JP. 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(9):851-8.
55. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, Young JB, Nissen SE. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. **Circulation** 2001;103(22):2705-10.
56. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Erbel R, Nafe B, Brennecke R, Meyer J. Ten-year outcome after coronary angioplasty in patients with single-vessel coronary artery disease and comparison with the results of the Coronary Artery Surgery Study (CASS). **Am J Cardiol** 2000;85(3):321-6.
57. Burkarj F, Salsmann L. Angiographic findings in postinfarction patients under the age of 35. **Metabolism** 2002; 51(6 Suppl 1):56-60.
58. Keller KB, Lemberg L. Myocardial infarction in the young adult. **Heart Lung** 1991; 20(1):95-7.
59. Wenger NK, Bauer S. Coronary embolism: review of the literature and presentation of fifteen cases. **Am J Med** 1958 Oct;25(4):549-57.

- 
60. Conti RA, Solimene MC, da Luz PL, Benjo AM, Lemos Neto PA, Ramires JA. Comparação entre homens e mulheres jovens com infarto agudo do miocárdio. **Arq Bras Cardiol** 2002;79(5):510-25.
61. Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Kohler E, Assmann G. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. **Clin Chem** 1990; 36(1):20-3.
62. Dolder MA, Oliver MF. Myocardial infarction in young men. Study of risk factors in nine countries. **Br Heart J** 1975;37(5):493-503.
63. Hoit BD, Gilpin EA, Henning H, Maisel AA, Dittrich H, Carlisle J, Ross J Jr. Myocardial infarction in young patients: an analysis by age subsets. **Circulation** 1986;74(4):712-21.
64. Morgan DML. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. In: Jones FE. **Method in molecular medicine**. (Serie Human Cell Culture Protocols, 1998; v.101:4).
65. Zweier JL, Wang P, Kuppusamy P. Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. **J Biol Chem** 1995;270(1):304-7.
66. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med** 1993; 329(27):2002-12. Review.
67. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. **Circulation** 1997;96(12):4219-25.

68. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. **Circulation** 1999;99(2):237-42.
69. Andreotti F, Burzotta F, Maseri A. Fibrinogen as a marker of inflammation: a clinical view. **Blood Coagul Fibrinolysis** 1999;10 Suppl 1:S3-4. Review.
70. Sykes TC, Fegan C, Mosquera D. Thrombophilia, polymorphisms, and vascular disease. **Mol Pathol** 2000;53(6):300-6. Review.
71. Stone MC, Thorp JM. Plasma fibrinogen--a major coronary risk factor. **J R Coll Gen Pract** 1985;35(281):565-9.
72. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. **Lancet** 1986; 2(8506):533-7.
73. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtzen K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. **N Engl J Med** 1984; 311(8):501-5.
74. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. **JAMA** 1987; 258(9):1183-6.
75. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Circulation** 1997;96(4):1102-8.

76. Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. **Arterioscler Thromb** 1994;14(1):54-9.
77. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. **JAMA** 1998;279(18):1477-82.
78. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2004;24(2):216-29.
79. Weng X, Cloutier G, Genest J Jr. Contribution of the -455G/A polymorphism at the beta-fibrinogen gene to erythrocyte aggregation in patients with coronary artery disease. **Thromb Haemost** 1999;82(5):1406-11.
80. DeLoughery TG. Coagulation abnormalities and cardiovascular disease. **Curr Opin Lipidol** 1999;10(5):443-8. Review.
81. SM, Peters RJ, de Maat MP, Zwinderman AH, van Der Wall EE, Reitsma PH, Jukema JW, Kastelein JJ. Interaction between a genetic variant of the platelet fibrinogen receptor and fibrinogen levels in determining the risk of cardiovascular events. **Am Heart J** 2004;147(1):181-6.
82. Liu Y, Saha N, Heng CK, Hong S, Low PS. Fibrinogen genotypes (alpha and beta) are associated with plasma fibrinogen levels in Chinese. **J Med Genet** 2001; 38(9):E31.
83. Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455--> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. **J Clin Invest** 1997;99(12):3034-9.

- 
84. Lee AJ, Lowe GD, Woodward M, Tunstall-Pedoe H. Fibrinogen in relation to personal history of prevalent hypertension, diabetes, stroke, intermittent claudication, coronary heart disease, and family history: the Scottish Heart Health Study. **Br Heart J** 1993;69(4):338-42.
85. Coleman PL, Patel PD, Cwikel BJ, Rafferty UM, Sznycer-Laszuk R, Gelehrter TD. Characterization of the dexamethasone-induced inhibitor of plasminogen activator in HTC hepatoma cells. **J Biol Chem** 1986;261(9):4352-7.
86. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thromb Haemost** 1999; 82(2):259-70. Review.
87. Padro T, Steins M, Li CX, Mesters RM, Hammel D, Scheld HH, Kienast J. Comparative analysis of plasminogen activator inhibitor-1 expression in different types of atherosclerotic lesions in coronary arteries from human heart explants. **Cardiovasc Res** 1997;36(1):28-36.
88. Scarabin PY, Bara L, Ricard S, Poirier O, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Evans AE, Samama MM, Cambien F. Genetic variation at the beta-fibrinogen locus in relation to plasma fibrinogen concentrations and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. **Arterioscler Thromb** 1993;13(6):886-91.
89. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. **N Engl J Med** 1985;313(25):1557-63.
90. Rifon J, Paramo JA, Panizo C, Montes R, Rocha E. The increase of plasminogen activator inhibitor activity is associated with graft occlusion in patients undergoing aorto-coronary bypass surgery. **Br J Haematol** 1997;99(2):262-7.



91. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999;99(8):999-1004.
92. Bosma PJ, van den Berg EA, Kooistra T, Siemieniak DR, Slightom JL. Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1988;263(19):9129-41.
93. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268(15):10739-45.
94. Wu KK. Hemostatic tests in the prediction of atherothrombotic disease. *Int J Clin Lab Res* 1997;27(3):145-52. Review.
- 94a. Glueck CJ, Fontaine RN, Gupta A, Alasmi M. Myocardial infarction in a 35-year-old man with homocysteinemia, high plasminogen activator inhibitor activity, and resistance to activated protein C. *Metabolism* 1997;46(12):1470-2.
95. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101(16):1899-906.
96. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986 Oct 23;315(17):1046-51.
97. Celermajer DS. Testing endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32 Suppl 3:S29-32. Review.

98. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. **J Am Coll Cardiol** 2002;39(2):257-65.
99. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. **Br Heart J** 1995; 74(3):247-53.
100. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. **Atherosclerosis** 1997;129(1):111-8.
101. HYPERTENSION and coronary heart disease: classification and criteria for epidemiological studies. **World Health Organ Tech Rep Ser** 1959;58(168):1-28.
102. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol** 2004;82 Suppl 4:7-22.
103. Santos RD; Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol** 2001;77 Suppl 3:1-48.
104. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem** 1998;44(8 Pt 1):1748-50.

105. Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p.10-14.
106. Yoshioka KK, Cavalli AS, Salazar LA, Doi SQ, Hirata RDC, Hirata MH. Desenvolvimento de métodos para detecção direta do polimorfismo g894t do gene da eNOS. Congresso Latinoamericano de Bioquímica Clínica 15 e Congresso Brasileiro de Análises Clínicas da 28. **Anais SBAC** 2000; 33(12).
107. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. **Nitric Oxide** 2001;5(4):343-8.
108. Yoon S, Moon J, Shin C, Kim E, Jo SA, Jo I. Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. **Clin Chim Acta** 2002; 324(1-2):113-20.
109. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, Vecchione G, Celentano E, Cappucci G, Giordano M, Grilli M, Simone P, Fusilli S, et al. Raised plasma fibrinogen concentrations in subjects attending a metabolic ward--relation to family history and vascular risk factors. **Thromb Haemost** 1995;73(4):579-83.
110. Doggen CJ, Bertina RM, Cats VM, Reitsma PH, Rosendaal FR. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction. **Thromb Haemost** 1999;82(1):115-20.
111. Vieira S. **Introdução à bioestatística**. 3. ed. Rio de Janeiro: Campus; 1998.

- 
112. Siegel S, Castellan NJ. ***Nonparametric statistics***. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 1988.
  113. Armitage P, Berry G. ***Statistical methods in medical research***. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Blackwell Science; 1994.
  114. Zdichynec B. [Conclusions from a clinical study of myocardial infarction in young men under 40 years of age]. ***Vnitr Lek*** 1977;23(2):113-8.
  115. Walker WJ, Gregoratos G. Myocardial infarction in young men. ***Am J Cardiol*** 1967; 19(3):339-43.
  116. Uhl GS, Farrell PW. Myocardial infarction in young adults: risk factors and natural history. ***Am Heart J*** 1983;105(4):548-53.
  117. Bergstrand R, Vedin A, Wilhelmsson C, Wallin J, Wedel H, Wilhelmsen L. Myocardial infarction among men below age 40. ***Br Heart J*** 1978;40(7):783-8.
  118. Gohlke H, Gohlke-Barwolf C, Sturzenhofecker P, Gormandt L, Thilo A, Haakshorst W, Roskamm H. Myocardial infarction at young age: correlation of angiographic findings with risk factors and history in 619 patients (Abstract). ***Circulation*** 1980; 62(Suppl III):39.
  119. Nixon JV, Lewis HR, Smitherman TC, Shapiro W. Myocardial infarction in men in the third decade of life. ***Ann Intern Med*** 1976;85(6):759-60.
  120. Cheitlin MD, McAllister HA, de Castro CM. Myocardial infarction without atherosclerosis. ***JAMA*** 1975;231(9):951-9.
  121. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. ***N Engl J Med*** 1998; 338(23):1650-6.

122. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III27-32. Review.
123. Irvine N, Ward PR, Kenmure AC. The results of coronary arteriography in young men after myocardial infarction in north-east Scotland. *Scott Med J* 1985; 30(1):8-14.
124. Kennelly BM. Aetiology and risk factors in young patients with recent acute myocardial infarction. *S Afr Med J* 1982;61(14):503-7. Review.
125. Warren SE, Thompson SI, Vieweg WV. Historic and angiographic features of young adults surviving myocardial infarction. *Chest* 1979;75(6):667-70.
126. Fournier JA, Sanchez A, Quero J, Fernandez-Cortacero JA, Gonzalez-Barrero A. Myocardial infarction in men aged 40 years or less: a prospective clinical-angiographic study. *Clin Cardiol* 1996;19(8):631-6.
127. Wolfe MW, Vacek JL. Myocardial infarction in the young. Angiographic features and risk factor analysis of patients with myocardial infarction at or before the age of 35 years. *Chest* 1988;94(5):926-30.
128. Gohlke H, Sturzenhofecker P, Thilo A, Drost C, Gornand TL, Roskamm H. Coronary angiographic findings and risk factors in postinfarction patients under age of 40. *Metabolism* 1999; 51(Suppl 1):61-77.
129. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992;15(11):1509-16.
130. Davia JE, Hallal FJ, Cheitlin MD, Gregoratos G, McCarty R, Foote W. Coronary artery disease in young patients: arteriographic and clinical review of 40 cases aged 35 and under. *Am Heart J* 1974;87(6):689-96.

131. Falsetti HL, Schnatz JD, Greene DG, Bunnell IL. Lipid and carbohydrate studies in coronary artery disease. *Circulation* 1968;37(2):184-91.
132. Heinle RA, Levy RI, Frederickson DS, Gorlin R. Lipid and carbohydrate abnormalities in patients with angiographically documented coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1969;24(2):178-86.
133. Tzagournis M, Seidensticker JF, Hamwi GJ. Serum insulin, carbohydrate, and lipid abnormalities in patients with premature coronary heart disease. *Ann Intern Med* 1967;67(1):42-7.
134. Shekelle RB, Shryock AM, Paul O, Lepper M, Stamler J, Liu S, Raynor WJ Jr. Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric study. *N Engl J Med* 1981;304(2):65-70.
135. Akosah KO, Gower E, Groon L, Rooney BL, Schaper A. Mild hypercholesterolemia and premature heart disease: do the national criteria underestimate disease risk? *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(5):1178-84.
136. Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, et al: Apolipoprotein AI and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation*. *Circulation* 1996; 94:273-278.
137. Malmberg K, Bavenholm P, Hamsten A. Clinical and biochemical factors associated with prognosis after myocardial infarction at a young age. *J Am Coll Cardiol* 1994;24(3):592-9.
138. Hamsten A, Waldius G, Dahlen G, Johansson B, De Faire U. Serum lipoproteins and apolipoproteins in young male survivors of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 1986;59(2):223-35.

139. Benfante RJ, Reed DM, MacLean CJ, Yano K. Risk factors in middle age that predict early and late onset of coronary heart disease. *J Clin Epidemiol* 1989;42(2):95-104.
140. McKeigue PM, Ferrie JE, Pierpoint T, Marmot MG. Association of early-onset coronary heart disease in South Asian men with glucose intolerance and hyperinsulinemia. *Circulation* 1993;87(1):152-61.
141. Balleisen L, Assmann G, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de Loo J. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population--II. Baseline data on the relation to blood pressure, blood glucose, uric acid, and lipid fractions. *Thromb Haemost* 1985;54(3):721-3.
142. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C, Blomback M, Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2(8549):3-9.
143. Crutchley DJ, McPhee GV, Terris MF, Canossa-Terris MA. Levels of three hemostatic factors in relation to serum lipids. Monocyte procoagulant activity, tissue plasminogen activator, and type-1 plasminogen activator inhibitor. *Arteriosclerosis* 1989;9(6):934-9.
144. Kaukola S, Manninen V, Halonen PI. Serum lipids with special reference to HDL cholesterol and triglycerides in young male survivors of acute myocardial infarction. *Acta Med Scand* 1980;208(1-2):41-3.
145. Blacket RB, Leelarthapin B, Palmer AJ, Woodhill JM. Coronary heart disease in young men: a study of seventy patients with a critical review of etiological factors. *Aust N Z J Med* 1973;3(1):39-62.
146. Paramo JA, Colucci M, Collen D, van de Werf F. Plasminogen activator inhibitor in the blood of patients with coronary artery disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;291(6495):573-4.

147. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103(4):491-5.
148. Farouque HM, Meredith IT. The assessment of endothelial function in humans. *Coron Artery Dis* 2001;12(6):445-54. Review.
149. Folsom AR, Peacock JM, Nieto FJ, Rosamond WD, Eigenbrodt ML, Davis CE, Wu KK. Plasma fibrinogen and incident hypertension in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Hypertens* 1998;16(11):1579-83.
150. Voss R, Cullen P, Schulte H, Assmann G. Prediction of risk of coronary events in middle-aged men in the Prospective Cardiovascular Munster Study (PROCAM) using neural networks. *Int J Epidemiol* 2002;31(6):1253-62.
151. Humphries SE, Ye S, Talmud P, Bara L, Wilhelmsen L, Tiret L. European Atherosclerosis Research Study: genotype at the fibrinogen locus (G-455-A beta-gene) is associated with differences in plasma fibrinogen levels in young men and women from different regions in Europe. Evidence for gender-genotype-environment interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(1):96-104.
152. Teng JK, Lin LJ, Tsai LM, Kwan CM, Chen JH. Acute myocardial infarction in young and very old Chinese adults: clinical characteristics and therapeutic implications. *Int J Cardiol* 1994;44(1):29-36.
153. Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 2001; 7(10):1138-43.
154. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111(11):1448-54.



155. Branco LM, Patricio L, Pereira H, Abreu A, Pitta ML, Valerio L, Nunes H, Agapito AF, Goncalves JM, Antunes AM. Changes in coronary angiography in young patients with myocardial infarction. **Rev Port Cardiol** 1991;10(10):749-55.
156. Waters DD, Halphen C, Theroux P, David PR, Mizgala HF. Coronary artery disease in young women: clinical and angiographic features and correlation with risk factors. **Am J Cardiol** 1978;42(1):41-7.
157. Salem BI, Haikal M, Zambrano A, Bollis A, Gowda S. Acute myocardial infarction with "normal" coronary arteries: clinical and angiographic profiles, with ergonovine testing. **Tex Heart Inst J** 1985;12(1):1-7.
158. Wei JY, Bulkley BH. Myocardial infarction before age 36 years in women: predominance of apparent nonatherosclerotic events. **Am Heart J** 1982; 104(3):561-6.
159. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. **Circulation** 2000;101(8):841-3.
160. Theilmeyer G, Verhamme P, Dymarkowski S, Beck H, Bernar H, Lox M, Janssens S, Herregods MC, Verbeken E, Collen D, Plate K, Flameng W, Holvoet P. Hypercholesterolemia in minipigs impairs left ventricular response to stress: association with decreased coronary flow reserve and reduced capillary density. **Circulation** 2002;106(9):1140-6.
161. Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. **Circ Res** 1999;85(1):29-37.

162. Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T. The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem* 2001; 276(17):13750-5.
163. Blann AD, Dobrotova M, Kubisz P, McCollum CN. von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1995;74(2):626-30.
164. Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem* 2000;275(15):11278-83.
165. Lupattelli G, Marchesi S, Roscini AR, Siepi D, Gemelli F, Pirro M, Sinzinger H, Schillaci G, Mannarino E. Direct association between high-density lipoprotein cholesterol and endothelial function in hyperlipemia. *Am J Cardiol* 2002;90(6):648-50.
166. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(1):111-6.
167. Luft FC, Mervaala E, Muller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H. Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999;33(1 Pt 2):212-8. Review.

168. Souza HP, Liu X, Samouilov A, Kuppusamy P, Laurindo FR, Zweier JL. Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 2002;282(2):H466-74.
169. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. ***J Am Coll Cardiol*** 1994;24(6):1468-74.
170. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. ***Circulation*** 2001;104(16):1905-10.
171. Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M, Motoyama T, Kawano H, Inobe Y, Hirashima O, Sugiyama S. Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers. ***J Am Coll Cardiol*** 1996;28(5):1161-7.
172. Kiowski W, Linder L, Stoschitzky K, Pfisterer M, Burckhardt D, Burkart F, Buhler FR. Diminished vascular response to inhibition of endothelium-derived nitric oxide and enhanced vasoconstriction to exogenously administered endothelin-1 in clinically healthy smokers. ***Circulation*** 1994 Jul;90(1):27-34.
173. Nene S, Gelabert H, Moore W, Quinones-Baldrich W, Santibanez-Gallerani A, Ignarro L. Cigarette smoking increases endothelial-derived vasorelaxation in the rat carotid artery in a dose-dependent manner. ***J Surg Res*** 1997;71(2):101-6.
174. Sarkar R, Gelabert HA, Mohiuddin KR, Thakor DK, Santibanez-Gallerani AS. Effect of cigarette smoke on endothelial regeneration in vivo and nitric oxide levels. ***J Surg Res*** 1999;82(1):43-7.

- 
175. Jacobs MC, Lenders JW, Kapma JA, Smits P, Thien T. Effect of chronic smoking on endothelium-dependent vascular relaxation in humans. **Clin Sci** (Lond) 1993; 85(1):51-5.
176. Rangemark C, Wennmalm A. Endothelium-dependent and -independent vasodilation and reactive hyperemia in healthy smokers. **J Cardiovasc Pharmacol** 1992;20 Suppl 12:S198-201.
177. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1998;19(5):819-25.
178. Zhang S, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. **Atherosclerosis** 2001;154(2):277-83.
179. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **FEBS Lett** 2000;471(1):45-50.
180. Wright JL, Dai J, Zay K, Price K, Gilks CB, Churg A. Effects of cigarette smoke on nitric oxide synthase expression in the rat lung. **Lab Invest** 1999;79(8):975-83.
181. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. **Circulation** 2000;102(18):2165-8.
182. Newby DE, McLeod AL, Uren NG, Flint L, Ludlam CA, Webb DJ, Fox KA, Boon NA. Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis. **Circulation** 2001;103(15):1936-41.

183. Jambrik Z, Venneri L, Varga A, Rigo F, Borges A, Picano E. Peripheral vascular endothelial function testing for the diagnosis of coronary artery disease. *Am Heart J* 2004;148(4):684-9.
184. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101(9):948-54.
185. Zhang X, Zhao SP, Li XP, Gao M, Zhou QC. Endothelium-dependent and -independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000;149(1):19-24.
186. Sorensen KE, Kristensen IB, Celermajer DS. Atherosclerosis in the human brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1997;29(2):318-22.
187. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(5):1235-41.
188. Kinlay S, Ganz P. Relation between endothelial dysfunction and the acute coronary syndrome: implications for therapy. *Am J Cardiol* 2000;86(8B):10J-13J.
189. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101(16):1899-906.
190. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004; 109(11):1359-65.

191. Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, Cavallin M, Maiolino P, Pessina AC. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. **J Am Coll Cardiol** 2003;41(6):930-7.
192. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. **Heart** 2002; 87(6):525-8.
193. Leeson CP, Hingorani AD, Mullen MJ, Jeerooburkhan N, Kattenhorn M, Cole TJ, Muller DP, Lucas A, Humphries SE, Deanfield JE. Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function. **Circ Res** 2002;90(11):1153-8.
194. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Antoniadis C, Skoumas J, Brown M, Stefanadis C. Evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and inflammatory markers: the ATTICA study. **Am Heart J** 2004;148(4):733-8.
195. Yoshimura M, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Nakamura S, Ito T, Mizuno Y, Harada E, Yasue H, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K. A T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility. **Am J Cardiol** 2000;85(6):710-4.
196. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H,

- Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32(1):3-8.
197. Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(6):938-45.
198. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001; 11(8):719-25.
199. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DE. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3147-53.
200. van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A, Iliadou A, Eriksson P, Hamsten A. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(12):3063-70.
201. Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, Benedetta Donati M. Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. *Hypertension* 2001;38(5):1199-203. Review.
202. Yu Q, Safavi F, Roberts R, Marian AJ. A variant of beta fibrinogen is a genetic risk factor for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Investig Med* 1996; 44(4):154-9.
203. Blake GJ, Schmitz C, Lindpaintner K, Ridker PM. Mutation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene and the risk of future myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Eur Heart J* 2001;22(24):2262-6.

- 
204. Izar MC, Fonseca FA, Ihara SS, Kasinski N, Sang WH, Lopes IE, Pinto Ldo E, Relvas WG, Lourenco D, Tufik S, de Paola AA, Carvalho AC. Risk Factors, biochemical markers, and genetic polymorphisms in early coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol* 2003;80(4):379-95.
205. Kain K, Blaxill JM, Catto AJ, Grant PJ, Carter AM. Increased fibrinogen levels among South Asians versus Whites in the United Kingdom are not explained by common polymorphisms. *Am J Epidemiol* 2002;156(2):174-9.
206. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361(9360):865-72. Review.
207. Ter Bogt NC, Hoekstra T, Roest M, Van De Vijver LP, Verhoef P. The 4G-allele of the PAI-1 gene is not consistently associated with a higher prevalence of coronary stenosis. *J Thromb Haemost* 2004; 2(9):1668-70.
208. Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati MB. The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998;80(6):1029-30.
209. Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost* 1999;82(3):1121-6.
210. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 1):C1424-37. Review.



211. Nadaud S, Soubrier F. Molecular biology and molecular genetics of nitric oxide synthase genes. *Clin Exp Hypertens* 1996;18(2):113-43. Review.
212. Niu XL, Yang X, Hoshiai K, Tanaka K, Sawamura S, Koga Y, Nakazawa H. Inducible nitric oxide synthase deficiency does not affect the susceptibility of mice to atherosclerosis but increases collagen content in lesions. *Circulation* 2001; 103(8):1115-20.
213. Radomski MW, Moncada S. Biological role of nitric oxide in platelet function. Madrid: Edicomplet; 1991. ***Clinical reliance of nitric oxide in the cardiovascular system***. p.45-56.
214. Gimenez A, Arriero MM, Lopez-Blaya A, Gonzalez-Fernandez F, Garcia R, Fortes J, Millas I, Velasco S, Sanchez De Miguel L, Rico L, Farre J, Casado S, Lopez-Farre A. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in the vascular wall and in mononuclear cells from hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2001; 104(15):1822-30.
215. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* 1995 Aug;1(8):804-9.
216. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of *cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. *Circulation* 2001 Nov 27;104(22):2673-8.
217. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 97(4):363-8.

218. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? ***Circulation*** 1999;100(1):96-102. Review.
219. Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. ***Endotélio e doenças cardiovasculares***. São Paulo: Atheneu; 2003.
220. Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. ***Circulation*** 2001;103(23):2839-44.
221. Hirooka Y, Egashira K, Imaizumi T, Tagawa T, Kai H, Sugimachi M, Takeshita A. Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans. ***J Am Coll Cardiol*** 1994;24(4):948-55.