

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra  
Instituto Nacional de Medicina Legal

**Polimorfismos Genéticos e Doenças  
Cardiovasculares:  
Estudo Caso-Controllo de um Grupo de Indivíduos  
Vítimas de Enfarte Agudo do Miocárdio**

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências  
Forenses

Ana Isabel Pessoa Pinto Machado

**Coimbra  
2009**

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra  
Instituto Nacional de Medicina Legal

**Polimorfismos Genéticos e Doenças  
Cardiovasculares:  
Estudo Caso-Controllo de um Grupo de Indivíduos  
Vítimas de Enfarte Agudo do Miocárdio**

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências  
Forenses

Orientador: Prof. Doutor Francisco Corte Real

Ana Isabel Pessoa Pinto Machado

**Coimbra**  
**2009**

A dissertação aqui apresentada não teria sido possível sem o valioso contributo das entidades e individualidades seguidamente referidas e às quais se pretende agradecer:

Professor Doutor Francisco Corte Real, pela sua fulcral intervenção e orientação para a boa prossecução da investigação empreendida.

Professor Doutor António Brehm, pelas suas indicações num momento menos fácil do percurso do trabalho realizado.

Serviço de Anatomia Patológica da Delegação de Coimbra do Instituto Nacional de Medicina Legal, pela importante colaboração na análise histológica das amostras tratadas.

Às colegas Inês Crespo, Francisca Granja e Carla Fernandes, pela amizade e espírito de equipa.

Dra Alda Ambrósio, por proporcionar a realização deste investigação na Unidade de Genética Clínica e Molecular da Delegação de Coimbra do INML.

Um agradecimento especial à família, pelo apoio e incentivo sempre manifestados.

## **Resumo**

O Enfarte Agudo do Miocárdio é, em mais de 90% dos casos, uma manifestação clínica resultante de um processo aterosclerótico, que culmina, por processos embólicos ou trombóticos, na oclusão das artérias coronárias.

As doenças cardiovasculares, incluindo o EAM, são uma das principais causas de mortalidade em Portugal e a nível global; prevê-se que a sua incidência continue a aumentar até ao ano 2025, especialmente nos países em vias de desenvolvimento.

O controlo dos factores de risco (modificáveis) não se tem revelado totalmente eficaz na profilaxia do EAM, o que sugere que a predisposição genética pode ter um papel importante na sua etiologia.

No presente estudo, recorreu-se a variantes genéticas causais putativas do EAM (SNPs) e procedeu-se a um estudo de associação directa. Seleccionaram-se cinco polimorfismos, supostamente funcionais, em genes candidatos biologicamente relevantes para a etiopatogenia do EAM, a saber: os genes que codificam a COX-2, a eNOS, o VEGF, o RAGE e o NPY.

A COX-2 catalisa a conversão oxidativa do ácido araquidónico em prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub>. Estas moléculas possuem efeitos vasculares muito diversos, como angiogénese, vasodilatação ou vasoconstricção, indução da produção de metaloproteínases da matriz ou da agregação plaquetar. A sobre-expressão de COX-2 em placas de ateroma sintomáticas foi relacionada com a instabilidade das mesmas. O polimorfismo T8473C do gene da COX-2 parece influenciar a estabilidade e degradação do seu RNAm e, assim, os níveis de expressão da enzima.

A eNOS, em situações fisiológicas, converte L-arginina em Óxido Nítrico, um forte vasodilatador, anti-trombótico e anti-inflamatório. Na patologia aterosclerótica, a enzima produz sobretudo ião superóxido, que origina peroxinitrito por reacção com o Óxido Nítrico. Este produto promove a oxidação de LDL e de lípidos, aumenta a proliferação da íntima vascular, é trombogénico e pró-inflamatório. O polimorfismo G894T do gene da eNOS parece alterar a conformação da eNOS, aumentando a sua susceptibilidade à clivagem proteolítica, alterando assim a sua biodisponibilidade e a sua actividade.

O VEGF e actua como citocina pró-inflamatória, potenciando o crescimento das lesões ateromatosas e é angiogénico, por activação do crescimento endotelial. Os neovasos produzidos no local das lesões possuem paredes frágeis e sofrem frequentemente hemorragia; nesta altura, o VEGF exerce uma acção trombogénica. Estudos demonstram que níveis elevados de VEGF estão relacionados com risco acrescido de EAM. O polimorfismo 936CT do gene do VEGF parece ter influência nos níveis de transcrição e na actividade do VEGF, uma vez que cria um local de ligação para a proteína activadora 4 (AP-4).

O RAGE é o receptor dos produtos finais de glicosilação avançada. Da sua associação a estes produtos resulta quimiotaxia, acumulação e activação de células

inflamatórias, proliferação de células de músculo liso e consequente estenose vascular, trombose e acumulação de LDL oxidadas. O aumento dos níveis de RAGE em placas de ateroma está associado a um maior desenvolvimento destas. O polimorfismo T-374A demonstrou estar relacionado especificamente com o grau de estenose vascular, o que poderá dever-se ao facto de influenciar a ligação de uma série de factores de transcrição, alterando a transcrição da proteína.

O NPY é vasoconstritor, regula o metabolismo do colesterol, promove a activação plaquetária, a migração e activação de monócitos e é angiogénico. Pensa-se que níveis elevados de NPY estão associados a a progressão acelerada de aterosclerose, a níveis elevados de colesterol total e LDL e a isquémia do miocárdio. O polimorfismo T1128C no gene do NPY altera o péptido-sinal da proteína. Assim, este polimorfismo poderá alterar a expressão, o armazenamento e a cinética da libertação do NPY; de facto, parece influenciar as concentrações séricas de colesterol total e LDL e o grau de espessamento da íntima-média vascular.

No presente estudo, não se encontrou associação estatisticamente significativa entre qualquer das variantes estudadas e a susceptibilidade à ocorrência de EAM, quando estudadas isoladamente. Encontrou-se, isso sim, uma associação estatisticamente significativa entre a presença simultânea do alelo C do polimorfismo T8473C da COX-2 e do alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE e o risco de ocorrência de EAM. A homozigotia simultânea CC para o polimorfismo T8473C e TT para o polimorfismo T-374A esteve também significativamente associado a risco de ocorrência de EAM.

O alelo C do polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY não foi encontrado na amostra estudada, pelo que esta variante continua por identificar na população portuguesa.

# Índice de conteúdos

## **I. Introdução..... 1**

1.1 Enfarte Agudo do Miocárdio .....	1
1.1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.2 Factores de risco .....	2
1.2. Abordagem à Genética do Enfarte Agudo do Miocárdio.....	3
1.3. Etiopatogenia do Enfarte Agudo do Miocárdio .....	5
1.3.1 Fisiopatologia da Aterosclerose .....	5
1.3.2 Acção biológica de proteínas codificadas por genes candidatos no Enfarte Agudo do Miocárdio.....	9
1.3.2.1. Ciclooxigenase-2.....	9
1.3.2.2. Óxido Nítrico Síntase Endotelial.....	11
1.3.2.3. Factor de Crescimento Endotelial Vascular.....	15
1.3.2.4. Receptor dos Produtos Finais da Glicosilação Avançada.....	17
1.3.2.5. Neuropeptídio Y.....	20

## **II. Objectivo.....23**

## **III Material e Métodos:.....24**

3.1. Selecção e recolha de amostras.....	24
3.2. Extracção de DNA genómico.....	25
3.3 Quantificação do DNA.....	26
3.3.1 Avaliação do grau de pureza do DNA.....	26
3.4. Amplificação do DNA pela Reacção em Cadeia da Polimerase: PCR.....	27
3.4.1 Fundamentos da técnica de PCR.....	27
3.4.2. Condições de amplificação:.....	28
.....	30
3.5 Digestão dos fragmentos de DNA amplificados e visualização dos fragmentos digeridos.....	31
3.5.1 Fundamentos da técnica utilizada.....	31
3.5.2 Polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2:.....	32
3.5.3 Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS.....	32
3.5.4 Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF.....	32
3.5.5 Polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE.....	33
3.5.6 Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY.....	33

## **IV Resultados .....34**

4.1 Polimorfismo T8473C no gene que codifica a COX-2 .....	34
4.2. Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS.....	36
4.3 Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF.....	38
4.4 Polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE.....	40
4.5. Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY.....	42

<b>V. Tratamento estatístico dos resultados.....</b>	<b>44</b>
5.1. Polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2:.....	44
5.2. Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS:.....	45
5.3. Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF:.....	45
5.4. Polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE:.....	46
5.5. Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY:.....	47
5.6. Efeitos combinados dos polimorfismos tomados dois a dois.....	47
5.6.1. T8473C da COX-2 e G894T da eNOS.....	47
5.6.2. T8473C da COX-2 e C936T do VEGF.....	48
5.6.3. T8473C da COX-2 e T-374A do RAGE.....	49
5.6.4. G894T da eNOS e C936T do VEGF.....	50
5.6.5. G894T da eNOS e T-374A do RAGE.....	51
5.6.6. C936T do VEGF e T-374A do RAGE.....	52
<b>VI. Discussão.....</b>	<b>53</b>
6.1. Polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2.....	53
6.2. Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS.....	55
6.3. Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF.....	57
6.4. Polimorfismo T-374A no gene que codifica o RAGE.....	58
6.5. Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY.....	60
6.6. Efeitos combinados dos polimorfismos no EAM.....	61
<b>7. Limitações do Estudo.....</b>	<b>64</b>
<b>8. Conclusão.....</b>	<b>66</b>
<b>9. Bibliografia Consultada.....</b>	<b>67</b>

## Índice de figuras:

<b>Figura 1:</b> Fisiopatologia do Enfarte Agudo do Miocárdio.....	7
<b>Figura 2:</b> Actividade da COX-2.....	9
<b>Figura 3:</b> Produção de ON a partir de L-arginina e acções biológicas do ON.....	11
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de acção da eNOS na parede vascular aterosclerótica.....	13
<b>Figura 5:</b> Angiogénese na parede vascular e espessamento da íntima.....	15
<b>Figura 6:</b> Modelo simplificado das acções biológicas dos ligandos do RAGE.....	17
<b>Figura 7:</b> Acções biológicas do NPY durante a agressão e stress vascular e isquémia .....	21
<b>Figura 8:</b> Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo T8473C.....	34
<b>Figura 9:</b> Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para análise do polimorfismo T8473C.....	35
<b>Figura 10:</b> Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo G894T.....	36
<b>Figura 11:</b> Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para análise do polimorfismo G894T.....	37
<b>Figura 12:</b> Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo 936CT.....	38
<b>Figura 13:</b> Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para análise do polimorfismo -936 C/T.....	39
<b>Figura 14:</b> Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo T- 374A.....	40
<b>Figura 15:</b> Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para análise do polimorfismo T-374A.....	41
<b>Figura 16:</b> Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo T1128C.....	42
<b>Figura 17:</b> Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para análise do polimorfismo T1128C.....	43



## Índice de Tabelas:

<b>Tabela 1:</b> Distribuição genotípica para o polimorfismo T8473C no gene que codifica a COX-2, na amostra estudada.....	35
<b>Tabela 2:</b> Distribuição genotípica, para o polimorfismo G894T no gene que codifica a eNOS, na amostra estudada.....	37
<b>Tabela 3:</b> Distribuição genotípica, na amostra estudada, para o polimorfismo C936T no gene que codifica o VEGF.....	39
<b>Tabela 4:</b> Distribuição genotípica, na amostra estudada, para o polimorfismo T-374A no gene que codifica o RAGE.....	41
<b>Tabela 5:</b> Distribuição alélica, na amostra estudada, para o polimorfismo T1128C no gene que codifica o NPY.....	43



# I. Introdução

## 1.1 Enfarte Agudo do Miocárdio

O Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) é uma manifestação clínica resultante, quase sempre, de um processo patológico aterosclerótico, que culmina ou com a ruptura de placas de ateroma instáveis, que migram e embolizam as artérias coronárias, ou com a formação de trombos oclusivos nestas artérias. A oclusão impede a irrigação distal do miocárdio, de forma brusca e prolongada e, como consequência, produz-se isquémia e necrose do músculo cardíaco, que sofre distúrbios nas suas funções mecânica, bioquímica e eléctrica (Braunwald *et al*, 1997; Harrison *et al*, 2002).

O Enfarte Agudo do Miocárdio pode ter outras etiologias, como endocardite bacteriana, doença dos pequenos vasos, arterites coronárias, hipotensão ou hábitos narcóticos. Contudo, a quase totalidade dos casos é devida a patologia aterosclerótica (Braunwald *et al*, 1997).

### 1.1.1 Epidemiologia

As Doenças Cardiovasculares, incluindo o Enfarte Agudo do Miocárdio, são uma das principais causas de mortalidade em Portugal e a principal causa de mortalidade na generalidade dos países desenvolvidos, estando a sua incidência a aumentar nos países que mais recentemente adoptaram o estilo de vida ocidental (Gouveia *et al* 2004). Na Europa, há cerca de quatro milhões de mortes por Doenças Cardiovasculares por ano e a OMS estima que, mundialmente, este número seja de 16.6 milhões (Estatística AHA 2003).

O Enfarte Agudo do Miocárdio pode ser incapacitante tendo, por isso, custos sociais e económicos não negligenciáveis, quer directos, quer indirectos (Gíria *et al* 2004). No intuito de minimizá-los, têm vindo a ser adoptadas medidas preventivas, na tentativa de fazer com que este episódio coronário agudo, a ocorrer, surja em faixas etárias cada vez mais elevadas.

Durante os últimos anos, a taxa de mortalidade ajustada à idade por Enfarte Agudo do Miocárdio diminuiu, nos países ocidentais. Em Portugal, reduziu-se de 15 para 13% entre 1997 e 2001. No entanto, a incidência de Cardiopatia Isquémica tem aumentado de forma significativa, (Gíria *et al* 2004) o que significa que a diminuição da letalidade não se deveu ao sucesso de medidas profiláticas, mas sim ao aumento da

sobrevida, graças à evolução das medidas terapêuticas. Prevê-se que a incidência de Enfarte Agudo do Miocárdio continue a aumentar, a nível global, até cerca do ano 2025 (WHO, 2002).

Desta forma, torna-se essencial controlar os factores de risco conhecidos e conhecer novos factores, no intuito de criar novas medidas profiláticas e terapêuticas, mais eficazes e, idealmente, mais específicas para cada indivíduo.

### **1.1.2 Factores de risco**

São diversos os factores de risco para o Enfarte Agudo do Miocárdio e existe uma profunda relação e sinergia entre eles. Dividem-se, tradicionalmente, em modificáveis e não modificáveis. Os primeiros incluem níveis elevados de colesterol LDL e níveis reduzidos de colesterol HDL (Marques da Silva *et al*, 2002), tabagismo, hipertensão arterial, Diabetes Mellitus (Carneiro, 2004), obesidade, sedentarismo (Leal *et al* 2005) e factores psico-sociais (Vaz Serra, 2002; Dias *et al*, 2004). Estes factores são, pelo menos em parte, dependentes do estilo de vida. Os factores não modificáveis incluem idade, sexo.

O controlo dos factores de risco modificáveis tem-se revelado insuficiente na profilaxia do Enfarte Agudo do Miocárdio, o que sugere que a predisposição genética pode ter um papel importante (Navarro-Lopéz *et al*, 2002; Sturm, 2004).

De facto, estudos em gémeos homocigóticos demonstram que existe uma componente genética essencial no risco de doenças de etiologia aterosclerótica, (Marenberg *et al*, 1994) como é o caso da Cardiopatia Isquémica, que é a condição quase sempre subjacente à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio.

Da mesma forma, estudos em indivíduos não relacionados geneticamente confirmaram a existência de genes de susceptibilidade, ou seja: genes que aumentam o risco de os seus portadores virem a desenvolver uma determinada patologia. Este risco parece ser uma consequência directa das interacções dos efeitos destes genes de susceptibilidade com os diversos factores de risco ambientais (Casas *et al*, 2006). Serão estas interacções que, por diversos mecanismos dinâmicos, epigenéticos e reguladores interactuantes, levarão ao fenótipo da doença (Sing *et al* 2003; Sabatine *et al*, 2006).

## 1.2. Abordagem à Genética do Enfarte Agudo do Miocárdio

A Cardiopatia Isquémica é a condição mais comumente subjacente ao Enfarte Agudo do Miocárdio e é uma doença poligénica e multifactorial. Assim, não será um fenótipo atribuível a uma mutação ou polimorfismo num só gene: a propensão para esta patologia será, em vez disso, determinada por múltiplos polimorfismos em vários genes, cuja expressão será ainda influenciada por factores ambientais (Navarro-López *et al*, 2002; Sturm, 2004). A epidemiologia genética tem como objectivo identificá-los e quantificar o grau de associação entre estes polimorfismos e o risco da expressão fenotípica da doença.

Para uma análise deste tipo, recorre-se frequentemente a estudos de associação, que comparam a incidência de um marcador polimórfico, num grupo de indivíduos com fenótipo de uma doença, com a incidência desse marcador num grupo controlo, geneticamente não relacionado com os casos. Se é encontrada uma diferença estatisticamente significativa nas prevalências do alelo selvagem e da variante entre casos e controlos, considerar-se-á a existência de associação entre o gene analisado e a patologia. Para isto, seleccionam-se polimorfismos ou mutações, que se julguem serem funcionais, em genes biologicamente relevantes para a etiopatogenia da patologia em estudo. Esta é a chamada estratégia do gene candidato (Sabatine *et al*, 2006).

Um gene candidato, no caso da Cardiopatia Isquémica e do Enfarte Agudo do Miocárdio, poderá ser um gene que codifica uma proteína interveniente no metabolismo lipídico, no stress oxidativo, na função endotelial, inflamação, trombose ou outros mecanismos envolvidos na fisiopatologia do EAM. A actividade e/ou expressão desta proteína pode ser alterada por variantes genéticas funcionais que interfiram na extensão dos mecanismos fisiopatológicos em que a proteína está envolvida. Assim, estas variantes poderão aumentar ou diminuir, em maior ou menor grau, a susceptibilidade individual à patologia em causa (Sing *et al*, 2003; Casas *et al*, 2006).

A maioria das variantes genéticas ocorre geralmente sob a forma de uma única alteração nucleotídica e, portanto, pontual, constituindo polimorfismos da sequência ancestral. Um polimorfismo é, assim, uma alteração da sequência de um gene normal ou “selvagem”. O alelo que constitui a forma alternativa poderá ter uma frequência relativamente elevada numa população. As formas mais comuns de variantes do genoma humano são constituídas por mutações pontuais designadas SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), tendo sido até à data, identificados cerca de 10 milhões de polimorfismos deste tipo (Sabatine *et al.*, 2006).

Na população humana, a construção um mapa de SNPs, em genes candidatos tem sido essencial para esclarecer o papel das variantes genéticas comuns em doenças comuns, como a Cardiopatia Isquémica de etiologia aterosclerótica. A genética das doenças cardiovasculares tem, assim, permitido a identificação de indivíduos com um risco acrescido de desenvolver este tipo de patologias, mesmo quando elas não se manifestam clinicamente.

O objectivo da avaliação genética da susceptibilidade a Enfarte Agudo do Miocárdio será o de criar uma estratégia para a detecção e prevenção precoces da doença, bem como a criação de uma terapêutica adaptada ao indivíduo (Sturm, 2004). No caso da Cardiopatia Isquémica de etiologia aterosclerótica, a importância dos estudos genéticos é acrescida, já que mais de 50% dos indivíduos cuja causa de morte é o Enfarte Agudo do Miocárdio não tem sintomas *ante-mortem*, (Harrison *et al*, 2002) sendo essencial a identificação precoce de indivíduos de risco.

### **1.3. Etiopatogenia do Enfarte Agudo do Miocárdio**

#### **1.3.1 Fisiopatologia da Aterosclerose**

Embora tenham sido propostas várias teorias ou hipóteses para a aterogénese, nenhuma consegue explicar globalmente a fisiopatologia deste processo, uma vez que estão envolvidas múltiplas vias e factores de risco. Contudo, é comumente aceite que a aterosclerose é uma manifestação específica de um processo inflamatório crónico, que resulta de interacções de lipoproteínas plasmáticas, componentes celulares (monócitos/macrófagos, linfócitos T, células de músculo liso e células endoteliais) e matriz extracelular, na parede arterial (Braunwald et al, 1997; Ehara et al, 2000).

A aterosclerose faz parte do processo natural de senescência dos vasos, e desenvolve-se, em geral, lenta e insidiosamente. Contudo, se ocorre uma agressão vascular continuada ou intensa, ou o organismo produz uma resposta excessiva à agressão endotelial, perpetua-se uma reacção em cascata, que poderá terminar nas diversas manifestações clínicas de etiologia aterosclerótica, como o Enfarte Agudo do Miocárdio (Harrison et al, 2002).

O processo da aterosclerose inicia-se na infância, com deposição de partículas lipoproteicas na íntima arterial intacta; estas partículas contribuem para a formação de estruturas denominadas estrias lipídicas. Estas estrias crescem, com a continuação da acumulação de lipoproteínas (essencialmente LDL pequenas e densas,  $\beta$ -VLDL e Lipoproteína a) e vão sofrendo alterações. Como têm um tempo de permanência longo na parede vascular e como aí não gozam da protecção anti-oxidante do plasma, estas moléculas tornam-se susceptíveis a modificação oxidativa e são, efectivamente, oxidadas (Ehara et al, 2000).

As lipoproteínas oxidadas agridem o endotélio e afectam a sua integridade, expondo a matriz extracelular da membrana basal da íntima arterial. Esta agressão activa uma resposta inflamatória: um conjunto de mecanismos de defesa com o objectivo de restaurar a integridade do endotélio. Neste contexto, as células endoteliais e as células de músculo liso vasculares são estimuladas pelas LDL oxidadas a sintetizar moléculas de adesão para linfócitos e monócitos. Simultaneamente, aumenta a permeabilidade vascular, permitindo o afluxo e fixação destes leucócitos no local da agressão endotelial. Aqui, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, cuja função é a ingestão das lipoproteínas oxidadas que se haviam acumulado no endotélio. Exercem esta função até se tornarem disfuncionais, transformando-se em células espumosas. A

formação destas células perpetua o recrutamento de monócitos e linfócitos T e instala-se um estado de inflamação vascular crónica.

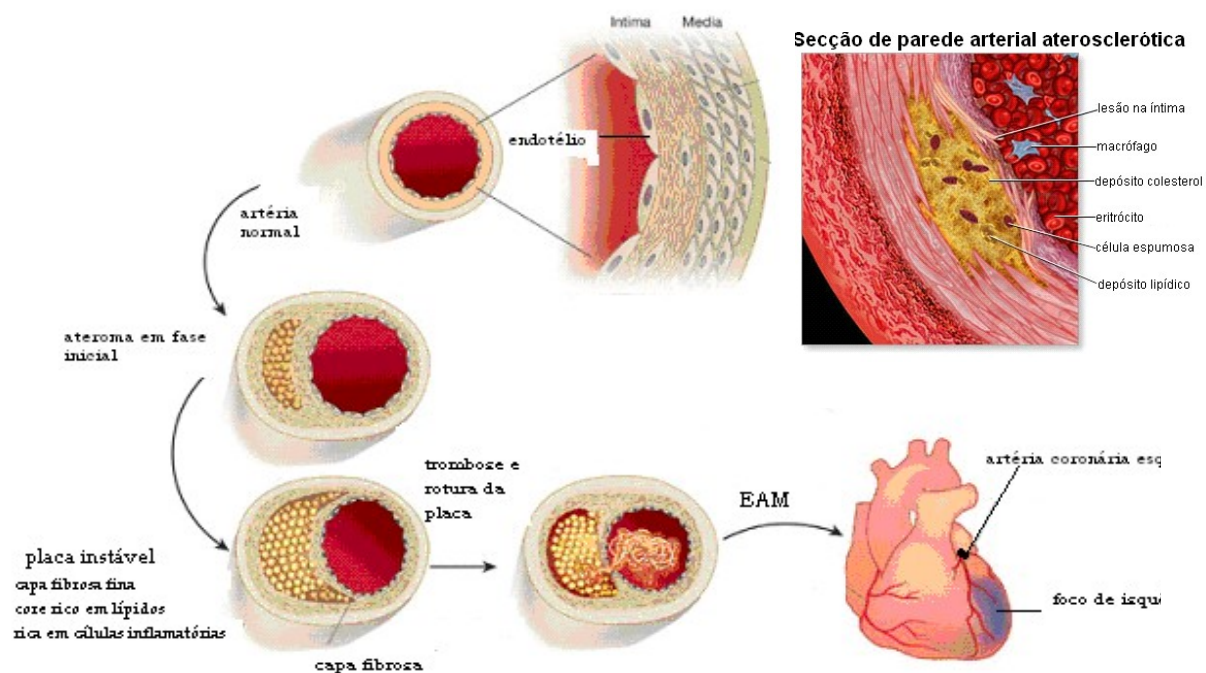
A lesão ateromatosa cresce, à medida que os monócitos e linfócitos continuam a penetrar na íntima, através de microvasos que vão sendo formados na periferia da placa e a formação e acumulação de células espumosas prossegue. Uma vez que o crescimento da placa de ateroma é centrífugo, as regiões mais centrais deixam, em determinado momento, de ser irrigadas, e formam um núcleo necrótico (Carvalho e Silva, 2000).

Os macrófagos e linfócitos T também expressam ou induzem a expressão de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimocinas, factores de crescimento e diversas outras moléculas bioactivas. Estas podem estimular a multiplicação de células de músculo liso, produzindo-se matriz extracelular. A matriz forma uma capa fibrosa sob o endotélio, que irá envolver o núcleo lipídico da placa de ateroma, formado pelas células espumosas, aprisionando-as (Moreno *et al*, 1994; Harrison *et al*, 2002).

A capa fibrosa é dinâmica e a sua constituição e estabilidade variam de acordo com os mediadores inflamatórios que vão sendo expressos durante a aterogénese. Diferentes citocinas podem inibir ou induzir a proliferação de matriz extracelular. Se inibirem, a capa fibrosa torna-se menos celular, mais rica em lípidos e, assim, menos estável. Da mesma forma, as metaloproteinases da matriz, sintetizadas pelos macrófagos, degradam as proteínas estruturais da capa fibrosa, destabilizando-a (Moreno *et al*, 1994; Harrison *et al*, 2002).

Uma placa de ateroma instável torna-se susceptível a hemorragia e trombose. A hemorragia resulta da ruptura das frágeis paredes vasculares dos microvasos que irrigam a lesão aterosclerótica e é um factor crítico para o seu crescimento, por acumulação de membranas de eritrócitos, aumento do colesterol livre e excessiva infiltração com macrófagos (Moreno *et al*, 1994). Ao mesmo tempo, a hemorragia aumenta o risco de ruptura e, assim, de formação de trombos oclusivos. Se a capa fibrosa fissa e rompe, o seu conteúdo lipídico necrótico e trombogénico é posto em contacto com o sangue e é activada a cascata da coagulação, com acumulação e agregação plaquetares. Este mecanismo, associado a vasoconstrição, resulta numa redução significativa do fluxo sanguíneo, nomeadamente o coronário, e constitui o principal mecanismo pelo qual ocorre Enfarte Agudo do Miocárdio (Braunwald *et al*, 1997; Harrison *et al*, 2002). (Figura 1)





**Fig 1: Fisiopatologia do Enfarte Agudo do Miocárdio. (Adaptado de Braunwald *et al*, 1997):** A placa de ateroma forma-se por deposição de lipoproteínas oxidadas no endotélio vascular. Estas lipoproteínas activam uma resposta inflamatória, da qual resulta a proliferação de uma capa fibrosa a envolver o núcleo lipídico necrótico, entretanto fagocitado por macrófagos. A capa fibrosa pode instabilizar-se e romper, libertando o conteúdo trombogénico da placa e promovendo, assim, processos trombóticos ou embólicos.

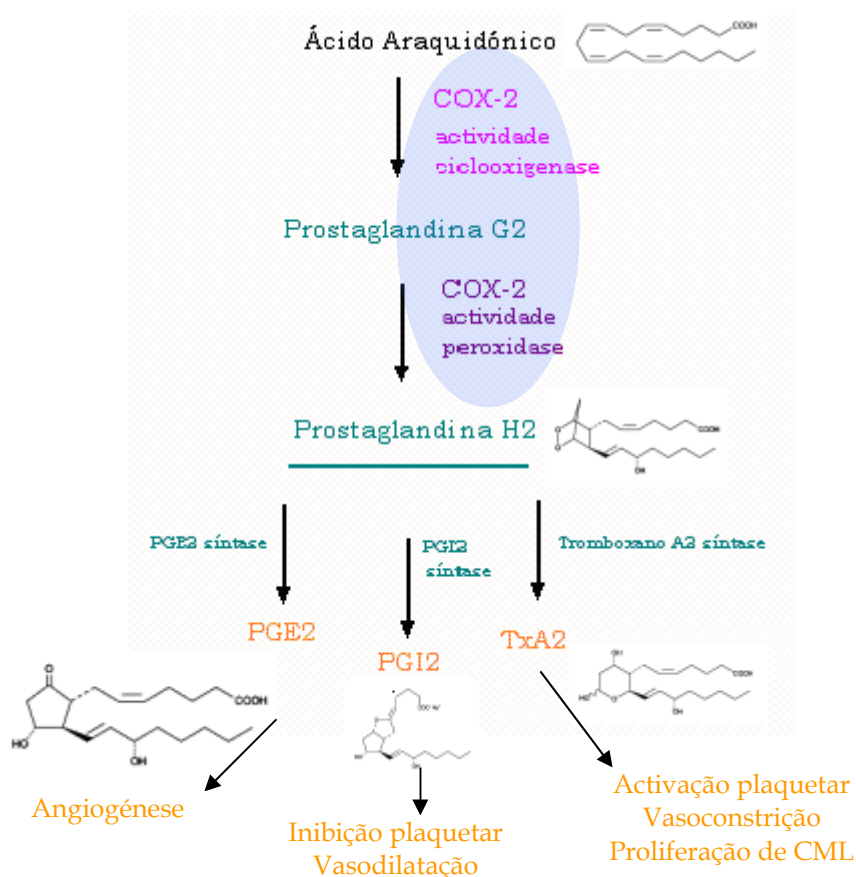
O processo fisiopatológico mais determinante no Enfarte Agudo do Miocárdio é, como foi anteriormente descrito, a ruptura de placas instáveis; o risco de ocorrência desta ruptura depende da taxa de influxo de LDL, dos níveis inflamatórios e da eficácia da reparação da capa fibrosa (Carvalho e Silva, 2000). Os factores que alteram estas taxas ou aqueles que influenciem a aterogénese em qualquer das suas fases poderão influenciar a formação e ruptura de placas instáveis e, assim, a ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio.

No presente trabalho, serão abordadas as implicações de polimorfismos em genes que codificam proteínas intervenientes nestes processos. São elas a Ciclooxygenase 2, a Óxido Nítrico Síntase Endotelial, o Factor de Crescimento Endotelial Vascular, o Receptor de Produtos Finais de Glicosilação Avançada e o Neuropeptídeo Y.

### 1.3.2 Acção biológica de proteínas codificadas por genes candidatos no Enfarte Agudo do Miocárdio

#### 1.3.2.1 Ciclooxygenase-2

A Ciclooxygenase-2 (COX-2) é uma enzima induzida por citocinas pró-inflamatórias e produzida por monócitos em tecidos vasculares activados e proliferativos, como microvasos angiogénicos e lesões ateroscleróticas (Sano et al, 1992 *in* Simmons, 2004). Nestes tecidos, a COX-2 catalisa a conversão oxidativa do ácido araquidónico em prostaglandina G<sub>2</sub> e a peroxidação desta em prostaglandina H<sub>2</sub> (Smith & Lands, 1972). A prostaglandina H<sub>2</sub> é metabolizada por outras isomerases e oxi-redutases em vários prostanóides, como prostaglandina E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub> (Demasi *et al*, 2003). (Figura 2)



**Figura 2: Actividade da COX-2:** a enzima catalisa a oxidação do ácido araquidónico em prostaglandina G<sub>2</sub> e a peroxidação desta em prostaglandina H<sub>2</sub>. A prostaglandina H<sub>2</sub> é metabolizada em vários prostanóides, como prostaglandina E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>; estes exercem efeitos biológicos que interferem na aterogénese. (Adaptado de Simmons, 2004)

A expressão de COX-2 por estímulos inflamatórios induz a síntese de prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub> em plaquetas, monócitos e macrófagos humanos. (Fels *et al*, 1996 *in* Simmons, 2004) Estas células infiltram-se nas placas de ateroma, onde os prostanóides exercem as suas funções biológicas (Cipollone *et al*, 2001).

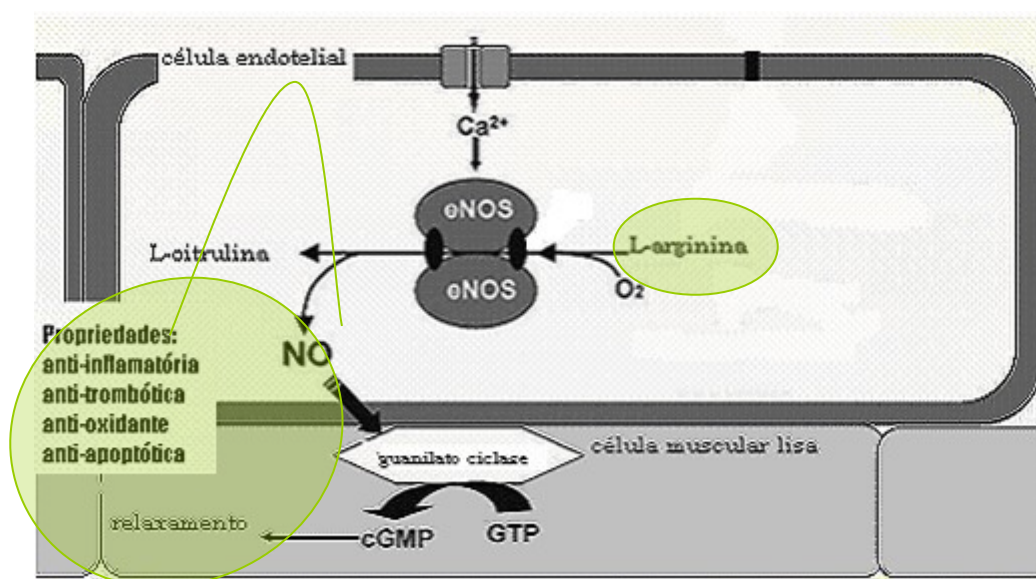
A Prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) é a principal prostaglandina produzida nas células vasculares, exercendo efeitos vasodilatadores e de aumento da permeabilidade da parede vascular, nomeadamente, a células inflamatórias. A sobre-expressão de COX-2, acoplada à prostaglandina E síntase, em placas de ateroma sintomáticas, demonstrou conduzir à instabilidade das placas de ateroma, por indução da produção de metaloproteinases da matriz pela PGE<sub>2</sub> (Cipollone *et al.*, 2001). A PGE<sub>2</sub> pode ainda induzir a vasoconstrição ou a vasodilatação, conforme o leito vascular, e induz a angiogénese, via sobre-regulação do VEGF (Ben Av *et al*, 1995 *in* Simmons *et al.*, 2004). O tromboxano A<sub>2</sub> promove essencialmente a agregação plaquetar, sendo também vasoconstritor (Davidge, 2003) e indutor da produção de citocinas pró-inflamatórias (Demasi *et al*, 2003).

Verificou-se que os níveis de expressão do mRNA da COX-2 são diferentes entre indivíduos, em resposta aos agentes ambientais. Esta variabilidade pode ser, pelo menos em parte, geneticamente determinada por diversos factores moleculares, como SNPs nas regiões funcionais do gene que codifica esta proteína, que podem alterar a expressão, a actividade da enzima ou o *turnover* dos seus substratos, (Malkovski *et al.*, 2001 *in* Lin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005) influenciando o potencial de susceptibilidade a doenças de etiologia inflamatória, como a Cardiopatia Isquémica.

O gene da COX-2 humana, localizado no cromossoma 1q25.2–q25.3, é constituído por cerca de 8.3 pares de kb e contém 10 exões e 9 intrões. O polimorfismo T8473C, localizado numa região funcional putativa no exão 10, na 3'UTR (untranslated region) do gene da COX-2, downstream em relação ao codão de finalização, (Fritsche *et al.*, 2001) foi implicado em diversas patologias associadas a elevada actividade inflamatória.

### 1.3.2.2 Óxido Nítrico Síntase Endotelial

A eNOS, ou Óxido Nítrico Síntase Endotelial, é uma enzima expressa em células do endotélio vascular e em cardiomiócitos, que intervêm na homeostase cardiovascular. É responsável pela conversão de L-arginina, um aminoácido semi-essencial, em Óxido Nítrico (e L-citrulina) (Markus *et al*, 1998). O Óxido Nítrico (ON) assim produzido activa a guanilato ciclase solúvel das células de músculo liso, aumentando o GMP e diminuindo as concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . O GMP actua como mensageiro secundário, mediando os efeitos biológicos do ON (Siasos *et al.*, 2006). (Figura 3)



**Figura 3: Produção de ON a partir de L-arginina e acções biológicas do ON:** a L-citrulina e o ON são os produtos da oxidação da L-arginina pela eNOS. O ON activa a guanilato ciclase das células de músculo liso, aumentando o GMP cíclico e diminuindo a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . O ON promove assim o relaxamento das células de músculo liso. Esta molécula exerce ainda acções anti-inflamatórias, anti-oxidantes, anti-trombóticas, anti-oxidantes e anti-apoptóticas. (Adaptado de Siasos *et al*, 2006)

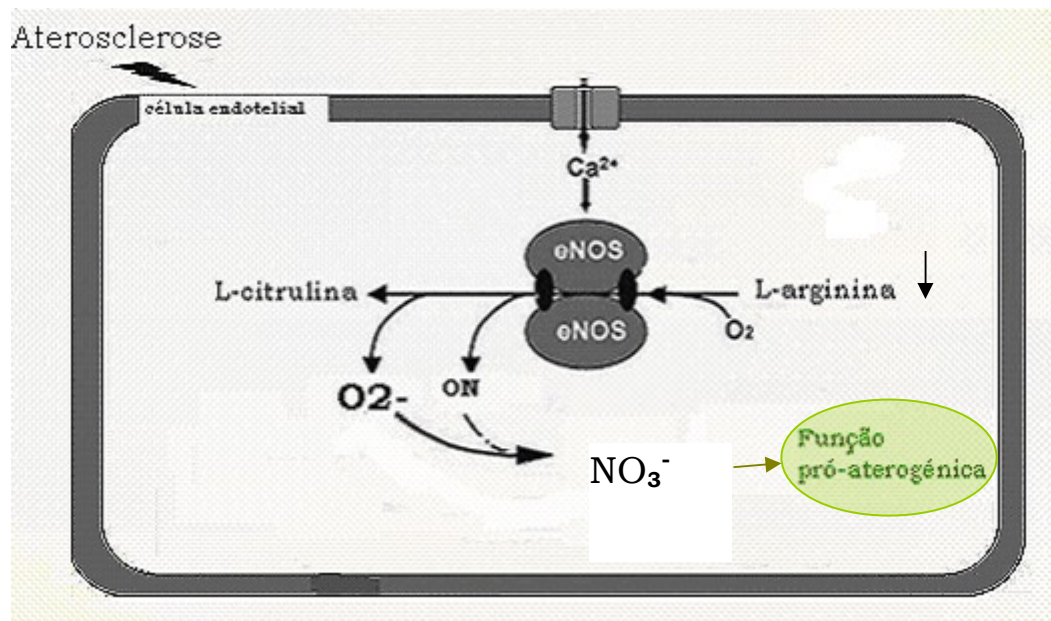
O Óxido Nítrico é um produto fundamental da homeostase das células endoteliais, uma vez que inibe vários passos chave da aterogénese (Kawashima *et al.*, 2004). É sintetizado nas células endoteliais de artérias saudáveis, mas observou-se que as suas concentrações nas artérias ateroscleróticas se encontram abaixo dos níveis fisiológicos (Oemar *et al*, 1998).

O Óxido Nítrico produzido pela eNOS nos cardiomiócitos é um forte vasodilatador, intervindo na regulação da perfusão miocárdica (Landmesser *et al.*, 2005). O Óxido

Nítrico tem propriedades anti-trombóticas, inibindo a agregação plaquetar e a síntese de factor tecidual. É anti-inflamatório, já que suprime a activação de quimocinas e citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão em monócitos (Kinley, 2001 *in* Ganz, 2003). O Óxido Nítrico tem ainda propriedades anti-oxidantes, que resultam na inibição da oxidação das LDL; tem acções anti-apoptóticas sobre as células endoteliais (Siasos *et al.*, 2006) e regula os níveis de homocisteína, cuja elevação é um importante factor de risco para a doença cardiovascular (Brown *et al.*, 2003). O Óxido Nítrico produzido pelas células endoteliais inibe a migração e proliferação de células de músculo liso e, assim, a formação de neoíntima e o crescimento da placa de ateroma (Sarkar *et al.*, 1996). Desta forma, o Óxido Nítrico sintetizado pela eNOS é um dos principais mediadores da função endotelial normal (Kawashima *et al.*, 2004).

Contudo, a actividade da enzima é alterada em situação de patologia aterosclerótica, na qual ocorre uma diminuição da biodisponibilidade de L-arginina. Desta forma, a expressão e/ou actividade da eNOS fica reduzida e diminui a produção Óxido Nítrico, com diminuição concomitante dos seus efeitos ateroprotectores (Oemar *et al.*, 1998).

Nestas condições, em vez de produzir apenas Óxido Nítrico, e eNOS passa a produzir também e sobretudo ião superóxido (Kawashima *et al.*, 2004). Os níveis de Óxido Nítrico diminuem e o Óxido Nítrico produzido reage com o ião superóxido formando-se peroxinitrito. (Figura 4) Este é citotóxico e pró-inflamatório. Promove a oxidação de LDL e de lípidos, induz a expressão de genes pró-inflamatórios, aumenta a proliferação de células de músculo liso, a adesão de monócitos e leucócitos no endotélio, aumenta a agregação plaquetar e a vasoconstrição e induz a apoptose (Seccia, 1996 *in* Siasos *et al.*, 2006).



**Figura 4: Mecanismo de acção da eNOS na parede vascular aterosclerótica.** Nestas condições, há menor biodisponibilidade de L-arginina, ficando reduzida a actividade da eNOS e, assim, a produção do Óxido Nítrico ateroprotector. A eNOS passa a produzir sobretudo ião superóxido, que reage com o Óxido Nítrico, formando peroxinitrito, uma molécula citotóxica e pró-inflamatória. (Adaptado de Siasos *et al*, 2006)

Pelas implicações que a eNOS possui nas vias fisiopatológicas da aterosclerose, alterações na actividade ou expressão da enzima poderão intervir na susceptibilidade a patologias de etiologia aterosclerótica, como o Enfarte Agudo do Miocárdio (Hingorani *et al.*, 1999).

Foram identificadas diversas variantes no gene da eNOS humana e vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm sugerido que algumas delas poderão alterar a expressão da enzima (Ichihara *et al.*, 1998; Casas, 2004). Assim, o gene da eNOS é um gene candidato na etiopatogenia do Enfarte Agudo do Miocárdio (Hingorani *et al.*, 1999; Erbs *et al.*, 2003; Spence *et al.*, 2004).

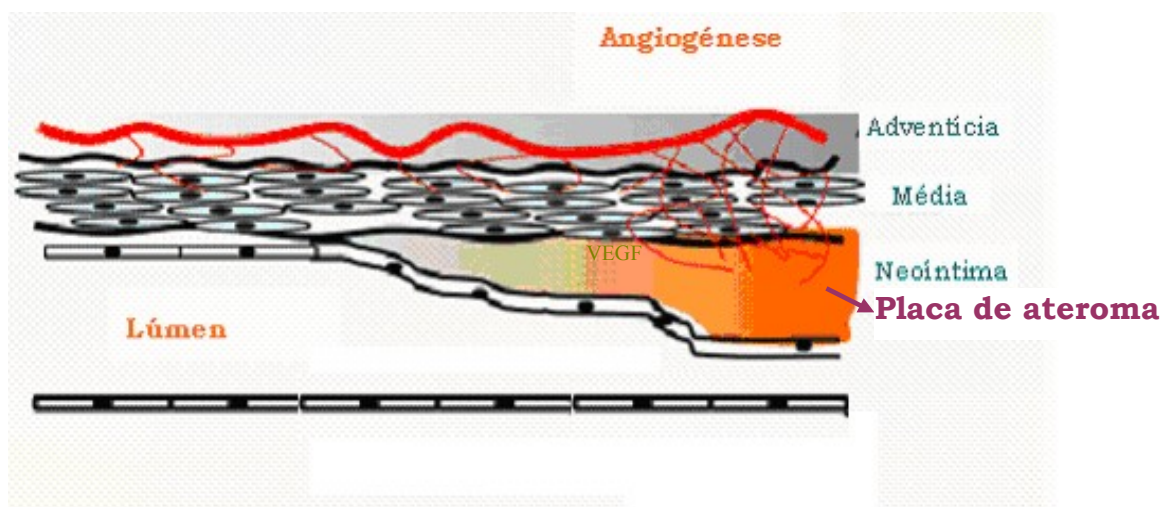
O gene que codifica a eNOS humana está localizado no cromossoma 7q35-7q36, tem 26 exões e estende-se por 22 kb do genoma. Até à data, foram descritos cerca de 10 polimorfismos no gene da eNOS, entre eles, o G894T.

O polimorfismo G894T localiza-se no exão 7 do gene da eNOS e provoca uma substituição aminoacídica conservativa de um glutamato por um resíduo de aspartato na posição 298 (Loscalzo *et al.*, 2003.) A guanina na posição 894 do codão codifica o aminoácido Glutamato na posição 298 e a enzima com o aminoácido Asparagina na mesma posição, é codificada pelo alelo 894T (Erbs *et al.*, 2003). Julga-se que esta alteração aminoacídica tem efeitos na actividade da proteína.

### 1.3.2.3 Factor de Crescimento Endotelial Vascular

O Factor de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é produzido em diversos tipos celulares, essencialmente em megacariócitos e plaquetas activadas. A expressão do seu RNAm é sobre-regulada por hipóxia ou isquémia do miocárdio, em modelos animais (Kimura *et al.*, 2005). O VEGF exerce os seus efeitos biológicos em células que expressam os seus receptores específicos: VEGFR1 e VEGFR2, como é o caso de células endoteliais, células de músculo liso, linfócitos T e macrófagos.

O VEGF actua enquanto citocina pró-inflamatória, aumentando a permeabilidade vascular, activando monócitos e estimulando a acumulação e infiltração de macrófagos nas lesões ateroscleróticas (Inoue *et al.*, 1998). Em placas ateroscleróticas desenvolvidas, o VEGF comporta-se como factor de crescimento angiogénico, promovendo a migração e proliferação de células endoteliais e a migração de células de músculo liso. Estas células organizam-se em capilares e a proliferação angiomatóide (com conseqüente aporte de oxigénio, nutrientes e de monócitos e linfócitos T) potencia o crescimento e a destabilização da lesão ateromatosa (Khurana *et al.*, 2005). (Figura 5)



**Figura 5: Angiogénese na parede vascular e espessamento da íntima:** pequenas arteríolas penetram nas tûnicas média e adventícia das artérias coronárias. Estes *vasa vasorum* irrigam a parede vascular das coronárias. O VEGF promove o crescimento destes pequenos vasos (por indução do crescimento de células endoteliais), favorecendo a criação de um meio inflamatório propício à formação de placas de ateroma (por promoção da permeabilidade vascular e da adesão de macrófagos). (Adaptado de Virmani *et al.*, 2005)

Estes neovasos, produzidos via VEGF, possuem paredes frágeis e são a fonte primária de hemorragia em locais de fragilidade microvascular. Quando a hemorragia

ocorre, o VEGF promove a trombogénese, por activação plaquetar e estimulação da expressão de factor tecidual e de factor de von Willebrand (Virmani *et al.*, 2005).

O VEGF promove ainda a produção de Óxido Nítrico, o qual fomenta, em meio aterosclerótico, a migração de células endoteliais e a angiogénese coronária. O VEGF estimula também a COX-2 a catalisar a formação de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Esta, actuando sinergicamente com o Óxido Nítrico, promove o aumento da permeabilidade vascular. Este efeito está relacionado com a acção vasodilatadora desta prostaglandina (He *et al.*, 1999).

Assim, o VEGF potencia uma série de fenómenos bioquímicos que conduzem à formação, crescimento e destabilização das placas de ateroma, bem como à trombogénese após fissuração e ruptura das lesões ateroscleróticas.

Desta forma, o VEGF é considerado um marcador da inflamação e a elevação dos seus níveis é frequentemente encontrada em doentes com um risco aumentado de episódios cardiovasculares tromboembólicos, nomeadamente de Enfarte Agudo do Miocárdio fatal e não fatal. De facto, verificaram-se níveis elevados de VEGF no sangue periférico de doentes com aterosclerose coronária e estes níveis estiveram positivamente relacionados com a extensão do dano do miocárdio. Da mesma forma, foram identificados níveis elevados de VEGF nas placas de ateroma, especialmente nas mais desenvolvidas. Assim, polimorfismos funcionais no gene do VEGF poderão alterar a susceptibilidade individual à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio (Heeschen *et al.*, 2003).

O gene que codifica o VEGF localiza-se no cromossoma 6p21.3. (Vincenti *et al.*, 1996) Foram identificados alguns polimorfismos na sua região promotora e nas 5'UTR e 3'UTR.

Nomeadamente, o polimorfismo C936T, que está localizado na 3'UTR e consiste na substituição de uma citosina por uma timina, na posição 936 desta região (Jacob *et al.*, 2006). Este polimorfismo parece ter influência nos níveis de transcrição e na actividade do VEGF (Renner *et al.*, 2000).

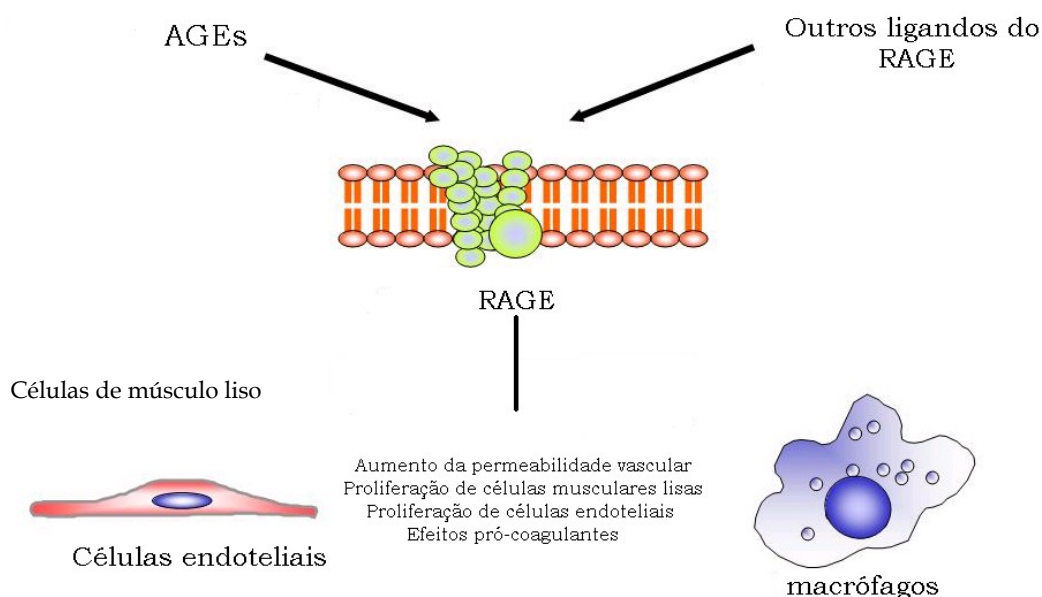


### 1.3.2.4 Receptor para os Produtos Finais de Glicosilação Avançada

O RAGE (Receptor para os Produtos Finais de Glicosilação Avançada) foi recentemente implicado na fisiopatologia geral da aterosclerose. É um receptor dos produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), de calgranulinas S100, péptido  $\beta$ -amilóide, fibrilhas de folha  $\beta$  e anfoterina (Kanauchi *et al.*, 2001; Yan, 2003; Chavakis *et al.*, 2004; Yamagishi *et al.*, 2006).

Os AGEs resultam de proteínas modificadas por glicosilação ou glicoxidação ou, também, de lípidos modificados por glicoxidação ou lipoxidação. A produção destas moléculas é estimulada por stress oxidativo nas placas de ateroma (Kilhovd *et al.*, 2005). As calgranulinas S100 encontram-se em locais de inflamação crónica, como as lesões ateroscleróticas. A anfoterina é uma proteína nuclear que, em meio extracelular, exerce actividades pró-inflamatórias durante a aterogénese (Chavakis *et al.*, 2004).

O RAGE parece não intervir directamente na aterosclerose, mas antes mediar e amplificar as acções pró-inflamatórias dos seus ligandos. (Figura 6)



**Figura 6: Modelo simplificado das acções biológicas dos ligandos do RAGE.** Estas acções são mediadas pelo RAGE e consistem em indução da migração de células de músculo liso, macrófagos e células endoteliais, bem como indução da expressão vascular de moléculas pró-inflamatórias e pró-trombóticas. (Adaptado de Gugliucci *et al.*, 2002)

Nos vasos ateroscleróticos, os ligandos do RAGE são transportados para a parede vascular por células inflamatórias. A acumulação destes ligandos nas placas de ateroma induz a expressão de RAGE (Yamagishi *et al.*, 2006). Os ligandos do RAGE associam-se, então, ao seu receptor. Desta associação resulta quimiotaxia, activação de monócitos e células T (que produzem moléculas de adesão e quimocinas, citocinas e factores de crescimento) e ainda depleção de Óxido Nítrico (Yan *et al.*, 2003; Kanauchi *et al.*, 2004). Nesta situação, ocorre ainda um aumento da permeabilidade vascular e produzem-se efeitos pró-coagulantes.

A acumulação de AGEs, que se verifica em situações de stress oxidativo, perpetua as condições oxidantes, promovendo a peroxidação lipídica e aumentando a acumulação de LDL oxidadas (Palinski *et al.*, 1995). Por outro lado, a acumulação de AGEs interfere com a integridade da matriz extracelular e da parede vascular, por entre-cruzamento de moléculas da matriz, como colagénio ou vitronectina (Chavakis *et al.*, 2004). Este processo é acompanhado de proliferação endotelial e conduz à estenose do vaso, ao endurecimento das artérias e ao desenvolvimento de aterosclerose prematura (Zhou *et al.*, 2003; Kihovd *et al.*, 2005).

As acções pró-ateroscleróticas do RAGE podem ainda ocorrer por interacção com outros mediadores da aterosclerose. De facto, o RAGE sobre-regula a expressão da COX-2 em macrófagos das placas ateroscleróticas, em modelos animais e em humanos, o que resulta na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Em particular, o RAGE demonstrou regular a produção de metaloproteínases da matriz dependente de PGE<sub>2</sub> (Cipollone *et al.*, 2003). Em casos de rápido desenvolvimento da aterosclerose (como é o caso da Diabetes Mellitus ou Hipercolesterolemia), o RAGE induz a expressão de factores vasoactivos e indutores do crescimento das placas de ateroma, como o VEGF. Este factor medeia, por sua vez, os efeitos angiogénicos dos ligandos do RAGE (Okamoto *et al.*, 2002).

O aumento dos níveis de RAGE em placas de ateroma está associada a um maior desenvolvimento destas lesões e o antagonismo farmacológico do RAGE é eficaz na prevenção e estabilização da disfunção vascular inflamatória (Yan *et al.*, 2003). Assim, o RAGE é considerado um mediador da disfunção vascular e da aterosclerose.

A expressão de RAGE pode ser regulada por variantes genéticas e um aumento dos seus níveis parece, por si só, amplificar os mecanismos pró-aterogénicos. De facto, polimorfismos no gene do RAGE demonstraram estar directamente envolvidos na

susceptibilidade à doença aterosclerótica e seus adventos, como Enfarte Agudo do Miocárdio (Zee *et al.*, 1995; Pettersson-Fernholm *et al.*, 2003; Falcone *et al.*, 2005).

O gene do RAGE está localizado no cromossoma 6p21.3, próximo do locus do HLA. Este gene é altamente polimórfico, tendo sido nele identificados cerca de 30 polimorfismos. O polimorfismo T-374A está próximo do local de início da transcrição, na região promotora do gene do RAGE, e parece ter efeitos funcionais. Trata-se de um SNP comum, caracterizado por uma substituição de glicina por serina no aminoácido na posição 82 (Pettersson-Fernholm *et al.*, 2003).

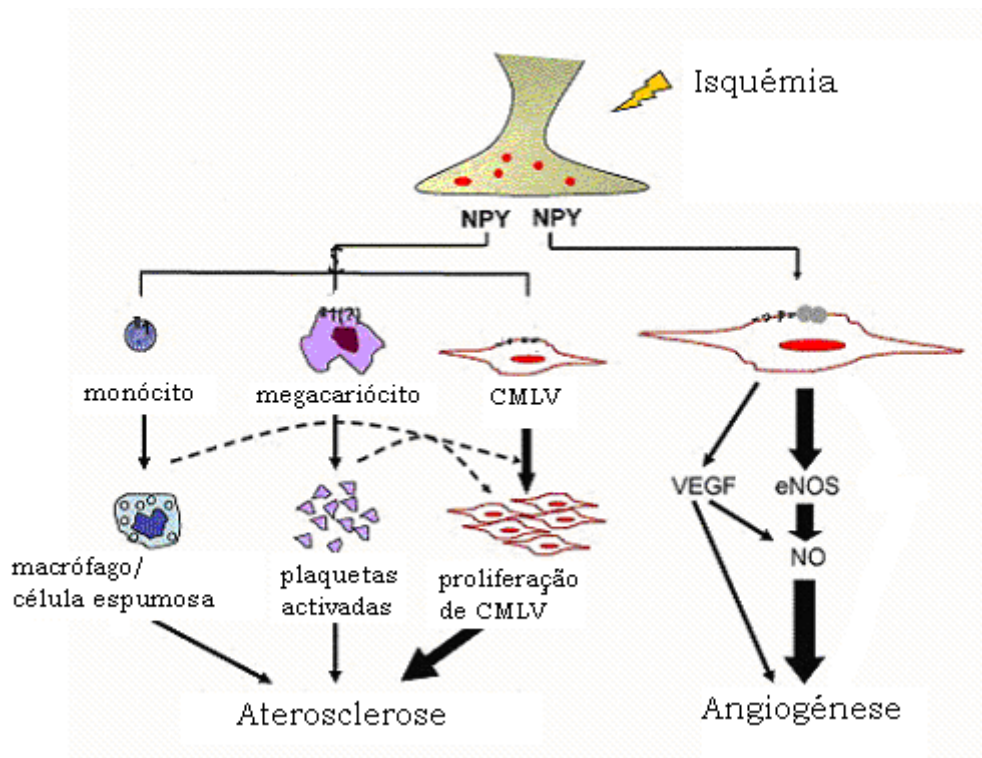
### 1.3.2.5 Neuropeptídeo Y

O Neuropeptídeo Y (NPY) é o peptídeo mais abundante no miocárdio e existe em grandes concentrações nas fibras nervosas simpáticas perivasculares. Funciona simultaneamente como uma hormona ubíqua (Zukowska *et al.*, 1998) e como um neurotransmissor simpático, com actividade pleiotrópica na homeostase cardiovascular (Zukowska *et al.*, 2003). É induzido por isquémia nas placas de ateroma.

O NPY é um poderoso vasoconstritor e pode provocar uma significativa redução do fluxo coronário, podendo ter um papel essencial na isquémia do miocárdio, em doentes com miocardiopatia isquémica (Gullestad *et al.*, 2000; Sobey *et al.*, 2003). A vasoconstricção mediada pelo NPY é prolongada no tempo; esta acção prolongada é devida ao facto de este peptídeo ser libertado durante fases de elevada estimulação simpática e/ou a uma difusão lenta na circulação sistémica, aliada a uma eliminação também lenta da circulação (Pernow *et al.*, 1987 *in* Gullestad *et al.*, 2000). Por estas razões, níveis elevados de NPY têm sido apontados como um factor de risco de mortalidade em casos de Enfarte Agudo do Miocárdio.

O Neuropeptídeo Y estimula a migração de monócitos e regula o metabolismo do colesterol, influenciando os níveis séricos de colesterol LDL e a deposição destas partículas na parede arterial. Contribui, assim, para a formação de células espumosas. Este neuropeptídeo promove também a activação de plaquetas e a migração e activação de monócitos, contribuindo assim para a aceleração da progressão do processo aterosclerótico (Kuo *et al.*, 2007).

O NPY possui ainda actividade angiogénica, mediando a actividade trófica dos nervos simpáticos sobre células de músculo liso e células endoteliais (que se diferenciam em microvasos) (Zukowska-Grojec, 1998). Esta actividade é amplificada pela interacção do NPY com outras vias angiogénicas, como a do VEGF e eNOS: o VEGF e o NPY estimulam a eNOS e, por conseguinte, a produção de Óxido Nítrico derivado do endotélio (Kuo *et al.*, 2007). (Figura 7) Este demonstrou, *in vitro*, ser um mediador da actividade angiogénica do NPY. Os efeitos angiogénicos do NPY promovem a neovascularização da íntima e a síntese de matriz extracelular. Como foi anteriormente referido, a neovascularização permite o crescimento da placa de ateroma e a proliferação da matriz diminui progressivamente o lúmen das artérias coronárias (Sobey *et al.*, 2003).



**Figura 7: Ações biológicas do NPY durante a agressão e stress vascular e isquemia:** a activação de receptores do NPY em células de músculo liso, megacariócitos e monócitos conduz à proliferação e activação celulares, fomentando o crescimento de placas de ateroma. A activação dos receptores do NPY em células de músculo liso vasculares resulta ainda em angiogénese, quer directamente, via activação da eNOS, quer indirectamente, via VEGF. (Adaptado de Kuo *et al.*, 2007).

Verificou-se que níveis elevados de NPY estão relacionados com miocardiopatia isquémica (Gullestad *et al.*, 2000). Desta forma, uma variante genética no gene que codifica o NPY que promova o aumento da expressão ou actividade deste neurotransmissor, poderá aumentar a susceptibilidade individual à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio.

O gene do NPY humano está localizado no cromossoma 7p15.1. A sequência de transcrição estende-se por cerca de 8 pares de kilobases. O gene é constituído por quatro exões, separados por três intrões. O polimorfismo T1128C no gene que codifica o NPY resulta de uma substituição de timina por citosina na posição 1128 do gene, que origina numa substituição de leucina por prolina na posição 7 (Leu7Pro) no péptido-sinal do NPY (Portolés *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2005). O péptido sinal conduz o precursor do NPY ao retículo endoplasmático, onde ele é clivado e transformado no NPY maduro. Assim, este polimorfismo poderá alterar o armazenamento do NPY, bem como a cinética da sua libertação (Kallio *et al.*, 2001).

## II. Objectivos

O Enfarte Agudo do Miocárdio, como a maioria das doenças cardiovasculares comuns, é uma doença multifactorial. Demonstrou-se que a susceptibilidade à ocorrência de EAM é influenciada por marcadores polimórficos em genes que codificam proteínas intervenientes na fisiopatologia da aterosclerose, que é o factor etiológico responsável pela grande maioria dos episódios isquémicos do músculo cardíaco.

Com recurso à estratégia do gene candidato, pretende-se investigar a possível associação entre polimorfismos em cinco genes que codificam proteínas intervenientes na fisiopatologia da aterosclerose e a susceptibilidade à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio, numa amostra da população portuguesa. Foram analisados os seguintes polimorfismos:

- T8473C, no gene que codifica a COX-2,
- G894T, no gene que codifica a eNOS,
- C936T, no gene que codifica o VEGF,
- T-374A, no gene que codifica o RAGE e
- T1128C, no gene que codifica o NPY.

## III Material e Métodos:

### 3.1. Selecção e recolha de amostras

O presente estudo baseou-se na análise de amostras de sangue colhido *post-mortem*, no decorrer de autópsias médico-legais efectuadas na Delegação do Centro e do Norte e nos Gabinetes Médico-Legais de Viseu, Aveiro, Figueira da Foz e Leiria, do Instituto Nacional de Medicina Legal, durante 2006 e 2007.

Juntamente com as amostras de sangue, foram colhidas amostras de miocárdio. A catalogação das amostras de sangue inicialmente colhidas, enquanto casos ou controlos, foi feita após confirmação histológica de focos de necrose nas amostras de músculo cardíaco. Esta análise histológica foi feita pelo Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do INML. Foram analisadas, na Unidade de Genética Clínica e Molecular da Delegação do Centro do INML, 80 amostras, das quais 40 pertenciam a indivíduos com necrose do miocárdio compatível com EAM, confirmada por análise histopatológica, que constituíram os casos; as restantes 40 amostras pertenceram a indivíduos que não mostravam qualquer sinal de alteração a este nível, nem sinais de doença aterosclerótica. Estes últimos foram considerados como controlos.

As amostras de sangue colhidas foram provenientes das cavidades cardíacas e foram obtidas, sempre que possível, num volume de cerca de 10 mL. O sangue foi recolhido em tubos de vácuo (vacutainer) com anticoagulante (EDTA K3E, 15%, 0,12mL) e processado com a maior brevidade possível.

A recolha de amostras foi realizada após consulta do Registo Nacional de Não Dadores de Órgãos (RENNDA).

### 3.2. Extração de DNA genómico

O DNA genómico foi obtido a partir de leucócitos, pelo método de Miller (Miller *et al.*: 1988) com algumas modificações. Este é um método “salting out” de proteínas, que tem a vantagem de ser simples, rápido, pouco oneroso, sem recurso a solventes agressivos. Possibilita, além disto, a obtenção quantidades consideráveis de DNA com um elevado grau de pureza (Miller *et al.*, 1988), que possibilitam a aplicação da técnica de PCR.

Os procedimentos de extração iniciaram-se com um processo de hemólise, por adição aos 10 mL de sangue, de 3 volumes de um tampão de lise de glóbulos vermelhos (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7.4). Após homogeneização cuidadosa, o tampão de lise actuou durante 15 minutos, a 4°C, após o que se procedeu à centrifugação das amostras a 2500 rpm, durante 15 minutos, a 4°C (Centrífuga Rotanta 460R, Hettich).

Ressuspendeu-se o pellet, enriquecido em leucócitos, em 20 mL de tampão de lise de eritrócitos, após o que se realizou uma segunda centrifugação, desta vez a 2800 rpm, durante 15 min, a 4°C.

Obteve-se um sedimento de leucócitos, ao qual se adicionaram 3 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (Tris-HCL, NaCl,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.4), 350µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% (Sigma-Aldrich) e 30µL de proteinase k, 20mg/mL (Roche).

Foi feita uma incubação durante a noite, num shaker a 42°C, com agitação suave, ao fim do qual se obteve o DNA isolado de histonas.

Após esta incubação, precipitaram-se as proteínas com 3 mL de uma solução saturada de NaCl 6M e centrifugou-se o preparado a 3750 rpm, durante 30 minutos, a 25°C.

Rejeitou-se então o pellet proteico e procedeu-se à precipitação do DNA com 2 volumes de etanol absoluto a 4°C. O DNA precipitado foi recolhido e transferido para etanol a 70%, para remover possíveis contaminantes ainda presentes.

Procedeu-se à dissolução do DNA em cerca de 350µl de uma solução de Tris-EDTA (composta por Tris-HCl e  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , com pH ajustado a 8), numa estufa a 37°C, com agitação suave e contínua.

Após dissolução completa, o DNA obtido foi conservado a 4°C em TE (Tris-EDTA).



### 3.3 Quantificação do DNA

As bases heterocíclicas púricas e pirimídicas que constituem o DNA, absorvem preferencialmente radiação de comprimento de onda de cerca de 260 nm. (Stryer, 1995)

O DNA obtido foi quantificado por um espectrofotômetro, (Smart Spec™ Plus, BioRad) através da leitura da absorvância a 260 nm.

Considerou-se que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 50µL/mL de DNA de dupla cadeia. A concentração de DNA foi calculada segundo a fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{D.O. a } 260\text{nm} \times \text{constante da dupla hélice} \quad (\mu\text{g/mL})$$

#### 3.3.1 Avaliação do grau de pureza do DNA

Para verificar a presença de contaminantes proteicos, foi medida a absorvância a 280 nm, já que vários resíduos de aminoácidos absorvem preferencialmente radiação neste comprimento de onda.

O grau de pureza do DNA, dado pela razão Absorvância de radiação de 260nm/Absorvância de radiação de 280nm, deverá ter um valor de cerca de 1.8. Para valores inferiores, poderá suspeitar-se de contaminação proteica; para valores superiores, poderá haver uma contaminação por RNA, (Sambrook, 1989) já que este ácido nucleico, embora absorva radiação preferencialmente de 260nm, pode absorver radiação de comprimento de onda superior.

A obtenção de DNA com um grau de pureza elevado é crucial, uma vez que desta depende o processo de amplificação, nomeadamente o emparelhamento dos primers e a eficácia da Taq DNA polimerase.

### **3.4. Amplificação do DNA pela Reacção em Cadeia da Polimerase: PCR**

#### **3.4.1 Fundamentos da técnica de PCR**

A reacção em cadeia da polimerase, desenvolvida por Mullis e Faloona, permite a amplificação exponencial de um fragmento de DNA, possibilitando a obtenção de mais de 10 milhões de cópias a partir de alguns nanogramas de ácido desoxirribonucleico. É uma técnica rápida, que se completa em 2 a 3 horas, e é dotada de grande sensibilidade e especificidade.

A PCR inicia-se com a desnaturação das duplas cadeias de DNA, a uma temperatura de cerca de 95 a 98°C. Após a desnaturação, a temperatura é rapidamente reduzida, permitindo o emparelhamento dos primers à cadeia molde. Os primers são sequências curtas de DNA (cerca de 15-30 nucleótidos) que flanqueiam a região a amplificar. A seguir à ligação dos primers, a temperatura é ligeiramente elevada, permitindo a incorporação específica de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), segundo a regra da complementaridade. Estes dNTPs vão constituindo a nova cadeia de DNA, na fase de extensão. A extensão é catalisada pela Taq DNA polimerase, uma enzima termo-resistente que possui um pH óptimo de actuação, que é criado pela adição de um tampão específico. A acção da Taq DNA polimerase é optimizada por iões  $Mg^{2+}$  e, em certos casos, pode ser necessário recorrer a detergentes para obter este efeito. Os inibidores da enzima podem ser inactivados com albumina sérica bovina (BSA).

A reacção em cadeia da polimerase dá-se ao longo de vários ciclos, de desnaturação das cadeias de DNA, emparelhamento dos primers nas cadeias desnaturadas, e extensão das novas cadeias de DNA. Cada um destes passos ocorre a temperaturas específicas e durante um intervalo de tempo determinado consoante a constituição nucleotídica do fragmento a amplificar.

Para a amplificação de cada polimorfismo estudado no presente trabalho, todas as condições da PCR foram previamente aferidas, no que diz respeito às concentrações de cada reagente, às temperaturas de emparelhamento dos primers, e à duração e número dos ciclos de amplificação.

### 3.4.2. Condições de amplificação:

A amplificação do DNA genômico para estudo do polimorfismo T8473C no gene que codifica a COX-2 foi baseada nas condições descritas por Hu *et al*, (2005).

Polimorfismo	Volume final	DNA	BSA	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Primers (cada)	Taq DNA pol 1:10 (BioRad)
T8473C	20µL	75ng	85ng/µL	3,5mM	160µM	0,625µM	0,06U/µL

Desnaturação inicial do DNA: 96°C, 5'

PCR em 40 ciclos, 95°C, 30", 52°C, 40", 72°C, 45" cada e extensão final 72°C, 10'.

Os primers utilizados para amplificar este fragmento de DNA foram:

*Forward:* 5'-GTT TGA AAT TTT AAA GTA CTT TTG AT-3' e

*Reverse:* 5'-TTT CAA ATT ATT GTT TCA TTG C-3'.

A amplificação do DNA para estudo do polimorfismo G894T no gene que codifica a eNOS baseou-se no protocolo publicado por Hingorani *et al*. (1999).

Polimorfismo	Volume final	DNA	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Primers (cada)	Taq DNA pol 1:10 (BioRad)
G894T	25µL	50 ng	1,5mM	160µM	0,5µM	0,04U/µL

Desnaturação inicial do DNA: 94°C, 5'

PCR em 35 ciclos: 94°C, 30"; 66°C, 30"; 72°C, 30" e extensão final 72°C, 8'.

Os primers utilizados para amplificar este fragmento de DNA foram:

*Forward:* 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' e

*Reverse:* 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3'

O protocolo de amplificação da região contendo o polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF foi baseado em Abe *et al.* (2002)

Polimorfismo	Volume final	DNA	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Primers (cada)	Taq DNA pol 1:10 ( <i>BioRad</i> )
936 C/T	20µL	25 ng	1,8mM	200µM	1µM	0,05U/µL

Desnaturação inicial: 95°C, 10'

PCR em 35 ciclos: 95°C, 20"; 60°C, 1'; 72°C, 1 e extensão final 72°C, 5'.

Os primers utilizados para amplificar este fragmento de DNA foram:

*Forward:* 5'-AAG GAA GAG GAG ACT CTG CGC AGA GC -3' e

*Reverse:* 5'-TAA ATG TAT GTA TGT GGG TGG GTG TGT CTA CAG G-3'

A amplificação do polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE foi feita com base em Hudson *et al.* (2001), com alterações.

Polimorfismo	Volume final	DNA	detergente w-1	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Primers (cada)	Taq DNA pol 1:10 ( <i>BioRad</i> )
T-374 <sup>a</sup>	25µL	100ng	0,05%	2mM	200µM	1µM	0,03U/µL

Desnaturação inicial: 95°C, 5'

PCR em 30 ciclos: 94°, 1'; 57°C, 1'; 72°, 1' e extensão final 72°C, 5'.

Os primers utilizados para amplificar este fragmento de DNA foram:

*Forward:* 5'- GGG GGC AGT TCT CTC CTC -3'

*Reverse:* 5' – CTT GAT TGC GCA AAG TTG CAT-3'

A amplificação do DNA genómico para estudo do polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY baseou-se em Jia *et al.* (2004).

Polimorfismo	Volume final	DNA	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Primers (cada)	Taq DNA pol 1:10( <i>BioRad</i> )
T1128C	25µL	25 ng	1mM	100µM	0,3µM	0,03U/µL

Desnaturação inicial: 94°C, 4'

PCR em 30 ciclos: 94°C, 30'; 64°C, 1'; 72°C, 1' e extensão final 72°C, 4'.

Os primers utilizados para amplificar este fragmento de DNA foram:

*Forward:* 5'- CCC GTC CGT TGA GCC TTC TG -3' e

*Reverse:* 5' – CGG TCC CGC GGT CCC -3'

### **3.5 Digestão dos fragmentos de DNA amplificados e visualização dos fragmentos digeridos**

#### **3.5.1 Fundamentos da técnica utilizada**

Nesta fase, os fragmentos de DNA amplificados foram digeridos por endonucleases. Estas são enzimas que reconhecem determinadas sequências de bases azotadas, normalmente constituídas por 4 a 8 pares de bases. As endonucleases hidrolisam o DNA num local específico desta pequena sucessão de bases, formando fragmentos de restrição.

É escolhida uma enzima que cliva uma sequência que existe numa das formas do polimorfismo, mas não na outra. Assim, a sequência de um dos alelos é clivada e a do outro não o é. Se o fragmento de DNA possuía a sequência reconhecida pela endonuclease, é dividido em dois ou mais fragmentos, de menor tamanho que o inicial (Sambrook *et al.*, 1989).

Para distinguir estes produtos de digestão, procedeu-se à sua separação, por electroforese. Esta técnica baseia-se na aplicação de um campo eléctrico a um meio, como um gel de agarose, através do qual os fragmentos de DNA migram, do pólo negativo para o positivo. A extensão da migração através dos poros do gel é inversamente proporcional ao logaritmo do número de pares de bases do fragmento de DNA.

Na preparação dos geles, foi utilizada agarose SeaKem® LE Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Esta foi dissolvida numa concentração de 3% para a análise de todos os polimorfismos, excepto para o do NPY. Neste caso, a sua concentração foi de 2%. A dissolução foi feita numa solução tampão, de TBE 1:10 (Tris Borato-EDTA, Tris-base 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH=8), que produz a condução eléctrica essencial para a corrida electroforética, aumentando a força iónica do meio. Por este motivo, o TBE foi também usado como solução de imersão do gel nas tinas de electroforese.

Para aumentar a densidade dos fragmentos de interesse e observar a sua migração através do gel de agarose, adicionaram-se 5 µL de corante, composto de 0,05% xileno cianol e 0,05% azul bromofenol e glicerol, a cada amostra.

As corridas electroforéticas foram feitas a uma diferença de potencial de 100 volts, excepto para o polimorfismo do gene NPY que foi sujeito a 120 volts.

Para a visualização dos fragmentos de DNA no gel de agarose, foi utilizado um corante fluorescente, o Brometo de Etídio (EtBr). Este intercala-se nas bases azotadas do DNA de dupla cadeia. Ao ser irradiado com luz UV, o EtBr emite radiação do espectro visível, permitindo observar a localização dos fragmentos de DNA no gel.

Foi utilizado um marcador de peso molecular, (*Gene Ruler<sup>TM</sup> 100 bp DNA ladder* MBI Fermentas) que constitui uma referência para a estimativa do número de bases azotadas que constituem os fragmentos de DNA obtidos. Os gels foram visualizados num sistema de imagem Gel Doc (BioRad).

### **3.5.2 Polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2:**

A digestão dos fragmentos amplificados foi feita segundo o protocolo descrito por Hu *et al.* 2005), com 3U da enzima de restrição *BclI* (New England Biolabs). A enzima actua a uma temperatura de 50°C, durante a noite. Esta endonuclease reconhece e cliva a sequência:



### **3.5.3 Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS**

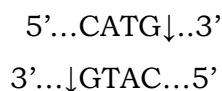
Os fragmentos amplificados por PCR foram digeridos segundo os procedimentos descritos por Hingorani *et al.* (1999), por 3U de endonuclease *MboI* (New England Biolabs), a 37°C, durante a noite. Esta enzima de restrição reconhece e cliva a sequência:



### **3.5.4 Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF**

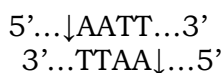
Foram utilizadas 5U da enzima de restrição *Nla III* (New England Biolabs), para clivar os fragmentos de interesse. A endonuclease actuou, a 37°C, durante a noite, de

acordo com o protocolo publicado por Abe *et al.* (2002). Esta enzima de restrição reconhece e cliva a sequência:



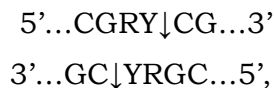
### **3.5.5 Polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE**

Os fragmentos amplificados foram digeridos, segundo as condições descritas por Hudson *et al.* (2001), com 5U da endonuclease *Tsp 509 I* (New England Biolabs), a uma temperatura de 65°C, durante a noite. Esta enzima de restrição reconhece e cliva a sequência:



### **3.5.6 Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY**

Utilizaram-se 10U da enzima de restrição *BsiEI* (New England Biolabs), para digerir os produtos da amplificação, segundo as condições descritas por Jia *et al.* (2004). A digestão ocorreu durante a noite, a 60°C. A endonuclease cliva a sequência:



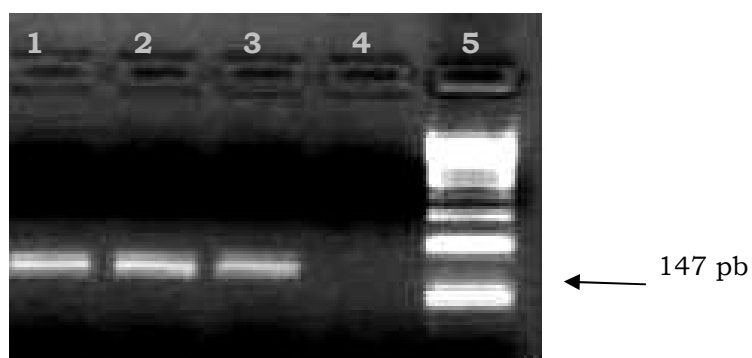
sendo Y citosina ou timina e R adenina ou guanina.



## IV Resultados

### 4.1 Polimorfismo T8473C no gene que codifica a COX-2

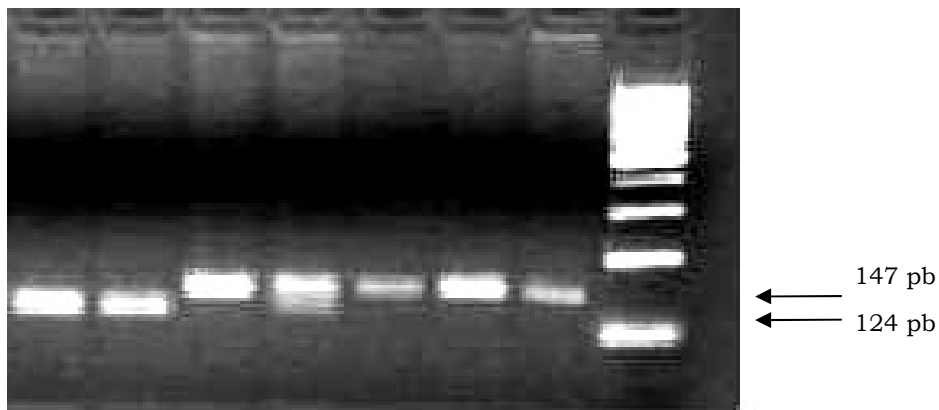
Para o estudo do polimorfismo T8473C, amplificaram-se os segmentos de interesse das amostras de DNA. Estes foram constituídos por 147 pares de bases (pb), tal como se observa na figura 8.



**Figura 8: Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo T8473C**

Os números de 1 a 3 representam as bandas dos fragmentos amplificados de amostras de DNA estudadas. O número 4 indica o controlo negativo da reacção. O marcador de peso molecular (em 5) confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 147 pares de bases.

Após a digestão com a enzima de restrição *BclI*, segundo as condições descritas em 3.5.2, estes fragmentos foram separados por electroforese em gel de agarose. O alelo polimórfico 8473C produziu dois fragmentos, de 124 e 23 pares de bases e o alelo 8473T correspondeu a um único fragmento de 147 pares de bases. (Figura 9)



**Figura 9: Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição, para análise do polimorfismo T8473C** no gene que codifica a COX-2, após clivagem pela endonuclease Bcl I. As amostras nas bandas 1 e 2 correspondem a dois indivíduos CC. As bandas 3, 5, 6 e 7 correspondem a indivíduos TT. A amostra que formou a banda 4 pertence a um indivíduo heterozigótico CT. Em 8, encontra-se o marcador de peso molecular.

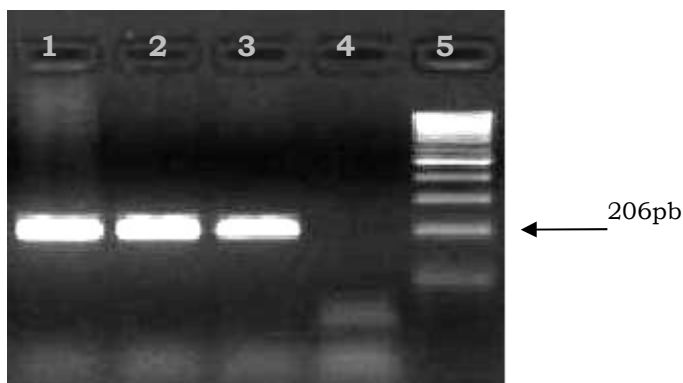
Na amostra estudada, os genótipos obtidos para os casos e controlos relativamente ao polimorfismo T8473C foram:

Tabela 1: Distribuição genotípica para o polimorfismo T8473C no gene que codifica a COX-2, na amostra estudada.

Polimorfismo	Genótipo			Alelos	
	TT	TC	CC	T	C
T8473C					
<b>Casos</b>	35 (87,5%)	1 (2,5%)	4 (10%)	88,75%	11,25%
<b>Controlos</b>	38 (95%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	96,25%	3,75%

#### 4.2. Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS

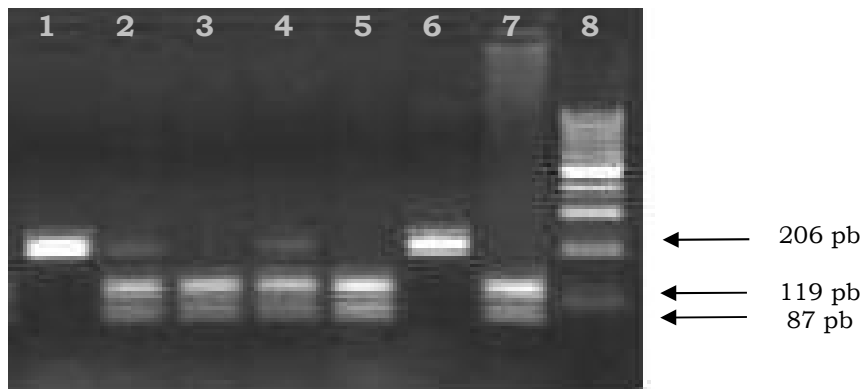
Os fragmentos amplificados por PCR para o estudo do polimorfismo G894T foram constituídos por 206pb, tal como se observa na figura 10.



**Figura 10: Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo G894T**, após electroforese. O marcador de peso molecular (em 5) confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 206 pares de bases. Os números de 1 a 3 representam as bandas dos fragmentos amplificados de algumas amostras de DNA estudadas. Na pista 5 está o marcador de peso molecular.

Estes fragmentos de DNA foram digeridos com a enzima de restrição *MboI* e, posteriormente, separados por electroforese em gel de agarose (Fig 14), segundo as condições descritas em 3.5.3.

Na presença do alelo G, a sequência de 206 pares de bases não é clivada pela *MboI*. Em contraste, na variante T, a endonuclease produz dois fragmentos de 119 e 87 pb (Figura 11).



**Figura 11: Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para análise do polimorfismo G894T** após digestão com a endonuclease MboI. As amostras nas bandas 1 e 6 correspondem a dois indivíduos homocigóticos para o alelo G (genótipo GG). As bandas 2 e 4 correspondem a indivíduos heterocigóticos GT. As amostras que formaram as bandas 3, 5 e 7 pertencem a indivíduos homocigóticos para o alelo T (genótipo TT). A pista 8 contém o marcador de peso molecular.

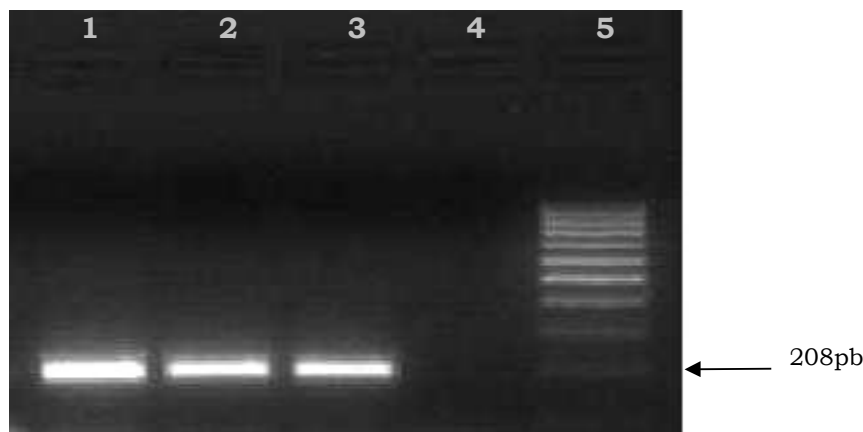
Na amostra estudada, os genótipos obtidos para os casos e controles relativamente ao polimorfismo G894T foram:

Tabela 2: Distribuição genotípica e alélica, na amostra estudada, para o polimorfismo G894T no gene que codifica a eNOS.

Polimorfismo	Genótipo			Alelos	
	GG	GT	TT	T	G
G894T					
<b>Casos</b>	18 (45%)	20 (50%)	2 (5%)	70%	30%
<b>Controlos</b>	19 (47,5%)	15 (37,5%)	6 (15%)	66,25%	33,75%

### 4.3 Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF

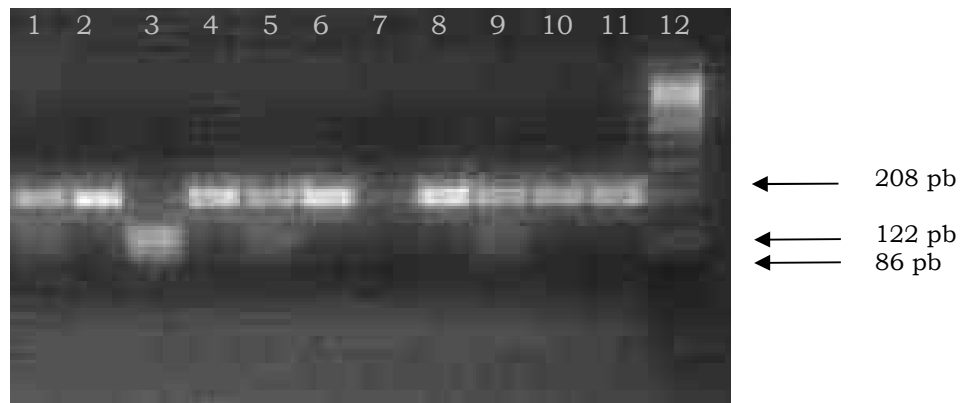
Os fragmentos amplificados para o estudo do polimorfismo C936T tiveram um comprimento de 208pb, como se observa na figura 12.



**Fig 12: Fotografia da electroforese dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo 936CT.** O marcador de peso molecular (em 5) confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 208 pares de bases. Os números de 1 a 3 representam as bandas dos fragmentos amplificados de algumas amostras de DNA estudadas.

Estes fragmentos foram digeridos com *NlaIII* e os produtos de restrição foram separados em gel de agarose, segundo as condições descritas em 3.5.4.

A presença de uma timina cria um local de restrição para a enzima *NlaIII*, que produz então dois fragmentos de 122 e 86 pb. Em contraste, quando ocorre o alelo C, o fragmento de 208 pares de bases não é clivado. (Figura 13)



**Figura 13 – Fotografia da electroforese dos produtos de amplificação para o polimorfismo C936T do gene do VEGF**, após digestão com a endonuclease Nla III. As bandas 1, 5 e 9 correspondem a indivíduos heterozigóticos CT. As pistas 2, 4, 6, 7, 8, 10 e 11 correspondem a indivíduos homozigóticos CC. A banda 3 representa um indivíduo homozigótico TT. A pista 12 contém o marcador de peso molecular.

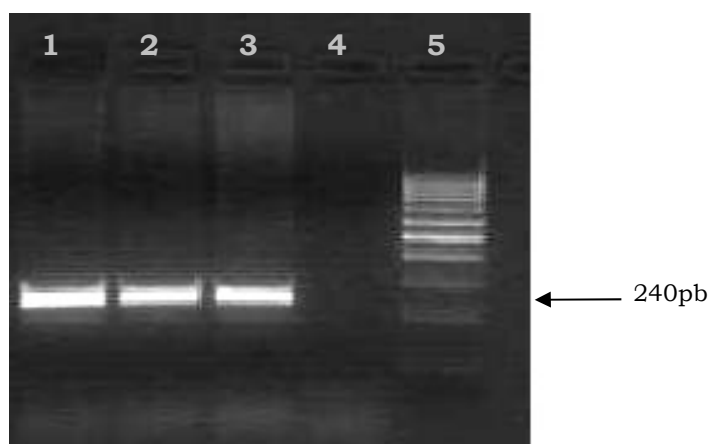
Na amostra estudada, os genótipos obtidos para os casos e controlos relativamente ao polimorfismo C936T foram:

Tabela 3: Distribuição genotípica e alélica, na amostra estudada, para o polimorfismo C936T no gene que codifica o VEGF.

Polimorfismo	Genótipo			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
C936T					
<b>Casos</b>	36 (90%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)	93,75%	6,25%
<b>Controlos</b>	31 (77,5%)	8 (20%)	1 (2,5%)	87,5%	12,5%

#### 4.4 Polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE

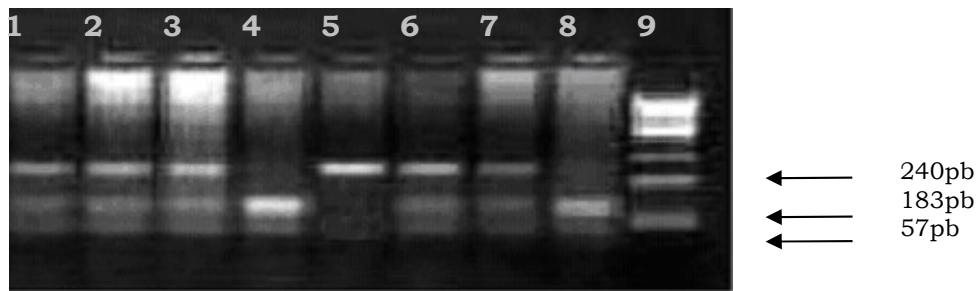
A amplificação da sequência que contém o polimorfismo T-374A deu origem a fragmentos de 240pb, como se observa na figura 14.



**Fig 14: Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo T-374A**, após electroforese em gel de agarose. O marcador de peso molecular (em 5) confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 240 pares de bases. Os números de 1 a 3 representam as bandas dos fragmentos amplificados de três amostras de DNA estudadas

Estes fragmentos foram depois digeridos com a enzima de restrição *Tsp 509I*, de acordo com as condições descritas em 3.5.5.

Na presença do alelo T, obtém-se um único fragmento de 240 pares de bases; quando ocorre a variante A, a *Tsp 509 I* cliva o fragmento de 240 pares de bases em dois, de 183 e 57 pares de bases. (Figura 15).



**Figura 15: Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para análise do polimorfismo T-374A** após digestão com a endonuclease Tsp 509 I. As amostras nas bandas 1, 2, 3, 6 e 7 correspondem a indivíduos TA. As bandas 4 e 8 correspondem a indivíduos AA. A pista 5 corresponde a um indivíduo TT.

Na amostra estudada, os genótipos obtidos para os casos e controles relativamente ao polimorfismo T-374A foram:

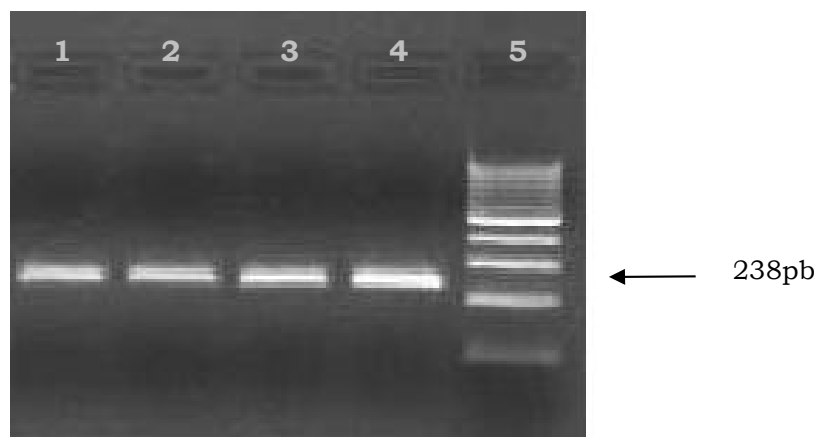
Tabela 4: Distribuição genotípica e alélica, na amostra estudada, para o polimorfismo T-374A no gene que codifica o RAGE

Polimorfismo	Genótipo			ALELOS	
	TT	TA	AA	T	A
T-374A					
<b>Casos</b>	16 (40%)	21 (52,5%)	3 (7,5%)	66,25%	33,75%
<b>Controlos</b>	15 (37,5%)	20 (50%)	5 (12,5%)	62,5%	37,5%



#### 4.5. Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY

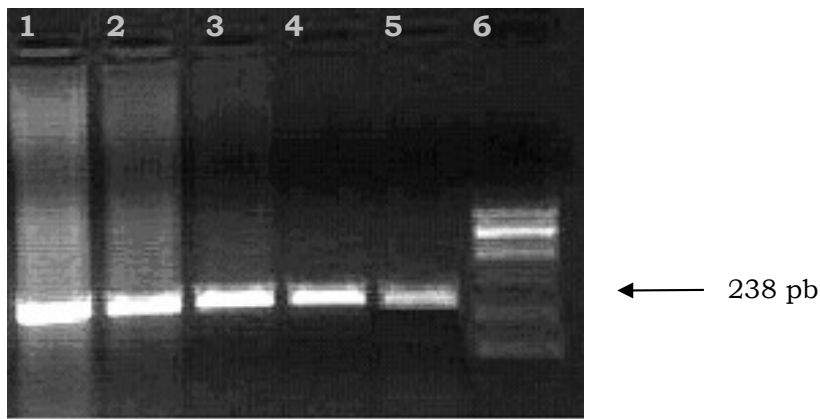
Para o estudo do polimorfismo T1128C, amplificaram-se sequências de 238pb, como se observa na figura 16.



**Figura 16: Fotografia dos fragmentos amplificados contendo a região do polimorfismo T1128C**, após electroforese. O marcador de peso molecular (em 5) confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 238 pares de bases. Os números de 1 a 4 representam as bandas dos fragmentos amplificados de algumas amostras de DNA estudadas

Os fragmentos foram digeridos com a enzima de restrição *BsiEI* e os fragmentos de restrição separados em gel de agarose, segundo as condições descritas em 3.5.6.

Na presença do alelo T, a *BsiEI* produz um único fragmento de 238 pares de bases. Em contraste, quando ocorre a variante C, o fragmento de 238 pares de bases é clivado em dois, de 190 e 48 pares de bases (figura 17).



**Figura 17: Fotografia da electroforese dos fragmentos de restrição para o estudo do polimorfismo T1128C**, após digestão com a endonuclease *BsiEI*. As amostras nas bandas 1 a 5 correspondem a indivíduos homozigóticos TT.

Observaram-se apenas bandas de 238pb, o que indica homozigotia para o alelo normal deste gene. A presença da mutação teria sido facilmente detectada porque criaria um novo sítio de restrição que produziria bandas com 190 e 48 pares de bases.

Na amostra estudada, os genótipos obtidos para os casos e controlos relativamente ao polimorfismo T1128C foram:

Tabela 5: Distribuição genotípica e alélica, na amostra estudada, para o polimorfismo T1128C no gene que codifica o NPY.

Polimorfismo	Genótipo			Alelos	
	TT	TC	CC	T	C
T1128C	TT	TC	CC	T	C
<b>Casos</b>	40 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	100%	0%
<b>Controlos</b>	40 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	100%	0%

## V. Tratamento estatístico dos resultados

### 5.1. Polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2:

Entre os casos, a frequência do alelo T foi de 88,75% e foi de 96,25% entre os controles. A frequência do alelo C foi de 11,25% nos casos, enquanto que, nos controles, foi de 3,75%.

O genótipo TT surgiu em 87,5% dos casos e em 95% dos controles analisados. O genótipo TC foi encontrado em 2,5% dos casos e 2,5% dos controles. O genótipo CC esteve presente em 10% dos casos e 2,5% dos controles.

O teste de Qui-Quadrado demonstrou que as frequências alélicas da amostra em estudo para este polimorfismo não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=53,77$ ).

Para testar possíveis diferenças entre os grupos de casos e controles no que se refere aos genótipos e alelos utilizou-se o teste do Qui-Quadrado. O valor de  $\chi^2$  encontrado foi de 1,923,  $df=2$  e  $p=0,382$  para os genótipos. Para os alelos, obteve-se um  $\chi^2$  de 3,243 e  $p=0,072$ . Assim, o teste de  $\chi^2$  demonstrou não existir uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas ou alélicas dos dois grupos analisados.

Para a determinação dos Odds Ratio e respectivos intervalos com 95% de confiança, recorreu-se a regressões logísticas. O OR (IC 95%) relativamente ao grupo dos casos com genótipo TT foi de 3,63 (0,07-18,03) para os indivíduos (casos) de genótipo TC e de 4,34 (0,46-40,75) para os indivíduos (casos) com genótipo CC.

Assim, conclui-se que não existe uma associação entre o polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2 e a susceptibilidade à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio na amostra analisada.

## **5.2. Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS:**

No que diz respeito ao polimorfismo G894T no gene que codifica a eNOS, a frequência alélica do alelo G foi de 66,25% nos casos e 70% nos controles. A frequência do alelo T foi de 33,75% nos casos e 30% nos controles.

O genótipo GG surgiu em 45% dos casos e em 47,5% dos controles. O genótipo GT foi encontrado em 50% dos casos e 37,5% dos controles. 5% dos casos e 15% dos controles foram homozigóticos recessivos (TT).

O teste de Qui-Quadrado demonstrou que as frequências alélicas da amostra em estudo para este polimorfismo estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=0$ ).

Para testar possíveis diferenças entre os grupos de casos e controles no que se refere aos genótipos e alelos utilizou-se o teste do Qui-Quadrado. O teste de  $\chi^2$  ( $\chi^2=2,741$ ;  $df=2$ ;  $p=0,256$ ) revelou não existir uma diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas dos dois grupos analisados. O valor de  $\chi^2$  encontrado para os alelos foi de 0,259, com  $p=0,661$ , revelando igualmente a ausência de uma diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas em casos e controles..

Para a determinação dos Odds Ratio e respectivos intervalos com 95% de confiança estimaram-se regressões logísticas. Relativamente aos casos com genótipo TT, o OR para os casos com genótipo GT foi de 0,25 (0,04-1,42) e para os casos com genótipo TT foi de 0,35 (0,06-1,98).

Assim, conclui-se que não existe uma associação entre o polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS e o risco de Enfarte Agudo do Miocárdio na amostra do presente estudo.

## **5.3. Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF:**

Na amostra em estudo, a frequência alélica do alelo C foi de 96,25% nos casos e 87,5% nos controles. A frequência do alelo T foi de 3,75% nos casos e 12,5% nos controles.

O genótipo CC for encontrado em 90% dos casos e em 77,5% dos controles. O genótipo CT surgiu em 7,5% dos casos e 20% dos controles. O genótipo TT foi identificado em 2,5% dos casos e 2,5% dos controles.

O teste de Qui-Quadrado demonstrou que as frequências alélicas da amostra em estudo para este polimorfismo não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=2,91$ ).

Também para este polimorfismo, o teste de  $\chi^2$  ( $\chi^2=2,646$ ;  $df=2$ ;  $p=0,266$ ) não revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos dos casos e dos controles analisados. Relativamente às frequências alélicas, obteve-se um  $\chi^2$  de 1,839, com  $p=0,175$ , não existindo, assim, igualmente, uma diferença estatisticamente significativa entre casos e controles.

Para a determinação dos Odds Ratio e respectivos intervalos com 95% de confiança recorreu-se a regressões logísticas. Usou-se como grupo de referência os casos com genótipo TT e o OR para os casos com genótipo TC foi de 2,67 (0,12-57,62) e para os casos com genótipo CC foi de 0,86 (0,05-14,35).

Conclui-se, assim, que não existe uma associação entre o polimorfismo C936T do gene que codifica a VEGF e a susceptibilidade à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio nesta amostra.

#### **5.4. Polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE:**

Na amostra estudada, a frequência do alelo T foi de 72,5% em casos e 68,75% em controles. A frequência da variante, A, foi de 27,5% nos casos e 31,25% nos controles.

O genótipo TT foi encontrado em 40% dos casos e em 37,5% dos controles. 52,5% dos casos e 50% dos controles eram heterozigóticos (TA). O genótipo AA foi observado em 7,5% dos casos e 12,5% dos controles.

O teste de Qui-Quadrado demonstrou que as frequências alélicas da amostra em estudo para este polimorfismo não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=1,1$ ).

O teste de  $\chi^2$  ( $\chi^2=0,557$ ;  $df=2$ ;  $p=0,266$ ) revelou a inexistência de uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos de casos e controles, no que diz respeito ao polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE. Da mesma forma, para os alelos, o valor de  $\chi^2$  obtido foi de 0,245, com  $p=0,620$ , não se verificando igualmente uma diferença significativa nas frequências alélicas dos casos e controles.

Para a determinação dos Odds Ratio e respectivos intervalos com 95% de confiança estimaram-se regressões logísticas. Relativamente aos casos TT, o OR dos casos TA foi de 1,02 (0,40-2,58) e o OR dos casos AA foi de 1,78 (0,36-8,74).

Assim, conclui-se que não existe uma associação entre o polimorfismo e o risco de Enfarte Agudo do Miocárdio na amostra em estudo.

## **5.5. Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY:**

Na amostra estudada, a frequência alélica de T foi de 100% em casos e controles. O alelo C não foi encontrado.

Não foi, assim, encontrada diferença entre os genótipos dos casos e os controles analisados no que diz respeito ao polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY, uma vez que os 80 casos e controles tinham genótipo TT. Assim, concluiu-se que não existe associação entre o polimorfismo e o risco de Enfarte Agudo do Miocárdio na amostra do presente estudo.

## **5.6. Efeitos combinados dos polimorfismos tomados dois a dois**

### 5.6.1. T8473C da COX-2 e G894T da eNOS

Entre os casos, verificou-se que 80% dos indivíduos portadores do alelo C (genótipo TC ou CC) do polimorfismo T8473C da COX-2, são simultaneamente portadores do alelo T (genótipo GT ou TT) do polimorfismo G894T da eNOS. Ambos os alelos foram associados a um efeito potenciador da etiopatogenia do EAM.

Contudo, 87,5% dos casos são simultaneamente portadores do alelo T (genótipo TT ou TC) do polimorfismo T8473C da COX-2, e do alelo G (genótipo GG ou GT) do polimorfismo G894T da eNOS.

Não se verificou uma associação significativa entre a presença de um dos alelos de um polimorfismo e a presença de um dos alelos do outro polimorfismo, nos casos.  $X^2=3,368$ ,  $df=1$ ,  $p=0,66$ .

Entre os controles, 87,2% dos indivíduos portadores do alelo T do polimorfismo T8473C da COX-2 (genótipo TT ou TC) são simultaneamente portadores do alelo G do polimorfismo G894T da eNOS (genótipo GG ou GT). Ambos os alelos foram associados a um efeito protector da etiopatogenia do EAM.

85% dos controles têm simultaneamente estes dois alelos.

Na amostra analisada, 1 indivíduo (1,25% da amostra) era simultaneamente portador do alelo C do polimorfismo T8473C da COX-2 e do alelo T do polimorfismo G894T da eNOS, ambos putativamente potenciadores da etiopatogenia do EAM. De facto, este indivíduo pertencia ao grupo dos casos (constitui 2,5% dos casos). A razão de possibilidade de se ser vítima de EAM, relativamente a não o ser, quando se possui esta

associação de alelos, foi de  $OR=0,975$  ( $0,928-1,025$ ), pelo que a presença desta associação de alelos não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

O indivíduo portador simultaneamente dos dois alelos de risco era homozigótico CC para o polimorfismo T8473C e homozigótico TT para o polimorfismo G894T. Desta forma, a razão de possibilidade de se ser vítima de EAM relativamente a não o ser, possuindo este genótipo, foi de  $OR=0,975$  ( $0,928-1,025$ ), pelo que a presença deste genótipo não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

#### 5.6.2. T8473C da COX-2 e C936T do VEGF

Verificou-se que entre os casos, todos dos indivíduos portadores do alelo C (genótipo TC ou CC) do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo C (genótipo CC ou CT) do polimorfismo C936T do VEGF. Ambos os alelos foram associados a um efeito potenciador da etiopatogenia do EAM.

Contudo, 90% dos casos são simultaneamente portadores do alelo T (genótipo TT ou TC) do polimorfismo T8473C da COX-2, e do alelo C (genótipo CC ou CT) do polimorfismo C936T do VEGF.

Não se verificou uma associação significativa entre a presença de um dos alelos num polimorfismo e a presença de um dos alelos no outro polimorfismo, nos casos.  $X^2=0,125$ ,  $df=1$ ,  $p=0,724$ .

Entre os controlos, 23% dos indivíduos portadores do alelo T do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo T do polimorfismo C936T do VEGF. Ambos os alelos foram associados a um efeito protector da etiopatogenia do EAM.

95% dos controlos têm simultaneamente o alelo T do polimorfismo T8473C da COX-2 e o alelo C do polimorfismo C936T do VEGF.

Na amostra analisada, 5 indivíduos (6,25% da amostra) eram simultaneamente portadores do alelo C do polimorfismo T8473C da COX-2 e do alelo C do polimorfismo C936T do VEGF, ambos putativamente potenciadores da etiopatogenia do EAM. De facto, 4 destes indivíduos pertenciam ao grupo dos casos (constituem 10% dos casos). A razão de possibilidade de se ser vítima de EAM, relativamente a não o ser, quando se possui esta associação de alelos, foi de  $OR=4$ , ( $0,476-34,238$ ), pelo que a presença desta associação de alelos não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

Os 5 indivíduos portadores simultaneamente dos dois alelos de risco eram homocigóticos CC para o polimorfismo T8473C e homocigótico CC para o polimorfismo C936T. Desta forma, a razão de possibilidade de se ser vítima de EAM relativamente a não o ser, possuindo este genótipo, foi de OR=4 (0,476-34,238), pelo que a presença deste genótipo não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

### 5.6.3. T8473C da COX-2 e T-374A do RAGE

Verificou-se que entre os casos, 80% dos indivíduos portadores do alelo C (genótipo TC ou CC) do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo T (genótipo TT ou TA) do polimorfismo T-374A do RAGE. Ambos os alelos foram associados a um efeito potenciador da etiopatogenia do EAM.

82,5% dos casos são simultaneamente portadores do alelo T (genótipo TC ou CC) do polimorfismo T8473C da COX-2, e do alelo T (genótipo TT ou TA) do polimorfismo T-374A do RAGE.

Não se verificou uma associação significativa entre a presença de um dos alelos num polimorfismo e a presença de um dos alelos no outro polimorfismo, nos casos.  $X^2=0,396$ ,  $df=1$ ,  $p=0,529$ .

Entre os controlos, 48,7% dos indivíduos portadores do alelo T do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo A do polimorfismo T-374A do RAGE. Ambos os alelos foram associados a um efeito protector da etiopatogenia do EAM.

Contudo, 85% dos controlos têm simultaneamente o alelo T do polimorfismo T8473C da COX-2 e o alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE.

Na amostra analisada, 4 indivíduos (5% da amostra) eram simultaneamente portadores do alelo C do polimorfismo T8473C da COX-2 e do alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE, ambos putativamente potenciadores da etiopatogenia do EAM. De facto, estes 4 indivíduos pertenciam ao grupo dos casos (constituindo 10% dos casos). A razão de possibilidade de se ser vítima de EAM, relativamente a não o ser, quando se possui esta associação de alelos, foi de OR=0,900 IC(0,812-0,998), pelo que a presença desta associação de alelos representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

Os 4 indivíduos portadores simultaneamente dos dois alelos de risco eram homocigóticos CC para o polimorfismo T8473C e homocigótico TT para o polimorfismo T-374A. Desta forma, a razão de possibilidade de se ser vítima de EAM relativamente a não



o ser, possuindo este genótipo, foi de OR=0,900 (0,812-0,998), pelo que a presença deste genótipo representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

#### 5.6.4. G894T da eNOS e C936T do VEGF

Verificou-se que entre os casos, todos os indivíduos portadores do alelo T (genótipo GT ou TT) do polimorfismo G894T da eNOS são portadores do alelo C (genótipo CC ou CT) do polimorfismo C936T do VEGF. Ambos os alelos foram associados a um efeito potenciador da etiopatogenia do EAM.

Contudo, 95% dos casos são simultaneamente portadores do alelo G (genótipo GG ou GT) do polimorfismo G894T da eNOS, e do alelo C (genótipo CC ou CT) do polimorfismo C936T do VEGF.

Não se verificou uma associação significativa entre a presença de um dos alelos num polimorfismo e a presença de um dos alelos no outro polimorfismo, nos casos.  $X^2=0,147$ ,  $df=1$ ,  $p=0,702$ .

Entre os controlos, 20% dos indivíduos portadores do alelo G do polimorfismo G894T da eNOS são portadores do alelo T do polimorfismo C936T do VEGF. Ambos os alelos foram associados a um efeito protector da etiopatogenia do EAM.

Contudo, 85% dos controlos têm simultaneamente o alelo G do polimorfismo G894T da eNOS e o alelo C do polimorfismo C936T do VEGF.

Na amostra analisada, 7 indivíduos (8,75% da amostra) eram simultaneamente portadores do alelo T do polimorfismo G894T da eNOS e do alelo C do polimorfismo C936T do VEGF, ambos putativamente potenciadores da etiopatogenia do EAM. Destes 7 indivíduos, 5 pertenciam ao grupo dos casos (constituindo 12,5% dos casos). A razão de possibilidade de se ser vítima de EAM, relativamente a não o ser, quando se possui esta associação de alelos, foi de OR=2,5 (0,082-1,42), pelo que a presença desta associação de alelos não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

Dos 7 indivíduos portadores simultaneamente dos dois alelos de risco, 5 eram homozigóticos TT para o polimorfismo G894T e homozigótico CC para o polimorfismo C936T. 3 deles eram casos e 2 controlos. Desta forma, a razão de possibilidade de se ser vítima de EAM relativamente a não o ser, possuindo este genótipo, foi de OR=1,499 (0,118-3,778), pelo que a presença deste genótipo não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

#### 5.6.5. G894T da eNOS e T-374A do RAGE

Verificou-se que entre os casos, 85,7% dos indivíduos portadores do alelo T (genótipo GT ou TT) do polimorfismo G894T da eNOS são portadores do alelo T (genótipo TT ou TA) do polimorfismo T-374A do RAGE. Ambos os alelos foram associados a um efeito potenciador da etiopatogenia do EAM.

Contudo, 87,5% dos casos são simultaneamente portadores do alelo G (genótipo GG ou CG) do polimorfismo G894T da eNOS, e do alelo T (TT ou TA) do polimorfismo T-374A do RAGE.

Não se verificou uma associação significativa entre a presença de um dos alelos de um polimorfismo e a presença de um dos alelos no outro polimorfismo, nos casos.  $X^2=3,951$ ,  $df=1$ ,  $p=0,47$ .

Entre os controles, 60% dos indivíduos portadores do alelo G do polimorfismo G894T da eNOS são portadores do alelo A do RAGE. Ambos os alelos foram associados a um efeito protector da etiopatogenia do EAM.

Contudo, 80% dos controles têm simultaneamente o alelo G do polimorfismo G894T da eNOS e o alelo T do RAGE.

Na amostra analisada, 5 indivíduos (6,25% da amostra) eram simultaneamente portadores do alelo T do polimorfismo G894T da eNOS e do alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE, ambos putativamente potenciadores da etiopatogenia do EAM. Destes 5 indivíduos, apenas 2 pertenciam ao grupo dos casos (constituindo 5% dos casos), sendo que os restantes 3 indivíduos pertenciam ao grupo controlo (constituindo 7,5% deste grupo). A razão de possibilidade de se ser vítima de EAM, relativamente a não o ser, quando se possui esta associação de alelos, foi de  $OR=0,667$  (0,118-3,778), pelo que a presença desta associação de alelos não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

Dos 5 indivíduos portadores simultaneamente dos dois alelos de risco, 3 eram homozigóticos TT para o polimorfismo G894T e homozigótico TT para o polimorfismo T-374A. 1 deles era um caso e 2 eram controlos. Desta forma, a razão de possibilidade de se ser vítima de EAM relativamente a não o ser, possuindo este genótipo, foi de  $OR=0,5$  (0,470-35,296), pelo que a presença deste genótipo não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

#### 5.6.6. C936T do VEGF e T-374A do RAGE

Verificou-se que entre os casos, 92,5% dos indivíduos portadores do alelo C (genótipo CC ou CT) do polimorfismo C936T do VEGF são portadores do alelo T (genótipo TT ou TA) do polimorfismo T-374A do RAGE. Ambos os alelos foram associados a um efeito potenciador da etiopatogenia do EAM.

85% dos casos são simultaneamente portadores destes dois alelos.

Não se verificou uma associação significativa entre a presença de um dos alelos num polimorfismo e a presença de um dos alelos no outro polimorfismo, nos casos.  $X^2=0,171$ ,  $df=1$ ,  $p=0,679$ .

Entre os controlos, 66% dos indivíduos portadores do alelo T do polimorfismo C936T do VEGF são portadores do alelo A do polimorfismo T-374A do RAGE. Ambos os alelos foram associados a um efeito protector da etiopatogenia do EAM.

85% dos controlos têm simultaneamente o alelo C do polimorfismo C936T do VEGF e o alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE.

Na amostra analisada, 71 indivíduos (88,75% da amostra) eram simultaneamente portadores do alelo C do polimorfismo C936T do VEGF e do alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE, ambos putativamente potenciadores da etiopatogenia do EAM. Destes 71 indivíduos, 37 pertenciam ao grupo dos casos (constituindo 92,5% dos casos), sendo que os restantes 34 indivíduos pertenciam ao grupo controlo (constituindo 85% deste grupo). A razão de possibilidade de se ser vítima de EAM, relativamente a não o ser, quando se possui esta associação de alelos, foi de **OR=1,088 (0,930-1,174)**, pelo que a presença desta associação de alelos não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

Dos 71 indivíduos portadores simultaneamente dos dois alelos de risco, 37 eram homozigóticos CC para o polimorfismo C936T e homozigótico TT para o polimorfismo T-374A. 18 deles eram casos e 17 eram controlos. Desta forma, a razão de possibilidade de se ser vítima de EAM relativamente a não o ser, possuindo este genótipo, foi de **OR=1,059 (0,644-1,741)**, pelo que a presença deste genótipo não representou, na amostra estudada, um risco acrescido significativo de ocorrência de EAM.

## VI. Discussão

### 6.1. Polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2

O polimorfismo T8473C no gene que codifica a COX-2 é relativamente frequente na população caucasiana (Campa *et al.*, 2004). As frequências genótípicas encontradas no presente trabalho foram significativamente diferentes das de outras investigações: 87,5% para o genótipo TT, 2,5% para o genótipo TC e 10% para o genótipo CC. Noutros trabalhos, foram encontradas frequências genótípicas de 45% e 49,6% (para o genótipo TT), 42% e 43,36% (para o genótipo TC), 13% e 6% (para o genótipo CC) Estes dados referem-se a amostras da população holandesa e dinamarquesa, respectivamente (Sorensen *et al.*, 2005).

Embora as consequências funcionais do polimorfismo T8473C do gene da Ciclooxygenase-2 sejam ainda desconhecidas, estudos sugerem que este polimorfismo poderá conduzir a uma alteração da expressão da proteína (Langsenlehner *et al.*, 2006), alteração essa que poderá influenciar a actividade inflamatória e a angiogénese.

A 3'-UTR do gene da Ciclooxygenase-2, onde se encontra o polimorfismo T8473C, tem 22 cópias da sequência de Shaw-Kamens (AUUUA). Estas sequências estão envolvidas na regulação da síntese de COX-2, controlando a estabilidade e a degradação do seu RNAm, instabilizando a mensagem e inibindo a tradução (Dixon *et al.*, 2000 *in* Park *et al.*, 2006). Partindo desta observação, foi colocada a hipótese de um dos alelos deste polimorfismo poder estabilizar o RNAm da COX-2, por disrupção das sequências de Shaw-Kamens. Esta disrupção poderá resultar numa maior produção de COX-2 e prostaglandinas pró-inflamatórias e, assim, num maior estímulo pró-inflamatório (Sanak *et al.*, 2005).

É, assim, possível que o polimorfismo tenha também interferência na progressão da aterosclerose e na ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio. Um estudo recente demonstrou uma associação entre este polimorfismo e, por um lado, os níveis séricos lipídicos e, por outro a susceptibilidade à ocorrência de episódios coronários agudos em homens, mas não em mulheres (Vogel *et al.*, 2009). O polimorfismo T8473C foi associado a várias outras doenças, cuja progressão está também directamente relacionada com activação inflamatória elevada.

Os resultados obtidos nestes trabalhos foram díspares, tendo alguns proposto um efeito protector para o alelo C (Hu *et al.*, 2005), enquanto que outros encontraram uma

associação significativa entre este alelo e um risco acrescido de ocorrência de patologia de etiologia inflamatória (Langselehner *et al.*, 2006).

Estas disparidades poderão dever-se a vários factores. Nomeadamente, a estimativas pouco fiáveis nas frequências alélicas ou genóticas devido ao pequeno tamanho das amostras de população em estudo; poderá dever-se também a especificidades populacionais (o papel biológico desempenhado por este polimorfismo poder ter diferenças populacionais, ou o gene pode estar em desequilíbrio de linkage com genes diferentes em diferentes populações). As discrepâncias poderão ser ainda devidas a diferentes métodos de genotipagem (Hu *et al.*, 2005; Langselehner *et al.*, 2006).

No presente trabalho, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos dos casos e dos controlos analisados para este polimorfismo. Assim, não se demonstrou uma associação entre o polimorfismo T8473C do gene que codifica a COX-2 e a susceptibilidade à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio.

## 6.2. Polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS

O polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS é relativamente frequente na população caucasiana. Na amostra do presente trabalho, as frequências genóticas encontradas foram semelhantes às referidas noutras investigações, levadas a cabo em caucasianos: 46,25%, 43,7% e 10% para os genótipos GG, GT, TT, respectivamente, versus 46,1% (GG), 43,3% (GT) e 12,2% (TT) (Guzik *et al.*, 2001); 39,7% (GG), 48,1% (GT) e 12,2% (TT) (Spence *et al.*, 2004).

A escassez de dados funcionais quantitativos não permite ainda conhecer os efeitos moleculares exactos do polimorfismo G894T na função e actividade da eNOS (Erbs *et al.*, 2003). Na realidade, desconhece-se se a variante G894T altera directamente a actividade e regulação da eNOS, ou se é um marcador genético de associação com o fenótipo de doença cardiovascular nalgumas populações (Guzik *et al.*, 2001).

Contudo, foi sugerido que o polimorfismo G894T do gene que codifica a eNOS contribui para a disfunção vasomotora coronária, devido a um aumento da resistência microvascular (Naber *et al.*, 2001). Este polimorfismo parece ter também um impacto nos mecanismos envolvidos na formação de lesões ateroscleróticas e trombose, como agregação plaquetar ou adesão de leucócitos à parede vascular (Shimasaki *et al.*, 1998).

De facto, vários trabalhos revelaram uma associação entre este polimorfismo e Coronariopatia precoce (Cam *et al.*, 2004) e a ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio (Shimasaki *et al.*, 1998; Hingorani *et al.*, 1999; Erbs *et al.*, 2003; Loscalzo *et al.*, 2003; Casas *et al.*, 2004 ; Senthil *et al.*, 2005).

De acordo com estes últimos estudos, o polimorfismo G894T poderá ter um efeito funcional, uma vez que parece produzir uma alteração na estabilidade da proteína (Senthil *et al.*, 2005) e na sua conformação, que passa de hélice para *tight turn*, na variante T, aumentando assim a sua susceptibilidade à clivagem proteolítica (Schultz *et al.*, 1974 in Shimasaki *et al.*, 1998; Naber *et al.*, 2001; Erbs *et al.*, 2003; Tesauro *et al.*, 2000 in Loscalzo *et al.*, 2003).

Assim, o alelo T parece codificar produtos proteicos com um tempo de semi-vida reduzido. Este processo poderá ter implicações na biodisponibilidade e na actividade da eNOS, o que, possivelmente, acarreta uma série de consequências biológicas (Park *et al.*, 2004; Senthil *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2004).

De acordo com esta hipótese obteve-se, no presente trabalho, uma frequência do alelo T maior em casos que em controlos.

Contudo, a diferença encontrada não foi significativa: no presente trabalho, não se encontrou uma associação entre o polimorfismo G894T e o risco de ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio.

### **6.3. Polimorfismo C936T do gene que codifica o VEGF**

Em termos de frequências genóticas na amostra em estudo, os resultados obtidos divergiram um pouco de outro estudo europeu (Krippel *et al.*, 2003): 85% versus 76,5% de indivíduos com genótipo CC, 13,75% versus 21,6% de indivíduos CT e 1,25% versus 1,9% de indivíduos TT.

Tanto quanto sabemos, não existem trabalhos publicados acerca das implicações deste polimorfismo na susceptibilidade a ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio. Contudo, foi estudado no âmbito de algumas outras patologias de etiologia inflamatória ou potenciadas pela inflamação e angiogénese, tendo os resultados sido discordantes (Abe *et al.*, 2002; Krippel *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2006).

O VEGF exerce acções pró-inflamatórias (Inoue *et al.*, 1998), angiogénicas, promotoras do crescimento e destabilização das placas de ateroma (Khurana *et al.*, 2005), observando-se níveis elevados de VEGF no sangue periférico de doentes com risco aumentado de Enfarte de Miocárdio fatal e não fatal (Heeshen *et al.*, 2003). Desta forma, se o polimorfismo C936T alterar os níveis de expressão da proteína, poderá influenciar a susceptibilidade individual à ocorrência deste episódio cardiovascular.

Não se conhece o mecanismo exacto pelo qual o polimorfismo C936T afecta os níveis de VEGF. O alelo C codifica um local de ligação putativo para a proteína activadora 4 (AP-4), local esse que parece ser abolido com o alelo T (Renner *et al.*, 2000). A AP-4 é um factor de transcrição que aumenta a expressão de vários genes celulares, ligando-se a locais activadores específicos. A perda do local de ligação putativo para a AP-4 parece ter influência nos níveis de transcrição e na actividade do VEGF, estando o alelo T associado a níveis séricos significativamente mais baixos de expressão da proteína (Hu *et al.*, 1990 in Renner *et al.*, 2000; Krippel *et al.*, 2003).

No presente trabalho, os casos tiveram uma frequência inferior do alelo T em relação aos controlos, pelo que os resultados obtidos estão de acordo com estes dados. Contudo, as diferenças obtidas não são estatisticamente significativas.

De facto, no presente trabalho, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas dos casos e dos controlos analisados, pelo que não se demonstrou uma associação entre o polimorfismo C936T do gene que codifica a VEGF e a susceptibilidade à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio.



#### **6.4. Polimorfismo T-374A no gene que codifica o RAGE**

Na amostra em estudo, 40% dos casos tiveram genótipo TT, 52,5% eram TA e 7,5% eram homozigóticos AA. Estes resultados são semelhantes aos encontrados nos casos de Cardiopatia Isquémica de uma amostra da população italiana: 39,7% homozigóticos TT, 51,3% heterozigóticos TA e 9% homozigóticos AA (Falcone *et al*, 2005).

Sabe-se que o RAGE promove o entrecruzamento de fibras de colagénio e vitronectina (Chavakis *et al*, 2004), a migração e proliferação de células de músculo liso e o aumento da síntese de tecido conjuntivo (Falcone *et al*, 2005). Embora esta reparação fibrótica seja essencial na manutenção da integridade vascular, já que é um mecanismo de reparação da parede nas fases precoces da aterosclerose, (ou na restenose após agressão endotelial) ele potencia significativamente o crescimento das placas de ateroma. Assim, a redução da expressão do RAGE poderá produzir uma diminuição dos efeitos vasculares adversos desta proteína, (Zhou *et al*, 2005) uma vez que poderá conduzir a uma organização fibrótica menos extensa, à menor formação de neoíntima após agressão vascular e, assim, a lesões estenóticas menos desenvolvidas (Falcone *et al*, 2005).

Demonstrou-se que o alelo A impede a ligação de uma série de factores de transcrição, reprimindo a transcrição do RAGE (Knuppel *et al.*, 1994 *in* Hudson *et al*, 2004). Assim, os efeitos protectores putativos deste alelo poderão dever-se a uma menor expressão da proteína.

De facto, vários trabalhos sugerem um papel protector da variante A em relação ao desenvolvimento de ateromatose severa. Em indivíduos com Cardiopatia Isquémica, foi encontrada uma associação entre o genótipo AA e uma menor severidade de aterosclerose coronária e um número menor de vasos afectados por aterosclerose (Falcone *et al*, 2005). Da mesma forma, a homozigotia para o alelo A foi associada a protecção contra o risco de ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio (Zee *et al*, 2006) e episódios coronários em geral em indivíduos com doença coronária (Falcone *et al.*, 2008). De acordo com estes dados, no presente trabalho, 62,5% dos indivíduos homozigóticos AA foram controlos, versus 37,5% de casos AA. Contudo, esta diferença não foi significativa.

No presente trabalho, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas dos casos e dos controlos analisados no que diz respeito ao polimorfismo T-374A do gene que codifica o RAGE. Assim, não se

demonstrou uma associação entre este polimorfismo e o risco de Enfarte Agudo do Miocárdio.

## **6.5. Polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY**

A maior frequência do alelo C (6.0%) jamais encontrada num estudo foi-o numa amostra da população Finlandesa (Niskanen *et al.*, 2000). Na Suécia, foram encontradas frequências de 3,9 a 4,6% para o alelo C, em duas investigações diferentes (Zhou *et al.*, 2001 *in* Ding *et al.*, 2003). Numa amostra da população do Sul de Espanha, a frequência alélica de C encontrada foi de 0,1% (Portolés *et al.*, 2003). Este polimorfismo genético parece sofrer um gradiente de Norte para Sul, parecendo estar pouco representado nas baixas latitudes. Na amostra do presente estudo, a variante não foi identificada.

O polimorfismo T1128C no gene do NPY parece ser um dos polimorfismos que mais fortemente afectam o colesterol sérico. O alelo C parece determinar uma sobre-expressão do gene do NPY (Mitchell *et al.*, 2008), estando associado a níveis plasmáticos elevados do neuropeptídeo (Kallio *et al.*, 2001). Este alelo foi associado a concentrações séricas mais elevadas de colesterol total e LDL (Karvonen *et al.*, 1998; Niskanen *et al.*, 2000) e parece ainda exacerbar a acção proliferativa do NPY, aumentando o grau de espessamento da íntima-média. Este aumento eleva o risco de episódios cardiovasculares agudos, mesmo antes de manifestações clínicas de doença cardiovascular (O'Leary *et al.*, 1999 *in* Niskanen *et al.*, 2000).

O polimorfismo T1128C foi associado a Enfarte Agudo do Miocárdio em doentes hipertensos (Wallerstedt *et al.*, 2004), a progressão acelerada de aterosclerose, a hipertensão e a níveis elevados de colesterol total e LDL, no Norte da Europa (Karvonen *et al.*, 2001; Erkkila *et al.*, 2002).

Na amostra estudada no presente trabalho, não se identificou a variante C. Assim, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos dos casos e os controlos analisados no que diz respeito ao polimorfismo T1128C do gene que codifica o NPY, não se demonstrando, portanto, qualquer associação com o risco de Enfarte Agudo do Miocárdio.

## **6.6. Efeitos combinados dos polimorfismos no EAM**

No presente trabalho, encontrou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença simultânea do alelo C do polimorfismo T8473C da COX-2 e do alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE e o risco de ocorrência de EAM. A homozigotia simultânea CC para o polimorfismo T8473C e TT para o polimorfismo T-374A esteve também significativamente associado a risco de ocorrência de EAM. A presença individual de cada um destes dois alelos foi associada a um risco acrescido de ocorrência de EAM noutros trabalhos, como referido anteriormente.

Não se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre os casos e os controlos relativamente às restantes combinações de pares de alelos. Contudo, de forma geral, os indivíduos portadores de qualquer combinação dos alelos de risco pertenciam maioritária ou mesmo integralmente ao grupo dos casos. A única exceção foi o facto de os alelos de risco da eNOS e do RAGE estarem presentes simultaneamente em 2 casos e em 3 controlos, o que não vai de encontro aos resultados esperados.

Especificamente, observou-se que:

- O único portador simultaneamente do alelo de risco da COX-2 e do alelo de risco da eNOS era um caso.

- Dos 5 indivíduos simultaneamente portadores do alelo de risco da COX-2 e do alelo de risco do VEGF, quatro eram casos e um era um controlo.

- Os 4 indivíduos simultaneamente portadores do alelo de risco da COX-2 e do alelo de risco do RAGE pertenciam ao grupo dos casos.

- Dos 7 indivíduos simultaneamente portadores do alelo de risco da eNOS e do alelo de risco do VEGF, 5 pertenciam ao grupo dos casos e os restantes 2 ao dos controlos.

- Dos 5 indivíduos simultaneamente portadores do alelo de risco da eNOS e do alelo de risco do RAGE, apenas 2 pertenciam ao grupo dos casos, sendo os restantes do grupo dos controlos.

- Dos 71 indivíduos portadores simultaneamente do alelo de risco do VEGF e do alelo de risco do RAGE, 37 eram casos e 34 eram controlos.

Estas observações estão, em geral, de acordo com os resultados esperados, que seriam a obtenção de maiores frequências de casos com combinações de pares de alelos de risco, relativamente a controlos com a mesma combinação de alelos. Contudo, esta diferença só foi significativa no caso já referido. As observações relativamente aos genótipos tiveram resultados sobreponíveis.

A análise da presença simultânea dos dois alelos supostamente potenciadores da ocorrência de EAM - nos casos - e dos dois alelos putativamente protectores - nos controlos - demonstrou que:

- 80% dos casos portadores do alelo de risco do polimorfismo T8473C da COX-2 são simultaneamente portadores o alelo T de risco do polimorfismo G894T da eNOS. 87,2% dos controlos com o alelo protector do polimorfismo T8473C da COX-2 são simultaneamente portadores do alelo protector do polimorfismo G894T da eNOS.

- 100% dos casos portadores do de risco do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo de risco do polimorfismo C936T do VEGF. Quanto aos controlos, 23% dos indivíduos portadores do alelo protector do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo protector do polimorfismo C936T do VEGF.

- 80% dos casos portadores do alelo de risco do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo de risco do polimorfismo T-374A do RAGE. Quanto aos controlos, 48,7% dos indivíduos portadores do alelo protector do polimorfismo T8473C da COX-2 são portadores do alelo protector do polimorfismo T-374A do RAGE.

- 100% dos casos portadores do alelo de risco do polimorfismo G894T da eNOS são simultaneamente portadores do alelo de risco do polimorfismo C936T do VEGF. Entre os controlos, 20% dos portadores do alelo protector do polimorfismo G894T da eNOS são portadores do alelo protector do polimorfismo C936T do VEGF.

- 85,7% dos casos portadores do alelo de risco do polimorfismo G894T da eNOS são portadores do alelo de risco do polimorfismo T-374A do RAGE. Entre os controlos, 60% dos portadores do alelo protector do polimorfismo G894T da eNOS são portadores do alelo protector do RAGE.

- 92,3% dos casos portadores do alelo de risco do polimorfismo C936T do VEGF são portadores do alelo de risco do polimorfismo T-374A do RAGE. Entre os controlos, 66% dos portadores do alelo protector do polimorfismo C936T do VEGF são portadores do alelo A do polimorfismo T-374A do RAGE. Ambos os alelos foram associados a um efeito protector da etiopatogenia do EAM.

Ou seja: os alelos supostamente potenciadores da etiopatogenia do EAM surgem frequentemente associados dois a dois nos casos, o que poderia sugerir um efeito sinérgico da presença de mais do que um alelo de risco simultaneamente nos casos, embora esta associação não seja estatisticamente significativa. Os alelos putativamente protectores surgem menos frequentemente associados nos controlos, o que poderia sugerir que o seu efeito sinérgico nos controlos não será tão forte como o dos alelos de risco nos casos.

Não foi levado a cabo o estudo do efeito combinado dos vários polimorfismos com o T1128C do NPY, uma vez que a variante não foi encontrada na amostra em estudo

## **.7. Limitações do Estudo:**

Dadas as dimensões reduzidas da amostra em estudo, constituída por 80 indivíduos (40 casos e 40 controlos), os resultados obtidos não possuem poder estatístico. Os falsos negativos são um problema neste tipo de amostra, uma vez que o aumento ou diminuição da susceptibilidade a uma dada patologia devidos a um polimorfismo podem ser subestimados em amostras de pequenas dimensões. Considera-se que a amostra deveria ser constituída pelo menos por 1000 indivíduos para que os resultados obtidos sejam estatisticamente relevantes.

As frequências alélicas na amostra em estudo não estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que acontece frequentemente em amostras destas dimensões e que constitui uma fonte de enviesamento dos resultados.

Uma vez que não estiveram disponíveis dados clínicos ou laboratoriais acerca dos indivíduos que constituíram esta amostra, é possível que algum dos casos de EAM tenha sido causado por factores etiológicos independentes da aterosclerótico que, embora raros, existem e incluem: endocardite bacteriana, doença dos pequenos vasos, arterite coronária e hipotensão. Da mesma forma, é possível que, entre os indivíduos que constituíram os controlos (vítimas de morte violenta), se pudesse encontrar algum susceptível a sofrer EAM de etiologia aterosclerótica no futuro.

É importante notar que a associação estatística entre genes candidatos na etiologia do EAM e a ocorrência deste episódio, não seria prova irrefutável de causalidade, uma vez que um polimorfismo associado a uma patologia poderá não ser a variante causal, mas estar em forte desequilíbrio de linkage com esta. Não foram, no presente trabalho, feitas análises de linkage.

Os estudos genéticos epidemiológicos do tipo do presente trabalho tem várias outras limitações específicas, determinadas pela heterogeneidade genética, heterogeneidade fenotípica, imprecisão genética e existência de fenocópias.

É já possível usar uma análise de marcadores genéticos seleccionados ao acaso, que cubram todo o genoma, no sentido de minimizar os erros da abordagem aqui utilizada. A catalogação de cerca de 10 milhões de SNPs, bem como progressos na genotipagem, incluindo microarrays, tornam esta análise possível. Espera-se conhecer a sequência de todo o genoma humano, bem como um mapa de variantes genéticas comuns (SNPs), dentro de poucos anos. Este conhecimento poderá ser aplicado ao estudo de varias doenças, nomeadamente as cardiovasculares (principal causa de morte a nível global) para as quais a genómica possa dar resposta, com recurso às áreas afins da

bioinformática, genómica funcional e proteómica. Com o ritmo dos avanços na compreensão da base molecular da aterotrombose e no cuidado de pacientes, a inclusão da análise genética será cada vez mais um instrumento para melhorar a previsão e a estratificação de risco individual e orientar a terapêutica.



## **8. Conclusão**

No presente trabalho, realizou-se um estudo de associação numa amostra de 80 indivíduos, 40 dos quais com necrose do miocárdio histologicamente confirmada, e outros 40 indivíduos controlo, sem focos de necrose miocárdica confirmada histologicamente.

Não se observou uma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos T8473C do gene que codifica a COX-2, G894T do gene que codifica a eNOS, C936T do gene que codifica o VEGF, T-374A do gene que codifica o RAGE e T1128C do gene que codifica o NPY, quando analisados isoladamente, e uma maior susceptibilidade à ocorrência de Enfarte Agudo do Miocárdio.

É de referir que os erros estatísticos de tipo II (falsos negativos) são um problema quando se recorre a amostras de pequeno tamanho, como a do presente trabalho. O risco ou benefício acrescido associados a um polimorfismo pode ser insignificante e, assim, apenas detectável com estudos extensivos, com pelo menos 1000 pares caso-controlo, segundo alguns autores. A interpretação dos dados obtidos no presente trabalho deve ter este aspecto em consideração.

No presente trabalho, encontrou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença simultânea do alelo C do polimorfismo T8473C da COX-2 e do alelo T do polimorfismo T-374A do RAGE e o risco de ocorrência de EAM. A homozigotia simultânea CC para o polimorfismo T8473C e TT para o polimorfismo T-374A esteve também significativamente associado a risco de ocorrência de EAM. A presença individual de cada um destes dois alelos já tinha sido associada a um risco acrescido de ocorrência de EAM noutros trabalhos.

## 9. Bibliografia Consultada:

ABE, A, SATO, K. HABUCHI, T, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region of vascular endothelial growth factor gene in Japanese population with or without renal cell carcinoma. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2002;198(3):181-90.

American Heart Association. International cardiovascular disease statistics. Dallas, TX: American Heart Association, 2003

BASTA G, LAZZERINI G, MASSARO M, *et al.* Advanced glycation end product activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*. 2001; 105: 816-822.

BRAUNWALD *et al.*: Tratado de Cardiologia 5ªEd. Mc Graw-Hill 1997. pp1202-1225.

BROWN K. S., L. A.J. Kluijtmans, I. S. Young, J. Woodside, J. W.G. Yarnell, D. McMaster, L. Murray, A. E. Evans, C. A. Boreham, H. McNulty, *et al.* Genetic Evidence That Nitric Oxide Modulates Homocysteine: The NOS3 894TT Genotype Is a Risk Factor for Hyperhomocystenemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23(6): 1014 - 1020.

CAM, F., C. SEKURI, I. TENGIZ, The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Thrombosis Research* 2004; 116 (4): 287-292

CAMPA, D., ZIENOLDDINY, Z., MAGGINI, V., SKAUG, V., HAUGEN, A., CANZIAN, F., Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, 2004; 25 (2): 229-235

CARNEIRO, A.V. Doença Coronária na Diabetes Mellitus. Factores de risco e Epidemiologia. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2004; 23(10): 1359-1366

CARVALHO e SILVA, J. M.: Colesterol., Lípidos e Doença Vascular. Lidel, 2000

CASAS, J., L. BAUTISTA, S.E. HUMPHRIES, A.D. HINGORANI Meta-Analysis of 26 Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease. *Circulation* 2004;109: 1359-1365

CASAS, J., COOPER, J., GEORGE J. MILLER, HINGORANI, HUMPHRIES, S. Investigating the Genetic Determinants of Cardiovascular Disease Using Candidate Genes and Meta-analysis of Association Studies. *Annals of Human Genetics* 2006; 70: 145-169

CHAVAKIS, T., A. BIERHAUS, P. NAWROTH RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes and Infection* 2004; 4: 1219-1225

CIPOLLONE, F., PRONTERA, C., PINI, B., *et al.* Overexpression of Functionally Coupled Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Synthase in Symptomatic Atherosclerotic Plaques as a Basis of Prostaglandin E<sub>2</sub>-Dependent Plaque Instability. *Circulation*. 2001;104:921-929

CIPOLLONE, F., A. IEZZI, M. FAZIA, M. ZUCHELLI, B. PINI, C. CUCCURULLO, D. CESARE, G. BLASIS, R. MURARO, R. BEI, F. CHIARELLI, A-M SCHMIDT, F. CUCCURULLO, A. MEZZETTI The Receptor RAGE as a Progression Factor Amplifying Arachidonate-Dependent Inflammatory and Proteolytic Response in Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation*. 2003; 108: 1070-1078

DAVIDGE, S. Prostaglandin H Synthase and Vascular Function. *Circulation Research* 2001; 89: 650-657.

DEMASI, M., CLELAND L G., COOK-JOHNSON, R. J., CAUGHEY G. E.; JAMES, M. J Dissociation between changes in COX-2 expression and eicosanoid synthesis. *Journal of Biology and Chemistry* 2003;. 278 (40), 38607-38616

DIAS, C.C, MATEUS, C., BETTENCOURT, N. SANTOS, L., ADÃO, L., SAMPAIO, F., FONSECA, C., SIMÕES, L., COELHO, R., RIBEIRO, V. Síndrome Coronária Aguda e Depressão. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2004; 24(4): 507-516

DING B. Distribution of the NPY 1128C Allele Frequency in Different Populations. *Journal of Neural Transmission* 2003; 110: 1199-1204

- EHARA, M. U., NARUKO, T., HAZE, K., ITOH, A., OTSUKA, M. Elevated Levels of Oxidized Low Density Lipoprotein Show a Positive Relationship With the Severity of Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2001;103;1955-1960
- ERBS, S., Y. BAITHER, A. LINKE, V. ADAMS, Y. SHU, K. LENK, S. GIELEN, R. DILZ, G. SCHULER, R. HAMBRECHT. Promoter but Not Exon 7 Polymorphism of Endothelial Nitric Oxide Affects Training-Induced Correction of Endothelial Dysfunction Synthase. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 2003; 23:1814-1819
- ERKKILA, A., V. LINDI, S. LEHTO, M. LAAKSO, M.I.J. UUSITUPA Association of Leucine 7 to Proline 7 Polymorphism in the Preproneuropeptide Y with Serum Lipids in Patients with Coronary Heart Disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 2002; 75, 260-264
- FALCONE, C., I. CAMPO, E. EMANUELE, M. BUZZI, D. GEROLDI, C. BELVITO, M. ZORZETTO, I. SBARSI, M. CUCCIA 374T/A Polymorphism of the RAGE Gene Promoter in Relation to Severity of Coronary Atherosclerosis *Clinica Chimica Acta* 2005; 354 (1-2): 111-116
- Falcone, C., Geroldi, D., Buzzia, M. P., Yusuf, Y., Fontana, J.M., Vignali, L., Boiocchie, C., Sbarsi, I., Cuccia, M. The -374T/A RAGE Polymorphism Protects Against Future Cardiac Events in Nondiabetic Patients with Coronary Artery Disease. *Archives of Medical Research* 2008; 39(3): 320-325
- FAN & WATANABE, J & WATANABE, T: Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2003; 10 (2): 63-71
- FERREIRA, J., MONTEIRO, P., MIMOSO P., Registo Nacional de Síndromas Coronárias Agudas. Resultados da Fase Hospitalar de 2002. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2004; 23 (10):1251-1272
- GANZ, P., VITA, J. Testing Endothelial Vasomotor Function: Nitric Oxide, a Multipotent Molecule. *Circulation* 2003;108;2049-2053
- GILROY DW, COLVILLE-NASH PR, WILLIS D, CHIVERS J, PAUL-CLARK MJ, WILLOUGHBY DA. Inducible Cyclooxygenase May Have Anti-inflammatory Properties. *Nature Medicine* 1999; 5: 698-701.
- GIRIA, J., CATARINO, J., ROCHA, E. Síndromes Coronárias Agudas e Outras Formas de Cardiopatia Isquémica no Serviço Nacional de Saúde no Período 1997-2001. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2004; 23 (6): 883-892
- GOUVEIA, M., BORGES, M., COSTA, J., OLIVEIRA, O., DAVID, C., VAZ CARNEIRO, A. Cardiologia baseada na evidência: Custos da Doença Atribuíveis à Hipercolesterolemia em Portugal. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2004; 23 (7-8): 1037-1054
- GULLESTAD, B. JØRGENSEN, T. BJURØ, J. PERNOW, J. LUNDBERG, C. DOTA, C. HALL, S. SIMONSEN, B. ÅBLAD Postexercise Ischemia Is Associated With Increased Neuropeptide Y in Patients With Coronary Artery Disease. **Circulation.** 2000;102:987
- GUZIK, J., E. BLACK, N. WEST, D. McDONALD, C. RATNATUNGA, R. PILLAI, KM. CHANNON. Relationship Between the G894T Polymorphism (Glu 298 Asp Variant) in Endothelial Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide-Mediated Endothelial Function in Human Atherosclerosis. *American Journal of Medical Genetics* 200; 100: 130-137
- HARRISON *et al.* (2002) *Harrison Medicina Interna* (15ª edição). McGraw-Hill.
- HASHIMOTO E, OGITA T, NAKAOKA T, MATSUOKA R, TAKAO A, KIRA Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *American Journal of Physiology* 1994; 267: 1948-1954.
- He *et al.*: Vascular Endothelial Growth Factor Signals Endothelial Cell Production of Nitric Oxide and Prostacyclin. *Journal of Biology and Chemistry* 1999; 274 (35), 25130-25135
- HEESCHEN C *et al.*: Prognostic significance of Angiogenic Growth Factor Serum Levels in Patients with Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2003;107: 524-530.
- HINGORANI, A.D., LIANG, C.F., FATIBENE, J. *et al.*. 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.

- HU, Z., MIAO, X., MA, H., WANG, X., TAN, W., WEI, Q., LIN, D., SHEN H. A common polymorphism in the 3'UTR of cyclooxygenase 2/prostaglandin synthase 2 gene and risk of lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer* 2005; 48 (1): 11-17
- HUDSON, B., STICKLAND, M., FUTERS, T., GRANT, P. Study of the -429 T/C and T-374A Receptor For Advanced Glycation End Products Promoter Polymorphisms in Diabetic and Nondiabetic Subjects With Macrovascular Disease. *Diabetes Care* 2004;
- INOUE, M., H. ITOH, M. UEDA, T. NARUKO, A. KOJIMA, R. KOMATSU, K. DOI, Y. OGAWA *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Coronary Atherosclerotic Lesions Possible Pathophysiological Significance of VEGF in Progression of Atherosclerosis. **Circulation**. 1998; 98: 2108-2116
- ICHIHARA, S., Y. YAMADA, T. FUJIMURA, N. NAKASHIMA, M. YOKOTA. Association of a Polymorphism of the Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene With Myocardial Infarction in the Japanese Population. *The American Journal of Cardiology* 1998; 81: 83-86
- JACOBS, E., H. FEIGELSON, E. BAIN, K. BRADY, C. RODRIGUEZ, V. STEVENS, A. PATEL, *et al.* Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the Cancer Prevention Study II cohort. *Breast Cancer Research* 2006 <http://breast-cancer-research.com/content/8/2/R22>
- JARAMILLO, P., A. MUÑOZ, C. LANAS, F. LANAS, L. SALAZAR. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism in Chilean subjects with coronary artery disease and controls. *Clinica Chimica* 2006; 371 (1-2): 102-106
- JIA, C., Z. LIU, T. LIU, Y. NING. The T1128C Polymorphism of Neuropeptide Y Gene in a Chinese Population. *Archives of Medical Research* 2005; 36 (2): 175-177
- KAENG W. L., GREGORY Y., A. BLANN, Plasma Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin Receptor Tie-2, and Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Acute Coronary Syndromes. **Circulation**. 2004; 110: 2355-2360
- KALLIO, J., U. PESONEN, K. KAIPIO, M. K. KARVONEN, U. JAAKKOLA, O. J. HEINONEN, M. I. J. UUISTRA, M. KOULU. Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in humans. *The FASEB Journal*. 2001; 15: 1242-1244.
- KANAUCHI, M. N. TSUJIMOTO, T. HASHIMOTO. Advanced Glycation End Products in Nondiabetic Patients With Coronary Artery Disease *Diabetes Care* 2001; 24:1620-1623
- KARVONEN, M., U. PESONEN, M. KOULU, L. NISKANEN, M. LAAKSO, A. RISSANEN, J. M. DEKKER, L. HART, R. VALVE, M. I. J. UUSITUPA** Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels **Nature Medicine** 1998; 4, 1434 - 1437
- KARVONEN, M., V. VALKONEN, T. LAKKA, R. SALONEN, M. KOULU, U. PESONEN, T. TUOMAINEN, J. KAUKANEN, *et al.* Leucine7 to proline7 polymorphism in the preproneuropeptide Y is associated with the progression of carotid atherosclerosis, blood pressure and serum lipids in Finnish men. *Atherosclerosis* 2001; 159 (1): 145-151
- KAWASHIMA, S., The Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Pathophysiology of Atherosclerosis. *Endothelium* 2004; 11: 99-107
- KILHOVD, B., A. JUUTILAINEN, S. LEHTO, T. RÖNNEMAA, P. TORJESEN; K. BIRKELAND; T. BERG *et al.* High Serum Levels of Advanced Glycation End Products Predict Increased Coronary Heart Disease Mortality in Nondiabetic Women but not in Nondiabetic Men A Population-Based 18-Year Follow-Up Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005; 25: 815-825
- KHURANA, R., M. SIMONS, J. MARTIN, I. ZACHARY, Role of Angiogenesis in Cardiovascular Disease. **Circulation** 2005; 112:1813-1824.
- KIMURA, K., T. HASHIGUCHI, T. DEGUCHI, S. HORINOUCHE, T. UTO, H. OKU, S. SETOYAMA *et al.* Serum VEGF As a prognostic factor of atherosclerosis. *Etherosclerosis* 2006; 194 (1): 182-188

- KOLODIE FD, GOLD HK, BURKE AP, FOWLET DR, KRUTH HS, WEBER DK, FARB A, GUERRERO LJ, HAYASE M, KUTYS R, NARULA J, FINN AV, VIRMANI R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349: 2316–2325.
- KOYAMA, H., T. SHOJI, H. YOKOYAMA, K. MOTOYAMA K. MORI, S. FUKUMOTO, M. EMOTO *et al*. Plasma Level of Endogenous Secretory RAGE Is Associated With Components of the Metabolic Syndrome and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 2005;25:2587
- KRIPPL P, LANGSENLEHNER U, RENNER W, YAZDANI-BIUKI B, WOLF G, WASCHER TC, PAULWEBER B, HAAS J, SAMONIGG H. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *International Journal of Cancer*. 2003;106:468–471.
- KUBIS, N. BERNARD I. LEVY Angiogenic effect of prostaglandin I<sub>2</sub> in relation with its effect on PPAR nuclear receptors *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2004; 36 (3): 331-332
- KUBOKI, K., Z. JIANG, N. TAKAHARA, S. WOO HA, M. IRASHI, T. YAMAUCHI, E. FEENER, T.HERBERT, C.J. RHODES, G.KING. Regulation of Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells and *In Vivo*. *Circulation* 2000; 101 (6): 676-681
- KUO, L. E.; Zukowska, Z. Stress, NPY and vascular remodeling: Implications for stress-related diseases. *Peptides* 2007; 28 (2): 435-440
- LANDMESSER, Ulf; *et al*. The clinical significance of endothelial dysfunction: Ischemic heart disease. *Current Opinion in Cardiology*. November 2005; 20(6): 547-551.
- LANGSENLEHNER, U. YAZDANI-BIUKI B., EDER T., RENNER, W., WASCHER T.C., PAULWEBER, B., WEITZER *et al*. The Cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C Polymorphism is Associated With Breast Cancer Risk. *Clinical Cancer Research* 2006; 12(4): 1392-4
- LEAL, A., OLIVEIRA, J., AMADO, J., GOMES, L., MAGALHÃES, T. Antropometria e Biometria Cardíaca. *Revista Portuguesa e Cardiologia* 2005; 24(4): 521-530
- LOSCALZO J. Nitric oxide and vascular disease. *New England Journal of Medicine* 1995; 333: 251–253.
- LOSCALZO, J. Functional Polymorphisms in a Candidate Gene for Atherothrombosis: Unraveling the Complex Fabric of a Polygenic Phenotype . *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41 (6): 946-948
- MARENBERG ME, RISCH N, BERKMAN LF Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *New England Journal of Medicine*. 1994;330:1041–1046.
- MARQUES DA SILVA, P. José Maniel Carvalho e Silva, Victor Gil Prevenção cardiovascular: Recomendações para a Abordagem do Risco Vascular Associado às Dislipidemias. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2002;21 (10):1201-1209
- MCGEER, P., MCGEER, E., YASOJIMA, K., Expression of COX-1 and COX-2 mRNAs in atherosclerotic plaques. *Experimental Gerontology* 2002; 37 (7): 925-929
- MARKUS, H.,Y. RUIGROK, N. ALI, J.F. POWELL. Endothelial Nitric Oxide Synthase Exon 7 Polymorphism. Ischemic Cerebrovascular Disease, and Carotid Atheroma Stroke 1998; 29:1908-1911
- MILLER, S. A., DYKES, D. D., POLESKY, H. F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Research* 1988, 16: 1216-1219
- Mitchell, G.C., Wang, Q., Ramamoorthy, P., Whim, D. A Common Single Nucleotide Polymorphism Alters the Synthesis and Secretion of NPY. *The Journal of Neuroscience* 2008; 28(53): 14428-14434
- MORENO P.R., FALK E., PALACIOS I.F., NEWELL, J.B., FUSTER, V., FALLON, J.T., Macropages infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; 90(2):775-8.
- MORRIS MJ, Cox HS, Lambert GW, Kaye DM, Jennings GL, Meredith IT, Esler MD. Region- ecific neuropeptide Y overflows at rest and during sympathetic activation in humans. *Hypertension* 1997;29:137–143.

- MUROHARA T, HOROWITZ JR, SILVER M, TSURUMI Y, CHEN D, SULLIVAN A, ISNER JM: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998; 97:99-107
- NABER C., BAUMGART, D., ALTMAN, C. *et al.* eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *American Journal of Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 1908–1912
- NAVARRO-LÓPEZ F. Bases genéticas de la enfermedad coronaria. *Revista Española de Cardiología* 2002; 55: 413-31.
- NISKANEN, L., M.K. KARVONEN, R. VALVE, M. KOULU, U. PESONEN, M. MERCURI, R. RAURAMAA, J. TÖYRY, M. LAAKSO, M. UUSITUPA Leucine 7 to Proline 7 Polymorphism in the Neuropeptide Y Gene Is Associated with Enhanced Carotid Atherosclerosis in Elderly Patients with Type 2 Diabetes and Control Subjects *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85 (6): 2266-2269
- OEMAR, B., M.TSCHUDI, N. GODOY, V. BROVKOVICH, T. MALINSKI, T. LÜSCHER Reduced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Production in Human Atherosclerosis. *Circulation* 1998;97;2494-2498
- OKAMOTO, T *et al.* Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. **The FASEB Journal.** 2002;16:1928-1930
- PALINSKI, W. *et al.* Immunological Evidence for the Presence of Advanced Glycosylation End Products in Atherosclerotic Lesions of Euglycemic Rabbits. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 1995;15:571-582
- PARK, J-M *et al.* Relationship between *cyclooxygenase 8473T>C* polymorphism and the risk of lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer* 2006; 70: 1471-2407
- PARK, K-W, YOU, S OH, I-H CHAE, H-S KIM, B-H OH, M-M LEE and Y-B PARK Association of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism with acute coronary syndrome in Koreans. *Heart* 2004;90;282-285
- PETTERSSON-FERNHOLM, C.FORSBLOM, B. HUDSON, M. PEROLA, P. GRANT, Per-Henrik Groop for the FinnDiane Study Group The Functional T-374A RAGE Gene Polymorphism Is Associated With Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes* 2003; 52:891-894
- PORTOLES, O., SORLI, J.V., GONZALEZ, J.I., RIUZ de la FUENTE, S., RAMIREZ, J.P., CORELLA, D. Low prevalence of the Leu7/Pro polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in the Spanish Mediterranean population *Medicina Clinica (Barcelona)* 2003; 120(9): 337-9.
- RENNER W, KOTSCHAN S, HOFFMANN C, OBERMAYER-PIETSCH B, PILGER E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *Journal of Vascular Research* 2000; 37: 443–448.
- ROLFS, A., SCHULLER, I., FINCKH, U. & WEBER-ROLFS, I. (1992). PCR principles and reaction components, 1-18. In: *PCR: Clinical diagnostics and research*, Springer.
- SABATINE, M., SEIDMAN, J., SEIDMAN, C. Cardiovascular Genomics **Circulation** 2006; 113: 450-455
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., *et al.* *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- SANAK M., SZCZEKLIK, W., SZCZEKLIK, A. Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandins production in bronchial asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 116 (1): 221-223
- SARKAR R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1996;78:225–230.
- SENTHIL, D., M. Raveendran, Y. Shen, B. Utama, D. Dudley, J. Wang, X. Wang Genotype-Dependent Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and Its Regulatory Proteins in Cultured Endothelial Cells. *DNA Cell Biology* 2005; 24(4): 218-224

- SHIMASAKI, Y., Yasue, H., Yoshimura, M. *et al.* Association of the Missense Glu298Asp Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene With Myocardial Infarction *JACC* 1998; 31 (7): 1506–1510
- SØRENSEN, M., AUTRUPB, H., TJØNNELANDA, A., OVERVADC, K., RAASCHOU-NIELSEN, O. A genetic polymorphism in prostaglandin synthase 2 (8473, T/C) and the risk of lung cancer *Cancer Letters* 2005; 226: 49–54
- SIASOS, G. D. TOUSOULIS, C. ANTONIADES, E. STEFAN & WATANABEADI, C. STEFAN & WATANABEADIS L-Arginine, the substrate for NO synthesis: An alternative treatment for premature atherosclerosis? *International Journal of Cardiology* 2006; 116 (3): 300-308
- SIMMONS, D., BOTTING, R., Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 387–437
- SING, C., STENGÅRD, S., KARDIA, S. Genes, Environment, and Cardiovascular Disease *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 1190-1196
- SOBEY, C. Neurogenic Atherosclerosis Mediated by Neuropeptide Y *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003; 23: 1137.
- SPENCE M., P.McGLINCHEY, C. PATTERSON, A. ALLEN, G. MURPHY Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and ischemic heart disease. *American Heart Journal* 2004; 148 (5): 847-851
- STRYER, L. *Bioquímica*, 4ª ed, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro
- STEPHENS J . W. & Humphries S. E. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications *Journal of Internal Medicine* 2003; 253: 120–127
- SMITH W.L. and LANDS W.E. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis. *Biochemistry* 1972; 11: 3276–3285
- STURM A.C. Cardiovascular genetics: are we there yet? *Journal of Medical Genetics* 2004;41:321-323
- VAZ SERRA, A. Stress e Doenças Córdio-Vasculares *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2002;21 (10) :1173-1187
- VINCENTI, V., C. CASSANO, M. ROCCHI, M. PERSICO, Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3 **Circulation** 1996;93:1493-1495
- VIRMANI, R., F. KOLODZIE; A. BURKE, A. FINN, K. GOLD, T.N. TULENKO; S.WRENN Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture Angiogenesis as a Source of Intraplaque Hemorrhage *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2005; 25:2054-2056
- Vogel, U., Segel, S., Tjønneland, A., Thoustrup, A., Wallin, H., Jensen, M., Andersen, P.S., Overvad, K. Associations Between COX-2 Polymorphisms, Blood Cholesterol and Acute Coronary Syndrome. *Atherosclerosis* 2009; 209 (1): 155-162
- WALLERSTEDT, S., SKRTIC, S., ERIKSSON, A., OHLSSON, C., HEDNER, T. Association analysis of the polymorphism T1128C in the signal peptide of neuropeptide Y in a Swedish hypertensive population. *Journal of Hypertension* 2004; 22(7):1277-1281
- World Health Organization. *Reducing Risks Promoting Healthy Life.* Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2002.
- WORTHLEY, S.G., OSENDE, J.I., HELFT, G., BADIMON, J.J., FUSTER, V. Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mout Sinai Journal of Medicine* 2001; 68(3): 167-81
- YAMAGISHI, S., H. ADACHI, K. NAKAMURA, T. MATSUI, Y. JINNOUCHI, K. TAKENAKA *et al.* Positive association between serum levels of advanced glycation end products and the soluble form of receptor for advanced glycation end products in nondiabetic subjects. *Metabolism* 2006; 55 (9): 1227-1231
- YAN, S. R. RAMASAMY, Y. NAKA, A.-M SCHMIDT Glycation, Inflammation, and RAGE : A Scaffold for the Macrovascular Complications of Diabetes and Beyond. *Circulation Research* 2003; 93: 1159

ZEE, R., J. ROMERO, J. GOULD, D. RICUPERO, P. RIDKER, Polymorphisms in the Advanced Glycosylation End Product-Specific Receptor Gene and Risk of Incident Myocardial Infarction or Ischemic Stroke *Stroke* 2006; 37: 1686

Zhang, X., Miao, X., Tan, M., *et al.* Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association With Risk of Esophageal Cancer *Gastroenterology* 2005;129:565-576

ZHOU, Z., K. WANG, M. PENN, S. MARSO, M. LAUER, F. FORUDI, X. ZHOU, W. QU, Y. LU, *et al.* Receptor for AGE (RAGE) Mediates Neointimal Formation in Response to Arterial Injury *Circulation*. 2003;107:2238

ZUKOWSKA, Z., D. S. GRANT, E.W. LEE A Novel Mechanism for Ischemic Angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2003; 13 (2). 86-92

ZUKOWSKA-GROJEC, Z., E. KARWATOWSKA-PROKOPCZUK, W. ROSE, J. RONE, S. MOVAFAGH, H. JI, Y. YEH, W. CHEN, H. K. KLEINMAN, E. GROUZMANN, , D.S. GRANT A Novel Angiogenic Factor From the Sympathetic Nerves and Endothelium. ***Circulation Research*** 1998; 83:187-195