ESTRESSE OXIDATIVO E RUPTURA DA PLACA ATEROSCLERÓTICA

HERALDO P. SOUZA, FRANCISCO R. M. LAURINDO

Laboratório de Investigação Médica (LIM-51) — Disciplina de Emergências Clínicas — FMUSP
Laboratório de Biologia Vascular — Instituto do Coração (InCor) — HC-FMUSP

Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 455 — 3º andar — sala 3134 — CEP 01246-903 — São Paulo — SP

Inflamação, estresse oxidativo e disfunção do endotélio vascular constituem importantes fatores ligados à aterogênese, intermediando a relação entre fatores de risco e indução do ateroma. A inflamação, particularmente, é o fenômeno básico que determina a instabilização da placa, que culmina com ruptura do ateroma, trombose oclusiva e eventos clínicos agudos. Eventos inflamatórios na placa aterosclerótica incluem: infiltração de leucócitos mononucleares, aumento da expressão e atividade de metaloproteinases de matriz, aumento da expressão de fatores pró-trombóticos e morte celular programada (apoptose) de células musculares lisas e endoteliais. Todos esses fatores podem ser favorecidos ou mediados por estresse oxidativo, que é a produção excessiva ou não compensada de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico, está envolvido na oxidação da lipoproteína de baixa densidade e constitui segundo mensageiro intracelular de fatores de crescimento indutores de proliferação, secreção de matriz extracelular, diferenciação e senescência. O estresse oxidativo é um importante indutor do fator de transcrição NF-kappaB, que induz a transcrição de um programa gênico relacionado à inflamação. Recentemente vem sendo reconhecida a importância da via de sinalização CD40/CD40L no controle de todos esses processos. É interessante notar que muitos desses fenômenos são modulados por espécies reativas de oxigênio, sugerindo a participação do estresse oxidativo na ruptura da placa aterosclerótica.

Palavras-chave: aterosclerose, ruptura da placa, estresse oxidativo, CD40, inflamação.

(Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2002;4:584-94)

RSCESP (72594)-1248

RUPTURA DA PLACA ATEROSCLERÓTICA E SÍNDROMES CORONÁRIAS AGUDAS

Evidências acumuladas nas duas últimas décadas, em estudos histológicos e angioscópicos, suportam a hipótese de que o evento desencadeante da trombose oclusiva coronária, substrato anatômico das síndromes isquêmicas agudas, é a ruptura na integridade da superfície da placa aterosclerótica[1,2]. Partindo desse novo paradigma, grande quantidade de estudos foi dirigida para diferenciar morfologicamente as placas "vulneráveis" (caracterizadas por fina capa fibrosa, pouco colágeno e núcleo necrótico) das "estáveis" (caracterizadas por grossa capa fibrosa contendo células musculares lisas e colágeno fibrilar em quantidade significante)[3]. O denominador comum mais bem caracterizado na morfologia das placas vulneráveis foi a presença de processo inflamatório ativo[4].

Esses dados vão de encontro à descrição da aterosclerose como uma doença inflamató-

Apoio financeiro: FAPESP e PRONEX.

ria crônica, processo dinâmico no qual a inflamação presente na parede vascular desempenha papel fundamental na gênese e na evolução da placa aterosclerótica[5]. Esse modelo aperfeiçoado, desenvolvido nas últimas duas décadas e baseado em grande quantidade de dados clínicos e experimentais, substitui o antigo modelo, que descrevia a aterosclerose como uma doença na qual ocorre acúmulo passivo de lípides e cálcio na parede vascular[5].

No contexto desse novo modelo de aterogênese, a inflamação está intimamente associada a dois outros fatores, que também são interdependentes: o estresse oxidativo e a disfunção do endotélio vascular. O estresse oxidativo tem papel importante na fisiopatologia da disfunção endotelial inicial[6] ou na estimulação da migração de células musculares lisas[7], evento necessário para a formação da capa fibrosa. Entretanto, apesar da enorme quantidade de dados acumulados na literatura ligando o estresse oxidativo, a inflamação na parede vascular e a aterogênese[5, 7-9], ainda não está bem estabelecido o papel desempenhado pelas espécies reativas de oxigênio no processo de ruptura da placa aterosclerótica e no desencadeamento das síndromes coronárias agudas.

É sabido, entretanto, que as espécies reativas de oxigênio podem modular alguns dos mecanismos envolvidos no processo de ruptura da placa aterosclerótica, sintetizados na Figura 1, e que serão discutidos a seguir.

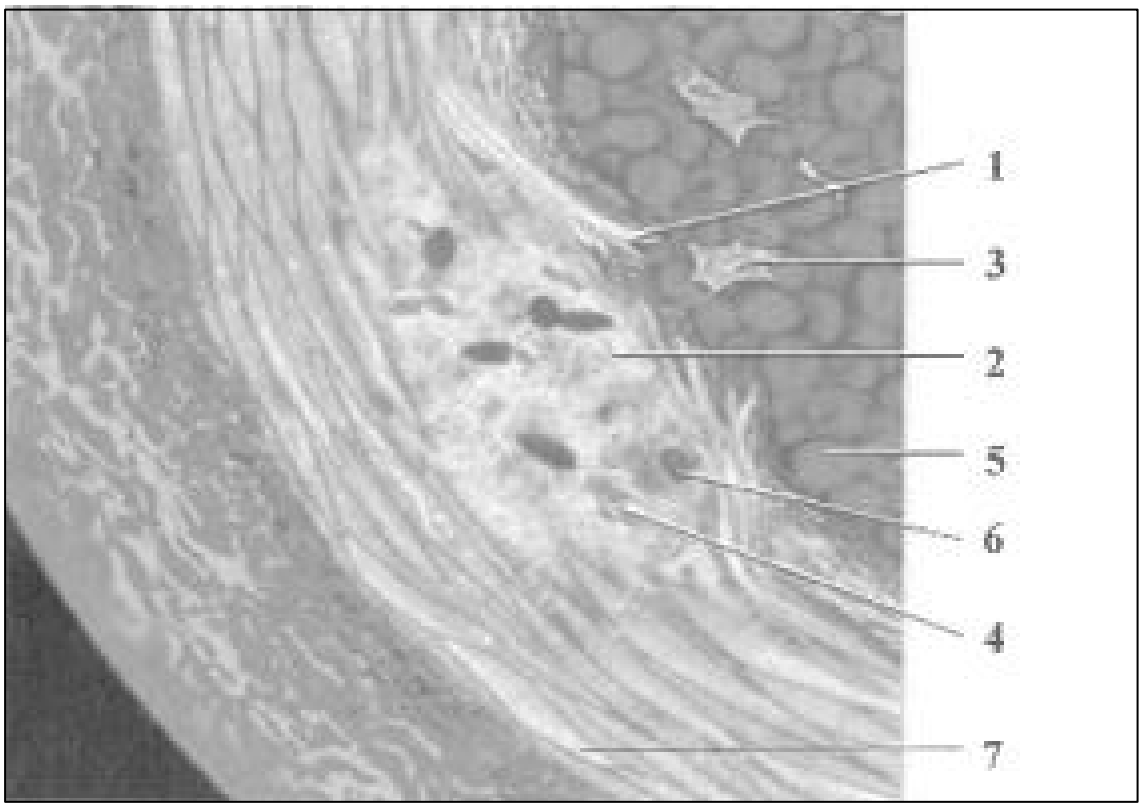

Figura 1. Resumo dos processos envolvidos na aterogênese (1 a 3) e na ruptura da placa aterosclerótica (3 a 7), que sofrem influência de espécies reativas de oxigênio: (1) redução da biodisponibilidade do óxido nítrico derivado do endotélio; (2) aumento da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); (3) infiltração de células inflamatórias na parede vascular; (4) aumento da expressão de metaloproteinases de matriz; (5) aumento da trombogênese (por aumento da expressão e atividade do fator tecidual da coagulação); (6) apoptose de células musculares lisas e endoteliais; (7) aumento da atividade da via de sinalização CD40/CD40L.

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RUPTURA DA PLACA ATEROSCLERÓTICA (Figs. 1 e 2)

Radicais livres de oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH·), são moléculas que possuem um elétron desemparelhado em seu orbital externo, característica que os torna extremamente reativos. Alguns oxidantes derivados do oxigênio molecular, entretanto, embora também altamente reativos, não são radicais, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Fig. 2). Por compartilharem algumas características químicas e biológicas, damos a esse conjunto o nome de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estresse oxidativo pode ser definido como a produção excessiva, não compensada, ou descompartimentalizada (ou seja, fora do microambiente celular adequado) de espécies reativas de oxigênio. Considerando a alta reatividade entre tais espécies, particularmente o radical superóxido e o óxido nítrico, um denominador comum do estresse oxidativo vascular é a redução da bioatividade do óxido nítrico, com conseqüente tendência a vasoconstrição, aumento da adesividade plaquetária, e aumento da expressão de moléculas de adesão da parede vascular. Estresse oxidativo é um mecanismo de lesão tecidual comum a diversas situações patológicas,

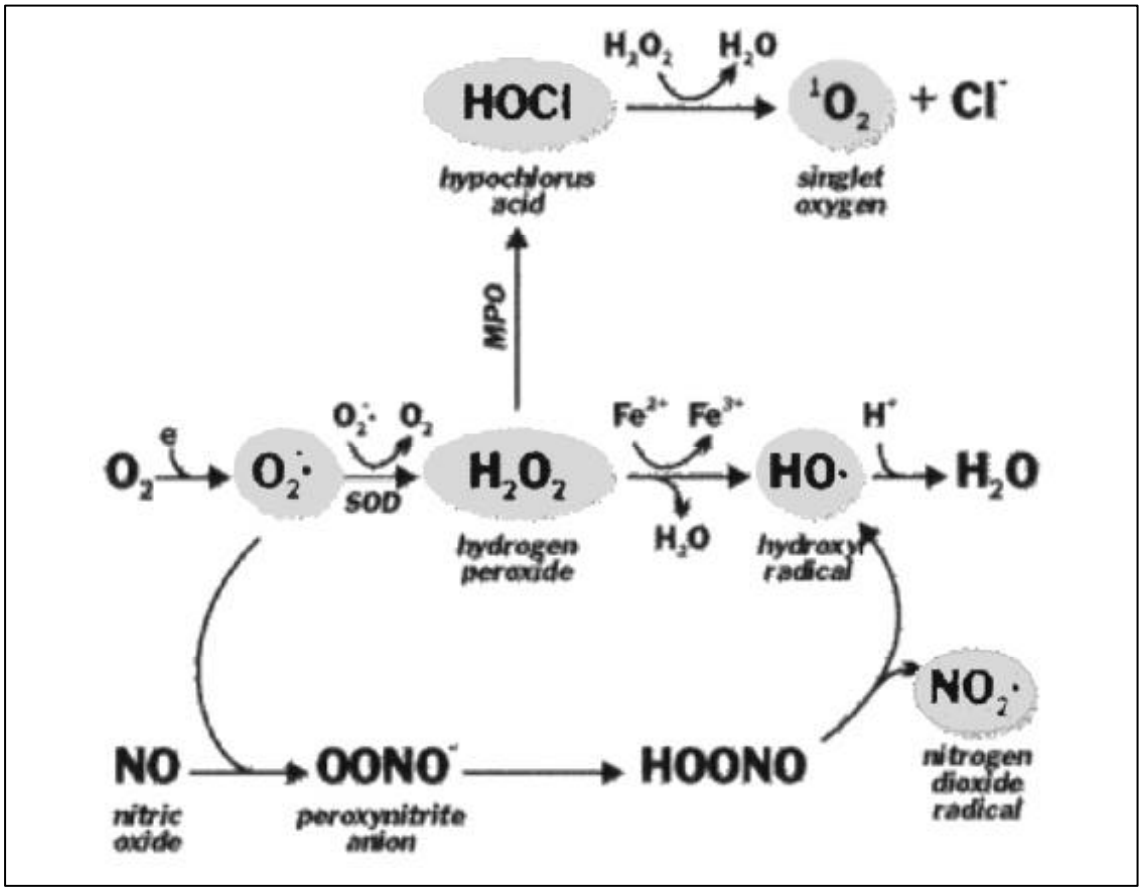

Figura 2. Diagrama ilustrando a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio. O oxigênio molecular é reduzido por diversos sistemas enzimáticos celulares ao radical superóxido. Esse radical é reduzido pela enzima superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Alternativamente, em condições especiais, o superóxido pode reagir com o óxido nítrico (NO), gerando o oxidante peroxinitrito. O peróxido de hidrogênio é convertido a água pela enzima catalase ou pode gerar, na presença de metais de transição, o radical hidroxila, extremamente reativo.

como, por exemplo, lesão de isquemia-reperfusão e carcinogênese[10]. Mais recentemente, entretanto, as espécies reativas de oxigênio foram descritas também como parte do sistema de transdução de sinais para o meio intracelular em situações fisiológicas ou patológicas, com especial importância no tecido vascular[7].

Degradação da matriz extracelular

As metaloproteinases participam em diversos dos processos envolvidos na aterogênese, como angiogênese e remodelamento[11]. Entretanto, mais interessante, pelo seu potencial clínico e terapêutico, é seu papel na ruptura da placa aterosclerótica. Um dos principais marcadores da vulnerabilidade da placa aterosclerótica é a diminuição do conteúdo de colágeno, particularmente na cápsula. Tal fenômeno ocorre tanto pela atividade proteolítica aumentada, como pela diminuição da síntese de colágeno pelas células da parede arterial[12].

A perda do colágeno fibrilar dentro da capa fibrótica da placa aterosclerótica é mediada por uma família especializada de metaloproteinases de matriz, chamadas colagenases intersticiais. Os três tipos de colagenases intersticiais (MMPs 1, 8 e 13) foram descritas dentro da placa aterosclerótica e co-localizam-se com regiões em que o colágeno tipo I é degradado[13,14].

As espécies reativas de oxigênio desempenham papel importante no controle da expressão e da atividade das metaloproteinases de matriz (MMP). Peróxido de hidrogênio mostrou ser importante indutor da expressão e da atividade de MMP-1[15, 16] e MMP-13[17] em células em cultura. Em modelos "in vivo", o desbalanço redox provocado pela infusão de glutationa reduzida ativou metaloproteinases e afetou negativamente a remodelação vascular[18]. Também as espécies reativas de oxigênio demonstraram ser capazes de modular a degradação da matriz extracelular em áreas de estresse oxidativo, podendo, portanto, contribuir para a instabilidade da placa aterosclerótica[19].

Formação do centro necrótico

Um dos motivos de instabilidade da placa aterosclerótica é a redução de sua celularidade, decorrente, em grande parte, da morte das células que compõem o ateroma. A formação desse núcleo necrótico ("necrotic core") da placa aterosclerótica decorre, basicamente, da apoptose das células da placa, especialmente das células musculares lisas e das células do sistema imune[20].

Evidências experimentais demonstraram que essa morte celular programada pode ser induzida por oxidantes[21]. Dados posteriores confirmaram esses achados e os expandiram para as células da parede vascular, em modelos "in vitro" e "in vivo"[22].

O papel das espécies reativas de oxigênio como indutores de apoptose nas células da placa aterosclerótica ainda precisa ser provado. Entretanto, alguns dados experimentais recentes parecem corroborar essa hipótese. Células endoteliais sofrem processo de apoptose quando expostas a estresse oxidativo[23, 24]. Ocorrendo "in vivo", esse fenômeno pode ser responsável por erosões na superfície da placa, fenômeno que pode causar trombose intracoronária e desencadear síndromes isquêmicas agudas.

Aumento da atividade pró-coagulante

Como descrito anteriormente, as espécies reativas de oxigênio podem modular a apoptose das células que compõem a placa de ateroma e a degradação de matriz extracelular, processos capazes de expor sítios pró-trombóticos na parede vascular[1, 12]. Paralelamente, as espécies reativas de oxigênio podem, entre outros efeitos na cascata de coagulação, ativar plaquetas[25] ou aumentar a expressão do fator tecidual[26]. O fator tecidual (fator "extrínseco da coagulação") é uma proteína altamente expressa pelo macrófago e que representa um elo importante entre inflamação e trombose.

Em conjunto, esses dados transferem para o equilíbrio redox importante papel no controle dos fenômenos trombóticos secundários à ruptura ou à erosão da placa aterosclerótica[27].

Processo inflamatório

A presença de processo inflamatório ativo é um achado comum em exames de artérias coronárias de pacientes que morreram subitamente em decorrência de isquemia cardíaca[28]. É comum, também, presença de células inflamatórias ativadas na região da placa aterosclerótica onde ocorreu a ruptura[3]. Em conjunto, esses dados sugerem que o processo inflamatório é um importante mecanismo desencadeante da ruptura da placa.

Embora os mecanismos de controle desse processo inflamatório sejam extremamente complexos, informações recentes nos auxiliam a entendê-lo melhor.

A via de sinalização CD40-CD40L

O receptor de membrana CD40 foi inicialmente descrito em linfócitos B como parte crucial de um sistema de ativação e diferenciação dependente do contato com o antígeno de membrana CD40L, presente em células T[29]. Posteriormente, foi demonstrado que ambas as proteínas são expressas de maneira funcional na placa aterosclerótica[30]. Esses achados desencadearam grande interesse sobre o papel da ligação CD40/CD40L na formação e na ruptura da placa de ateroma.

A relevância biológica desses mediadores nas fases iniciais da patogênese da aterosclerose foi confirmada com o uso de modelos animais. Camundongos hiperlipidêmicos deficientes em receptores para lipoproteína de baixa densidade (LDLr -/-) tratados com anticorpo anti-CD40L antes do aparecimento das lesões apresentaram significante redução na formação inicial das placas de ateroma[31]. Nesses mesmos animais, o tratamento com anticorpos anti-CD40L após o estabelecimento da aterosclerose evitou a progressão e alterou a composição das placas de ateroma, tornando-as mais ricas em colágeno e células musculares lisas, com menos lípides e macrófagos, menos propensas, portanto, à ruptura[32]. Esses achados foram confirmados em um modelo de camundongos hiperlipidêmicos por deficiência em apolipoproteína E, no qual o silenciamento da expressão de CD40L foi realizado geneticamente (apo E -/- e CD40L -/-). Nesses animais não houve alteração na formação inicial das lesões ateroscleróticas, mas as placas de ateroma continham menos lípides e eram mais ricas em colágeno, sendo, portanto, mais estáveis[33].

Paralelamente às evidências do papel do CD40/CD40L na formação e na composição da placa de ateroma, essa via de sinalização participa também dos fenômenos inflamatórios que levam ao desencadeamento das síndromes coronárias agudas (Figs. 3 e 4). A ativação da via de sinalização CD40/CD40L está envolvida na manutenção do processo inflamatório local, por meio da geração de citocinas (IL-1, IL-6) e do aumento da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio (VCAM)[34]. A ligação CD40/CD40L aumenta, também, a expressão e a atividade de MMP-1 (colagenase intersticial tipo 1), MMP-2 (gelatinase), MMP-3 (estromelisina 1) e MMP-9 (gelatinase B)[13, 35, 36], tanto em células musculares lisas vasculares[35] como em macrófagos[30]. A essa atividade aumentada das metaloproteinases, que levam a maior risco de ruptura da placa de ateroma, soma-se o fato de que a ligação CD40/CD40L ocasiona aumento da expressão de fator tecidual em células endoteliais[37] e musculares[35]. Em conjunto, a perda da integridade da placa e a expressão aumentada de proteínas pró-trombóticas, processos modulados pela via de sinalização CD40/CD40L, podem desencadear os fenômenos trombóticos agudos responsáveis pela isquemia tecidual.

Esses dados, obtidos em modelos experimentais, provavelmente têm relevância clínica. Inúmeras evidências histológicas em espécimes recolhidas por aterectomia[38] ou em exames "post mortem"[28] sugerem que a ruptura da placa aterosclerótica está relacionada a recrudescimento do processo inflamatório presente em sua vizinhança. Células T acumulam-se nas regiões vulneráveis da placa e aumentam sua produção de enzimas capazes de degradar colágeno, inclusive as metaloproteinases de matriz (MMPs)[11]. Em adição, o processo inflamatório local, com conseqüente produção de citocinas, especialmente interleucina 1beta (IL-1beta) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), pode também levar ao aumento da produção de metaloproteinases de matriz[11] e à diminuição da produção de colágeno[2] pelas células musculares lisas vasculares. Como descrito anteriormente, todos esses processos aqui listados são modulados pela via de sinalização CD40/CD40L.

Em conjunto, os dados experimentais e clínico-laboratoriais sugerem que a via de sinalização CD40/CD40L é um dos mecanismos importantes no desencadeamento do processo inflamatório, que culmina com a ruptura da placa de ateroma e a conseqüente síndrome isquêmica aguda.

O controle da expressão de CD40/CD40L ocorre na etapa da transcrição gênica e necessita síntese protéica[39]. Não se conhecem, até o momento, modificações pós-translacionais sofridas por essas proteínas. Assim, a atividade dessa via de sinalização é controlada pelo controle da expressão das proteínas CD40 e CD40L.

Alguns dos estímulos que sabidamente estimulam a expressão de CD40 ou CD40L, como, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias (IL-1beta, TNF-alfa, IL-4)[35, 40], exposição à luz ultravioleta[41] e ésteres de forbol[42], são capazes, também, de aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio. Partindo desses achados

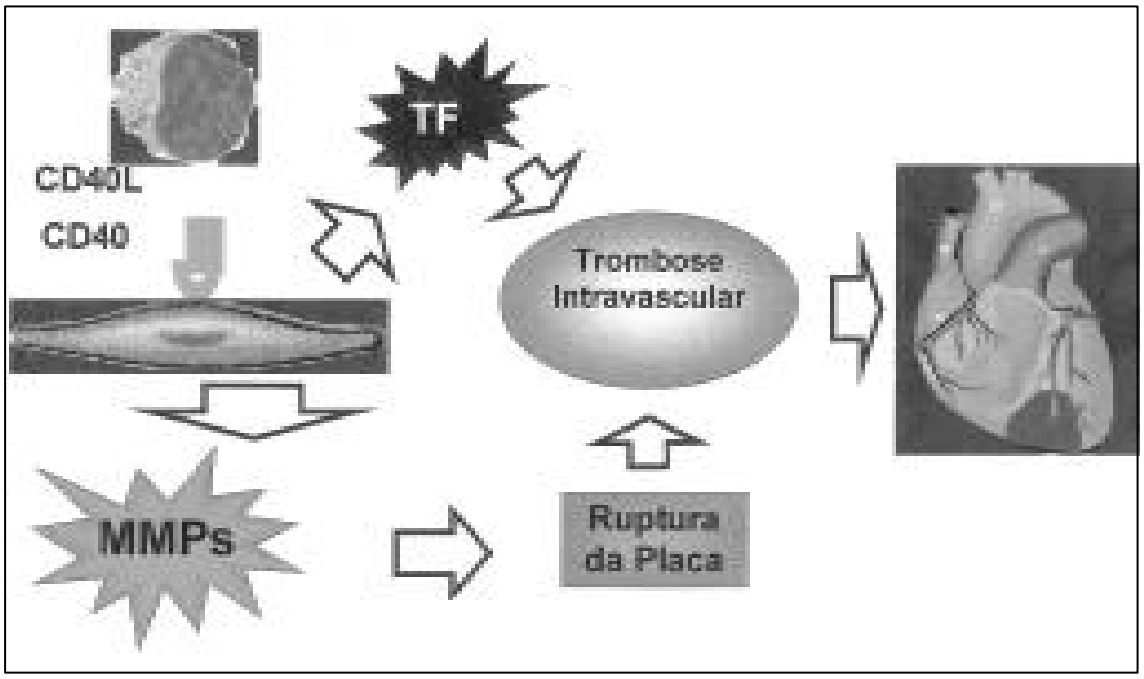

Figura 3. Esquema resumindo o envolvimento do sistema CD40/CD40L na ruptura da placa aterosclerótica. O antígeno de membrana CD40L pode ser expresso por células inflamatórias ou da parede vascular. Ao ligar-se ao receptor de membrana CD40, expresso por células da parede vascular, desencadeia aumento da expressão e ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs), levando à ruptura da placa. Paralelamente, ocorre aumento da expressão e da atividade do fator tecidual (TF). Em conjunto, esses fatores levam à coagulação intravascular, responsável pela oclusão arterial e pela isquemia tecidual, desencadeantes das síndromes coronárias agudas

prévios, realizamos experimentos para determinar se as espécies reativas de oxigênio podem funcionar como segundos-mensageiros no aumento da expressão de CD40 ou CD40L induzida por citocinas.

O aumento da expressão de CD40 induzida pelas citocinas IL-1beta e TNF-alfa em células musculares lisas de coronária humana em cultura foi abolido pelo tratamento prévio dessas células com antioxidantes (Fig. 4). Confirmando esses achados, a exposição dessas células a peróxido de hidrogênio causou grande aumento da expressão do CD40. Interessantemente, a expressão de CD40L não foi alterada pelo H_2O_2 ou antioxidantes, sugerindo mecanismos diversos de controle da expressão dessas proteínas.

As espécies reativas de oxigênio responsáveis por esse fenômeno eram derivadas de uma NAD(P)H oxidase, já que células nas quais foi bloqueada a produção da subunidade $p22^{phox}$ dessa enzima não apresentavam aumento de CD40 quando expostas a citocinas.

Esses dados experimentais, embora preliminares, sugerem uma maneira pela qual o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio pode alterar o tênue equilíbrio que modula a resposta inflamatória na placa aterosclerótica.

O fator de transcrição NF-kappaB (Fig. 5)

A adaptação a várias formas de estresse celular envolve a transdução de sinal para o citoplasma e, subseqüentemente, para dentro do núcleo, em que ocorrem alterações de regulação e expressão gênica[9]. Esse processo envolve a ativação de fatores de transcrição, proteínas que, uma vez ativadas, se ligam a seqüências específicas no DNA da região promotora de certos genes. Dessa forma, o estresse transitório pode determinar alteração sustentada do tecido por controlar programas específicos de respostas gênicas. A ativação de fatores de transcrição sensíveis a oxidantes pode afetar uma variedade grande de eventos fisiopatológi-

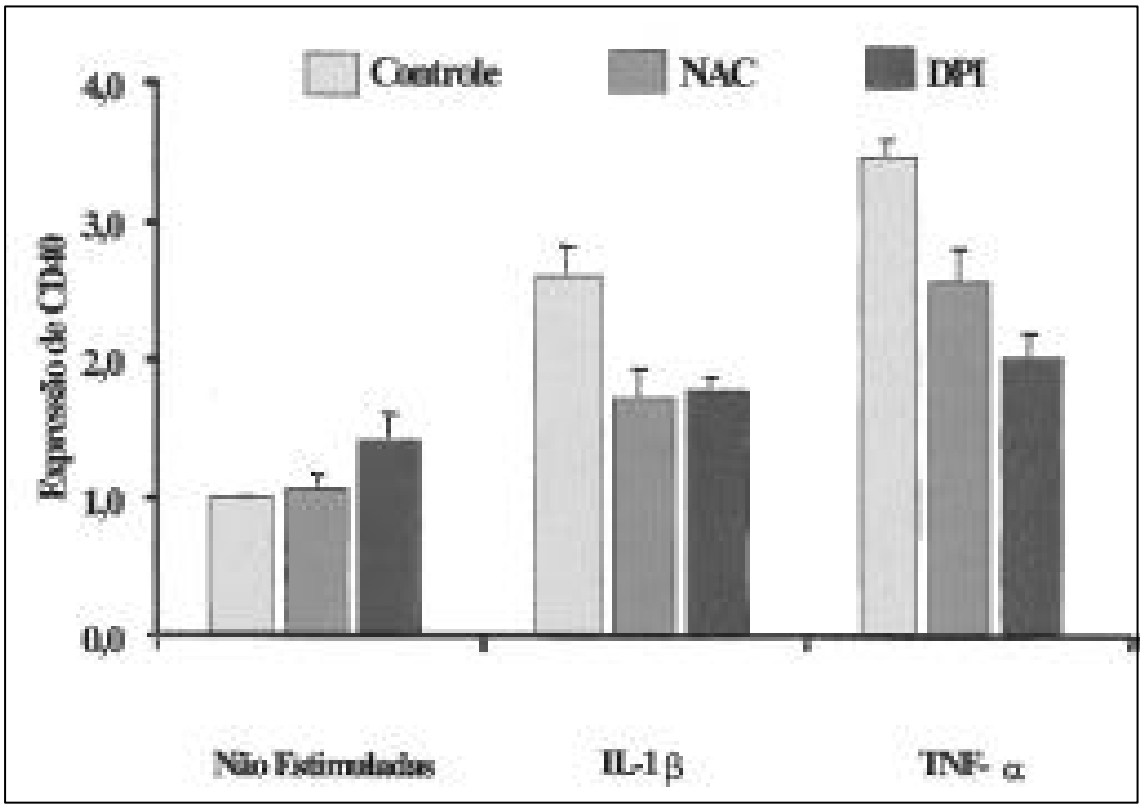

Figura 4. Expressão de CD40 por células musculares lisas (coronária humana) em cultura. O estímulo com as citocinas TNF-alfa ou IL-1beta aumenta a expressão do receptor de membrana CD40, conforme mostrado nos imunoblots. Esse aumento é bloqueado pelo antioxidante N-acetilcisteína ou pelo inibidor de flavoproteínas DPI (difenilenoiodônio), sugerindo que a formação de espécies reativas de oxigênio é necessária como segundo mensageiro para a expressão de CD40 induzida por essas citocinas. Experimentos adicionais (não mostrados) sugeriram que essas espécies derivam de uma NAD(P)H oxidase vascular.

cos envolvidos na gênese da aterosclerose e da ruptura da placa[43].

Entre os fatores de transcrição sensíveis a alterações do equilíbrio redox intracelular, o fator nuclear kappa B (NF-kappaB) é o mais estudado nas doenças cardiovasculares[44]. De forma simplificada, o fator de transcrição NF-kappaB existe como um complexo inativo no citosol, ligado à molécula inibidora I-kappaB. Na presença de determinados estímulos, inflamatórios ou não, o I-kappaB é fosforilado, liberando o NF-kappaB, que migra para o núcleo, onde se liga ao DNA, iniciando a transcrição de um programa gênico ligado à resposta inflamatória, desde moléculas de adesão e citocinas até enzimas antioxidantes[45].

Em estudos realizados em nosso laboratório, demonstramos que a ativação do fator de transcrição NF-kappaB ocorre após lesão vascular por balão de angioplastia e que essa ativação é dependente da geração de ERO pela NAD(P)H oxidase vascular[46]. Em outros modelos, a ativação do NF-kappaB também mostrou ser estimulada peças espécies reativas de oxigênio, inclusive na placa aterosclerótica, onde a ativação do fator de transcrição NF-kappaB faz parte das vias de sinalização responsáveis pelo aumento da expressão de metaloproteinases[47], no desencadeamento da apoptose celular[22, 48] ou no aumento de fatores pró-coagulantes[49].

Dessa maneira, por meio de sua atuação sobre o NF-kappaB e outros fatores de transcri-

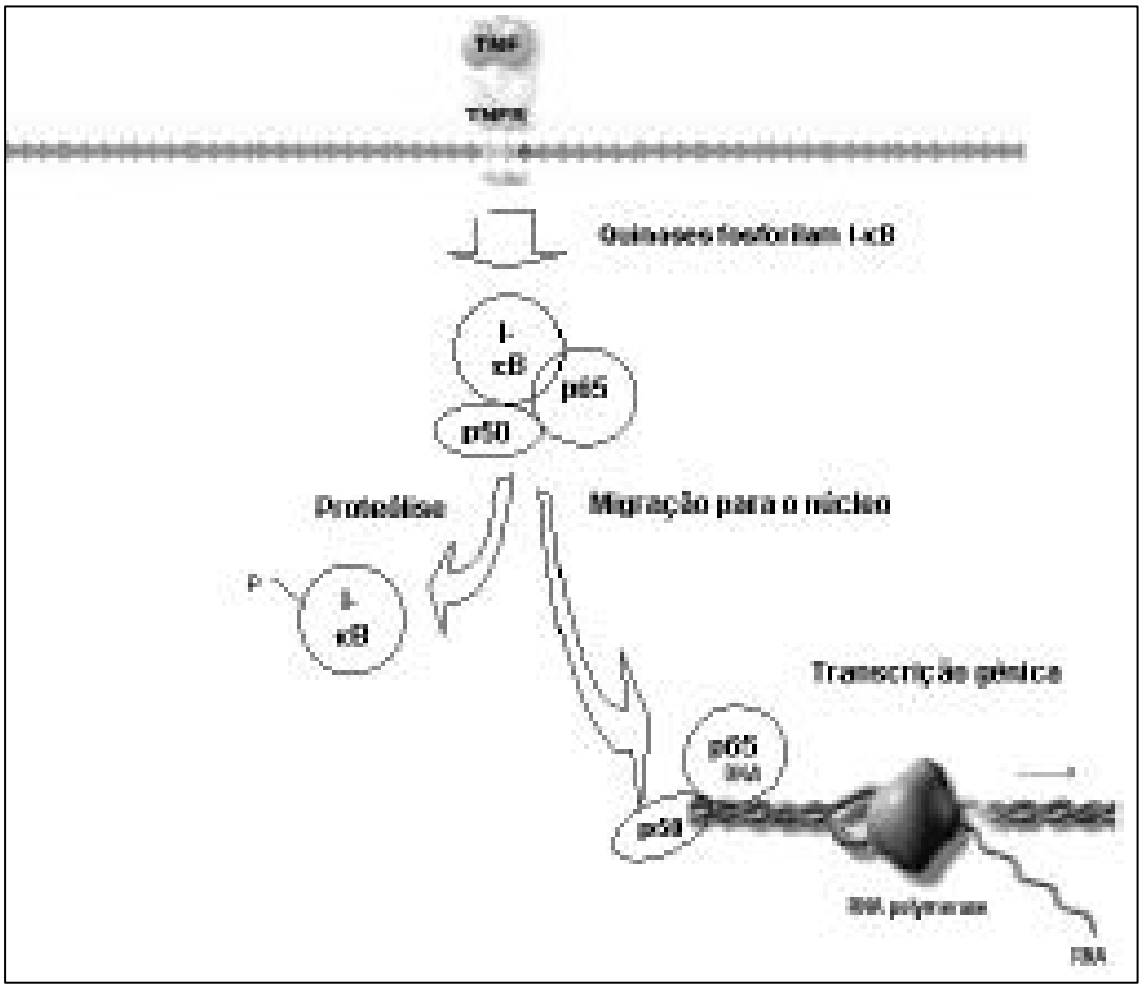

Figura 5. Mecanismo de ativação da transcrição gênica via fator de transcrição NF-kappaB. O fator de transcrição NF-kappaB, em sua forma mais comum, é um dímero composto pelas proteínas p50 e p65, localizadas no citoplasma e ligadas à molécula inibitória I-kappaB. Determinados estímulos, como, por exemplo, citocinas (TNF-alfa), podem ativar esse fator de transcrição por meio da fosforilação da proteína inibidora, liberando o NF-kappaB, que, então, migra para o núcleo, dando início à transcrição de proteínas ligadas à resposta inflamatória. Espécies reativas de oxigênio são necessárias para ativação das quinases responsáveis pela fosforilação do I-kappaB e pela migração do dímero p50-p65 para o núcleo.

ção sensíveis ao equilíbrio redox, o estresse oxidativo transitório pode modular um programa gênico de respostas sustentadas e coordenadas de inflamação e reparação teciduais, como aquele presente na placa aterosclerótica[45].

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A visão da aterosclerose como uma doença inflamatória traz importantes perspectivas terapêuticas. Para que essa promessa se torne realidade, é necessário o melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelo desencadeamento da ruptura da placa. Dentro desse novo paradigma, o estresse oxidativo desempenha papel importante, não somente nos fenômenos relacionados à aterogênese, mas, também, no desencadeamento das síndromes coronárias agudas.

As espécies reativas de oxigênio podem agir em diversos processos relacionados à ruptura

da placa: ativando metaloproteinases, modulando a apoptose de células que compõem a placa, induzindo fatores pró-trombóticos ou agindo em fatores de transcrição responsáveis pela expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória.

Esses achados tornam as espécies reativas de oxigênio um alvo potencial para o desenvolvimento de novas terapêuticas para a estabilização da placa aterosclerótica.

OXIDATIVE STRESS AND ATHEROSCLEROTIC PLAQUE RUPTURE

HERALDO P. SOUZA, FRANCISCO R. M. LAURINDO

Inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction are important factors contributing to atherogenesis and linking risk factors to atheroma formation. Inflammation, particularly, is the basic phenomenon underlying plaque instabilization, culminating with atheroma rupture, occlusive thrombosis and acute clinical events. Inflammatory events within the atherosclerotic plaque include: mononuclear leukocyte infiltration, increased activity and expression of matrix metalloproteinases, increased expression of prothrombotic factors and programmed cell death (apoptosis) of smooth muscle and endothelial cells. All such factors can be enhanced or mediated by oxidative stress, which is the excessive or uncompensated production of reactive oxygen species. Oxidative stress reduces nitric oxide bioavailability, is involved in low density lipoprotein oxidation and constitutes an intracellular second messenger of growth factors inducing cell proliferation, differentiation and senescence. Oxidative stress is a major inducer of NF-kappaB transcription factor, which induces transcription of a gene program related to inflammation. Recently, the importance of the CD40/CD40L signaling pathway has been increasingly recognized as related to the control of all such processes. It is interesting to note that most such phenomena are mediated by reactive oxygen species, suggesting a role for oxidative stress in the genesis of the ruptured plaque.

Key words: atherosclerosis, plaque rupture, oxidative stress, CD40, inflammation.

(Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2002;4:584-94)

RSCESP (72594)-1248

REFERÊNCIAS

1. Forrester JS. Role of plaque rupture in acute coronary syndromes. Am J Cardiol 2000;86 (8B):15J-23J.
2. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation 2001;104(3):365-72.
3. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. Prog Cardiovasc Dis 2002;44(5):349-56.
4. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. Circulation 1994;90(4):2126-46.
5. Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340(2):115-26.
6. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest 1993;91

(6):2546-51.
7. Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, et al. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. Cardiovasc Res 2000;47 (3):436-45.
8. Mashima R, Witting PK, Stocker R. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 2001;12(4):411-8.
9. De Nigris F, Lerman LO, Condorelli M, Lerman A, Napoli C. Oxidation-sensitive transcription factors and molecular mechanisms in the arterial wall. Antioxid Redox Signal 2001;3(6):1119-30.
10. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982;47(5):412-26.
11. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. Circ Res 2002;90(3):251-62.
12. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. Am J Cardiol 2000;86 (8B):3J-8J;discussion 8J-9J.
13. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. Circulation 1999;99(19):2503-9.
14. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. Circulation 2001;104 (16):1899-904.
15. Ranganathan AC, Nelson KK, Rodriguez AM, et al. Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H2O2-dependent ERK1/2 activation. J Biol Chem 2001;276(17):14264-70.
16. Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, et al. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. J Biol Chem 1999;274 (36):25869-76.
17. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol 2001;280(1): C53-C60.
18. Janiszewski M, Pasqualucci CA, Souza LC, Pileggi F, da Luz PL, Laurindo FR. Oxidized thiols markedly amplify the vascular response to balloon injury in rabbits through a redox active metal-dependent pathway. Cardiovasc Res 1998;39(2):327-38.
19. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. J Clin Invest 1996;98(11):2572-9.
20. Kolodgie FD, Narula J, Haider N, Virmani R. Apoptosis in atherosclerosis. Does it contribute to plaque instability? Cardiol Clin 2001;19(1):127-39, ix.
21. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93 (21):11848-52.
22. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. Circ Res 2000;87(3):179-83.
23. Warren MC, Bump EA, Medeiros D, Braunhut SJ. Oxidative stress-induced apoptosis of endothelial cells. Free Radic Biol Med 2000;29(6):537-47.
24. Cuda G, Paterno R, Ceravolo R, et al. Protection of human endothelial cells from oxidative stress: role of Ras-ERK1/2 signaling. Circulation 2002;105(8):968-74.
25. Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F. Oxygen free radicals and platelet activation. Free Radic Biol Med 1997;22(6):999-1006.
26. Herkert O, Diebold I, Brandes RP, Hess J, Busse R, Gorlach A. NADPH oxidase mediates tissue factor-dependent surface procoagulant activity by thrombin in human vascular smooth muscle cells. Circulation 2002; 105(17):2030-6.
27. Bayele HK, Murdock PJ, Perry DJ, Pasi KJ. Simple shifts in redox/thiol balance that perturb blood coagulation. FEBS Lett 2002; 510(1-2):67-70.
28. van der Wal AC, Piek JJ, de Boer OJ, et al. Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute

coronary syndromes. Heart 1998;80(1):14-8.
29. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol 2000;67(1):2-17.
30. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94(5): 1931-6.
31. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. Nature 1998;394(6689):200-3.
32. Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97(13): 7458-63.
33. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. Nat Med 1999;5(11):1313-6.
34. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature 1998;391(6667):591-4.
35. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? Circ Res 1997;81 (3):448-54.
36. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. J Exp Med 1999; 189(5):843-53.
37. Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczek RA, Muller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. Thromb Haemost 1998;80(6): 1008-14.
38. de Boer OJ, van der Wal AC, Houtkamp MA, Ossewaarde JM, Teeling P, Becker AE. Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to *Chlamydia pneumoniae*. Cardiovasc Res 2000;48(3):402-8.
39. Nguyen VT, Walker WS, Benveniste EN. Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta. Eur J Immunol 1998;28(8):2537-48.
40. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92 (10):4342-6.
41. Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, et al. The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. J Invest Dermatol 1998;110(4):422-7.
42. Law CL, Wormann B, LeBien TW. Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemic human B cell precursors. Leukemia 1990;4(11):732-8.
43. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? J Clin Invest 2001;107(3):255-64.
44. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20 (11):E83-E88.
45. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. Free Radic Biol Med 1997; 22(6):1115-26.
46. Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. Free Radic Biol Med 2000; 28(8):1232-42.
47. Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res 2001;50(3):556-65.
48. Aoki M, Nata T, Morishita R, et al. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. Hypertension 2001;38(1):48-55.
49. Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U. Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. J Biol Chem 2002;277(28):25032-9.