

A BIOLOGIA MOLECULAR E OS AVANÇOS NA PREVENÇÃO DA RUPTURA DA PLACA VULNERÁVEL

MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA IZAR, FRANCISCO ANTONIO HELFENSTEIN FONSECA,
SÍLVIA SAIULI MIKI IHARA, WALDIR GABRIEL MIRANDA RELVAS

Universidade Federal de São Paulo — UNIFESP

Endereço para correspondência: Rua Pedro de Toledo, 458 — Vila Clementino — CEP 04039-001 — São Paulo — SP

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, complexa, que afeta seletivamente a rede arterial, resultando de uma ação combinada de fatores genéticos e ambientais, e a ruptura da placa e a trombose subsequente são eventos desencadeantes das síndromes coronárias agudas.

A biologia molecular, como ferramenta, contribui para o desenvolvimento de estratégias que permitam o reconhecimento da placa vulnerável e promovam sua estabilização. Novas abordagens genômicas têm permitido a identificação de grupos de genes que determinam tanto a suscetibilidade como a resistência à aterosclerose e às complicações trombóticas. O conhecimento do perfil dos polimorfismos genéticos poderá facilitar o rastreamento dos indivíduos com placas vulneráveis e viabilizar novas abordagens terapêuticas e melhor prognóstico clínico. Portanto, alguns genes que afetam o metabolismo lipídico, a hemostasia, a inflamação, a função endotelial, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, a resistência à insulina e o estresse oxidativo aparecem como novas perspectivas para genes candidatos.

O estudo da expressão gênica diferencial, por meio de técnicas como DD/RT-PCR, SAGE ou "cDNA array", permitirá analisar um painel de genes, cujas interações das proteínas por eles codificadas resultam no desfecho do processo de ruptura da placa. Finalmente, a possibilidade de emprego da terapia gênica para corrigir doenças de herança mendeliana ou na prevenção de doenças de cunho degenerativo apresenta-se como uma proposta promissora no advento das novas técnicas que farão parte da Medicina do futuro.

Palavras-chave: aterosclerose, placa vulnerável, polimorfismos genéticos, terapia gênica.

(Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2002;4:680-93)

RSCESP (72594)-1259

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, complexa, que afeta preferencialmente a árvore arterial em áreas de bifurcações e curvaturas, em que o fluxo laminar uniforme é alterado⁽¹⁻⁴⁾. As lesões iniciais caracterizam-se pelo acúmulo de lipídeos no subendotélio, que sofre modificações oxidativas na íntima vascular e ainda inibem a produção de óxido nítrico. As células endoteliais são ativadas e passam a produ-

zir substâncias pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento, como o M-CSF, que tem participação na proliferação e na diferenciação dos macrófagos. Enquanto as selectinas (P e E) favorecem o rolamento dos monócitos na superfície endotelial, ligando-se aos carboidratos de sua superfície, as integrinas permitem sua firme adesão ao endotélio. Os macrófagos, por meio de seus receptores de varredura, cuja expressão depende de fatores de transcrição (PPARs γ), citoci-

nas (TNF- α) e interferon, incorporam as partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas por peroxidação, lipólise, proteólise e agregação, formando as chamadas células espumosas. Células musculares lisas migram da média para a íntima e passam a sintetizar matriz, formando as lesões fibrosas, com a participação de citocinas e fatores de crescimento. Reações imunes envolvendo linfócitos T e B, com expressão de CD-40 e de seu ligante CD-40L, propiciam o desenvolvimento de lesões avançadas, com produção de vários mediadores da inflamação e de metaloproteases de matriz. A instalação de um trombo em uma placa que sofre ruptura ou erosão e que desencadeia o evento coronário agudo depende mais da composição e da vulnerabilidade da placa que de seu grau de estenose. Assim, placas vulneráveis geralmente têm conteúdo lipídico exuberante, capa fibrosa delgada e grande número de células inflamatórias. Sua manutenção reflete os processos de síntese e degradação de matriz, influenciados pelos produtos da inflamação. Macrófagos e células musculares lisas sintetizam proteases, entre elas gelatinases, collagenases e estromelisinase. A ruptura ocorre, freqüentemente, nos ombros das lesões, ricos em células espumosas, expondo o subendotélio, que contém o fator tecidual, e desencadeando o processo de trombose⁽⁴⁾.

O estudo de marcadores genéticos e de abordagens terapêuticas que permitam a identificação e o tratamento precoces da placa vulnerável reveste-se de grande importância, uma vez que as doenças cardiovasculares representam altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo um alvo para o desenvolvimento de tecnologias de ponta.

Este artigo irá abordar o emprego da biologia molecular como ferramenta diagnóstica e terapêutica no manuseio do paciente sob risco de apresentar uma placa vulnerável. Doenças genéticas raras com herança mendeliana e polimorfismos genéticos comuns foram descritas em associação com eventos coronários. Os genes candidatos estão entre os que regulam a expressão de lipoproteínas, marcadores da inflamação e hemostasia, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, a função endotelial e o estresse oxidativo. Expressão gênica diferencial em células vasculares e sanguíneas por interações gene-gene e gene-ambiente pode ser considerada a base molecular da doença. É avaliada pelo método do "high through-put", como "cDNA

array", SAGE e DD/RT-PCR, que são técnicas que permitem visualizar os genes expressos de forma diferencial quando comparados ao tecido normal. Finalmente, as estratégias em terapia gênica para promover a prevenção da ruptura e a estabilização da placa vulnerável terão espaço num futuro próximo. Entre essas estratégias incluem-se a redução dos níveis de LDL-colesterol por transferência do gene do receptor de LDL em indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar tipo IIb, que apresentem deficiência nos receptores hepáticos de LDL-colesterol, e o aumento dos níveis do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) por terapias que aumentem a expressão de apolipoproteína AI, LCAT, ou suprimam a CETP, entre outras.

POLIMORFISMOS QUE AFETAM O METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

Elevações do LDL-colesterol

Hipercolesterolemia familiar

É uma condição clínica relativamente comum, em que o desenvolvimento da aterosclerose prematura e dos eventos coronários é precipitado pelos níveis muito elevados de LDL-colesterol. Está presente em cerca de 5% dos pacientes com infarto do miocárdio. Foram identificados quatro tipos de defeitos genéticos, cuja expressão clínica se dá pela hipercolesterolemia familiar: 1) defeitos no receptor de LDL, com mais de 600 mutações já descritas, em que a expressão é variável, desde a ausência de síntese do receptor até defeitos funcionais menores; 2) defeitos na apolipoproteína B-100 (apo B), em que há alteração da afinidade entre a apo B e o seu receptor B/E, ou ainda no peptídeo sinal da apo B, afetando a transcrição do gene apo B; 3) hipercolesterolemia autossômica recessiva; e 4) sitosterolemia⁽⁵⁻⁹⁾.

Polimorfismos da apolipoproteína E (apo E)

Variações naturais do gene que codifica a apolipoproteína E originam suas três isoformas (ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4), cuja afinidade pelo receptor B/E difere. Conseqüentemente, os níveis de colesterol são determinados pela isoforma específica. Essas isoformas respondem por 3% a 5% da variação dos níveis de LDL-colesterol na população geral, e os indivíduos ϵ 4 apresentam os maiores níveis de colesterol e risco coronário 40% maior que o observado em ϵ 3 ou ϵ 2, além de maior risco de morte e melhor resposta

terapêutica à sinvastatina⁽⁹⁻¹¹⁾. Por outro lado, os homozigotos para o alelo E2 podem desenvolver um distúrbio chamado disbetalipoproteinemia, em que há acúmulo de partículas remanescentes e que resulta em aterosclerose prematura.

Elevações da lipoproteína (a)

Polimorfismos da apolipoproteína (a)

Os níveis de lipoproteína (a) [Lp(a)] são determinados geneticamente e variam amplamente na população (de < 0,1 mg/dl a > 200 mg/dl).⁽¹²⁾ Estudos epidemiológicos evidenciaram que níveis acima de 20 mg/dl se associavam ao infarto do miocárdio, ao acidente vascular cerebral e à insuficiência vascular periférica⁽¹³⁻¹⁵⁾. O componente protéico da Lp(a) contém uma grande apo (a), cuja função é desconhecida, mas que guarda semelhança estrutural com o precursor do plasminogênio, pela presença de número variável de cópias de seu Kringle IV. A apo (a) é incapaz de degradar a fibrina; no entanto, compete com o sítio de ligação do plasminogênio. Os níveis de Lp(a) sérica guardam relação inversa com o tamanho da apo (a), e indivíduos com isoformas de baixo peso molecular estão sujeitos a risco aumentado de doença arterial coronária⁽¹⁶⁾. A presença de isoformas de baixo peso molecular e do alelo E4 da apo E foi associada a risco de mortalidade três vezes maior no estudo 4S, enquanto o tratamento com sinvastatina foi acompanhado de redução de 80% nessas taxas.⁽¹¹⁾

Elevações dos triglicérides

Polimorfismos da lipoproteína lipase

A lipoproteína lipase (LPL) é a principal enzima do catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides (quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa — VLDL), situando-se estrategicamente ancorada ao endotélio vascular⁽⁶⁾. O gene da LPL é sede de muitas mutações (cerca de 40). Algumas situam-se no domínio C terminal, e afetam sua função de ligante; outras, situam-se na porção N terminal, deprimem a função enzimática, e ocasionam elevações da VLDL e da lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e redução da HDL⁽⁶⁾. São conhecidas três mutações do gene da LPL que afetam o domínio N: Asp9Asn (D9N), Asn291Ser (N291S) e Gly188Glu. As duas primeiras ocorrem em 3% a 5% em sua forma heterozigota e associam-se a aumento de 20% a 30% nos triglicérides e a redução de cerca de 10 mmol/l na

HDL do plasma, e a risco coronário 30% maior. A Gly188Glu é mais rara (1/1.000), mas deprime mais a função enzimática, havendo aumento de 80% nas taxas de triglicérides, redução de 25 mmol/l nos níveis de HDL e risco coronário cinco vezes maior⁽¹⁷⁾. Outro polimorfismo da LPL (Ser447Ter), que ocorre em 20% da população, parece ser protetor por promover maior afinidade pelo substrato, associando-se a menores níveis de triglicérides, maiores níveis de HDL e risco coronário 20% menor⁽¹⁷⁾.

Polimorfismos da apolipoproteína CIII

Polimorfismos no grupamento gênico A-I/C-III/A-IV foram descritos em associação com doença arterial coronária⁽¹⁸⁾. A apo C-III é o principal constituinte protéico dos quilomícrons e da VLDL⁽¹⁹⁾. Os níveis de apo C-III correlacionam-se com a trigliceridemia, tendo-se demonstrado, "in vitro", papel inibitório da apo C-III sobre a LPL e a captação hepática das partículas remanescentes⁽²⁰⁾.

Reduções do HDL-colesterol

Polimorfismos da apolipoproteína AI

Polimorfismos no gene apo AI que resultam em ausência de apolipoproteína AI no plasma associam-se a níveis extremamente baixos de HDL-colesterol, xantomas e doença arterial coronária. Aqueles que cursam com deficiências parciais de apo AI, porém, como na apo AI Milano, essa associação não é tão clara, apesar de níveis baixos de HDL⁽²¹⁾.

Polimorfismos do gene ABC-1

O transportador ABC-1 foi identificado recentemente como o gene responsável pela doença de Tangier⁽²²⁾. Os pacientes afetados têm um defeito na remoção celular do colesterol, chegando a apresentar valores de HDL-colesterol próximos de zero no plasma, e um depósito maciço de ésteres de colesterol nos tecidos, particularmente nos órgãos linfóides. Embora tenha herança mendeliana autossômica recessiva e rara, foram descritos outros polimorfismos no transportador ABC-1 (-477T/C), em que os homozigotos (TT) e os heterozigotos (TC) apresentaram reduções modestas de HDL-colesterol e de apo AI, porém com doença coronária grave à angiografia⁽²³⁾.

Polimorfismos do gene lecitina:colesterol aciltransferase

Deficiência de lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) é uma condição recessiva, que resulta de mutações estruturais do gene da LCAT,

em que a gravidade das manifestações fenotípicas depende da deficiência ser completa (deficiência familiar de LCAT) ou incompleta ("fish eye disease"). Os níveis de HDL são muito baixos (1 mg/dl a 10 mg/dl), sendo a HDL do tipo nascente, os níveis de apo AI estão reduzidos em cerca de 25% e existe associação com coronariopatia prematura, insuficiência renal e opacidade da córnea⁽²⁴⁾.

Polimorfismos da proteína de transferência de ésteres de colesterol

Foram descritas quatro mutações do gene da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) entre os japoneses. Uma mutação em região intrônica presente em 2% da população acompanhava-se de níveis de HDL acima de 100 mg/dl nos homozigotos. Em outra, no exon 14 (D442G), os níveis de HDL não são tão elevados, mas está associada a excesso de risco de doença arterial coronária. Entretanto, ajustada para outros fatores de risco e para os níveis de HDL, essa associação só foi observada em homens com HDL < 60 mg/dl⁽²⁵⁾. Outro polimorfismo, Taq 1-B do gene CETP, tem efeito pró-aterogênico. No estudo REGRESS, os portadores do genótipo B1B1 (35%) tiveram maior progressão da doença arterial coronária que os outros genótipos e melhor resposta terapêutica.⁽²⁶⁾

POLIMORFISMOS QUE AFETAM O ESTRESSE OXIDATIVO E A FUNÇÃO ENDOTELIAL

Polimorfismos da paraoxonase

A paraoxonase é uma aril-esterase associada à HDL, que hidrolisa os peróxidos lipídicos e destrói moléculas pró-inflamatórias produzidas pela oxidação das LDL. Embora presente na parede arterial normal, suas concentrações elevam-se de forma importante na placa de aterosclerose, possivelmente em resposta ao aumento do estresse oxidativo⁽²⁷⁾. Existe variação interindividual da ordem de 10% a 40% na atividade enzimática da paraoxonase (PON), a qual é atribuída parcialmente à presença de dois polimorfismos: PON 1-192, com substituição de uma arginina por glutamina no códon 192 (R192Q), e PON 1-55, em que uma leucina substitui uma metionina no códon 55 (L55M). Em estudos experimentais, demonstrou-se que a capacidade das HDL em proteger das modificações oxidativas era claramente maior nos indivíduos QQ/MM que nos RR/LL⁽²⁸⁾. Nos diabéticos tipo 2, é

particularmente importante a redução da atividade enzimática da paraoxonase na presença desses polimorfismos⁽²⁹⁾. O estudo REGICOR confirmou que o alelo R aumentava o risco de infarto em diabéticos⁽³⁰⁾ e que esse risco chegava a 60% em fumantes⁽³¹⁾.

Polimorfismos do sistema NADPH oxidase

A principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) são as enzimas oxidativas, entre elas NADH/NADPH oxidase. Foi descrito um polimorfismo C242T do gene p22phox, um dos elementos de transporte de elétrons da NADH oxidase microssômica das células musculares lisas, que diminui a produção do ânion superóxido na parede vascular e melhora a função do endotélio coronário, sendo sugerido seu papel protetor⁽³²⁾.

Polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial

A capacidade de contrapor-se ao estresse oxidativo e manter a homeostase endotelial pode depender de um polimorfismo na óxido nítrico (NO) sintase (NOS 3 G894T). Demonstrou-se que os homozigotos GG têm a capacidade vasodilatadora diminuída às custas da menor produção de NO⁽³³⁾. Isso poderia ser um fator de risco de grande magnitude, particularmente na angina vasoespástica⁽³⁴⁾.

Polimorfismos da metilenotetraidrofolato reductase e cistationa β sintetase

A hiper-homocisteinemia tem papel aterogênico, pois provoca disfunção endotelial, além de aumentar o estresse oxidativo e o risco trombótico⁽⁶⁾. Na variante termolábil da metilenotetraidrofolato reductase (MTHFR) (C677T), uma meta-análise demonstrou que os indivíduos CT e TT têm risco coronário ligeiramente aumentado, com graduação dose-efeito com o número de alelos T⁽³⁵⁾. Já a deficiência de cistationa β sintetase (CBS), doença mendeliana rara, cursa, em sua forma homozigota, com aterosclerose generalizada e prematura grave, e complicações tromboembólicas arteriais e venosas antes dos 30 anos⁽⁶⁾.

POLIMORFISMOS DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

Angiotensinogênio, enzima conversora da angiotensina e receptor AT1 da angiotensina II

O polimorfismo M235T do angiotensinogê-

nio (AGT) foi descrito como capaz de duplicar o risco de infarto e de doença arterial coronária nos indivíduos TT⁽³⁶⁾, enquanto para o polimorfismo inserção/deleção de uma sequência Alu no íntron 16 do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) (I/D) os portadores do alelo D possuem maior atividade enzimática da ECA tanto plasmática como tecidual, e, conseqüentemente, maiores níveis de angiotensina II. No genótipo DD, presente em 28% a 31% dos indivíduos, os níveis são duas vezes maiores que nos II, e há excesso de risco de infarto do miocárdio^(37, 38). Há ainda um polimorfismo do receptor AT1 da angiotensina II (A1166C), com maior suscetibilidade à cardiopatia isquêmica em presença do alelo C, sendo descrito efeito sinérgico dos alelos DD da ECA e AT1R-CC⁽³⁹⁾. Há ainda um polimorfismo descrito para o gene CYP11B2, que regula a síntese da aldosterona, associado à extensão da doença arterial coronária⁽⁴⁰⁾.

POLIMORFISMOS DOS GENES RELACIONADOS À HEMOSTASIA

Fibrinogênio

O fibrinogênio (FNG) é uma proteína dimérica formada por duas subunidades idênticas, cada qual com três cadeias (α , β , γ), codificadas por três genes distintos situados no braço longo do cromossomo 4. As concentrações de fibrinogênio dependem, em parte, dos genótipos. Vários polimorfismos são descritos na cadeia β (FNG B), entre os quais o -455G/A. No estudo ECTIM, os portadores do alelo -455A, que representam 25% da população, tinham níveis maiores de fibrinogênio, com relação dose-efeito para o número de alelos A, e associaram-se ao infarto do miocárdio⁽⁴¹⁾ e à doença vascular periférica⁽⁶⁾.

Inibidor do ativador do plasminogênio

Polimorfismo determinado pela presença de 4 ou 5 guaninas (4G/5G) em uma região promotora do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) afeta sua transcrição e seus níveis plasmáticos, que são 50% maiores nos homozigotos 4G/4G, com diminuição da atividade fibrinolítica e risco discretamente aumentado de infarto^(42, 43).

Receptores plaquetários

Glicoproteína Ia-IIa

É o principal receptor constitutivo para o co-

lágênio na superfície plaquetária, envolvido na adesão à matriz subendotelial⁽⁴⁴⁾. Um dimorfismo (C807T) afeta a densidade do receptor nas plaquetas e sua atividade, associando-se a um excesso de risco de infarto (1,6 vez), especialmente em indivíduos jovens⁽⁴⁵⁾.

Glicoproteína Ib-V-X

É o receptor constitutivo para o fator de von Willebrand (vWF), que modula a ligação da plaqueta ao vWF presente na matriz perivascular⁽⁴⁴⁾. São descritos dois polimorfismos (C/T 3550, no sistema aloantigênico, e outra em que há número variável de repetições de uma sequência "tandem"), que afetam o fenótipo e se associam ao risco aumentado de infarto do miocárdio⁽⁴⁶⁾, embora resultados negativos também tenham sido descritos.

Glicoproteína IIb/IIIa

É o receptor plaquetário para o fibrinogênio. Quando em situação de repouso, esse receptor tem baixa afinidade pelo fibrinogênio, porém após ativação essa afinidade aumenta de forma significativa⁽⁴⁴⁾. São descritas variações do gene glicoproteína (Gp) IIb/IIIa, sendo a variante PLA2, resultante de uma substituição Pro/Leu no aminoácido 33, associada a maior agregação plaquetária e infarto do miocárdio, especialmente em idade prematura⁽⁴⁴⁾.

Os demais polimorfismos, como os do fator V, fator tecidual, fator VIII, fator de von Willebrand, TFPI e receptor da proteína C, carecem de maior investigação para avaliar sua associação com o risco aterotrombótico⁽⁴⁴⁾.

POLIMORFISMOS DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Várias interleucinas estão envolvidas na resposta inflamatória da aterosclerose, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa), as quais aumentam o risco para eventos coronários. Outras citocinas são descritas como relacionadas com efeitos antiinflamatórios na aterosclerose, como interleucina-10 (IL-10), a qual se encontra expressa em placas precoces e avançadas, inibindo alguns processos celulares relacionados com erosão ou ruptura da placa, tais como produção de metaloproteases ou expressão de fator tecidual.

Polimorfismos genéticos de citocinas inflamatórias têm sido associados com aumento do ris-

co de aterosclerose, sugerindo que variações genéticas no sistema inflamatório são potencialmente importantes moduladores de risco vascular⁽⁴⁷⁾.

Interleucina-1 (IL-1)

A IL-1 β e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) são citocinas que mediam a inflamação, estando envolvidas com a patogênese do processo aterosclerótico. Os polimorfismos C/T -511 do gene da IL-1 β e o polimorfismo do antagonista do receptor IL-1 (IL-1Ra-alelos repetidos no íntron 2) podem interferir na progressão da aterosclerose, apresentando associação com a incidência de doença arterial coronária⁽⁴⁸⁾. Observou-se, também, correlação do polimorfismo do gene da IL-1 no desenvolvimento da doença arterial coronária associada à infecção por *Chlamydia pneumoniae*. Pacientes soropositivos para essa bactéria têm maior tendência a apresentar infarto do miocárdio quando são portadores dos genótipos IL-1 C/C e/ou IL-1Ra com 2-3 alelos repetidos⁽⁴⁹⁾.

Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 tem papel central na reação inflamatória sistêmica e na resposta de fase aguda, pois estimula a síntese de várias outras proteínas relacionadas com a resposta inflamatória⁽⁵⁰⁾. Altos níveis de IL-6 podem promover crescimento da placa e ruptura, aumentando a expressão de vários genes. O polimorfismo G/C -174 do gene da IL-6 diminui sua produção, reduzindo a resposta inflamatória, e os níveis circulantes de IL-6 no genótipo CC são inferiores em 50% aos do genótipo GG. Em homens saudáveis, verificou-se que polimorfismo no promotor do gene para IL-6 (-174 G/C) foi associado a maior pressão sistólica e maior risco de doença arterial coronária⁽⁵¹⁾.

Fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória presente na maioria das lesões ateroscleróticas, ativando fatores de crescimento, citocinas e quimioatratantes, e afetando a síntese e a estimulação de moléculas de adesão. Positividade mais intensa para TNF é observada em locais de lesão endotelial e trombose, podendo tornar as placas mais suscetíveis à ruptura, estimulando macrófagos a secretar metaloproteases. Os genes para TNF e linfotóxina alfa (TNF- β ou LT- α) estão localizados na região MHC III no braço curto do cromossomo 6. Dois polimorfismos bi-

alélicos têm sido estudados: G/A -308 na região promotora do gene para TNF e G/A +252 no primeiro íntron do gene TNF- β (ou LT- α). No entanto, o papel do polimorfismo na progressão da aterosclerose não está definido, uma vez que a correlação de polimorfismos do gene para TNF- α com doença arterial coronária é controversa. Em pacientes avaliados angiograficamente, não se observou influência do polimorfismo -863 C/A e -308 G/A de TNF- α e 252 G/A do TNF- β na ocorrência de doença arterial coronária ou infarto do miocárdio⁽⁵²⁾.

Interleucina-10 (IL-10)

IL-10 e TNF- α têm papéis opostos na inflamação, havendo um mecanismo auto-regulatório no qual o TNF- α estimula a produção de IL-10, que, por sua vez, reduz a síntese de TNF- α . A IL-10 atua inibindo a função macrófagica em sua atividade citotóxica e síntese de citocina. O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1, entre 1q31 e 1q32. Alguns polimorfismos para o gene IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A) foram estudados, não se observando associação com doença arterial coronária ou infarto do miocárdio⁽⁵²⁾.

Moléculas de adesão

A aderência de linfócitos e monócitos circulantes ao endotélio ativado é um dos primeiros eventos na patogênese da aterosclerose. Tem sido observado aumento na expressão de ICAM-1 ("intracellular adhesion molecule-1") e E-selectina interagindo com linfócitos e macrófagos, além de VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule-1") nas placas ateroscleróticas.

E-selectina

A expressão de E-selectina é estimulada por TNF, IL-1 e LPS. Estudando-se polimorfismos das moléculas de adesão em pacientes com aterosclerose estabelecida angiograficamente, verificou-se diferença na frequência alélica para mutações na E-selectina, a qual está localizada em 1q12. Observou-se troca de serina por arginina (posição 128), leucina por fenilalanina (posição 554) e mutação em DNA de guanina por timina (posição 98), cuja frequência alélica foi significativamente diferente em pacientes jovens com aterosclerose grave.⁽⁵³⁾

ICAM-1

É uma glicoproteína de 95 kD, pertencente à

superfamília do gene da imunoglobulina. Polimorfismo C/T da ICAM-1, com substituição do ácido glutâmico (K) por lisina (E) no exon 6 do códon 469 da proteína ICAM (K469E), pode estar envolvido na patogênese da aterosclerose coronária⁽⁵⁴⁾.

P-selectina

Foram descritos 13 polimorfismos para P-selectina, dos quais 5 estão localizados na região codificadora do gene (S290N, N562D, V599C, T715P, T741T), mas somente T715T associou-se com infarto do miocárdio. Observou-se, também, que a presença de 2 códons de asparagina na região S290N e N562D associava-se a maior risco de infarto do miocárdio, mas somente quando estes apresentavam o mesmo haplótipo, mostrando a complexidade da interação entre a variabilidade genética e o desenvolvimento de doenças⁽⁵⁵⁾.

TLR-4

Recentemente, uma família de receptores, "toll like receptors 4" (TLR-4), foi descrita, relacionando imune estimulantes produzidos por microrganismos e resposta de defesa. A ativação desses receptores resulta no aumento de peptídeos antimicrobianos, citocinas inflamatórias e moléculas co-estimuladoras, que iniciam a imunidade adaptativa para bactérias Gram-negativas, incluindo *Chlamydia pneumoniae* e *Helicobacter pylori*, dois patógenos que parecem estar relacionados com aterogênese. Verificou-se que a presença do polimorfismo de TLR-4 Asp 299Gly codifica baixos níveis de moléculas inflamatórias circulantes e confere risco aumentado para infecções mas reduzido para aterosclerose⁽⁵⁶⁾.

Receptor CD14

O receptor CD14 é uma glicoproteína localizada na superfície celular de monócitos, sendo um importante mediador para a ativação de monócitos/macrófagos por endotoxinas de bactérias Gram-negativas. O gene para o receptor CD14 consiste de aproximadamente 3.900 bp, organizados em dois éxons, e codifica uma proteína de 375 aminoácidos. Um polimorfismo foi identificado no promotor do gene, -270 C/T, observando-se maior frequência em pacientes infartados que em controles, sugerindo sensibilidade à infecção como eventual fator de risco para aterosclerose⁽⁵⁷⁾.

Metaloproteases

As metaloproteases (MMPs) constituem uma família de endopeptidases que têm em comum presença de zinco em seu sítio ativo, dependência de cálcio para sua atividade e capacidade de reagir com inibidores teciduais de metaloproteases específicos (TIMPs), formando complexos enzimaticamente inativos. Pelo menos 20 MMPs foram identificadas como sendo capazes de degradar proteínas do tecido conjuntivo, o que indica que essas enzimas podem ter papel na destruição e no remodelamento associados com vários processos patológicos, entre eles a ruptura da placa aterosclerótica. A capacidade de certas MMPs, tais como MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-12, em hidrolisar elastina é de particular importância, pela sua ação na parede vascular. Polimorfismos têm sido identificados em vários genes de MMPs⁽⁵⁸⁾.

MMP3

A estromelisina é uma metaloprotease envolvida com a renovação dos componentes da matriz extracelular: É capaz de degradar proteoglicanos, colágenos III, IV, V e IX, laminina, fibronectina, gelatina e elastina, além de ativar outros membros da família MMP, como as collagenases. O polimorfismo do gene promotor 5A/6A foi analisado, em relação à aterosclerose, em estudos genéticos epidemiológicos, e a frequência do alelo 5A foi significativamente maior em pacientes com infarto do miocárdio que em controles⁽⁵⁹⁾. Por outro lado, a expressão do alelo 6A associa-se com o crescimento acelerado de ateromas coronários, sugerindo que sua presença leva à expressão insuficiente de MMP-3 pela menor atividade promotora desse alelo⁽⁶⁰⁾.

MMP-9

Possui atividade proteolítica em colágeno tipo IV, um componente importante da membrana basal, facilitando a migração de células musculares lisas, associando-se o polimorfismo C-1562T com a gravidade da aterosclerose coronária⁽⁶¹⁾.

MMP-12

É uma metaloelastase. Polimorfismo no gene promotor, por substituição de A para G, sendo o alelo A mais prevalente, associou-se ao estreitamento de artérias coronárias em pacientes com doença arterial coronária e diabetes⁽⁶²⁾.

EXPRESSÃO GÊNICA NA PLACA VULNERÁVEL

Aceita-se que a extensão e a expressão têm-poro-espacial de centenas de genes esteja alterada durante o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose, quando comparada à situação normal. Expressão gênica diferencial em células vasculares e sanguíneas foi descrita, e graças aos avanços tecnológicos é possível realizar-se grande inventário de genes diferencialmente expressos com as técnicas de "DNA array", DD/RT-PCR e SAGE, em laboratórios especializados. Diversos fatores de transcrição são diferencialmente expressos em células endoteliais, células musculares lisas e monócitos/macrófagos durante o processo de mudança fenotípica dessas células. O conhecimento dessas mudanças no processo de aterogênese e ruptura da placa possibilitará intervenções terapêuticas, visando a sua reversão quer por meio de terapia gênica quer utilizando drogas que interfiram com a expressão gênica aberrante⁽⁶³⁾.

TERAPIA GENÉTICA

Uma abordagem genética e terapêutica adequada requer conhecimento aprofundado dos componentes envolvidos na patogênese da doença estudada, bem como de suas alterações mais comuns e dos locais de ação, que determinarão o sucesso ou o fracasso da terapia. Em linhas gerais, trata-se da utilização de técnicas de manipulação de ácidos nucleicos, que visam a superexpressar ou inativar quaisquer genes-alvo, causando alterações metabólicas específicas, normalmente utilizadas no tratamento de deficiências genéticas hereditárias, e, no panorama atual, como alternativa para o manejo mais efetivo de doenças degenerativas crônicas, como hipertensão, infarto e aterosclerose, referindo-se ao sistema cardiovascular⁽⁶⁴⁾.

O correto desenvolvimento desse tipo de terapia segue uma estrutura protocolar, controlada e rígida, que envolve: identificação da doença cujo tratamento existente prova-se ineficaz ou inadequado; desenvolvimento de modelos animais de doença; determinação do gene-alvo mais apropriado; criação de um vetor de transferência efetivo que tenha especificidade ao tecido escolhido e permita boa expressão do alelo; provas de atenuação da doença estudada nos referidos modelos; e atestados de segurança da

utilização do gene e estudos clínicos controlados para determinação da dose terapêutica, aspectos de tolerabilidade e eficácia a longo prazo⁽⁶⁵⁾.

O gene utilizado como agente terapêutico, entretanto, nem sempre corresponde ao benefício esperado, e, em grande parte, essa teoria se confirma pelas dificuldades técnicas que se apresentam como fator limitante de sua aplicabilidade prática. A maximização da eficiência da transdução genética não representa, em sua maioria, o desfecho desejado quando da introdução do vetor contendo o gene escolhido, notadamente no momento em que essa magnitude leva a efeitos colaterais, como é o caso da utilização do "vascular endothelial growth factor" (VEGF) no estabelecimento de neoangiogênese^(64, 66). O estudo VIVA ("VEGF in Ischaemia for Vascular Angiogenesis") promoveu a administração controlada por placebo de VEGF-A165 em 178 pacientes com isquemia cardíaca, candidatos à revascularização do miocárdio ou à angioplastia. Nos pacientes tratados, não houve melhora (sem atingir o desfecho primário do estudo no teste ergométrico) nem alteração angiográfica ou de perfusão após 30 e 60 dias⁽⁶⁷⁾. Outro estudo fase II, controlado com placebo, duplo-cego (FIRST), com 337 pacientes, avaliou 3 doses intracoronárias diferentes de FGF-2 em solução protéica, sem melhora na área de isquemia e no teste de esforço num seguimento de 90 dias⁽⁶⁸⁾. Atualmente existem protocolos em humanos com a utilização de VEGF sem relatar piora clínica, apesar de alguns efeitos deletérios terem sido descritos em animais, como formação de angiomas e piora da aterosclerose no modelo de rato com "knockdown" do gene da apo E⁽⁶⁹⁾. Nessa situação particular, pode-se observar que os avanços desse tipo de intervenção dependem, em grande parte, da forma mais adequada de se utilizar o gene escolhido e a perfeita e modulada transmissão deste, a fim de se controlarem os efeitos deletérios sem mascarar a efetividade desejada.

Outra dificuldade clássica que se repete em diversos modelos experimentais diz respeito ao método utilizado para transfecção do gene-alvo no tecido de escolha. A preferência atual tem sido dada aos vetores virais, como os retrovírus, os adenovírus e os adenovírus-like. Estudos "in vitro" de células humanas, nesse caso, têm auxiliado na compreensão dos fatores intrínsecos existentes na aplicabilidade da tera-

pia gênica.

Rekhter e colaboradores⁽⁶⁹⁾, por meio de um vetor adenoviral, infectaram cultura celular de vasos humanos com e sem aterosclerose com o gene da fosfatase alcalina placentária e observaram algumas peculiaridades. Nos vasos não acometidos, o gene recombinante expressou-se em 100% de suas células endoteliais, grande quantidade nas células adventícias e em proporção bem reduzida nas células da musculatura lisa, com comportamento semelhante nos vasos ateroscleróticos com placas complicadas. Após tratamento com elastase e collagenase, a presença da expressão do gene inserido aumentou na razão de sete vezes ($p < 0,001$), inclusive nas células que sofreram baixa expressão inicial, sugerindo que o modelo de resposta genética fora afetado pela quantidade da matriz extracelular circunvizinha, o que reflete na exposição do vetor utilizado, e, portanto, com consequência direta no desfecho da terapia. Os resultados também demonstraram que as placas mais suscetíveis à transfecção são as mais vulneráveis e prestes a romper, o que reforça grandes possibilidades futuras de utilização desse tipo de abordagem. Entretanto, houve o questionamento acerca da eficácia do vetor, em decorrência das reações de hiperplasticidade por sua natureza de antígeno, portanto, agressor, o que pode, em muitos casos, piorar a afecção que se deseja tratar⁽⁶⁹⁾.

No campo da aterosclerose, alguns avanços foram obtidos, principalmente em relação à hipercolesterolemia familiar, com a utilização de terapia "ex vivo" (implantação de gene "in vitro" em tecido-alvo, com reintrodução deste ao organismo do paciente portador da entidade nosológica)⁽⁶⁵⁾ em hepatócitos geneticamente modificados, contendo um retrovírus recombinante portador do código para o receptor de LDL, resultando em redução de 6% a 23% do LDL-colesterol em 3 dos 5 pacientes tratados⁽⁷⁰⁾. Outros trabalhos realizados com HDL e "knock-down" de seu receptor SR-B1 ou por superexpressão do gene responsável pela apo AI determinaram resultados tímidos, mas promissores⁽⁶⁴⁾. O transporte reverso, dessa maneira, vem aparecendo como uma das principais metas de pesquisa científica, e muito se tem trabalhado em suas nuances, dentre elas o papel da enzima CETP e suas possibilidades de terapia genética.

Hirano e colaboradores⁽⁷¹⁾, por meio da utilização de um oligonucleotídeo anti-senso anti-

CETP ligado a uma glicoproteína, demonstraram diminuição significativa do colesterol não-HDL, com subsequente aumento deste por meio da redução do RNAm da CETP hepática. Em testes posteriores a partir desse modelo, verificou-se redução de 25% da placa aterosclerótica em ratos com dieta aterogênica. Esse e outros dados que referem a utilização de drogas anti-CETP demonstram que a inibição desse gene poderia atestar melhora no perfil da aterosclerose como um todo, parecendo haver discrepância, por outro lado, entre a deficiência de CETP humana e sua contraparte de coelhos geneticamente modificados em relação a sua aterogenicidade, apresentando efeitos antagônicos quando de sua análise em relação a suas ações nos níveis lipídicos, refletindo possível alteração de via metabólica entre as duas espécies e prejudicando sobremaneira a progressão dos estudos relacionados. Esse fato corrobora a necessidade da escolha correta do gene a ser utilizado e do modelo mais adequado, que possa refletir ao menos com alguma exatidão os efeitos mais prováveis da terapia empregada⁽⁷¹⁾.

Com o advento de inúmeras pesquisas relacionadas ao endotélio, a terapia genética acaba por se tornar uma grande perspectiva à estabilização da placa e à atenuação do risco trombótico, com a abertura, portanto, de diversas linhas de trabalho baseadas em componentes metabólicos relacionados à formação desta e sua evolução, tendo, em linhas gerais, como fator limitante, as barreiras já citadas anteriormente. Channon e colaboradores⁽⁷²⁾, num artigo de revisão a respeito do NO, postularam as possibilidades de utilização de vetores genéticos na superexpressão de alguns genes específicos de seu metabolismo. Esses autores perceberam que, pelo grande número de fatores que implicam a regulação da NOS, a expressão aumentada dessa enzima poderia não apenas ser antônimo do aumento de produção do NO, como também geraria efeitos deletérios dada a íntima relação da bioatividade deste com a produção de espécies reativas de oxigênio, dentre elas os íons peroxinitrito (OONO⁻) e superóxido, sabidamente danosos ao endotélio vascular e cruciais para a desestabilização da placa aterosclerótica. Os determinantes dessa relação placa/óxido nítrico vêm de seu efeito na inibição da proliferação celular, demonstrada em diversos estudos com angioplastia em ratos e cães e em modelos de coelho submetidos a "bypass", nos

quais, por meio da transferência de genes-alvo, houve significativa melhora no processo de formação de colágeno e redução da lesão⁽⁷²⁾.

Outros fatores importantes da relação do NO à aterosclerose residem em suas ações antiaterogênicas, reduzindo a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de macrófagos e linfócitos T, todas demonstradas "in vivo" em modelos animais. Qian e colaboradores⁽⁷³⁾, em estudo experimental com 30 ratos submetidos a dieta hipercolesterolêmica por 11 a 13 semanas, demonstraram claramente a melhora dos níveis de diversos marcadores da aterosclerose com a utilização de genes específicos da produção de NO. Utilizando-se de vetores adenovirais recombinantes que expressavam a enzima NOS neuronal e a β -galactosidase (Ad.nNOS e Ad.n β Gal, respectivamente), transfundiram-nos à artéria carótida das cobaias e verificaram, após 1 ± 2 dias o comportamento de fatores inflamatórios e aspectos histológicos, como ICAM-1, VCAM-1, linfócitos CD43(+) (como marcadores da infiltração linfocitária) e células RAM-11(+) (como marcadores da infiltração de monócitos). Todos os ratos tratados com NOS apresentaram melhora em relação aos tratados com β Gal, demonstrando, inclusive, o impacto maior e mais rápido do primeiro sobre a infiltração monocitária nas primeiras 24 horas⁽⁷³⁾. Ainda em relação aos monócitos, Egashira e colaboradores⁽⁷⁴⁾ demonstraram, em ratos portadores de deficiência crônica de NOS, que uma terapia genética efetiva anti-MCP-1 resulta na diminuição do diâmetro vascular da camada média arterial, sem reduzir, entretanto, a fibrose perivascular. Referindo-se à MCP-1 como fator de estímulo à ruptura da placa, esses autores reforçam a validade da utilização dessa técnica e seu valor no entendimento da fisiopatologia da aterosclerose "in vivo"⁽⁷⁴⁾.

Outro fator estudado recentemente é o fator tecidual e suas relações na coagulação e nos aspectos da placa pós-ruptura, que é superexpresso após o dano vascular em estados ateroscleróticos. Zoldhelyi e colaboradores⁽⁷⁵⁾ demonstraram que a administração sistêmica de um inibidor da ação do fator tecidual, o "tissue factor pathway inhibitor" (TFPI), diminui a hiperplasia intimal pós-injúria e suprime os mecanismos sistêmicos de coagulação e trombose. Em 19 ratos com hiperlipidemia genética (modelo de Watanabe), 10 deles tratados com TFPI recombinante (9 placebos), submetidos a angio-

plastia com balão, houve redução da extensão da hiperplasia em 43% dos casos ($p < 0,05$), comparados ao controle com a mesma titulação de dose. Sete dias após a infusão do gene-alvo, não houve melhora da hemostasia sistêmica; quatro semanas após a lesão, perfez-se o sacrifício e constatou-se que as artérias carótidas das cobaias com TFPI estavam livres de trombo, enquanto duas artérias controles estavam ocluídas, apesar de o valor de p não ter sido significativo. Sugeriu-se, então, que a superexpressão do TFPI pode regular a resposta hiperplásica na ausência de alterações no sistema de hemostasia, tornando o fator tecidual um possível candidato à manipulação genética na prevenção da estenose e da ruptura da placa⁽⁷⁵⁾.

Decerto, todos esses avanços relatados colaboram para alicerçar o que se pode esperar do futuro da terapia em Medicina, mas admite-se, com propriedade, que estes, por mais elaborados que sejam, ainda são tímidos ante à problemática oferecida pela falta de domínio da técnica, de conhecimento da estrutura e de manejo dos resultados. O estudo em humanos, embora precoce, é muito reduzido e limitado por questões éticas, criadas, em grande parte, pela própria inépcia do método utilizado. Apesar dos esforços dos pesquisadores envolvidos, ainda não trazem segurança que sustentem uma aplicação sem riscos. Os estudos com VEGF, por exemplo, são pioneiros nessa área, os quais, apesar de não terem relatado grandes resultados satisfatórios, podem estimular uma visão mais segura dos modelos animais, exaustivamente testados antes da utilização dos mesmos pelo "homo sapiens". Isso, de certa forma, assegura que novos modelos farão parte da certeza em utilizar-se novamente esse tipo de abordagem com outros genes e outras finalidades.

O advento de novas terapias cardiovasculares e médicas dependerá muito da racionalidade da escolha da droga ou do gene-alvo, do modelo que atesta a eficiência dessa proposta, e da melhor e mais específica forma de expressão desses genes. Isso é crucial ao sucesso da terapia por meio de técnicas que não venham a trazer efeitos colaterais, quaisquer que sejam, como no caso de alguns vetores virais, ou que permitam manutenção do efeito desejado por mais tempo, sem a necessidade de nova aplicação⁽⁷⁶⁾. O desenvolvimento consciente de critérios sérios e inteligíveis que possam estabele-

cer os pontos positivos e negativos do tratamento de doenças degenerativas lentas e progressivas como a aterosclerose é condição indispensável para o estabelecimento de metas que reflitam o correto modo de se tratar a doença, principalmente pelo seu caráter multifatorial, portanto, com inúmeras vertentes que podem contribuir para a supressão do sucesso que uma única estrutura teria num ambiente mais controlado.

Qual a real importância de apenas uma enzima num patamar gigantesco de outras subs-

tâncias que exercem funções intimamente relacionadas? Qual o grau de resposta que se deve esperar de um reagente orgânico para que sua ação não se torne deletéria? Que especificidade de desejar de um vetor para que este não simplesmente desapareça do tecido escolhido ou se desenvolva acima do esperado e cause efeitos colaterais ou indesejados? Evoluindo de forma vertiginosa, essas respostas provavelmente farão parte de um futuro próximo e, se possível, ainda mais promissor.

MOLECULAR BIOLOGY AS A TOOL IN THE PREVENTION OF VULNERABLE PLAQUE RUPTURE

MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA IZAR, FRANCISCO ANTONIO HELFENSTEIN FONSECA,
SÍLVIA SAIULI MIKI IHARA, WALDIR GABRIEL MIRANDA RELVAS

Atherosclerosis is a complex and chronic inflammatory disease that affects the arterial vessel wall at selected locations as a result of both genetic and environmental factors, where plaque rupture and thrombosis are triggers for coronary syndromes.

Molecular biology, as a tool, contributes in the development of strategies to determine individuals whose plaques are prone to rupture and to promote stabilization. New genomic approaches have allowed identification of grouping of genes that determine either the susceptibility or the resistance to atherosclerosis and to its thrombotic complications.

Genetic polymorphism profile would thus facilitate the screening of individuals with vulnerable plaques and provide new therapeutic options and a better clinic outcome. Some genes which affect lipoprotein metabolism, hemostasis, inflammation, endothelial function, renin-angiotensin-aldosterone system, and oxidative stress, appear as attractive candidate genes. Gene expression techniques such as DD/RT-PCR, SAGE or cDNA array will enable to analyze a panel of differentially expressed genes in the plaque and the interactions between and among their gene products. Finally, novel modalities of treatment using gene therapy approaches emerge to both correct Mendelian inherited diseases and to reverse an acquired phenotype.

Key words: atherosclerosis, vulnerable plaque, genetic polymorphisms, gene therapy.

(Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2002;4:680-93)

RSCESP (72594)-1259

REFERÊNCIAS

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993;362: 801-9.
2. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
3. Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest*

- 1997;99:1809-13.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407: 233-41.
5. Brown MS, Goldstein JL. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
6. Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. Genetics of atherosclerosis. In: Topol EJ, ed. *Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.2389-496.
7. Vuorio AF, Aalto-Setälä K, Koivisto UM, Turtola H, Nissen H, Kovanen PT, et al. Familial hypercholesterolemia in Finland: common, rare and mild mutations of the LDL receptor gene and their clinical consequences. Finnish FH-group. *Ann Med* 2001;33:410-21.
8. Gardemann A, Ohly D, Fink M, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, et al. Association of insertion/deletion gene polymorphism of the apolipoprotein B signal peptide with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1998;141:165-75.
9. Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Jensen G, Nordestgaard BG. Apolipoprotein E genotype: epsilon 32 women are protected while epsilon 43 and epsilon 44 men are susceptible to ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1192-9.
10. Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1250-5.
11. Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen OS, et al. The apolipoprotein E4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction. A substudy of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Circulation* 2000;101: 1366-71.
12. Boerwinckle E, Leffert CC, Lin J, et al. Apolipoprotein (a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein (a) concentrations. *J Clin Invest* 1992;90:52-60.
13. Rhoads GG, Dahlen G, Berk K, et al. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* 1986;256:2540-4.
14. Jauhiainen M, Koskinen P, Ehnholm C, et al. Lipoprotein (a) and coronary heart disease risk: a nested case-control study of the Helsinki Heart Study participants. *Atherosclerosis* 1991;89:59-67.
15. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective study of lipoprotein (a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 1993;270:2195-9.
16. Cohen JC, Chiesa G, Hobbs HH. Sequence polymorphisms in the apolipoprotein (a) gene. Evidence for dissociation between apolipoprotein (a) size and plasma lipoprotein (a) levels. *J Clin Invest* 1993;91:1630-6.
17. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation* 1999;99:2901-7.
18. Price WH, Kitchin AH, Burgon PRS, et al. DNA restriction fragment length polymorphisms as markers of familial coronary heart disease. *Lancet* 1989;1:1407-11.
19. Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, et al. Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII. *Atherosclerosis* 1991;87:239-47.
20. Breslow JL. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90:8314-8.
21. Breslow JL, Scriver C, Beaudet A, et al. Familial disorders of high density lipoprotein metabolism. In: *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 1995. p.2031-52.
22. Young SG, Fielding CJ. The ABCs of cholesterol efflux. *Nature Genet* 1999;22:316-8.
23. Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, et al. Novel polymorphisms in promoter region of ATP binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ Res* 2001;88:969-73.
24. Tall AR, Dammernan M, Breslow JL. Disorders of lipoprotein metabolism. In: Chien KR. *Molecular basis of cardiovascular disease*. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p.413-27.
25. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutations in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996;97: 2917-23.
26. Kuivenhoven JA, Jukma JW, Zwinderman AH, De Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, et al. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:86-93.
27. Hegele RA. Paraoxonase-genes and disease. *Ann Med* 1999;31:217-24.
28. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998;423: 57-60.
29. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, et al. Serum paraoxonase (PON 1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-

- insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998;139:341-9.
30. Aubo C, Senti M, Marrugat J, Tomas M, Vila J, Sala J, et al. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism of the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. The REGICOR Investigators. *Eur Heart J* 2000;21:33-8.
31. Sen-Banergee S, Siles X, Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20: 2120-6.
32. Schachinger V, Britten MB, Dimmeler S, Zeiher AM. NADH/NADPH oxidase p22phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Heart J* 2001;22:96-101.
33. Philip I, Plantefeve G, Vaillaumier-Barrot S, Vicaute E, LeMarie C, Henrion D, et al. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 1999;99:3096-8.
34. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimazaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu894Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998;103:65-9.
35. Kluitjans LAJ, Whitehead AS. Methylene-tetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease: evidence that the three MTHFR C677T genotypes confer different levels of risk. *Eur Heart J* 2001;22:294-9.
36. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillauneuf MT, Courbon D, Dumont C, et al. Genetic polymorphism of the renin angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 1997;99:66-73.
37. Cambien F, Poirer O, Lecert L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism and the angiotensin-converting enzyme gene is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-4.
38. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease. Meta-analysis of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:484-92.
39. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, et al. Angiotensin-converting-enzyme and angiotensin II receptor I polymorphism: association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 1998;54:1843-9.
40. Ortlepp JR, Lauscher J, Hanrath P, Hoffman R. Genetic polymorphisms in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(suppl A): 230.
41. Behaghe J, Poirer O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al. Beta fibrinogen gene polymorphism are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Circulation* 1996;93:440-9.
42. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor type I and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;343:1792-801.
43. Iacoviello I, Burzetta F, Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati MB. The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998;79:8-13.
44. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-9.
45. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbusch W, Gardemann A. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999;93:2449-53.
46. Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphisms of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 2001;115:491-506.
47. Navarro-Lopes F. Bases geneticas de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55 (4):413-31.
48. Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND, et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation* 1999;99: 861-6.
49. Momiyama Y, Hirano R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Effects of interleukin-1 gene polymorphisms on the development of coronary artery disease associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(3):712-7.
50. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000;21:1574-83.
51. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 — 174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001;22: 2243-52.
52. Koch W, Kastrati A, Böttiger C, Mehili J, von Beckerath N, Schömig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial

- al infarction. *Atherosclerosis* 2001;159: 137-44.
53. Wenzel K, Ernst M, Rohde K, Baumann G, Speer A. DNA polymorphisms in adhesion molecule genes — a new risk factor for early atherosclerosis. *Hum Genet* 1996;97:15-20.
54. Jiang H, Klein RM, Niederacher D, Du M, Marx R, Horlitz M, et al. C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2002;84:171-7.
55. Barbaux SC, Blankenberg S, Rupprecht HJ, Francomme C, Bickel C, Hafner G, et al. Association between P-selectin gene polymorphisms and soluble P-selectin levels and their relation to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(10):1668-73.
56. Kiechi S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347(3):185-92.
57. Hubacek JA, Pit'ha J, Skodová Z, Staněk V, Poledne R. C(-260)-T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999;99:3218-20.
58. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 2000;19:623-9.
59. Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, et al. Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation* 1999;99:2717-9.
60. Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, et al. Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1600-5.
61. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788-94.
62. Jormsjö S, Ye S, Moritz J, Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM, et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res* 2000;86:998-1003.
63. Monajemi H, Arkenbout EK, Pannekoek H. Gene expression in atherogenesis. *Thromb Haemost* 2001;86:404-12.
64. Khurana R, Martin JF, Zachary I. Gene therapy for cardiovascular disease — a case for cautious optimism. *Hypertension* 2001;38: 1210-6.
65. Rader DJ. Gene therapy for atherosclerosis. *Int J Clin Lab Res* 1997;27:35-43.
66. Cameli P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angiogenesis. *Nature Med* 2000;6:1102-3.
67. Henry TD, Annex BH, Azrin MA, McKendall GR, Willerson JT, Hendel RC, et al. Final results of the VIVA trial of rhVEGF human therapeutic angiogenesis. *Circulation* 1999;100: 1-476.
68. Post MJ, Laham R, Selke FW, Simons M. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res* 2001; 49:522-31.
69. Reikhter MD, Simari RD, Work CW, Nabel GJ, Nabel EG, Gordon D. Gene transfer into normal and atherosclerotic human blood vessels. *Circ Res* 1998;82:1243-52.
70. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Stein EA, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nature Med* 1995; 1:1148-54.
71. Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:589-96.
72. Channon KM, Qian H, George S. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury. Insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1873-81.
73. Qian H, Neplioueva V, Sheety MS, Channon K, George S. Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol fed rabbits. *Circulation* 1999;99:2979-82.
74. Egashira K, Koyanagi M, Kitamoto S, Ni W, Kataoka C, Morishita R. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats: blockade of MCP-1 activity after intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of NO synthesis. *FASEB J* 2000;14:1974-8.
75. Zoldhelyi P, Chen Z, Shelat HS, McNatt JM, Willerson JT. Local gene transfer of gene factor pathway inhibitor regulates intimal hyperplasia in atherosclerotic arteries. *PNAS* 2001;98:4078-83.
76. Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular diseases. *Science* 1996;272:689-93.