

José Manuel dos Santos Pereira de Moura

**Oxidação das Lipoproteínas Humanas de
Baixa Densidade,
Inflamação e Aterosclerose**

COIMBRA

2010

JOSÉ MANUEL DOS SANTOS
PEREIRA DE MOURA

**Oxidação das Lipoproteínas Humanas de
Baixa Densidade, Inflamação e Aterosclerose**

COIMBRA
2010

**DISSERTAÇÃO DE DOUTORAMENTO
APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

Prefácio

Ao prefaciар esta tese não posso deixar de recordar os factos que contribuíram para a sua concretização.

A realização do internato de Medicina Interna no serviço de Medicina 2 dos Hospitais da Universidade de Coimbra foi determinante no surgimento do meu interesse pela patologia cardiocerebrovascular. O seu Director de então, o Prof Dr Polybio Serra e Silva, ao ser um dos pioneiros no estudo da aterosclerose e dos seus factores de risco, criando uma consulta específica para o seu estudo, foi um catalisador do meu gosto por estas matérias da ciência médica. Uma outra área de interesse do serviço de Medicina 2, em grande parte por influência do Dr Borges Alexandrino, era a das doenças autoimunes, interesse reforçado pela chegada ao serviço do Prof Dr José Júlio Alves de Moura, que tomou posse como director do serviço após a Jubilação do Prof Dr Polybio Serra e Silva.

Assim, quando o Prof Dr José Moura me lançou o repto para a realização de um trabalho de investigação, que culminasse numa tese de doutoramento, procurei responder ao desafio, propondo-me realizar um trabalho que incluísse as minhas duas, e do serviço de Medicina 2, grandes paixões – a aterosclerose e os seus factores de risco e a inflamação / autoimunidade.

Estávamos a assistir a um cada vez maior interesse da inflamação como desencadeante da doença aterosclerótica e da responsabilização da oxidação lipídica, como fornecedora dos principais agressores para o endotélio vascular. Embora existissem muitos autores estrangeiros a debruçar-se sobre estas temáticas, a literatura publicada no nosso país, versando o tema da inflamação, da peroxidação e da aterosclerose era muito menos abundante. Era minha convicção, o interesse da realização de um estudo deste tipo em portugueses, atendendo entre outros factores, à dieta que ainda vai mantendo algumas características próprias.

Resolvi assim aceitar o desafio do meu actual Director, Prof Dr José Moura, elaborando um protocolo de estudo sobre a peroxidação lipídica, a inflamação/imunidade e a aterosclerose.

Sendo essencialmente um médico Internista e apenas acessoriamente um investigador, procurei que este meu estudo fosse essencialmente clínico, apoiado como não poderia deixar de ser numa indispensável componente laboratorial. E assim, o nosso grupo de dislipidémicos foi recrutado da Consulta de Lipidologia e periodicamente avaliado em consultas da especialidade. Reconheço que, da leitura desta tese, sobressaem essencialmente os dados laboratoriais, mas a componente clínica foi uma constante ao longo de todo o trabalho.

Ao escrever este prefácio, significa que terminei esta fase da minha vida profissional, sem dúvida uma das mais importantes.

Todo este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de muitos. Desde logo o Prof Dr José Moura que me lançou o desafio para esta aventura e que sempre me apoiou ao longo da sua realização. O Prof Dr José Manuel Silva que, com todo o seu entusiasmo e saber na área dos factores de risco da aterosclerose e da lipidologia, foi sempre uma presença imprescindível na orientação deste trabalho. O Prof Dr Manuel Santos Rosa, Director do laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que me orientou na componente da imunidade e inflamação e que, juntamente com a Profa Dra Anabela Mota Pinto e a Dra Vera Alves, procedeu à análise das diversas interleucinas e populações celulares. A Profa Dra Leonor Almeida, Directora do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e o Prof Dr Laranjinha, sem os quais toda a parte respeitante à peroxidação lipídica não teria sido possível. O Prof Dr Vítor Rodrigues da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra a quem devo todo o apoio em termos de tratamento estatístico. Os meus colegas da Medicina 2 que colaboraram nas consultas e no cumprimento do protocolo de estudo. Correndo o risco de ser injusto ao esquecer-me de algum, para o que peço já as minhas desculpas, gostaria de referir os Dr(s) Nuno Devesa, Nuno Silva, Patrícia Dias, Paulo Carrola, João Porto, Ana Sofia Madeira, Joana Mota e Elsa Gaspar. Sem a sua ajuda ter-me-ia sido impossível observar, com a periodicidade necessária, os cerca de quarenta participantes deste estudo. Aos Enf(s) Maria João Nicolau e Hélder Nunes, responsáveis pela colheita e envio das amostras para os laboratórios. Para todos eles os meus sinceros agradecimentos. Uma palavra muito especial para os Dr(s) José Ávila Costa,

Diniz Viera e Carmona da Mota, que, ao acederem ao meu pedido para rever esta tese, muito contribuíram, com as suas críticas e sugestões, para que ela contivesse menos imperfeições.

Por último mas não em último, uma palavra para a Cristina, o Gustavo e a Mariana, que com o seu apoio incondicional, particularmente nos momentos de algum desânimo, foram determinantes para levar este projecto até ao fim.

Um obrigado muito especial aos meus pais, exemplo de vida e que em muito contribuíram para o que sou.

Índice

Abreviaturas	1
1- INTRODUÇÃO	3
2 - Radicais livres	4
2.1 - Formação dos Radicais	6
2.1.1 – Cadeia respiratória mitocôndrial	6
2.1.2 – Xantina oxidase	7
2.1.3 – NADH/NADPH	7
2.1.4 – Metabolismo do ácido araquidônico	8
2.2 - Mecanismos Antioxidantes	8
2.2.1 – Peroxidases	9
2.2.2 – Superóxido dismutase	10
2.2.3 – Paroxonase	11
2.2.4 – <i>Plasma activating factor-acetilhidrolase</i> (PAF-AH)	11
2.2.5 - <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	12
2.2.6 - Proteínas de transporte/armazenamento dos metais de transição	12
2.2.7 – Vitamina E	13
2.2.8 – Vitamina C	14
2.2.9 – Coenzima Q	14
2.3 - Peroxidação Lipídica	15
3 - Fisiopatologia da Aterosclerose	16
3.1 - Teoria da Peroxidação Lipídica e Inflamação	17
3.2 - Oxidação das Lipoproteínas	23
3.2.1 – Ciclooxigenase e lipoxigenase	25
3.2.2 – Mieloperoxidase	25
3.2.3. – Óxido Nítrico	26
3.2.4 – NAD(P)H oxidases	28
3.2.5 - Anticorpos anti LDL oxidadas (OxLDL-AC)	30
3.2.6 - Receptores OxLDL	37
3.2.6.1 – Receptores da classe A	38
3.2.6.2 - Receptores da classe B	39
3.2.6.3 – Receptores da classe C	40
3.2.6.4 – Receptores da classe D	40

3.2.6.5 – Receptores da classe E	40
3.2.6.6 – Receptores da classe F	43
4 - Efeitos da Peroxidação Lipídica	43
4.1 - Quimiotaxia e Adesão Celular	43
4.2 - Proliferação celular	44
4.3 – Apoptose	47
4.4 - Ruptura da placa	49
4.5 - Peroxidação lipídica e Angiotensina II (Ang II)	50
4.6 - Peroxidação e proteínas de choque térmico (HSP)	52
4.7 - Peroxidação e Transdução de sinal	53
5 - Avaliação da Peroxidação	61
5.1 – Aldeídos (MDA e HNE)	62
5.2 – Gases voláteis (etano e pentano)	63
5.3 - <i>Total peroxyl radical trapping capacity</i> (TRAP)	63
5.4 – F2-Isoprostanos	63
6 - Protecção anti-oxidativa	68
6.1 – Catalase	69
6.2 - Glutathione peroxidase	69
6.3 – Paroxonase (PON1)	70
6.4 - Superóxido Dismutase (SOD)	71
6.5 - Óxido Nítrico (NO)	72
6.6 - Vitaminas antioxidantes	73
6.6.1 - Alfa-tocoferol (Vit E)	73
6.6.1.1 - Estudos no animal	76
6.6.1.2 - Estudos avaliando os biomarcadores da oxidação	79
6.6.1.3 - Estudos observacionais	81
6.6.1.4 - Estudos caso-controlo	82
6.6.1.5 - Estudos de coorte	83
6.6.1.6 - Estudos que utilizam os níveis sanguíneos da vitamina E	86
6.6.1.7 - Estudos com imagem arterial	88
6.6.1.8 - Estudos de intervenção controlados	90
6.6.1.9 - Vitamina E e Tabaco	98
6.6.2 - Vitamina C (ácido ascórbico ou ascorbato)	100
6.6.3 – Carotenóides	105

6.7 – Probuco	110
6.8 - Coenzima Q10 (CoQ)	112
6.9 – Isoflavonas	114
6.10 – Estatinas	115
6.11 - Outras moléculas antioxidantes	116
6.11.1 – Fármacos	116
6.11.2 - Hormonas sexuais	117
6.11.3 – Álcool	119
6.11.4 – Chá	121
6.11.5 - Ácido úrico	121
7 - Acção pró-oxidante da vitamina E	122
7.1 – α -TOH e a peroxidação das lipoproteínas da parede vascular	126
7.2 - Coantioxidantes para o α -TOH	126
7.2.1 - CoQ ₁₀ H ₂	127
7.2.2 – Ascorbato	128
7.2.3 - Óxido Nítrico (ON)	128
8 - Oxidação / Antioxidação e Genética	129
9 - Inflamação e Aterosclerose	131
9.1 - Factores de crescimento e citocinas	131
9.2 – Marcadores inflamatórios e o risco de DCV	136
9.2.1 - Proteína-C-Reactiva (PCR)	136
9.2.2 - Determinação da PCR para avaliação do risco cardiovascular	146
9.2.3 - Moléculas quimiotácticas (Quimiocinas)	150
9.2.4 – Interleucina-8 (IL8)	151
9.2.5 - <i>Cell adhesion molecules</i> (CAM)	152
9.2.6 - Interferão-gama (INFgama)	153
9.2.7 – Interleucina-1 (IL-1)	155
9.2.8 - <i>Tumour necrosis factor α</i> (TNF- α)	155
9.2.9 – Interleucina-6 (IL-6)	157
9.2.10 – Interleucina-3 (IL-3)	158
9.2.11 – Interleucina-18 (IL-18)	159
9.2.12 - Interleucina-10 (IL-10)	162
9.2.13 - <i>Transforming growth factor-β</i> (TGF- β)	164
9.2.14 – Integrinas	164

9.2.15 - CD40	165
9.2.16 - <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	167
9.2.17 - Phospholipase A2 (PLA ₂)	168
9.2.18 - Mieloperoxidase (MPO)	169
9.2.19 - <i>Pregnancy-Associated Plasma Protein A</i> (PAPP-A)	170
9.2.20 - Proteína Amilóide-A Sérica (SAA)	170
9.2.21 - Metaloproteinases (MMPs)	170
9.3 - Acção pró-aterosclerótica da Infecção e da Inflamação	172
9.4 - Infecção e aterosclerose	177
9.5 - Autoimunidade e aterosclerose	182
9.6 - Antígenos na Aterogénese	185
9.6.1 – OxLDL	185
9.6.2 - Células endoteliais (CE)	186
9.6.3 - <i>Heat Shock Proteins</i> (HSP(s))	188
9.7 - Inflamação e HTA	190
9.8 - Inflamação e Diabetes	190
10 – Ef. Imunomoduladores/ antiinflamatórios dos Hipolipemiantes	192
11 – Estatinas	196
11.1 – Efeitos pleiotrópicos	197
11.1.1 – Endotélio	200
11.1.2 - Neo-vascularização	201
11.1.3 - Coagulação e fibrinólise	203
11.1.4 - Proliferação celular	204
11.1.5 - Metabolismo ósseo / Osteoporose	206
11.1.6 - Infecção e sépsis	207
11.1.7 - Activação neurohormonal	208
11.1.8 – Inflamação	208
11.1.9 - Efeitos antioxidantes	220
12 - Activadores dos PPAR(s) – Fibratos e glitazonas	220
12.1 - PPARs e a resposta inflamatória	222
12.2 - PPARs e a estabilidade da placa	226
12.3 - PPARs e trombose	227
12.4 - PPAR(s) e Angiotensina II	228

13 – Probucol	229
14 - CONTRIBUIÇÃO PESSOAL	231
14.1 – Objectivos	232
14.2 - Material e Métodos	233
14.2.1 – Caracterização das populações estudadas	233
14.2.2 - Protocolo do Estudo	234
14.2.2.1 - Avaliação clínica e laboratorial	234
14.2.2.2 - Análise Estatística	235
14.2.2.3 - Apresentação dos resultados	236
14.2.2.4 - Fármacos utilizados	236
14.2.2.5 - Objectivos da terapêutica hipolipemiante	237
14.2.2.6 – Exames complementares realizados	237
15 – Resultados	244
15.1 - Caracterização das populações estudadas	244
16 - Comparação entre as populações estudadas	245
16.1 - Determinações lipídicas	245
16.2 - Determinações séricas da Glicose e do Ácido Úrico	247
16.3 - Resumo e comentários	248
16.4 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante	248
16.4.1 - Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina	249
16.4.2 – Vit. E, TRAP e OxLDL no Plasma	255
16.4.3 - Resumo e comentários	253
16.5 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios	258
16.5.1 - hsPCR e AAT	258
16.5.2 – Interleucinas	261
16.5.3 – Populações Linfocitárias	263
16.5.4 - Resumo e comentários	271
17 – Comparação Grupo Dislipidémicos (D) / Grupo Controlo (C)	286
17.1 - Determinações antropométricas	286
17.2 – Consumo de álcool	287
17.3 - Determinações Lipídicas	288
17.4 - Determinações séricas da Glicose e do Ácido úrico	294
17.5 - Resumo e comentários	296
17.6 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante	300
17.6.1 - Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina	300

17.6.2 - Vitamina E, TRAP e OxLDL no Plasma	302
17.6.3 - Resumo e comentários	307
17.7 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios	309
17.7.1 - hsPCR e AAT	309
17.7.2 – Interleucinas	312
17.7.3 – Populações Linfocitárias	317
17.7.4 - Resumo e Comentários	331
18 - Avaliação arterial não-invasiva	342
18.1 - Índice Perna-Braço	342
18.2 - Espessura Média-Íntima Carotídea	344
19 - Comparação Grupo Estatinas / Grupo Controle	347
19.1 - Determinações Lipídicas	347
19.2 - Resumo e Comentários	354
19.3 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante	355
19.3.1 - Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina	355
19.3.2 - Vitamina E, TRAP e OxLDL no Plasma	357
19.3.3 - Resumo e comentários	361
19.4 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios	364
19.4.1 - hsPCR e AAT	364
19.4.2 – Interleucinas	367
19.4.3 - Populações Linfocitárias	372
19.4.4 - Resumo e Comentários	387
20 - Comparação grupo fibratos / grupo controle	401
20.1 - Determinações Lipídicas	401
20.2 - Resumo e Comentários	408
20.3 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante	409
20.3.1 – Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina	409
20.3.2 - Vitamina E, TRAP e OxLDL no Plasma	411
20.3.3 - Resumo e Comentários	415
20.4 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios	419
20.4.1 - hsPCR e AAT	419
20.4.2 – Interleucinas	422
20.4.3 - Populações Linfocitárias	427
20.4.4 - Resumo e Comentários	441
21 - Comentários finais e conclusões	450

Abreviaturas

4-HNE-LDL	LDL modificadas pelo 4-hidroxinonenal
AE	Angina Estavel
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
AI	Angina Instável
BAEC	<i>Bovine aortic endothelial cells</i>
CCR2	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
CHDL	Colesterol HDL
CLDL	Colesterol LDL
CPE	Células Progenitoras Endoteliais
Cu ²⁺ -LDL	<i>Copper-oxidized LDL</i>
CVLDL	Colesterol VLDL
DCC	Doença cardíaca coronária
EAM	Enfarte agudo do miocárdio
FT	Factor Tecidual
HAEC	<i>Human aortic endothelial cells</i>
HTA	Hipertensão arterial
LOX-1	<i>Lectine-like LDL receptor</i>
LPS	Lipopolissacárido
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDA-LDL	<i>Malondialdehyde-modified LDL</i>
ON	Óxido nítrico
OR	<i>Odds ratio</i>
OxLDL Ac	Anticorpos anti OxLDL
OxLDL	LDL oxidadas
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RR	<i>Relative risk</i>
SCA	Síndrome coronária aguda
SON	Síntase do óxido nítrico
SR	<i>Scavenger receptor</i>
TAS	Tensão arterial sistólica
α-TOH	Alpha-tocopherol

1 - Introdução

Todos os seres vivos, animais e plantas, excepto os organismos especialmente adaptados a viver estritamente em condições anaeróbias, requerem oxigénio para uma eficiente produção de energia. O oxigénio livre terá aparecido na atmosfera terrestre há aproximadamente 2×10^9 anos, acompanhando a evolução dos organismos fotossintéticos, sendo agora o elemento mais abundante da crosta terrestre. A produção do oxigénio terá sido acompanhada pelo aparecimento da camada de ozono na alta atmosfera e a absorção das radiações ultravioletas solares pelo oxigénio e ozono, o que permitiu a evolução para organismos mais complexos.

Se a pressão barométrica do ar a nível do mar for de 760 mm Hg, a pressão parcial do oxigénio será de 159 mm Hg. O oxigénio encontra-se também dissolvido na água dos mares, lagos, rios e massas de gelo, estando a sua concentração geralmente em equilíbrio com a da atmosfera. A solubilidade do oxigénio na água do mar, a 10°C, corresponde a uma concentração de 0,284 mmol⁻¹, reduzindo-se com o progressivo aumento da temperatura.

A concentração do oxigénio celular depende das necessidades de cada célula e das velocidades com que ele entra na célula e é consumido. Em alguns ambientes celulares caracterizados por intenso metabolismo, como é o caso dos hepatócitos e dos cardiomiócitos, existe mesmo um gradiente de concentração, com maior nível na membrana celular e menor na mitocôndria.

À medida que a concentração do oxigénio atmosférico aumentou, os seres vivos foram sofrendo cada vez mais a sua agressão, sendo obrigados a desenvolver mecanismos de protecção contra o ataque oxidativo, ou a refugiarem-se em ambientes destituídos de oxigénio.

2 - Radicais Livres

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existência independente e que contém um ou mais electrões desemparelhados (electrão desemparelhado, é aquele que ocupa sozinho uma orbital atómica ou molecular)¹. A presença de um ou vários electrões desemparelhados faz com que o átomo ou molécula seja atraído por um campo magnético e confere-lhe uma alta reactividade química. Um radical pode ter a sua origem quando se quebra uma ligação covalente e cada um dos electrões do par anteriormente partilhado, permanece ligado a cada um dos átomos; este processo designa-se por cisão homolítica. A energia necessária para dissociar uma ligação covalente (as ligações C-H, C-C e C-O requerem temperaturas de 450-600 °C) pode ter origem no calor, nas radiações electromagnéticas ou noutras fontes¹.

Se A e B forem dois átomos ligados covalentemente (xx representando o par electrónico partilhado), a cisão homolítica pode-se representar da seguinte forma: $A \text{ xx } B \rightarrow Ax + Bx$; Ax e Bx são radicais e escrevem-se $A\cdot$ e $B\cdot$ respectivamente. A cisão homolítica da molécula da água dará origem a um radical H \cdot e a um radical hidroxilo ($OH\cdot$)¹.

O oposto da cisão homolítica é a cisão heterolítica, em que um átomo recebe os dois electrões quando uma ligação covalente se dissocia:

$A \text{ xx } B \rightarrow Axx^- + B^+$; o electrão extra recebido por A confere-lhe uma carga negativa e o B, ao perder um electrão, fica positivamente carregado¹.

Voltando ao nosso exemplo da água, a cisão heterolítica, dará origem ao ião H⁺ e ao ião hidróxido (OH^-).

A molécula de oxigénio possui dois electrões desemparelhados, estando assim de acordo com a definição de radical; no entanto, os dois electrões têm o mesmo número quântico de spin (spins paralelos – restrição de spins, reduzindo muito a sua reactividade), constituindo-se no estado mais estável da molécula de Oxigénio. O Oxigénio é um bom agente oxidante (a oxidação é a perda e a redução é o ganho de electrões por um átomo ou molécula – um agente oxidante é aquele capaz de retirar electrões e um redutor é o que fornece electrões)¹.

Formas mais reactivas de Oxigénio são as espécies *singlet*, que podem ser formadas através do fornecimento de energia. Embora não contendo

electrões desemparelhados e não podendo por isso ser considerados radicais, como não têm a restrição de spins do O_2 vêem a sua capacidade oxidativa grandemente aumentada. Se um electrão for adicionado a um átomo de Oxigénio, forma-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Com um único electrão desemparelhado, o superóxido é um radical mais fraco que o próprio O_2 . A adição de mais um electrão, origina o ião peróxido que como não tem electrões desemparelhados não é um radical; nos sistemas biológicos, o produto da redução com dois electrões é o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e a redução com quatro electrões dá origem à água H_2O ¹.

O peróxido de hidrogénio mistura-se facilmente com a água e actua como agente oxidante, aparentemente com propriedades anti-sépticas; por exemplo a actividade anti-séptica do mel, reconhecida desde os tempos antigos no tratamento de feridas cutâneas, deve-se provavelmente à formação do peróxido de hidrogénio pelas enzimas nele contidas.

Os chamados metais de transição, como o Ferro (Fe) e o Cobre (Cu), caracterizam-se pela capacidade de sofrer reacções de oxidação e redução. O Fe, por exemplo, tem duas valências comuns consoante perde dois ou três electrões – Fe $2+$ ou Fe $3+$; também o Cu ao perder um ou dois electrões transforma-se no ião Cu $+$ ou Cu $2+$ ¹.

A capacidade de perder e aceitar electrões, permite a estes iões metálicos participar em importantes reacções de radicais.

Destas, merece especial referência a *reacção de Fenton*, em que a combinação do Fe $2+$ com o peróxido de hidrogénio, dá origem à oxidação do ião Fe $2+$ em Fe $3+$ e produz o *radical Hidroxilo* (OH^{\cdot}) altamente reactivo¹. Esta reacção necessita que um agente redutor forneça um electrão ao Fe $3+$ para o reduzir em Fe $2+$ afim de reagir com o peróxido de hidrogénio; entre os agentes redutores disponíveis “in vivo”, destacam-se o ácido ascórbico e o próprio anião superóxido.

Também o ião Cu⁺, ao reagir com o peróxido de hidrogénio, dá igualmente origem ao radical Hidroxilo e ao Cu $^{2+}$ ¹.

De acordo com os mecanismos descritos acima, é evidente que os metais de transição ferro e cobre são necessários para a produção do altamente reactivo, radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Os organismos procuram manter sob controlo

estes iões metálicos e para isso, socorrem-se de proteínas de transporte e armazenamento, como sejam a transferrina, a ceruloplasmina e a ferritina.

Este tipo de reacções entre os metais de transição e o peróxido de hidrogénio, que muito provavelmente ocorrem nos sistemas biológicos sob certas condições, dão origem a uma série de reacções com o radical OH^\cdot . Assim, o OH^\cdot reage com quase todo o tipo de moléculas celulares: hidratos de carbono, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos e ácidos orgânicos, essencialmente retirando, adicionando ou transferindo electrões. Por exemplo, na reacção do OH^\cdot com a lecitina, um importante fosfolípido das membranas biológicas, o radical oxida este lípido retirando-lhe um electrão, originando um radical carbono que, ao sofrer uma série de posteriores reacções, conduz à lesão da membrana celular. Também ao reagir com a desoxirribose, pertencente ao DNA, o OH^\cdot produz uma série de produtos químicos, alguns dos quais têm demonstrado propriedades mutagénicas nas bactérias.

2.1 - Formação dos Radicais livres

2.1.1 - Cadeia Respiratória Mitocondrial

Nos sistemas celulares, o mecanismo mais eficiente de produção energética, baseia-se na combustão dos açúcares e gorduras, através do grande poder oxidativo do Oxigénio molecular. Estes processos são cuidadosamente controlados nos sistemas biológicos e são executados essencialmente a nível da cadeia respiratória mitocondrial. Nesta cadeia respiratória, o Oxigénio é reduzido (cada átomo de Oxigénio recebe dois electrões e dois prótons, originando uma molécula de água); chama-se redução tetravalente do Oxigénio, porque quatro electrões são captados pelo oxigénio molecular. Uma pequena percentagem de moléculas de O_2 não segue este tipo de reacção, sofrendo em alternativa uma redução monoelectrónica, com produção do anião superóxido $\text{O}_2^\cdot^-$. O anião superóxido possui um electrão extra desemparelhado, constituindo-se como Oxigénio reduzido e como radical. Apesar do nome, o superóxido não é um potente oxidante; dependendo das reacções tanto se pode comportar como agente redutor ou como oxidante. Nas células, o anião superóxido é transformado em peróxido de hidrogénio H_2O_2 , por uma reacção de dismutação,

catalisada pela superóxido dismutase. Uma posterior redução do H_2O_2 com a ajuda de um ião metálico (Fe e Cu, através da reacção de Fenton) dá, como vimos atrás, origem ao radical hidroxilo altamente reactivo. Todas estas reacções envolvem a transferência de electrões, pertencendo ao tipo de *reacção redox*^{1,2}.

2.1.2 - Xantina oxidase

Em condições de hipóxia e/ou anóxia, verifica-se um aumento do cálcio citosólico com activação de enzimas dependentes do Ca^{++} , entre as quais se encontra a que transforma a Xantina desidrogenase em Xantina oxidase. Esta última enzima catalisa a oxidação monovalente das purinas, com produção do anião superóxido e muito provavelmente do Oxigénio singlet¹.

Diversas experiências no animal demonstraram o aumento da Xantina oxidase em situações de isquémia, assim como a protecção do oxipurinol (um inibidor da Xantina oxidase) contra as lesões de isquémia-reperusão. Também o tecido hepático isquémico liberta para a circulação quantidades significativas de Xantina oxidase e de radicais livres.

2.1.3 - NADH/NADPH Oxidase

Uma importante fonte do anião superóxido e de outras espécies reactivas de oxigénio é o conjunto de células fagocíticas, nomeadamente os leucócitos polimorfonucleares. No estado de repouso, os polimorfonucleares satisfazem as suas necessidades energéticas principalmente através da glicólise. O contacto da sua membrana plasmática com microorganismos e outros agentes resulta num rápido aumento das necessidades de oxigénio, a que não corresponde um aumento da actividade respiratória mitocondrial. No processo da fagocitose, o oxigénio é utilizado para produzir espécies reactivas de oxigénio, com forte actividade bactericida. Uma oxidação acelerada da glucose, através da desidrogenase da hexose monofosfato, faz parte deste consumo peculiar do oxigénio. Por cada glucose-6-fosfato oxidada em ribulose-5-fosfato e CO_2 , dois $NADP^+$ são reduzidos em dois $NADPH + H^+$. O $NADPH$ é o substrato para a $NADPH$ oxidase, uma enzima que utiliza o poder redutor do $NADPH$ para

catalisar a redução do oxigénio molecular em superóxido, que, por sua vez e com a acção catalítica da superóxido dismutase, gera peróxido de hidrogénio. A NADPH oxidase é composta de várias subunidades tais como a rac1, a p22phox, a gp91phox, a nox1, a p47phox e a p67phox, sendo a sua actividade dependente da modulação de cada subunidade^{3 4 5 6 7}. A formação do radical hidroxilo pode igualmente ocorrer durante o processo da fagocitose, através da reacção de Fenton.

Um sistema NADH/NADPH oxidase, semelhante ao dos macrófagos, existe na parede vascular e é o principal responsável pela produção de espécies reactivas de oxigénio pelas células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos da adventícia⁸. As células endoteliais contêm todas as sub-unidades da oxidase dos neutrófilos e as células musculares lisas possuem uma proteína denominada NOX (nonphagocytic oxidase), que parece substituir a gp91phox⁹. A actividade da NADPH oxidase vascular é estimulada por determinadas hormonas, factores metabólicos e forças mecânicas, sendo o seu principal activador a Ag II através do receptor AT1¹⁰.

2.1.4 - Metabolismo do ácido araquidónico

A estimulação da fosfolipase A₂, liberta o ácido araquidónico das membranas celulares. Através da acção catalítica das enzimas cicloxigenase e hidroperoxidase, o ácido araquidónico é inicialmente oxigenado em Prostaglandina G₂ e depois convertido em Prostaglandina H₂. Durante este último processo, na presença do NADH e do NADPH, produz-se igualmente o ião superóxido.

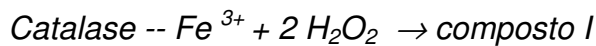
2.2 - Mecanismos antioxidantes

Uma primeira defesa antioxidante baseia-se na capacidade de reduzir enzimaticamente o peróxido de hidrogénio e outros peróxidos e de sequestrar os iões metálicos (ligando-os a proteínas), impedindo assim a produção do radical hidroxilo.

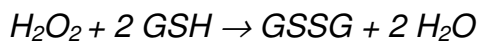
2.2.1- Peroxidases

As peroxidases são enzimas que catalisam a redução dos hidroperóxidos, utilizando diferentes substratos como agentes redutores. As peroxidases mais estudadas são a *catalase* e a *glutathione peroxidase*.

A maior parte das células aeróbicas contém actividade catalase, contrariamente às células anaeróbicas que, na sua esmagadora maioria, não contém a referida enzima; encontra-se essencialmente localizada em organelos rodeados por uma única membrana, conhecidos como peroxisomas. Nos animais, a catalase está presente na maioria dos órgãos, concentrando-se particularmente no fígado e nos eritrócitos. A enzima é constituída por quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um grupo heme Fe^{3+} ; a catalase, na presença do Fe^{3+} , transforma o H_2O_2 em H_2O e O_2 .

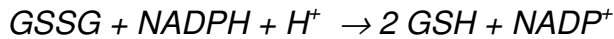


A glutathione peroxidase, é outra enzima envolvida na defesa anti-oxidante e o seu substrato é a glutathione, um tripeptídeo que se encontra em concentrações na ordem dos milimoles por litro nos animais, plantas e algumas bactérias aeróbicas, essencialmente na sua forma reduzida (GSH). No homem, a glutathione é sintetizada no fígado e no intestino. A glutathione peroxidase catalisa a oxidação da GSH em glutathione oxidada (GSSG), servindo-se do H_2O_2 para esse efeito:

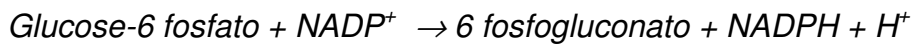


Esta peroxidase apresenta grande actividade no fígado, moderada no coração, pulmão e cérebro e baixa no músculo; é específica para a GSH como doador de hidrogénio, mas reage com outros peróxidos para além do peróxido de hidrogénio. É constituída por quatro subunidades proteicas, cada uma das quais contendo um átomo do elemento Selénio; este elemento, com propriedades intermédias entre as dos metais e as dos não metais, é necessário em pequenas quantidades na dieta animal e alguns dos sintomas da deficiência de selénio poder-se-ão explicar pela resultante falta de glutathione peroxidase. A relação entre a GSH e a sua forma oxidada é normalmente alta a nível celular, pelo que

algum mecanismo deverá existir para reduzir a GSSG; esta acção redutora é executada pela glutathione reductase, enzima que catalisa a reacção:



A NADPH requerida é essencialmente fornecida pela via das pentoses (oxidative pentose phosphate pathway) e a primeira enzima desta via é a glucose-6-fosfato desidrogenase que catalisa a reacção:



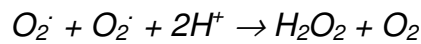
A maioria dos tecidos contém catalase e glutathione peroxidase em proporções variáveis, protegendo as células do ataque oxidativo. Enquanto a catalase se encontra nos peroxisomas, a glutathione peroxidase está no citoplasma e também na matriz das mitocôndrias. A nível celular, a catalase decompõe o H_2O_2 produzido pela glicolato-oxidase e urato-oxidase, nos peroxisomas e a glutathione peroxidase defende a célula do H_2O_2 com origem na mitocôndria, no retículo endoplasmático e no citoplasma.

Tomando como exemplo os eritrócitos, certos indivíduos são portadores de um defeito do gene que codifica a glucose-6 fosfato desidrogenase, possuindo menores quantidades de NADPH, necessária para a redução da glutathione. Estes indivíduos, quase sempre de origem tropical, sofrem uma hemólise quando em contacto com certos fármacos com capacidade para aumentar a produção de H_2O_2 . Este defeito enzimático parece ser um mecanismo de resistência à colonização pelo plasmódio, que necessita do NADPH eritrocitário para regenerar a sua própria GSH. Por outro lado, um defeito da glutathione peroxidase eritrocitária ou da própria GSH, embora menos comum, provoca uma hemólise muito mais severa.

2.2.2 – Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima, ou melhor, um grupo de enzimas, contendo cobre, zinco ou manganésio. A SOD contendo Cu e Zn (SOD CuZn) é constituída por duas sub-unidades proteicas, uma delas ligada ao ião Cu e a outra ao Zn. Enquanto o Cu, durante a acção enzimática, sofre alternadamente reacções de oxidação e redução, o Zn funcionará como estabilizador da enzima. A SOD Manganésio contém em vez de Cu e Zn, um

átomo de Manganésio nas suas sub-unidades proteicas; tem a mesma acção catalítica da SOD CuZn e encontra-se igualmente no citoplasma e na matriz mitocondrial. Em 1968, J.M.McCord e Fridovich, nos Estados Unidos da América, demonstraram a capacidade desta enzima em remover o radical superóxido, dando origem ao peróxido de hidrogénio, através de uma reacção de dismutação:



Sendo o superóxido um radical e um dos principais agentes redutores do Fe^{3+} , transformando-o em Fe^{2+} , necessário para a reacção de Fenton, a SOD constitui um mecanismo de defesa antioxidante, encontrando-se no glóbulo vermelho, no fígado, no cérebro e provavelmente, em muitos outros órgãos e tecidos.

2.2.3 - Paroxonase 1

PON1 - A Paroxonase sérica (PON1) é uma esterase associada às lipoproteínas HDL e que hidrolisa os produtos da peroxidação lipídica, prevenindo assim a oxidação das LDL. Dois polimorfismos comuns do gene PON1, o 192 Gln (Q)→Arg (R) e o 55 Leu (L) →Met (M), determinam a variação individual na actividade da PON1.

2.2.4 - Plasma activating factor-acetilhidrolase (PAF-AH)

A PAF-AH é uma enzima que hidrolisa os ácidos gordos dos fosfolípidos, encontrando-se ligada às lipoproteínas LDL (em 60 a 70%) e às HDL. Ao hidrolizar os fosfolípidos oxidados protege as LDL da oxidação; no entanto, ao hidrolizar a fosfatidilcolina, transforma-a em lisofosfatidilcolina, uma molécula responsável por alguns dos efeitos mais importantes das OxLDL, incluindo a quimiotaxia dos monócitos, a indução das moléculas de adesão e outros¹¹. O papel desta enzima, como protector ou indutor da aterosclerose, será abordado no capítulo da inflamação e aterosclerose.

2.2.5 - Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

O VEGF, também conhecido como factor de permeabilidade vascular é um factor de crescimento e encontra-se presente nas lesões ateroscleróticas humanas e para alguns autores, poderá ter uma acção protectora da célula endotelial. O VEGF contribui para o desenvolvimento do sistema vascular, em situações tão diferentes como o crescimento tumoral, a cicatrização de feridas e a retinopatia diabética^{12 13 14}. A sua acção é regulada através de dois receptores pertencentes à família das tirosina quinases, o Flt-1 e o KDR / Flk-1, ambos expressos nas células endoteliais¹⁵, com diferentes respostas biológicas à estimulação pelo VEGF.

A pré-incubação das células endoteliais da aorta bovina com o VEGF preveniu a toxicidade induzida pelas OxLDL. Este efeito protector está na dependência do aumento da glutathiona intracelular, através da estimulação do receptor KDR/Flk-1, pelo VEGF¹⁶. Os autores admitem que o VEGF possa ter um papel importante na manutenção da morfologia e da função da célula endotelial, nomeadamente contra as agressões oxidativas.

2.2.6 - Proteínas de transporte / armazenamento dos metais de transição

Sendo os metais de transição necessários para a formação do radical hidroxilo, um mecanismo suficientemente eficaz para sequestrar os referidos iões metálicos constituirá, certamente, uma defesa antioxidante.

A *transferrina*, a proteína de transporte do Fe, liga-se a dois átomos de Fe.

A *ferritina*, por sua vez, é uma proteína de armazenamento do mesmo metal, contendo até 4500 átomos deste ião.

A *ceruloplasmina* é a proteína de transporte do Cu. Na doença de Wilson, em que existe uma redução severa nos níveis desta proteína, verifica-se um aumento da produção de radicais livres, estimulada pelo Cu, com as repercussões patológicas características da doença.

2.2.7 – Vitamina E

Uma outra linha de defesa antioxidante baseia-se na capacidade de determinadas moléculas, chamadas por vezes de “radical scavenger”, de reagir com os radicais livres, transformando-os em não radicais. Por sua vez, as moléculas antioxidantes, ao reagir com os radicais livres, transformam-se elas próprias em radicais mais estáveis, interrompendo a reacção em cadeia; podem igualmente ser reconvertidos na sua forma reduzida inicial, anti-oxidante, por agentes redutores apropriados. Por exemplo, a SOD pode ser considerada um “radical scavenger” porque reage com o radical superóxido, transformando-o num não radical. Entre as moléculas com capacidade “scavenger”, encontram-se a albumina, o ácido ascórbico, o ácido úrico, a bilirrubina, os tióis, a vitamina E e a coenzima Q. A eficiência antioxidante de todas estas moléculas depende da sua concentração, da sua reactividade intrínseca e da sua mobilidade.

A Vit E (α -tocoferol) é essencial na dieta de vários animais e a sua falta estará na origem de determinadas doenças: infertilidade / esterilidade (ratos, cães, coelhos e macacos), anemia hemolítica (ratos e galinhas), degenerescência cerebelosa (galinhas). Em contraste, a sua ausência na dieta humana não está associada a qualquer doença específica, provavelmente devido à presença de outras defesas antioxidantes.

A Vit E é uma molécula lipossolúvel que, devido à sua hidrofobia, se concentra predominantemente nas membranas biológicas, nomeadamente na membrana mitocondrial. Constitui o principal antioxidante lipossolúvel do plasma humano, encontrando-se associada às lipoproteínas plasmáticas. Dado que as alterações causadas pela sua deficiência, no animal, são total ou parcialmente corrigidas por antioxidantes sintéticos, admite-se que a sua principal função seja a de proteger contra a oxidação, nomeadamente contra a oxidação lipídica. Esta vitamina reage com o oxigénio singlet, com o superóxido e provavelmente mais importante, com os radicais peroxil nas membranas biológicas, inactivando-os e interrompendo a reacção em cadeia da peroxidação lipídica. Ao reagir com os radicais livres, a Vit E perde um electrão, transformando-se ela própria num radical, embora com reduzida capacidade para continuar as reacções de oxidação. A vitamina E oxidada pode ser de novo reduzida pela acção da Vit C.

Embora a falta da Vit E na dieta dos humanos adultos não esteja associada inequivocamente a qualquer sinal ou sintoma de doença, torna os indivíduos mais susceptíveis à peroxidação. Por exemplo, a quantidade de pentano exalado por voluntários durante um exercício severo, reflexo das reacções de peroxidação lipídica, pode ser reduzido pela administração de suplementos de Vit E¹⁷.

2.2.8 – Vitamina C

A Vit C (ácido ascórbico) é uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada a partir da glicose pelas plantas e muitos animais, mas devido à falta do equipamento enzimático necessário, não é passível de ser sintetizada pelo homem nem por outros primatas. A actividade química mais significativa do ácido ascórbico é a sua capacidade como agente redutor. Por exemplo, a redução do Fe³⁺ em Fe²⁺ pela Vit C é de extrema importância para a absorção intestinal do ferro. Ao doar um electrão, o ácido ascórbico transforma-se em radical semihidroascórbico, podendo ser ainda mais oxidado, dando origem ao dehidroascórbico. As soluções aquosas de ácido ascórbico são estáveis, a menos que estejam presentes metais de transição que catalisam a sua rápida oxidação. A oxidação da Vit C induzida pelo cobre produz peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo. Por outro lado, o ácido ascórbico reage rapidamente com os radicais superóxido e hidroxilo, inactivando-os e transformando-se em semihidroascorbato e catalisa a reacção de redução do radical da Vit E, repondo os níveis desta importante vitamina antioxidante. Pelo que foi dito, a Vit C tem propriedades pró e antioxidantes.

2.2.9 – Coenzima Q

A coenzima Q (ubiquinona) foi descoberta no interior da membrana mitocondrial, aonde a energia química de algumas moléculas orgânicas é transformada em adenosina trifosfato (ATP), a principal forma de energia utilizada pelas células. A ubiquinona encontra-se igualmente nas lipoproteínas plasmáticas.

A coenzima Q funciona como antioxidante lipossolúvel nas membranas biológicas, tendo as suas propriedades antioxidantes sido testadas em numerosos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. São vários os mecanismos pelos quais a coenzima Q protege as membranas da oxidação. A ubiquinona é reduzida em ubiquinol (CoQH₂) e nesta forma reduzida, impede o ataque oxidativo aos ácidos gordos, catalisado pelo ferro, impedindo ou atrasando a reacção em cadeia da peroxidação lipídica. Por outro lado, a coenzima Q regenera o α -tocoferol ao reduzir o seu radical tocoferil.

2.3 - Peroxidação Lipídica

A Peroxidação lipídica pode ser definida como a deterioração oxidativa dos lípidos polinsaturados, ou seja, os que contêm mais do que uma dupla ligação covalente carbono-carbono.

A reacção de lipoperoxidação, quer ocorra numa membrana ou numa lipoproteína, tem início com a acção de qualquer espécie química, capaz de retirar um hidrogénio a um grupo metileno (-CH₂-) de um ácido gordo polinsaturado, transformando este grupo num radical carbono, que, ao ser estabilizado por rearranjo molecular, produz um dieno conjugado. O dieno conjugado reage posteriormente com uma molécula de oxigénio para formar um radical peroxil, (R—OO \cdot). Este radical pode retirar um átomo de hidrogénio de uma outra molécula lipídica, transformando-se num hidroperóxido lipídico (R—OOH) e perpetuando a reacção em cadeia da peroxidação. Os hidroperóxidos lipídicos são razoavelmente estáveis às temperaturas fisiológicas, mas, na presença de metais de transição, a sua decomposição é catalisada. Muitos destes metais estão presentes *in vivo*, sendo o ferro o mais abundante, presente na hemoglobina, na mioglobina, e nos citocromos. A ferritina catalisa a decomposição dos hidroperóxidos numa extensão proporcional ao seu conteúdo em ferro. A transferrina e a lactoferrina têm um efeito inibidor, excepto quando estão completamente saturadas com ferro. O ferro reduzido (Fe²⁺) pode reagir com um hidroperóxido lipídico, numa forma semelhante à sua reacção com o peróxido de hidrogénio, causando a ruptura da ligação O-O para formar um radical alcoxi.



Os radicais alcoxi são mais reactivos do que os peroxi; qualquer um destes radicais pode, no entanto, perpetuar a reacção em cadeia da peroxidação lipídica. Se o Fe^{2+} reage com um hidroperóxido no 5º Carbono dum grupo metil terminal de um ácido gordo, forma-se o gás pentano. Esta reacção pode acontecer com os ácidos gordos polinsaturados linoleico e araquidónico. De uma forma semelhante, produzem-se os gases etano e pentano na reacção com o ácido linolénico. Paralelamente à sua função perpetuadora da peroxidação, os radicais alcoxi e peroxi sofrem uma série de reacções complexas, conduzindo à formação de hidrocarbonetos e compostos com o grupo carbonilo (C=O), particularmente aldeídos (RCHO). Exemplos de aldeídos são o 4-hidroxinonal e o malonaldeído (MDA).

Quando o fenómeno da peroxidação lipídica ocorre nas membranas biológicas, provoca uma perda das suas propriedades. A membrana perde fluidez, torna-se permeável para substâncias que normalmente não a atravessam e vê as enzimas que normalmente lhe estão ligadas serem inactivadas.

3 - Fisiopatologia da Aterosclerose

Não é nossa intenção fazer uma revisão exaustiva sobre as diversas teorias que procuram explicar a fisiopatologia da aterosclerose. De facto e socorrendo-nos da Dissertação de Doutoramento de José Manuel Silva¹⁸, as diferentes interpretações sobre a patogénese da aterosclerose vão desde a *teoria lipídica*, que sugere que a acumulação de colesterol na parede arterial será o desencadeante da aterogénese, passando pela *teoria da peroxidação lipídica / radicais livres*, em que se defende que os lípidos e particularmente as LDL, só depois de sofrerem uma modificação oxidativa serão capazes de iniciar todos os mecanismos que culminam na doença aterosclerótica, pela *teoria imunológica*, em que os principais responsáveis pela lesão do vaso serão as imunidades celular e humoral, pela *hipótese do cálcio*, que aponta este ião como factor primário da aterogénese, pela atractiva *hipótese infecciosa / viral*, em

que se defende que serão os agentes infecciosos, nomeadamente certos vírus, a iniciar os mecanismos inflamatórios que desencadeiam e perpetuam a lesão aterosclerótica, até à *teoria da fadiga*, que, através da mecânica de fluidos e tensões da parede, procura explicar não só a patogénese da aterosclerose como as localizações preferenciais das lesões arteriais.

Elegemos como objecto do nosso trabalho teórico e prático a:

3.1 - Teoria da Peroxidação Lipídica e Inflamação

Quaisquer que sejam o(s) mecanismo(s) desencadeadores da aterosclerose, inicialmente interpretada como uma doença essencialmente degenerativa, é hoje considerada uma doença inflamatória crónica, que, em determinada altura e devido à ruptura da placa, se transforma numa síndrome isquémica aguda. Um facto que, aparentemente, é indispensável ao desencadear das lesões de aterosclerose, é a penetração e retenção na parede da artéria das lipoproteínas, nomeadamente das LDL. As LDL penetram através do endotélio e são retidas na matriz intercelular, constituída por fibras e fibrilhas secretadas pelas células da parede arterial, para a qual a apolipoproteína B (apoB) apresenta grande afinidade. Esta fixação subendotelial das lipoproteínas tem uma predilecção por determinados locais dos vasos, relacionada com fenómenos hemodinâmicos e mecânicos¹⁹. Na parede arterial, as LDL são sujeitas à acção de diversas espécies altamente reactivas, com capacidade oxidativa, sintetizadas pelas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos^{20 21 22 23}. A peroxidação das LDL, fenómeno de particular importância na patogénese da aterosclerose, ocorrerá muito provavelmente em duas etapas sucessivas. Inicialmente, antes da penetração dos monócitos no espaço subendotelial, verifica-se a modificação oxidativa dos lípidos das LDL, mantendo-se a apoB praticamente inalterada. Quando os monócitos são recrutados para a lesão e se convertem em macrófagos, com o consequente aumento da sua capacidade oxidativa, para além da continuação da peroxidação da metade lipídica da lipoproteína, ocorre igualmente a oxidação da apoB^{24 25 26}.

Há cerca de 20 anos, alguns investigadores descobriram a citotoxicidade das LDL oxidadas (OxLDL) e a sua capacidade para transformar os macrófagos, nas características células espumosas, “foam cells”, capacidade esta não

partilhada pelas LDL não oxidadas^{27 28 29 30}. O termo OxLDL não identifica uma molécula bem definida, mas uma classe de lipoproteínas que, consoante a natureza dos lípidos e a qualidade e concentração dos antioxidantes da partícula lipoproteica e das espécies oxidantes presentes, sofrerão alterações oxidativas em maior ou menor extensão dando origem a diferentes lipoproteínas³¹. As próprias LDL nativas são heterogéneas e não seria de esperar que a oxidação de partículas inicialmente heterogéneas resultasse em partículas homogéneas. Assim, existe uma variabilidade quase infinita de lipoproteínas oxidadas, com diversos graus de oxidação do colesterol, dos fosfolípidos, dos ésteres de colesterol, dos triglicerídeos e das apoproteínas³². Esta variabilidade pode ser uma das explicações para a ausência de concordância, entre alguns dos trabalhos encontrados na literatura, sobre o papel das OxLDL na aterogénese.

Há diversos factos que suportam o papel da oxidação das lipoproteínas na etiopatogénese da aterosclerose:

- 1 - As OxLDL estão presentes *in vivo*, particularmente nas lesões arteriais.
- 2 - A possibilidade de, *in vitro*, as OxLDL desencadearem um conjunto de alterações que se admite estarem na génese da lesão arterial *in vivo*.
- 3 - Em modelos animais, a utilização de antioxidantes inibe ou atrasa a formação das lesões de aterosclerose
- 4 - A utilização de animais transgénicos e *Knockout* para testar a importância de diversos sistemas que se julga estarem envolvidos nos mecanismos oxidativos.

Uma variedade de produtos de oxidação de lípidos e proteínas têm sido identificados nas lesões de ateroma, o que não significa que pertençam necessariamente às LDL. Contudo, algumas lipoproteínas isoladas dessas lesões apresentam características das OxLDL, como sejam a mobilidade electroforética e a reactividade com os anticorpos anti OxLDL (OxLDL-Ac)^{33 34}. Não nos esqueçamos, no entanto, que os OxLDL-Ac podem reagir cruzadamente com outros epítomos antigénicos, presentes, por exemplo, nas células apoptóticas. Assim, a reactividade com estes anticorpos nem sempre é sinónimo da presença de OxLDL. Por exemplo, a oxidação da fosfatidilcolina, que ocorre durante a modificação oxidativa das LDL, é responsável por alguma da reactividade cruzada entre as OxLDL e as células apoptóticas³⁵. As OxLDL têm sido identificadas no plasma humano; se elas são oxidadas no plasma, ou

se sofrem a modificação oxidativa na parede vascular e depois regressam ao compartimento plasmático, é ainda motivo de investigação^{36 37}. No entanto, a presença dos OxLDL-Ac plasmáticos sugere que os mecanismos de oxidação se processam *in vivo*³⁸. Também têm sido identificados no plasma diversos produtos da oxidação lipídica e na urina alguns produtos da sua degradação^{39 40}⁴¹. Algumas destas substâncias oxidadas resultam certamente da oxidação das LDL, embora possam também resultar da oxidação de lípidos com outra origem.

Em relação aos efeitos biológicos dos produtos de oxidação lipídica, nomeadamente das OxLDL, têm sido fruto de intensa investigação.

Assim, sabe-se que as OxLDL apresentam propriedades que se julga serem da maior importância para o desenvolvimento da aterosclerose. As OxLDL podem atrair os monócitos, induzir a sua adesão ao endotélio, estimular a formação das “foam cells”, lesar as células endoteliais, induzir a migração das células musculares lisas e a sua proliferação, interferir com a vasodilatação dependente do endotélio e promover a trombose^{42 43 44}. As OxLDL induzem as células endoteliais a expressar factores quimiotácticos e activadores dos monócitos, como o *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) e o *monocyte colony stimulating factor* (M-CSF), assim como algumas moléculas de adesão⁴⁵⁴⁶. Estas acções são responsáveis pela adesão dos monócitos ao endotélio e a sua migração para o espaço subendotelial. Num curioso trabalho, em que se utilizaram células endoteliais e musculares lisas de aorta humana, demonstrou-se a indução, pelas LDL oxidadas, da produção de MCP-1 e da migração dos monócitos para o espaço subendotelial⁴⁷. Estas e outras citocinas inflamatórias têm sido identificadas nas lesões de aterosclerose no animal e no homem^{48 49}. Também a nível das células endoteliais, os oxisteróis das LDL, produtos da oxidação do colesterol, serão responsáveis pela inibição da produção do óxido nítrico (NO), com a consequente perturbação das propriedades vasomotoras do endotélio⁵⁰. Nem todas as acções das OxLDL serão forçosamente pró-aterogénicas. Estas lipoproteínas oxidadas mostraram possuir propriedades anti-factor de crescimento derivado das plaquetas, que pode ser considerada anti-aterogénica, dada a função pró-proliferante deste factor sobre a célula muscular lisa⁵¹.

As OxLDL terão propriedades citotóxicas, nomeadamente para as células endoteliais. Os mecanismos da lesão celular incluem a necrose e a apoptose, induzidas, entre outras moléculas, pelos produtos de oxidação do colesterol⁵².

Evidência da citotoxicidade das OxLDL, no vivo, é confirmada pela identificação nas lesões arteriais de fenómenos de necrose e apoptose^{53 54}, pela presença dos lípidos tóxicos das OxLDL nas lesões humanas^{55 56}, pelo facto das LDL oxidadas no vivo serem citotóxicas para as células em cultura⁵⁷ e também pela constatação de que as LDL oxidadas *in vitro* provocam a disfunção e a lesão endotelial *in vivo*^{58 59}. O grande número de efeitos biológicos das OxLDL será justificado pelo facto da oxidação promover a acumulação de moléculas bioactivas, que estarão ausentes, ou em muito menor concentração, nas LDL nativas. Utilizando aortas de coelho, sem lesões de aterosclerose, avaliou-se a resposta da sua exposição às LDL oxidadas; concluíram os autores que a lisolecitina que se acumula nas OxLDL produz um defeito na regulação vasomotora dependente do endotélio⁶⁰.

Em doentes coronários, com AI e EAM, os fumadores crónicos apresentaram uma redução da vasodilatação dependente do endotélio (3,5% versus 6,18%, $p < 0,001$) e maiores níveis urinários dos F2-isoprostanos ($p < 0,001$), um marcador da peroxidação lipídica, quando comparados aos não fumadores⁶¹.

Diversos trabalhos têm procurado avaliar se a utilização de antioxidantes tem algum efeito benéfico na evolução da aterosclerose. Numa revisão de estudos no animal concluiu-se que, em 16 dos 23 estudos revistos, os antioxidantes conseguiram inibir a aterosclerose (entre 30 a 80%) e nos restantes sete, apesar dos antioxidantes, a evolução foi no sentido do agravamento⁶². É de salientar que uma significativa inibição da aterosclerose foi conseguida no animal com a utilização de antioxidantes, mesmo na presença de hipercolesterolemias significativas (> 800 mg / dl). No entanto, os diversos autores alertam para o facto de estes resultados poderem não estar na total dependência do efeito antioxidante, dado que os inibidores da oxidação utilizados, têm comprovadamente outros efeitos biológicos para além da inibição da oxidação⁶³.

A patogénese e a morfologia da aterosclerose humana são semelhantes à do animal. Assim, poder-se-á esperar que os resultados obtidos neste último

tenham algum paralelismo no homem. No entanto, algumas diferenças significativas merecem referência. No homem, as lesões de aterosclerose, contrariamente ao que ocorre nos estudos experimentais no animal, desenvolvem-se ao longo de décadas, pelo que os antioxidantes poderão não partilhar com os agentes hipocolesterolemiantes a capacidade de reduzir a doença vascular num curto período de tempo. Os dados obtidos nos modelos animais dizem respeito quase exclusivamente às lesões precoces, enquanto que os *end points* utilizados nos ensaios clínicos humanos avaliam quase sempre lesões avançadas e/ou as suas repercussões clínicas, como sejam as síndromes coronárias agudas, a doença cerebrovascular, ou a morbi mortalidade vascular.

Por outro lado, há razões para acreditar que a modificação oxidativa na doença humana tenha grande semelhança com o que se passa no animal.

Sendo a diabetes um dos principais factores de risco da aterosclerose precoce e constituindo as complicações vasculares a principal causa de morbidade e mortalidade dos diabéticos, será oportuno investigar a importância dos fenómenos oxidativos nesta perturbação metabólica. Algumas das vias bioquímicas associadas à hiperglicemia, como sejam a auto-oxidação da glucose, a via dos polióis, a síntese dos prostanóides e a glicação das proteínas, aumentam a síntese dos radicais livres, enquanto alguns dos efeitos da hiperglicemia são revertidos pelos antioxidantes⁶⁴. As reacções de glicação e oxidação, que ocorrem entre os açúcares redutores e as proteínas, reacções estas exacerbadas nas condições de hiperglicemia, dão origem aos chamados produtos de glicoxidação, que se acumulam no colagénio de uma forma particularmente acelerada na diabetes. Alguns estudos *in vitro* apontam estes produtos de glicoxidação como bio-marcadores das lesões oxidativas, permitindo uma avaliação da magnitude dos fenómenos de oxidação, particularmente nos diabéticos⁶⁵. Uma das acções nefastas da hiperglicemia sobre as células endoteliais é a indução de uma apoptose exagerada⁶⁶. Alguns autores procuraram entender os mecanismos moleculares subjacentes a estes fenómenos, utilizando células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) sujeitas a altas concentrações de glucose, na presença ou na ausência de um antioxidante, o ácido ascórbico. Estes estudos demonstraram que as altas concentrações de glucose induziram a produção exagerada de espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente H_2O_2 , através das quais activaram as JNK

(c-Jun NH₂- Terminal Kinase) e as caspases, com a consequente apoptose das células endoteliais ($p < 0,05$); estas acções foram inibidas pelo ácido ascórbico (Vit C 100 µmL)⁶⁷. Baseados nos seus resultados, os mesmos autores defendem um possível papel dos antioxidantes na prevenção das complicações vasculares da diabetes. Outros trabalhos avaliaram o papel do superóxido na disfunção e em particular, na proliferação das células endoteliais, em condições de normo e de hiperglicemia, utilizando células endoteliais da aorta e da veia umbilical humanas. Na hiperglicemia, o excesso de superóxido inibe a síntese do ADN e a proliferação das células endoteliais, sendo estes efeitos revertidos nas células enriquecidas em superóxido dismutase (SOD)⁶⁸.

Um grande número de estudos epidemiológicos mostrou que indivíduos com altos níveis séricos ou ingestão significativa de Vit E têm um menor risco de desenvolver doença coronária^{69 70 71 72}. Também a Vit C tem estado associada, numa forma inversa, com o risco de cancro e de doença cardiovascular, novamente em estudos epidemiológicos. Ensaio *in vitro* têm demonstrado uma grande capacidade da Vit E em inibir a oxidação das LDL. Em contraste com todos estes resultados, os ensaios clínicos utilizando antioxidantes, têm apresentado resultados díspares. O ATBC (*alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers*), usando doses baixas de Vit E, não obteve qualquer benefício em termos de doença cardiovascular⁷³. O CHAOS (*Cambridge Heart Antioxidant Study*), utilizando doses de Vit E entre 400 e 800 mg/dia, obteve significativa redução de enfarte agudo do miocárdio em indivíduos com doença coronária angiograficamente comprovada⁷⁴. Mais recentemente, dois estudos clínicos, utilizando a Vit E em doses entre 300 – 400 mg/dia, não encontraram qualquer benefício em termos de doença vascular. Foram eles o HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation Study*) e o GISSI (*Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico*)^{75 76}. Estes e outros estudos serão objecto de análise mais aprofundada no capítulo da terapêutica antioxidante. Os resultados contraditórios entre os diversos ensaios clínicos e entre estes e a maioria dos estudos epidemiológicos poderão estar na dependência das metodologias aplicadas, das diferentes doses de Vit E utilizadas, da associação ou não de outros antioxidantes, de estilos de vida diversos e da duração relativamente curta dos ensaios clínicos.

Para os defensores da teoria da peroxidação lipídica, os produtos resultantes da acção dos radicais livres sobre as diversas moléculas lipídicas terão a capacidade de desencadear e perpetuar as respostas inflamatórias e imunológicas, que se pensa estarem na génese da aterosclerose. Assim, as LDL oxidadas induzem as células endoteliais a produzir MCP-1 e M-CSF, que estimulam a adesão dos monócitos ao endotélio e a penetração para o espaço subendotelial, onde irão desempenhar um papel primordial no processo inflamatório da aterogénese, através da produção de citocinas, radicais livres, factores de crescimento, componentes do complemento, factores da coagulação e hidrolases.

Os factos que apontam para a participação dos processos imunológicos e inflamatórios no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, incluem a deposição de imunoglobulinas e de componentes do complemento na parede arterial, a participação de linfócitos e macrófagos no infiltrado mononuclear da íntima e a presença de citocinas, factores quimiotácticos e de crescimento. Também os marcadores séricos de inflamação, tais como as proteínas de fase aguda, apresentam uma correlação com as lesões de aterosclerose. As infecções, particularmente virais do grupo herpes vírus e a Clamídea, têm sido apontadas como possíveis desencadeantes da aterogénese.⁷⁷

Diversos trabalhos têm procurado identificar os possíveis antígenos capazes de desencadear as respostas imunológicas, humorais e celulares, responsáveis pelo desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. As *heat shock proteins* e as OxLDL são os antígenos mais frequentemente apontados como indutores/amplificadores das reacções imunes e inflamatórias. Serão objecto de reflexão em capítulo posterior.

3.2 - Oxidação das Lipoproteínas

As gorduras são insolúveis na água. Para que seja possível a sua circulação no sangue, elas são transportadas na forma de lipoproteínas. Como se sabe, existem diferentes classes de lipoproteínas, variando entre elas na sua composição lipídica e proteica. A sua densidade reduz-se com o aumento da percentagem de lípidos, de forma que as *low density lipoproteins* (LDL) e as *very low density lipoproteins* (VLDL) transportam maior quantidade de lípidos,

comparativamente às *high density lipoproteins* (HDL). As LDL, as principais lipoproteínas aterogénicas, têm um núcleo hidrofóbico, constituído por colesterol livre e esterificado e uma pequena percentagem de triglicéridos. Na periferia contêm essencialmente fosfolípidos, que são moléculas anfifáticas ou seja, com uma estrutura química que lhes permite interagir com um ambiente aquoso através da superfície externa e com os lípidos na superfície interna. As LDL contêm ainda, na superfície, proteínas, as Apo B100, que têm importantes acções estruturais e funcionais, sendo reconhecidas pelos receptores LDL, permitindo que o colesterol sintetizado no fígado seja disponibilizado a vários tecidos.

Sendo as LDL ricas em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), tais como o ácido linoleico e araquidónico, são facilmente oxidáveis, dando origem a grandes quantidades de dienos conjugados e malondialdeído^{78 79} O papel dos PUFA na modificação oxidativa das LDL é corroborado pelo resultado de alguns estudos, em que se utilizaram suplementos dietéticos de ácido oleico (ácido gordo monoinsaturado) e com isso, se reduziu significativamente a oxidação das LDL⁸⁰. A apoproteína B100 também sofre significativas alterações oxidativas, principalmente devidas às reacções dos produtos da oxidação lipídica com certos resíduos de aminoácidos. Neste processo, os resíduos amino da lisina sofrem a neutralização da sua carga positiva, impedindo que a apoproteína seja reconhecida pelos receptores LDL. Também como resultado da agressão oxidativa, as proteínas são fragmentadas.

Como já foi dito, julga-se que as LDL deverão ser oxidativamente modificadas antes de poderem transformar os macrófagos da parede arterial nas *foam cells*, o principal componente da estria gorda, lesão mais precoce da aterosclerose. Admite-se que essa oxidação das lipoproteínas ocorre *in vivo*, sendo esta hipótese apoiada por diversos dados experimentais⁸¹. Múltiplos sistemas podem estar envolvidos nestes mecanismos oxidativos, encontrando-se presentes em várias células, nomeadamente nos macrófagos, células musculares lisas e células endoteliais. Estas últimas possuem importantes sistemas enzimáticos, entre os quais salientamos o da cicloxigenase e o da lipoxigenase.

3.2.1 – Cicloxigenase e lipoxigenase

Um curioso trabalho avaliou o papel destas duas enzimas na peroxidação das LDL, através da utilização de inibidores específicos. Os inibidores da lipoxigenase, mas não os da cicloxigenase, conseguiram reduzir em 70-85% a oxidação das LDL, o que aponta para um papel de relevo da lipoxigenase na modificação oxidativa das LDL⁸². O *13-Hydroperoxyoctadecadienoic acid* (13-HPODE) é produzido pela oxidação do ácido linoleico, quer pela 15-lipoxigenase quer pela cicloxigenase e a posterior redução do grupo hidroperoxi pela glutathione-peroxidase transforma-o em 13 – *Hydroxyoctadecadienoic acid* (13-HODE), sendo este o principal produto da oxidação do ácido linoleico. Estas reacções de oxidação ocorrem em muitos tipos de células, como os leucócitos mononucleares⁸³, os polimorfonucleares⁸⁴, os eosinófilos⁸⁵, as células do lavado brônquico⁸⁶, as células do carcinoma da mama⁸⁷, os fibroblastos de embriões de hamster⁸⁸ e nos fibroblastos da derme humana⁸⁹. O endotélio tem capacidade para captar o 13-HODE e constitui um importante local de metabolismo deste mediador no sistema vascular. O 13-HODE liga-se aos fosfolípidos endoteliais, particularmente à fosfatidilcolina e esta ligação poderá estar subjacente aos efeitos vasculares do 13-HODE (redução da adesão das plaquetas, aumento da produção da prostaglandina I₂ e vasodilatação, mas também alguns efeitos proaterogénicos)⁹⁰. Segundo alguns autores, a maior parte das acções do 13-HODE, assim como as de outros ácidos gordos oxidados, estarão na dependência da interacção directa com componentes da superfície celular, dada a sua fraca penetração intracelular⁹¹.

3.2.2 – Mieloperoxidase

Um outro mecanismo que se julga importante na oxidação das lipoproteínas é o que utiliza a mieloperoxidase; esta enzima, produzida pelos fagócitos activados e utilizando o H₂O₂, transforma o aminoácido L-tirosina no radical tirosil, que, por sua vez, pode sofrer uma reacção de dimerização em ditirosina. A oxidação das LDL pelo radical tirosil pode ocorrer através da estimulação da peroxidação lipídica ou da transformação dos hidroperóxidos nos

radicais alcoxi e peroxi. Quer a síntese da ditirosina, quer a peroxidação das LDL pela mieloperoxidase ocorrem em concentrações plasmáticas fisiológicas dos diversos reagentes, o que apoia a hipótese de esta forma de peroxidação ter lugar na fisiologia humana⁹².

3.2.3. – Óxido Nítrico

O óxido nítrico (ON), embora possuindo diversas e importantes propriedades anti-ateroscleróticas, como seja a sua capacidade vasodilatadora, de inibição do recrutamento dos monócitos, da inibição da proliferação das células T e musculares lisas, pode igualmente dar origem ao *peroxinitrito*, uma espécie altamente reactiva. Esta molécula, com forte capacidade oxidativa, é formada quando o ON reage com o anião superóxido. O peroxinitrito pode, efectivamente, iniciar a peroxidação lipídica dos ácidos gordos polinsaturados, facto este demonstrado pela formação de F2-isoprostanos quando o plasma ou as LDL humanos são expostos a esta espécie química⁹³. Foi já demonstrada a presença simultânea da *sintase do ON* e do peroxinitrito nas placas ateroscleróticas avançadas. Através de técnicas de imunoreacção, a sintase do ON e o ON foram localizados nos macrófagos e nas foam cells, em torno do núcleo necrótico.

A ceróide é um material insolúvel composto de lípidos e proteínas oxidadas. Este material, que inicialmente se encontra no citoplasma dos macrófagos, constitui posteriormente grandes depósitos extracelulares no núcleo necrótico da placa. A co-localização da ceróide, da sintase do ON e do peroxinitrito nas lesões avançadas é mais um dado a favor das capacidades oxidativas do óxido nítrico⁹⁴.

A importância do ON impõe que nos debrucemos um pouco mais sobre esta molécula. Este agente transdutor de sinal é sintetizado endogenamente pela sintase do óxido nítrico (SON), enzima que se encontra presente em vários tipos de células, como sejam as células endoteliais, as células musculares lisas, as plaquetas, os neurónios, os macrófagos e os neutrófilos. Existem essencialmente duas isoformas: a SON constitutiva e a SON indutível. O ON, lipofílico, difunde livremente através das membranas celulares e reage com um grande número de alvos intracelulares, manifestando diferentes acções

biológicas consoante o ambiente químico. Em meio aeróbio, o ON reage com o oxigénio para formar o dióxido de nitrogénio; como o ON e o O₂ se encontram em grandes concentrações nas membranas, esta reacção pode aumentar de velocidade até 300 vezes num ambiente hidrofóbico, como é o caso do núcleo das LDL e as membranas celulares⁹⁵. Quando o dióxido de nitrogénio reage com o ON ou uma outra molécula de dióxido de nitrogénio, formam-se o bióxido e o tetróxido de dinitrogénio, respectivamente. Quando o ON reage com o superóxido, forma-se o peroxinitrito, espécie altamente reactiva, capaz de reagir com proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ADN⁹⁶. A actividade da sintase do ON, o ADN e a própria proteína, estão aumentados nas células em proliferação. Utilizando células endoteliais da aorta bovina, em cultura, verificou-se um aumento da produção do superóxido, comparativamente ao ON, podendo condicionar a actividade biológica deste último. Da interacção destas duas moléculas pode resultar o peroxinitrito⁹⁷. No sistema vascular, o ON pode ser removido por reacção com a oxihemoglobina, formando methemoglobina.

O ON e os seus metabolitos podem estimular ou inibir a peroxidação lipídica, dependendo das concentrações relativas do ON, das espécies reactivas de oxigénio e dos antioxidantes, para além das características do meio, em termos de lipo ou hidrossolubilidade^{98 99}.

À medida que a concentração do ON aumenta, aumentam também as reacções entre o ON e o O₂ e entre o ON e o superóxido (O₂⁻), com a formação das espécies altamente reactivas, dióxido de nitrogénio e peroxinitrito, respectivamente. Nestas condições, o ON comporta-se como uma espécie essencialmente pró-oxidante¹⁰⁰. Quando a concentração do ON excede a do O₂⁻, a peroxidação é inibida pelo ON, devido à formação dos chamados *produtos de limitação de radicais lipídicos nitrados*. Desta forma, o ON protege os lípidos da oxidação, terminando a reacção de propagação em cadeia induzida pelos radicais¹⁰¹. Também através da ligação do ON aos metais de transição, nomeadamente às formas férrica e ferrosa do Fe, o ON protege os lípidos da oxidação^{102 103}.

3.2.4 – NAD(P)H oxidases

As NAD(P)H oxidases do sistema cardiovascular são enzimas associadas às membranas, que catalisam a redução do O₂, usando a NADH ou a NADPH como doadores de electrões. Presentemente, estas enzimas são consideradas as principais oxidases dos tecidos vascular e cardíaco, com capacidade para produzir maiores quantidades de espécies reactivas de oxigénio (ROS), particularmente o superóxido, do que a xantina oxidase, o ácido araquidónico ou as oxidases mitocondriais¹⁰⁴. A actividade das NAD(P)H oxidases cardiovasculares é estimulada pela Angiotensina II, com aumento da produção do superóxido nas células musculares lisas^{105 106}, fibroblastos¹⁰⁷ e células mesangiais¹⁰⁸.

A actividade enzimática da NADP(H) oxidase foi inicialmente identificada nos neutrófilos polimorfonucleares e identificaram-se 5 sub-unidades constituintes da enzima: duas citosólicas (p47phox e p67phox), duas membranares (p22phox e gp91phox), que constituem o citocromo b558 e uma proteína G de baixo peso molecular (rac-1). A NADPH oxidase fagocítica possui um papel primordial na defesa inespecífica contra organismos patogénicos, produzindo grandes quantidades de superóxido, através da chamada *respiratory burst*. Defeitos moleculares nos componentes da oxidase fagocítica resultam na doença granulomatosa crónica, caracterizada por uma propensão para infecções recorrentes, por vezes fatais¹⁰⁹. Posteriormente, tornou-se evidente que outras células não fagocíticas, nomeadamente as células endoteliais, musculares lisas e células da adventícia, possuem igualmente esta actividade NAD(P)H oxidase. Perante a distribuição da actividade enzimática por diversas sub-unidades e diferentes tipos celulares, é de admitir que várias células tenham capacidade para a produção de radicais livres e assim, induzir a peroxidação lipídica. É, igualmente, perfeitamente credível que a falta de uma das fontes enzimáticas (por exemplo a macrofágica) seja colmatada pelas outras, não se verificando assim qualquer diferença na capacidade oxidativa.

Embora se verifique uma homologia da NAD(P)H vascular e da macrofágica, existe uma especificidade celular. As proteínas transportadoras de electrões são predominantemente intracelulares nas células endoteliais e predominantemente extracelulares nos neutrófilos. Verificam-se, igualmente,

diferenças estruturais em alguns domínios das subunidades entre os dois tipos enzimáticos; por exemplo, no domínio C do gp91-phox existe uma substituição da serina, na forma vascular, pela fenilalanina, na forma fagocítica. Estes factos podem explicar as diferenças celulares específicas no que concerne à actividade enzimática. Por exemplo, a capacidade produtora de $O_2^{\cdot-}$ é menor nas células vasculares, em que a actividade enzimática é constitutivamente expressa, comparativamente aos macrófagos, em que a produção de radicais livres é essencialmente dependente de estimulação¹¹⁰.

Será curioso avaliar se a existência de polimorfismos das sub-unidades da NAD(P)H oxidase lhes altera a capacidade oxidativa e com ela, o risco cardiovascular. Dois potenciais polimorfismos do gene *CYBA*, que codifica o componente p22phox foram já identificados. Um deles (C242T) resulta da substituição do aminoácido histidina-72 pela tirosina, alterando a estabilidade da proteína e reduzindo-lhe a capacidade de produzir $O_2^{\cdot-}$. Esta menor capacidade de produzir $O_2^{\cdot-}$, pelo polimorfismo C242T, foi já demonstrada nos vasos sanguíneos humanos ($p < 0,001$), admitindo-se que esta menor produção de radicais de oxigénio confira algum efeito protector contra a aterosclerose^{111 112}. No que diz respeito à ocorrência da doença, os resultados dos estudos têm sido contraditórios, mostrando uns, uma redução do risco de doença coronária¹¹³ e outros, uma associação positiva com a mesma doença, particularmente em doentes com menos de 45 anos¹¹⁴. Um segundo polimorfismo (A640G) parece estar associado com a doença coronária, também particularmente em indivíduos jovens. Uma possível explicação para estes resultados, aparentemente contraditórios, será a influência de determinados factores, nomeadamente os clássicos factores de risco da aterosclerose. Assim, a hipercolesterolemia, o tabagismo e a diabetes estarão associados a uma maior actividade da NAD(P)H oxidase, com a consequente hiperprodução de radicais livres¹¹⁵. A variação genética nas enzimas pró-oxidantes e também das antioxidantes, como veremos adiante, pode contribuir para o impacto das variáveis clássicas no risco individual de doença vascular, estando alguns polimorfismos associados a uma maior ou menor actividade oxidativa e a um maior ou menor risco aterogénico¹¹⁶.

Um exemplo de como uma substância antioxidante interfere com a NAD(P)H oxidase e com a capacidade peroxidativa é-nos dado pela molécula flavonóide *Glabridina*. Os flavonóides são compostos polifenólicos, constituintes

naturais dos frutos e vegetais e que se comportam como potentes antioxidantes. Num curioso trabalho, utilizando macrófagos do rato, demonstrou-se a acumulação macrofágica da glabridina e a consequente inibição da oxidação das LDL, por supressão da NAD(P)H oxidase. Segundo o mesmo trabalho, a acção da glabridina sobre esta oxidase verifica-se através da inibição da fosforilação pela proteína-c-quinase (PKC) de uma proteína indispensável à activação da enzima, a P-47¹¹⁷.

Se a peroxidação das LDL ocorre antes ou depois da sua entrada na parede arterial, não está ainda completamente elucidado.

Na parede do vaso, os proteoglicanos da íntima ligam e podem fixar as LDL na matriz extracelular¹¹⁸. As LDL pré-expostas aos proteoglicanos apresentam maior sensibilidade à oxidação *in vitro* pelo cobre, quando comparadas com as LDL nativas não expostas, constituindo um alvo relativamente fácil para as acções oxidativas das células da parede, nomeadamente as células endoteliais, os macrófagos e as células musculares lisas.^{119 120}

Por outro lado, a oxidação das LDL pode ocorrer antes da sua entrada na parede arterial. Os autoanticorpos anti OxLDL estão presentes na circulação, embora a relação entre os OxLDL-Ac e os eventuais fenómenos oxidativos no plasma não esteja perfeitamente estabelecida¹²¹. O plasma contém múltiplas defesas antioxidantes, que protegem os lípidos das LDL da peroxidação; as próprias LDL contêm antioxidantes lipossolúveis de origem plasmática¹²². Se existirem no plasma, as OxLDL serão rapidamente captadas pelo fígado, pelo que apenas pequenas concentrações de hidroperóxidos lipídicos são detectados em humanos saudáveis.

Pelas razões expostas, é de esperar que a peroxidação lipídica das LDL, através dos mecanismos descritos, ocorra essencialmente na íntima da parede arterial.

3.2.5 - Anticorpos anti LDL oxidadas (OxLDL-AC)

Durante a oxidação das LDL formam-se produtos de peroxidação lipídica, tais como o *malondialdeído (MDA)* e o *4-hidroxinonenal (4-HNE)*, que são altamente reactivos, com grande apetência para reagir com os aminoácidos da

apoB, particularmente com a lisina. Estas reacções modificam a apoproteína, tornando-a altamente imunogénica. Como consequência, formam-se anticorpos que reconhecem diferentes epítomos destas lipoproteínas modificadas, os *OxLDL-Ac*. Estes anticorpos têm sido identificados no plasma do homem, do coelho e do macaco^{123 124 125}. Os *OxLDL-Ac* reagem cruzadamente com diversos lípidos e lipoproteínas, incluindo a cardiolipina (CL), a lisofosfatidilcolina (LPC), a fosfatidilcolina oxidada (PC) e a 1-palmitil-2-(5-oxovaleril)-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POVPC)^{126 127 128 129 130}. É provável que a acumulação das *OxLDL* nas lesões possa induzir a formação destes auto-anticorpos, mas também se podem formar como resposta aos fenómenos de peroxidação lipídica que ocorrem noutros locais, particularmente nas hipercolesterolemias. Um grande número de estudos tem encontrado altos títulos de *OxLDL-Ac* em indivíduos com aterosclerose carotídea, doença coronária, diabetes, doença vascular periférica, hipertensão arterial e pré-eclampsia^{131 132 133 134 135 136 137 138 139 140}.

Uns dos principais alvos da oxidação nas LDL são os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) dos fosfolípidos da superfície da partícula. Os epítomos gerados pela oxidação dos fosfolípidos dão origem à formação de *OxLDL-Ac* com características de anticorpos anti-fosfolípidos. A alteração oxidativa poderá justificar a formação de anticorpos contra estruturas tão comuns nos organismos, como são os fosfolípidos. Segundo alguns autores, a maioria dos anticorpos anti-fosfolípidos liga-se a neoepítomos produzidos pela oxidação dos fosfolípidos, ou secundários às ligações destes com as proteínas associadas¹⁴¹.

Um importante epítomo antigénico das *OxLDL* é o 1-palmitil-2-araquidonil-sn-fosfolina oxidado (*OxPAPC*), um fosfolípido com uma estrutura básica fosfatidilcolina-like e distribuído pelas células e lipoproteínas. As *OxPAPC* e as *OxLDL* apresentam actividades biológicas semelhantes, como seja a indução da adesão dos monócitos às células endoteliais¹⁴² e encontram-se presentes nas estrias gordas¹⁴³.

Têm sido identificados múltiplos epítomos nas *OxLDL* capazes de desencadear respostas autoimunes¹⁴⁴ e foi já possível realizar a clonagem de autoanticorpos monoclonais contra alguns desses epítomos, utilizando diversos modelos de LDL oxidadas: MDA-LDL, 4-HNE-LDL e Cu²⁺-LDL¹⁴⁵.

Como referido acima, vários investigadores têm procurado uma relação entre os OxLDL-Ac e a doença cardio-cerebrovascular.

A presença e o título dos OxLDL-Ac IgG no soro de indivíduos sujeitos a endarterectomia carotídea, na altura da cirurgia, correlacionou-se positivamente ($p < 0,012$) com uma maior espessura da íntima e média da parede, seis meses depois¹⁴⁶. Ainda no âmbito da doença cerebrovascular, avaliaram-se os títulos de OxLDL-Ac em 12 indivíduos idosos, na fase aguda dum acidente vascular cerebral e em 16 controlos. Os títulos dos anticorpos IgG foram significativamente menores no grupo dos doentes ($246,9 \pm 38,2$ mU/ml versus $505,8 \pm 103,4$ mU/ml; $p < 0,05$); os autores atribuem estes baixos títulos ao excessivo consumo, devido à elevada produção de radicais livres que acompanhará a isquémia cerebral aguda¹⁴⁷.

Outros trabalhos têm-se debruçado sobre a doença cardíaca isquémica. No *Helsinki Heart Study*, compararam-se 135 indivíduos com doença coronária (morte cardíaca ou enfarte agudo do miocárdio não fatal) com um grupo controlo, tendo-se verificado que níveis elevados de OxLDL-Ac, à entrada do estudo, estavam positiva e significativamente associados com o enfarte do miocárdio ($0,412$ versus $0,356$ U de densidade óptica, $p = 0,002$). Esta relação manteve-se mesmo após ajustamento para outras variáveis de risco, como a idade, o tabagismo, a HTA, e o nível do CHDL¹⁴⁸.

Num outro trabalho, em que se avaliou angiograficamente a árvore arterial, os autores concluíram que os OxLDL-Ac se encontravam em títulos significativamente maiores nos indivíduos que apresentavam evidência angiográfica de coronariopatia ($p < 0,05$). Os autores atribuem às Ox-LDL e aos mecanismos inflamatórios um possível papel na transição da disfunção endotelial e das placas estáveis para a instabilidade das placas e as consequentes síndromes coronárias agudas¹⁴⁹.

Um estudo procurou avaliar o *stress* oxidativo, através da determinação dos títulos de OxLDL-Ac, em indivíduos com enfarte agudo do miocárdio (EAM) e em que se realizou trombólise. Em todos os doentes com EAM, os títulos dos anticorpos anti lipoproteínas oxidadas, medidos às 2, 6, 8 e 12 H após o evento agudo e respectiva terapêutica trombolítica, mostraram uma progressiva e significativa redução, tendo esta relação atingido o seu maior significado às 8 H pós-enfarte ($p < 0,001$). A redução correlacionou-se com os valores da CK-MB

massa (às 8 H, $p=0.003$) e como a redução dos títulos antecedeu em 4 H o pico da referida enzima, os autores concluíram que a determinação dos títulos dos OxLDL-Ac pode ter valor prognóstico no EAM¹⁵⁰.

Num outro trabalho procurou-se um relacionamento entre os títulos dos OxLDL-Ac IgG e IgM e a espessura da média e da íntima (EMI) das artérias carótídea e femoral, em homens de 58 anos clinicamente saudáveis. Encontrou-se uma associação positiva entre os OxLDL-Ac IgG e a EMI da carótida comum ($p<0,01$) e uma correlação negativa entre os OxLDL-Ac IgM e a EMI da femoral ($p<0,05$). Qualquer destas relações não foi independente de outros factores de risco (tabaco, tensão arterial, colesterol total). Os autores explicam estes dados com a hipótese de os mecanismos envolvidos no processo aterosclerótico poderem não ser exactamente sobreponíveis nos diferentes territórios vasculares¹⁵¹.

Também a relação entre os títulos de OxLDL-Ac e os valores de colesterol têm sido fruto de investigação, mostrando alguns trabalhos títulos elevados, embora não significativos, nos indivíduos hiperlipidémicos¹⁵².

Compararam-se os títulos dos anticorpos em indivíduos com hipercolesterolemia familiar heterozigótica (HF) e num grupo controlo e avaliou-se uma possível correlação entre os OxLDL-Ac e a extensão (avaliada por ultrassonografia) das lesões ateroscleróticas. Não houve diferenças significativas nos títulos de OxLDL-Ac entre o grupo dos indivíduos com HF e o grupo controlo. Também não existiu associação significativa entre a EMI das artérias carótida e femoral e os títulos dos referidos anticorpos. Os autores explicaram estes resultados com a hipótese de que, perante valores extremamente elevados de colesterol sérico, como era o caso dos doentes estudados, a importância da resposta imune às OxLDL, no processo aterogénico, será ultrapassada pela excessiva concentração das lipoproteínas aterogénicas¹⁵³.

Ao comparar os títulos de anticorpos anti LDL oxidadas, entre um grupo de indivíduos com estenose coronária severa, um outro de doentes com estenose coronária menor, avaliados angiograficamente e um grupo controlo de indivíduos sem história de doença coronária, não foi encontrada qualquer relação entre os títulos dos referidos anticorpos e a extensão da doença coronária¹⁵⁴.

A relação entre os OxLDL-Ac e a doença aterosclerótica foi também avaliada em doentes diabéticos, admitindo alguns autores que a produção de espécies reactivas de oxigénio pode ter um importante papel na etiologia das complicações vasculares da diabetes. Durante dez anos, seguiram-se 91 diabéticos tipo 2 e 82 controlos não diabéticos, tendo sido determinados os títulos dos OxLDL-Ac basais e aos dez anos, assim como a determinação ultrassonográfica da espessura da média e da íntima da artéria carótida comum. Os títulos dos OxLDL-Ac não estavam significativamente aumentados nos diabéticos, quer no início, quer aos dez anos, não tendo sido igualmente encontrada qualquer relação entre os referidos títulos e a morbi/mortalidade cardiovascular (EAM fatal e não fatal, AVC). Também não se verificou qualquer relação significativa entre os títulos dos anticorpos e a EMI da bifurcação carotídea, quer nos diabéticos quer nos controlos¹⁵⁵.

Um outro estudo procurou determinar as diferenças na distribuição da gordura corporal e do estado antioxidante, em homens saudáveis (30-69 A) e em homens com DCV, com ou sem diabetes. Os indivíduos com DCV e diabetes apresentavam maiores quantidades de gordura visceral, maiores concentrações de homocisteína e menores concentrações de CHDL. Os referidos indivíduos apresentaram, igualmente, menores concentrações de β -caroteno e licopeno, traduzindo, segundo os autores, um maior stresse oxidativo e não uma alteração do comportamento alimentar¹⁵⁶.

A hipertensão arterial, mesmo em valores *borderline*, é considerada um importante factor de risco para a aterosclerose. Alguns autores determinaram os níveis dos OxLDL-Ac em setenta e três homens com HTA ligeira (TA diastólica 85 – 94 mmHg) e compararam-nos com um grupo de normotensos; foi igualmente avaliada a aterosclerose carotídea através de ultrassonografia. Os indivíduos hipertensos apresentavam títulos de OxLDL-Ac IgG e IgM significativamente menores do que os normotensos ($p=0,001$ para as duas classes de Ac), não se tendo verificado diferenças significativas nos títulos de anticorpos, entre os que apresentavam aterosclerose carotídea e aqueles em que a ultrassonografia era normal. Os autores admitiram que os menores níveis de anticorpos nos indivíduos com HTA diastólica poderão representar um maior consumo. Admitiram mesmo um papel protector dos OxLDL-Ac, que poderão ter

um importante papel na remoção das OxLDL da placa, retirando-lhe assim um dos principais estímulos inflamatórios e contribuindo para a sua estabilização¹⁵⁷.

Para além dos trabalhos que têm procurado uma relação significativa, positiva e / ou negativa, entre a presença e o título de OxLDL-Ac com as diferentes formas de doença vascular e perturbações metabólicas, outros têm-se debruçado sobre as possíveis acções fisiopatológicas dos OxLDL-Ac e da imunidade celular sobre a aterosclerose.

Para ajudar a compreender os referidos mecanismos vamos socorrer-nos, uma vez mais, da literatura existente.

Um interessante trabalho utilizou coelhos New Zealand White (NZW) hipercolesterolémicos, imunizando-os com OxLDL e avaliando a evolução da lesão da neoíntima, após lesão por balão da artéria íleofemoral. Comparativamente aos animais não imunizados, os que receberam OxLDL, apresentaram uma redução de 58% na área da neo-íntima ($0,53 \pm 0,13$ versus $1,27 \pm 0,26$ mm²; $p=0,01$). O grupo imunizado com LDL nativas teve uma redução de 19% na referida área, quando comparado com o grupo controlo (“p” não significativo). Este estudo demonstrou que a imunização dos coelhos NZW hipercolesterolémicos com OxLDL reduziu a formação da neoíntima, após lesão, na artéria íleofemoral¹⁵⁸. Curiosamente, os títulos de anticorpos nos dois grupos de animais, imunizados e controlos, foram sobreponíveis, sugerindo que a imunidade celular, mais do que a humoral, possa estar envolvida. Segundo os autores, a imunidade contra as OxLDL pode facilitar a remoção destas lipoproteínas oxidadas da íntima, reduzindo o estímulo inflamatório para a aterogénese.

Num outro estudo, recorrendo igualmente aos coelhos NZW, determinou-se o efeito da imunização com LDL ou OxLDL na formação da placa aterosclerótica. Encontraram-se anticorpos em todos os grupos de animais (alimentados com colesterol não imunizados e alimentados com colesterol e imunizados, quer com LDL homóloga, quer com OxLDL). No entanto, os títulos foram superiores nos animais imunizados, embora sem diferença entre os que receberam OxLDL ou LDL não oxidadas. Este último achado faz supor que as LDL sejam oxidadas *in vivo* durante a imunização. A imunização com LDL e OxLDL reduziu a formação de lesões ateroscleróticas na aorta proximal em 74% ($p<0,05$) e em 48% (“p” não significativo), respectivamente¹⁵⁹.

Outros trabalhos no animal demonstraram igualmente um aparente benefício das respostas imunes, humoral e celular, às lipoproteínas oxidadas. Os autores admitem que os OxLDL-Ac e os linfócitos T (activados pelos imunocomplexos OxLDL / OxLDL-Ac) terão a capacidade de eliminar as OxLDL da circulação, impedir a sua entrada na íntima arterial e a sua captação pelos macrófagos^{160 161}.

Para compreender o potencial papel das OxLDL e das respectivas respostas imunes na aterogénese humana, utilizaram-se anticorpos IgG monoclonais humanos (IK 17), que se injectaram em ratos hipercolesterolémicos. O anticorpo monoclonal ligou-se a diferentes lipoproteínas modificadas (MDA-LDL, MDA-HDL, e Cu-OxLDL). O IK 17 bloqueou a ligação e a posterior degradação das OxLDL nos macrófagos, sugerindo que este anticorpo poderá reconhecer alguns receptores envolvidos na internalização das OxLDL nos macrófagos¹⁶². Nesse mesmo trabalho e utilizando timócitos apoptóticos de rato, os autores verificaram a ligação dos OxLDL-Ac a determinados epítomos oxidados das células apoptóticas, impedindo a sua fagocitose.

Alguns autores consideram que os OxLDL-Ac são anticorpos naturais, predominantemente IgM, formados no período neo-natal e posteriormente estimulados pelos epítomos oxidados; reagem com uma variedade de auto-determinantes, tais como os hidratos de carbono e os glicolípidos e frequentemente, interagem de uma forma cruzada com antigénios bacterianos e oncofetais, contribuindo para a maturação do sistema imune adaptativo^{163 164}. Os OxLDL-Ac poderão, assim, constituir um novo paradigma imunológico contra epítomos específicos da oxidação, contribuindo para a homeostase das células apoptóticas, necróticas e senescentes e Ox-lipoproteínas¹⁶⁵.

Ao fixar-se preferencialmente nas lesões ateroscleróticas, o IK 17, marcado por radioisótopo, permitirá detectar e avaliar a evolução das lesões vasculares. Para além deste possível papel diagnóstico, abrem-se perspectivas sobre a futura utilização terapêutica do IK 17 para bloquear a captação das OxLDL pelos macrófagos¹⁶².

Voltando ao potencial papel diagnóstico dos OxLDL-Ac, de referir que a quantificação da aterosclerose nos modelos animais e no homem, em estudos necrópsicos, é usualmente realizada por planimetria das aortas, sujeitas a

corantes específicos dos lípidos, ou por análise de secções do anel aórtico. No entanto, a planimetria não tem capacidade para avaliar a progressão das estrias gordas para as lesões mais avançadas. Um método que preferencialmente quantifique as lesões ricas em OxLDL terá o maior interesse ao identificar os ateromas ricos em lípidos oxidados, altamente aterogénicos e pró-trombóticos, predispondo às síndromes coronárias agudas. Foi já possível, utilizando Ac anti MDA-LDL marcados com iodo radioactivo, demonstrar a acumulação destes anticorpos nas placas de aterosclerose da aorta do rato, poupando os segmentos não ateroscleróticos. Mais importante, ao comparar o grupo de ratos sujeitos a uma terapêutica anti-oxidante (vitaminas E e C), houve uma menor captação deste anticorpo marcado, relativamente ao grupo não tratado. Uma redução na captação dos anticorpos marcados, pode indicar uma reduzida peroxidação lipídica, uma menor aterogénese e um menor risco de complicações da placa.

Com a utilização de métodos imagiológicos, nomeadamente com radioisótopos, será possível, num futuro próximo, uma avaliação não invasiva, qualitativa e quantitativa, da aterosclerose no homem, bem como monitorizar a sua resposta às terapêuticas instituídas (dieta, hipolipemiantes, anti-oxidantes)¹⁶⁶.

3.2.6 - Receptores OxLDL

Será agora oportuno debruçarmo-nos sobre o modo como as OxLDL entram nos macrófagos e os transformam nas células espumosas, dando início à formação da placa de aterosclerose. Com efeito, a sua captação não poderá ser através dos receptores LDL, sujeitos a um retrocontrolo negativo, não podendo originar as típicas células “carregadas” de lípidos.

Já há mais de vinte anos que se reconhece a existência de receptores para as LDL modificadas, então chamados de *scavenger receptors* (SR), que reconheceriam as apoproteínas sujeitas à oxidação, acetilação ou a qualquer outra alteração química^{167 168}. Brown e Goldstein identificaram estes receptores em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, verificando que estes doentes acumulavam ésteres de colesterol nos macrófagos das placas ateroscleróticas, embora lhes faltassem os receptores LDL¹⁶⁹. Estes receptores não seriam

sujeitos a qualquer mecanismo de retrocontrolo, permitindo assim um exagerado “enriquecimento lipídico” dos macrófagos e a sua transformação nas *foam cells*.

Admite-se que a apoproteína modificada e os fosfolípidos oxidados das LDL serão, em grande parte, responsáveis pela ligação aos SR e que será também através dos fosfolípidos oxidados da membrana e particularmente, do aumento da expressão exterior da fosfatidilserina membranar, que os macrófagos reconhecem e fagocitam determinadas células, nomeadamente as células apoptóticas. Diversos trabalhos, utilizando os glóbulos vermelhos, demonstraram que a inactivação oxidativa da enzima *aminofosfolípido translocase* aumenta a expressão de fosfatidilserina na superfície externa da membrana das células apoptóticas, permitindo o seu reconhecimento pelos macrófagos e posterior captação pelos *scavenger receptors*^{170 171}.

Pelo que já foi dito, os SR não são específicos para as OxLDL, reconhecendo outras formas modificadas destas lipoproteínas, como sejam as LDL acetiladas (AcLDL), as MDA-LDL, mas também os ácidos nucleicos, os polissacáridos e os fosfolípidos (fosfatidilserina)¹⁷². Também se demonstrou o reconhecimento, por estes *scavenger receptors*, de produtos terminais da glicosilação¹⁷³, de eritrócitos oxidados¹⁷⁴, de células apoptóticas e da beta-amiloide¹⁷⁵. Utilizando LDL modificadas por oxidação e acetilação, OxLDL e AcLDL, respectivamente, verificou-se a existência de um ou mais receptores que reconheceriam as duas espécies de LDL modificadas e outro(s) específico(s) das OxLDL¹⁷⁶.

Os SR são heterogéneos na sua estrutura molecular, encontrando-se classificados em várias classes, nomeadamente classes A,B,C,D,E e F.

3.2.6.1 – Receptores da classe A

Os receptores da classe A (MSR-A) possuem um domínio de colagénio e sub-dividem-se em tipo I, II, III e MARCO (macrophage receptor with collagen structure), encontrando-se expressos nos macrófagos^{177 178}. Os MSR-A possuem vários domínios, um dos quais (C-terminal) se pode ligar a várias moléculas carregadas negativamente, tais como as OxLDL, as AcLDL, a apoB 100, os AGE (advanced glycation end products), o ácido lipoteicóico das bactérias gram-positivas, o lipopolissacárido (LPS) das gram-negativas e as

células apoptóticas¹⁷⁹. Através de técnicas imunohistoquímicas têm-se identificado os MSR-A nas lesões de aterosclerose humana, em maior concentração nas fases precoces (espessamento da íntima e estrias gordas) e em menor quantidade nas lesões avançadas^{180 181 182}. O M-CSF, ao induzir o desenvolvimento dos monócitos e a sua diferenciação em macrófagos e o MCP-1, ao promover a quimiotaxia dos monócitos, constituem importantes factores para a expressão dos MSR-AI e II nos macrófagos e a sua transformação em *foam cells*^{183 184}.

3.2.6.2 - Receptores da classe B

A classe B é constituída pelo CD36 e pelo scavenger receptor-B1 (SR-BI). O CD36 é uma glicoproteína transmembranar, expressa nos monócitos/macrófagos, plaquetas e células endoteliais vasculares. Utilizando anticorpos monoclonais anti CD36, conseguiu-se reduzir em 50% a ligação e em 26% a degradação específica das OxLDL pelos monócitos e macrófagos humanos. Embora a captação das OxLDL pelos *scavenger receptor*, dependa essencialmente da metade apoproteica alterada, sabe-se que o componente lipídico das LDL oxidadas é o responsável pela ligação ao CD36¹⁸⁵. Este receptor tem, muito provavelmente, um importante papel na acumulação de OxLDL pelos macrófagos humanos, transformando-os nas *foam cells*^{186 187}.

A expressão do CD36 nos monócitos/macrófagos depende do grau de diferenciação celular e da exposição a certos mediadores^{188 189}. A exposição de macrófagos de rato a LDL nativas, a AcLDL e a OxLDL, provocou um significativo aumento na expressão do mRNA do CD36 (4 a 8 vezes). A máxima indução verificou-se às 2H após exposição às AcLDL e às 4H após LDL nativas e OxLDL¹⁹⁰. Segundo diversos trabalhos e contrariamente aos receptores das LDL nativas, a expressão do CD36 aumenta nas células carregadas de colesterol e diminui nas que se encontram empobrecidas neste lípido¹⁹¹. O efeito das OxLDL sobre o CD36 dependerá, pelo menos parcialmente, da activação dos PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ)^{192 193}. Como veremos mais adiante, os PPAR- γ são reguladores da transcrição de genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico¹⁹⁴. A activação da expressão do gene do CD36 pelas OxLDL far-se-á através da activação

inicial da proteína C quinase (PKC) e posterior activação dos PPAR- γ . Os ésteres de forbol, o M-CSF e a IL-4 também apresentam capacidade de induzir a expressão do CD36 nos monócitos/macrófagos, enquanto que o LPS, a dexametasona e o INF- γ , reduzem a expressão deste SR^{195 196}. Os TGF- β 1 e TGF- β 2 (transforming growth factor) reduzem a expressão do CD36 através da fosforilação inactivadora dos PPAR- γ pela MAP quinase¹⁹⁷.

O SR-BI é considerado um receptor das HDL¹⁹⁸.

3.2.6.3 – Receptores da classe C

O dSR-CI (*Drosophila* scavenger receptor) encontra-se nos macrófagos fetais e pertence à classe C¹⁹⁹.

3.2.6.4 – Receptores da classe D

A classe D é constituída pelo CD68/macrossialina, membro da família LAMP (lysosomal associated membrane protein). Encontra-se nos lisosomas e na superfície dos macrófagos^{200 201}.

3.2.6.5 – Receptores da classe E

Foi possível, através de clonagem molecular, identificar um receptor específico das OxLDL nas células endoteliais, o LOX-1 (lectine-like LDL receptor), pertencente à classe E e com estrutura semelhante à lectina tipoC²⁰². Este receptor apresenta uma estrutura proteica com dois domínios hidrofílicos, um N-terminal curto e um carboxi-terminal longo, separados por um domínio hidrofóbico. Apresenta uma grande homologia com as proteínas da família NKR-P1, expressas na superfície das células *natural killer* (NK), proteínas essas envolvidas no reconhecimento das células alvo e na activação das NK. As LOX-1, tal como as NKR-P1, podem transmitir alguns sinais biológicos e activar as células endoteliais, após ligação das OxLDL.

A modificação oxidativa das LDL aumenta a carga negativa destas lipoproteínas, facilitando a sua ligação aos *scavenger receptors* positivamente carregados. No entanto, a ligação das OxLDL aos LOX-1 dependerá mais de

mecanismos moleculares do que da simples atracção de cargas eléctricas opostas. Embora os LOX-1 possam reconhecer alguns lípidos das OxLDL, a interacção com as lipoproteínas oxidadas faz-se, fundamentalmente, através da porção proteica (apoB alterada), havendo, aparentemente, uma especificidade destes receptores para as OxLDL²⁰³.

Como já foi referenciado e será mais à frente de novo abordado, as citocinas têm sido implicadas na aterogénese e nos processos inflamatórios responsáveis pela instabilidade da placa. Um interessante trabalho demonstrou que o TNF- α induziu a transcrição da LOX-1 nas células endoteliais da aorta bovina (BAEC). Este e outros estudos mostraram, pela primeira vez, que a expressão da LOX-1 não é constitutiva, mas pode ser induzida pelo TNF- α , sugerindo que as citocinas inflamatórias geradas na parede vascular podem ampliar a captação das OxLDL e a consequente activação / disfunção endotelial^{204 205}.

Para além das citocinas inflamatórias, outros estímulos fisiopatológicos activam as células endoteliais, sendo um desses estímulos constituído pelas forças mecânicas que actuam sobre a parede. Utilizando células BAEC demonstrou-se que o *shear stress* induziu a expressão da LOX-1 a nível do ARN mensageiro e da proteína; esta indução será relativamente transitória, atingindo a proteína um pico pós estimulação às 8 H, com posterior redução para os 30% às 12 H. Esta evolução contrasta com a verificada com o TNF- α , que induz uma estimulação mantida. A expressão da LOX-1, induzida pelo *shear stress*, depende da mobilização do cálcio intracelular e poderá ter um importante papel na localização preferencial das lesões de aterosclerose²⁰⁶.

Utilizando células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC), que possuem grandes quantidades de LOX-1 e receptores da Ang II (AT₁ > AT₂), demonstrou-se que a incubação destas células com Ang II aumentou a expressão do receptor LOX-1 e consequentemente, a captação das OxLDL pela HCAEC²⁰⁷. Os efeitos da Ang II a nível dos LOX-1 exerceram-se através dos AT₁.

No homem, utilizando peças de endarterectomia carotídea de indivíduos com doença vascular e aortas de indivíduos saudáveis, avaliou-se, por técnicas de *reverse transcription-polymerase chain reaction* (rt-PCR) e imunohistoquímica, a expressão da LOX-1. A expressão deste receptor nas

células endoteliais não é uniforme; tal como os MSR-A, predomina nas lesões mais precoces de aterosclerose, em detrimento das mais avançadas (placas). Quantidades mínimas foram detectadas nas aortas sem doença aterosclerótica. Estes estudos imunohistoquímicos revelaram, pela primeira vez, que, para além das células endoteliais, as LOX-1 se encontram igualmente expressas nos macrófagos e nas células musculares lisas, na íntima das lesões carotídeas humanas, contribuindo para a sua transformação em *foam cells*^{208 209}. Também nas células musculares lisas da aorta bovina se demonstrou a presença das LOX-1; utilizando a lisofosfatidilcolina, um componente aterogénico das LDL gerado durante a sua oxidação, foi possível aumentar a expressão do ARN mensageiro da LOX-1²¹⁰.

Investigando algumas das acções desencadeadas pelas LOX-1 após ligação das OxLDL, um estudo recente avaliou a produção intracelular de espécies reactivas de oxigénio (ROS) nas células BAEC. A incubação destas células com as OxLDL originou um significativo aumento da produção intracelular de ROS; o aumento das ROS intracelulares foi observado logo aos 30 segundos. É provável que a interacção receptor / OxLDL conduza à activação de determinadas enzimas produtoras de ROS. Este estudo revelou, igualmente, que as OxLDL induziram a activação intracelular do factor de transcrição NF-kB, provavelmente através da produção das espécies reactivas de oxigénio. Por outro lado, o NF-kB pode estar envolvido na indução do gene da LOX-1, aumentando as hipóteses de ligação com as OxLDL. Concluíram os autores, que uma das acções da ligação das OxLDL às LOX-1, pode ser a activação do NF-kB através do aumento da produção de ROS²¹¹.

Um outro estudo procurou determinar a acção da LOX-1 na adesão dos monócitos às HCAEC, utilizando para o efeito um *antisense* específico do ARN mensageiro da LOX-1. Este trabalho demonstrou que a adesão dos monócitos às células endoteliais, induzida pelas OxLDL, está associada a um aumento da expressão da LOX-1 e a um aumento da expressão do gene do MCP-1. Concluiu-se, assim, pela importância da LOX-1 na adesão dos monócitos às HCAEC e na posterior activação / lesão²¹².

3.2.6.6 – Receptores da classe F

Por último, os SREC (scavenger receptor expressed by endothelial cells) constituem a classe F dos SR²¹³.

4 - Efeitos da Peroxidação Lipídica

Neste capítulo, procura-se avaliar os efeitos dos produtos da peroxidação na fisiopatologia da aterogénese.

4.1 - Quimiotaxia e Adesão Celular

Há mais de vinte anos que se demonstrou que o principal produto da acção oxidativa da 12-lipoxigenase (12-LO) sobre o ácido araquidónico, o ácido 12-L hidroxi-5,8,10,14-eisosatetraenóico (12-HETE), se comportava como um potente agente quimiotáctico para as células musculares lisas da aorta do rato²¹⁴. A acção quimiotáctica sobre outro tipo de células, os monócitos, exerce-se através da estimulação da secreção do MCP-1 pelas células endoteliais. Para que a quimiotaxia seja realizada, é necessária a presença na superfície dos monócitos de uma ou várias moléculas capazes de interagir com o MCP-1, sendo a mais conhecida a CCR2. Curiosamente, esta molécula CCR2 viu a sua expressão reduzida na superfície dos monócitos quando estimulados pelas lipoproteínas oxidadas, comparativamente às LDL nativas²¹⁵. O aumento da produção de citocinas induzidas pelas OxLDL poderá fornecer uma explicação para este facto aparentemente inesperado; sabe-se, de anterior estudo, que a activação dos monócitos pelas citocinas resulta na redução da expressão do CCR2 na sua superfície²¹⁶.

Mais recentemente e avaliando de novo o 12-HETE, desta vez sobre a adesão dos monócitos às células endoteliais da aorta humana (HAEC) de diabéticos, os autores concluíram que a adesão dos monócitos às HAEC, cultivadas em altas concentrações de glucose, está aumentada. Esta estimulação da adesão está na dependência do 12-HETE, que vê aumentada a sua formação pela hiperglicemia. Não houve aumento da expressão na superfície das HAEC do VCAM-1, ICAM-1 ou da E-selectina, as principais

moléculas de adesão, mas sim de uma outra molécula de adesão, a fibronectina (CS-1), ligante da integrina *very late-acting antigen-4* (VLA-4)²¹⁷.

Outro trabalho, utilizando células endoteliais da veia umbilical humana, demonstrou que o 12-HETE estimulou a adesão dos monócitos, através do aumento da expressão de várias moléculas de adesão nas células endoteliais, nomeadamente das VCAM-1, ICAM-1 e da E-selectina²¹⁸. As diferenças encontradas em relação às moléculas de adesão poderão ser justificadas pelos diferentes tipos de células endoteliais. O que parece importante, é o facto de um dos produtos da oxidação lipídica, o 12-HETE, aumentar a ligação dos monócitos às células endoteliais, sendo esta ligação um dos fenómenos mais precoces e importantes da aterogénese.

Outros trabalhos testaram a hipótese dos produtos da oxidação das LDL, se poderem comportar como um sinal de um mecanismo sensível à oxidação, capaz de aumentar a expressão do gene da VCAM-1. A exposição de células endoteliais, arteriais e venosas, quer às OxLDL, ou aos seus componentes 13-HPODE, ou lisofosfatidilcolina (liso-PC), aumentou a expressão do VCAM-1 em resposta às citocinas inflamatórias. Este facto sugere que o 13-HPODE e a liso-PC, actuando como segundos mensageiros, podem sensibilizar as células vasculares aos mecanismos inflamatórios, através da modulação dos genes das moléculas de adesão²¹⁹. Apoiando o papel dos fenómenos oxidativos na expressão das moléculas de adesão, outros trabalhos demonstraram que a expressão da VCAM-1, induzida pela Interleucina 1 β , foi suprimida em cerca de 90% pelos antioxidantes ditiocarbamato e N-acetilcisteína, concluindo os autores que os alvos dos agentes anti-oxidantes poderão ser os factores reguladores que promovem a transdução de sinais metabólicos (oxidação) em sinais reguladores nucleares (expressão de genes de moléculas de adesão)²²⁰.

4.2 - Proliferação celular

Um outro fenómeno de inegável importância na patogénese da aterosclerose, a proliferação celular, tem-se mostrado igualmente sensível aos fenómenos oxidativos. Admite-se que a exposição de células vasculares, endoteliais e musculares lisas às OxLDL pode interferir com a proliferação, a secreção, a migração e a adesão.

Um possível mecanismo da mitogénese induzida pelas OxLDL poderá envolver a produção dos ácidos fosfatídico (PA) e / ou lisofosfatídico (LPA), fruto da activação da fosfolipase D (PLD). A activação da PLD e subsequente geração de PA é considerado um importante sinal de transdução nas células dos mamíferos. Quer o PA, quer o LPA, desencadeiam uma grande variedade de respostas biológicas, que incluem a estimulação da síntese do ADN em diversos tipos celulares^{221 222 223}. Um interessante estudo concluiu que as OxLDL são um potente activador da PLD nas células musculares lisas, sendo esta activação independente da proteína C quinase e do Ca^{2+} . A activação da PLD induzida pelas OxLDL pode representar um sinal para a proliferação celular e contribuir para o desenvolvimento das lesões de aterosclerose. Estas acções envolverão, muito provavelmente, a produção de moléculas segundas mensageiras, como o PA, o LPA ou outros factores mitogénicos que activarão as proteínas quinases, incluindo as tirosina quinases e as *proteínas quinases activadas por mitogénios* (MAPK)²²⁴.

Outros trabalhos têm procurado possíveis relações entre as acções promovidas pelos proto-oncogenes e as espécies reactivas de O_2 (ROS). O proto-oncogene p21^{Ras} participa em vários processos celulares, que incluem a proliferação, a diferenciação e a organização do cito-esqueleto. O aumento da expressão do Ras e mutações deste proto-oncogene têm sido encontradas em vários tipos de tumores e a via de transdução de sinal, pela qual o Ras induz algumas das suas acções, inclui o Rac1^{225 226 227}. Utilizando fibroblastos transformados, expressando o oncogene H-Ras^{V12}, foi possível demonstrar o papel das ROS, principalmente do superóxido, como mediador da progressão celular induzida pelo Ras, independentemente da via das MAPK e da JNK; o Ras induz a produção de ROS, muito provavelmente através do Rac1²²⁸.

Outra via pela qual as ROS podem estimular a proliferação celular será através da via da esfingomielina-ceramida. A hidrólise da esfingomielina, com a consequente produção de ceramida, está subjacente a várias respostas celulares, nomeadamente a proliferação²²⁹, a diferenciação²³⁰ e a apoptose²³¹. Foi já demonstrado que as OxLDL têm capacidade para induzir a degradação da esfingomielina através da estimulação da esfingomielinase, sugerindo que este fenómeno pode estar envolvido nas vias de sinalização celular desencadeadas pelas LDL oxidadas. Dado que a ceramida pode induzir a fosforilação e

activação das MAPK, classicamente associadas à proliferação celular, pode-se especular que a acção mitogénica das OxLDL se processa através da produção da ceramida e da activação das MAPK²³².

O factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é uma glicoproteína produzida por diversas células, entre as quais os macrófagos e as células endoteliais e tem sido demonstrada a sua relação com os processos de proliferação associados à inflamação e aterogénese²³³. Um estudo procurou determinar se as lipoproteínas oxidadas, desta feita a OxLp(a), poderão regular a expressão da PDGF nas células endoteliais em cultura (HUVEC). Os autores demonstraram que a OxLp(a), em pequenas concentrações e numa forma dose-dependente, aumentou a expressão do PDGF nas HUVEC. Esta constatação permite concluir que a OxLp(a) possui potencial aterosclerótico através da indução da expressão do PDGF²³⁴.

Um outro factor mitogénico com reconhecida importância na fisiopatologia da aterosclerose é o Factor de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF). Este factor, também conhecido como Factor de Permeabilidade Vascular, é um factor angiogénico, para além de apresentar potente actividade reguladora da permeabilidade vascular²³⁵. O VEGF apresenta actividade em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a progressão tumoral, a formação de colaterais nos tecidos isquémicos e a inflamação^{236 237 238}.

A propósito do papel desempenhado pelo VEGF na aterogénese, alguns autores investigaram se as OxLDL apresentavam capacidade para aumentar a produção deste factor de crescimento pelos macrófagos. Os seus resultados demonstraram a indução pelas OxLDL da expressão de mRNA e da proteína do VEGF nestas células. Esta acção das OxLDL pode ser, em parte, da responsabilidade da lisofosfatidilcolina, formada durante a oxidação das LDL por acção da fosfolipase A₂ sobre a fosfatidilcolina.

O *peroxisome proliferator-activated receptor-γ* (PPAR-γ), é um membro da superfamília de receptores nucleares de factores de transcrição, activados por ligantes. O PPAR-γ expressa-se, entre outros tecidos, nos adipócitos, nas células musculares lisas e nos monócitos / macrófagos, estando envolvido na diferenciação destes últimos e é activado por dois lípidos oxidados das OxLDL, os ácidos 9-hidroxi-(S)-10,12-octadecadienóico (9-HODE) e o 13-hidroxi-(S)-10,12-octadecadienóico (13-HODE)^{239 240}. Foi já demonstrada uma interacção

entre as OxLDL, o PPAR- γ e o VEGF a nível dos macrófagos e das células endoteliais. As OxLDL regulam a expressão do VEGF nestas células, presentes nas lesões ateroscleróticas, entre outros possíveis mecanismos através da activação do PPAR- γ , sugerindo um papel deste receptor nuclear na aterogénese induzida pelas lipoproteínas oxidadas²⁴¹. Os autores demonstraram, igualmente, a presença de VEGF nas artérias ateroscleróticas humanas. Para além dos macrófagos, as células musculares lisas poderão, também, constituir uma importante fonte deste factor de crescimento²⁴². O VEGF poderá participar na manutenção e reparação do endotélio vascular, apresentando assim uma função fisiológica da maior importância, mas poderá, igualmente, estar envolvido na formação dos microvasos na placa aterosclerótica, contribuindo para a evolução e complicações desta última.

As acções celulares do VEGF são mediadas por dois tipos de receptores: o KDR / Flk-1, presente nas células endoteliais, dependente da fosforilação e responsável pela síntese do DNA e a mitogénese e o Flt-1, responsável pela migração dos monócitos / macrófagos e pela angiogénese embrionária. Um trabalho, em que se utilizaram células endoteliais da aorta do boi, demonstrou um aumento, dose dependente, da glutathiona intracelular (GSH) induzido pelo VEGF, podendo este efeito proteger as células endoteliais contra a toxicidade das OxLDL. Esta acção do VEGF nos níveis da GSH exercer-se-á através do receptor KDR / Flk-1, sendo independente do Flt-1¹⁶. Um outro estudo, desta vez utilizando artérias coronárias humanas em que se verificou reestenose após colocação de *stent*, concluiu que os mecanismos oxidativos, exacerbados pelo ferro resultante de microhemorragias, activam o VEGF e o PDGF, resultando no espessamento e reestenose da íntima arterial²⁴³.

4.3 - Apoptose

A apoptose ou morte celular programada, seguida pela fagocitose e degradação pelos macrófagos, é um fenómeno comum a diversos tipos de células, fazendo parte do seu normal ciclo de vida. Os macrófagos possuem diversos receptores de superfície através dos quais reconhecem e fagocitam as células apoptóticas²⁴⁴.

A apoptose pode, igualmente, ser estimulada pelos oxidantes, nomeadamente pelo H_2O_2 ²⁴⁵. Houve indução da morte celular programada nos neurónios, na sequência da redução da actividade da superóxido dismutase e a apoptose induzida pela infecção pelo HIV foi inibida pela N-acetilcisteína, pela catalase e pela vitamina E^{246 247 248 249}. Os autores explicam estes resultados admitindo que a Bcl-2, molécula inibidora da libertação do citocromo-c pela mitocôndria, suprimindo a apoptose, exerce as suas acções através da regulação dos mecanismos anti-oxidantes e que a p53, indutora da apoptose, vê a sua actividade aumentada pelas espécies reactivas de oxigénio^{250 251}.

A proteína Fas encontra-se ligada à membrana e desencadeia um sinal apoptótico quando se liga à sua ligante, FasL²⁵². A Fas encontra-se presente em tecidos como o olho, o testículo e alguns tumores^{253 254 255 256}. A FasL também se encontra nas células endoteliais vasculares, aonde parece ter funções anti-inflamatórias²⁵⁷, embora estas células sejam normalmente resistentes à apoptose. As OxLDL induzem a apoptose nas células endoteliais da aorta humana por activação da Fas/FasL. A apoptose foi documentada por alterações da forma da célula, pela condensação nuclear, pela fragmentação do ADN e pela reduzida função mitocondrial, sendo inibida pelos anticorpos neutralizantes da FasL²⁵⁸.

As OxLDL induziram, igualmente, a apoptose nas células endoteliais de artérias coronárias humanas, por indução do receptor LOX-1 e através dele, da activação do factor de transcrição NF-kB, que se comporta como um importante mecanismo de transdução de sinal responsivo ao stress oxidativo²⁵⁹. Utilizando células musculares lisas da aorta bovina demonstrou-se a indução da apoptose pelas OxLDL; esta acção necessitou do receptor LOX-1 e resultou do aumento da relação entre as proteínas Bax (que induz a libertação do citocromo-c da mitocôndria, com activação das caspases e da apoptose) e da Bcl-2 que, como vimos atrás, tem acção anti-apoptótica²⁶⁰. Como a expressão da LOX-1 nas células musculares lisas pode ser estimulada pelas citocinas, pela lisofosfatidilcolina e pelas OxLDL, as respostas inflamatórias na placa de ateroma podem desencadear a apoptose das células musculares lisas e com isto, destabilizar a placa^{261 262}.

A diabetes e a hiperinsulinemia induzem a apoptose nas células endoteliais. Utilizando células endoteliais da veia umbilical humana, demonstrou-

se a indução da morte celular programada através da hiperglicemia e da hiperinsulinemia, admitindo-se que esta acção esteja na dependência da formação de espécies reactivas de oxigénio. A apoptose pode representar um mecanismo de defesa das células vasculares na diabetes, eliminando as células lesadas, procurando assim manter a integridade funcional do endotélio²⁶³.

Outras acções importantes das OxLDL resultam, como vimos atrás, da sua capacidade para induzir determinadas células a produzir citocinas, moléculas de adesão, factores de crescimento, etc. Foi, por exemplo, demonstrada a indução pelas OxLDL da secreção de Interleucina-1 beta pelas células mononucleares²⁶⁴. As OxLDL suprimiram a secreção, pelas células endoteliais em cultura, do peptídeo natriurético tipo-C (CNP), que, como é sabido, tem capacidade vasodilatadora, inibe a proliferação das células musculares lisas e o *remodeling* e suprime a libertação de endotelina pelas células endoteliais. A supressão do CNP pelas OxLDL tem, assim, uma acção pró-aterogénica, parecendo ser devida à acção dum oxiestero, o 7-cetocolesterol. As HDL, com capacidade para retirar este oxiestero das OxLDL, impedem a sua transferência para a membrana das células endoteliais, contrariando as suas acções aterogénicas²⁶⁵.

4.4 - Ruptura da placa

Um importante papel desempenhado pelas lipoproteínas oxidadas é a sua participação na transformação da placa aterosclerótica estável em instável, susceptível à ruptura e posterior trombose. É comum dizer-se que *se vive com a aterosclerose, mas que se morre com a trombose* e assim, esta transformação da placa tem enorme responsabilidade na génese das síndromes arteriais agudas. As placas instáveis ou vulneráveis, caracterizam-se por apresentar um grande núcleo, rico em lípidos extra-celulares, um reduzido número de células musculares lisas, escassa matriz extra-celular e uma fina capa fibrosa²⁶⁶. Estas placas instáveis estão infiltradas por grande número de células inflamatórias, predominantemente macrófagos derivados dos monócitos, mastócitos e linfócitos-T activados e *foam-cells*²⁶⁷. As *foam cells*, os macrófagos e provavelmente, outros tipos celulares da placa, produzem metaloproteinasas da matriz (MMPs) e inibidores tecidulares das metaloproteinasas (TIMPs). As MMPs

de que se conhecem já vários tipos (MMP-1,2,3,...), consoante os seus alvos preferenciais, têm capacidade para degradar o colagénio e a elastina, os principais constituintes da matriz extra-celular da capa fibrosa^{268 269}. Os genes das MMPs e das TIMPs são regulados pelos factores de transcrição NF-KB e AP-1^{270 271 272}. Foi já demonstrado, em macrófagos humanos, que as OxLDL, ao contrário das LDL nativas, aumentam a expressão do mRNA da MMP-9, os níveis da proteína e a sua actividade, enquanto reduzem a expressão das TIMPs. Estas acções das OxLDL serão realizadas a nível da transcrição dos genes, através da estimulação do NF-KB e do AP-1²⁷³. Conclui-se que as OxLDL podem influenciar o turnover das placas ateroscleróticas, aumentando as MMP e reduzindo as TIMP, favorecendo a degradação da matriz e predispondo as placas à ruptura. É possível que as HDL, por mecanismos ainda não totalmente conhecidos, possam inibir estas acções das OxLDL sobre as MMP e as TIMP. Alguns dos mecanismos pelos quais as HDL exercem as suas acções protectoras poderão estar na dependência das enzimas anti-oxidantes, PAF acetilhidrolase e paroxonase^{274 275}. Também em estudos no animal, particularmente no ratinho, se demonstrou que a redução dos níveis do colesterol reduziu a expressão nos macrófagos das MMPs e a sua actividade proteolítica, melhorando a estabilidade da placa aterosclerótica²⁷⁶.

4.5 - Peroxidação lipídica e Angiotensina II (Ang II)

A Ang II é uma enzima com potente acção estimuladora do crescimento, podendo causar hipertrofia cardíaca e hiperplasia da célula muscular lisa. Será, assim, interessante averiguar se existe qualquer relação entre esta enzima e os mecanismos oxidativos.

Demonstrou-se já que a Ang II estimula a peroxidação lipídica pelos macrófagos^{277 278}, que as LDL de indivíduos hipertensos são mais susceptíveis à oxidação²⁷⁹ e que os inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) atenuam a propensão das LDL à oxidação²⁸⁰. Num trabalho de T. Hayek et al, no rato deficiente em Apo E, procurou-se avaliar o possível papel da inibição do sistema renina angiotensina (SRA) com fosinopril ou losartan, na redução da tensão arterial, oxidação das LDL e inibição da aterosclerose. A susceptibilidade das LDL à oxidação, nos ratos tratados com baixas doses de fosinopril ou

losartan, foi significativamente reduzida (redução do MDA nas LDL em 90 (p<0,001) e 50% (p<0,005), respectivamente), comparativamente ao grupo placebo. Este efeito foi dependente da inibição do SRA, mas independente do efeito hipotensor²⁸¹. Utilizando o mesmo rato deficiente em Apo E, estudaram-se os efeitos da Ang II na captação das OxLDL pelos macrófagos. Demonstrou-se que a administração de Ang II a este tipo de rato aumentou a captação das OxLDL pelos macrófagos, podendo este aumento ser parcialmente explicado pelo aumento da expressão do mRNA CD36, que, como se sabe, é um dos receptores macrofágicos das OxLDL. Estes efeitos foram mediados pela libertação de IL-6, induzida pela Ang II, podendo contribuir para a aterosclerose acelerada destes ratos²⁸². Assim, o efeito anti-aterogénico dos inibidores da ECA poderá ser devido, entre outros factores, à redução da captação das OxLDL pelos macrófagos.

Tentando compreender melhor os mecanismos subjacentes à interacção entre a ECA e a oxidação lipídica, alguns trabalhos avaliaram as acções desta enzima nos mecanismos oxidativos. Utilizando células musculares lisas da aorta do rato, avaliou-se a capacidade da Ang II de estimular a formação do superóxido e procurou-se identificar as oxidases responsáveis pela sua produção. A incubação das células musculares lisas com Ang II conduziu à activação da NADPH e NADH oxidases, resultando num significativo aumento do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) intracelular. Os mecanismos subjacentes a esta activação não estão completamente esclarecidos, mas poderão estar na dependência da activação da fosfolipase D, com produção do ácido fosfatídico e do diacilglicerol. Estas duas moléculas encontram-se aumentadas nas células musculares lisas, após estimulação pela Ang II, podendo qualquer delas ou as duas ser responsável pela activação das oxidases²⁸³. A sub-unidade- α do citocromo b_{558} , o $p22^{phox}$, é uma das responsáveis pela transferência de electrões no sistema NAD(P)H oxidase; a inibição do mRNA $p22^{phox}$, por antisense $p22^{phox}$, resultou numa significativa redução da produção de $O_2^{\cdot-}$ induzido pela Ang II. Concluiu-se que o $p22^{phox}$ é um componente crítico na produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 dependente da estimulação do NAD(P)H pela Ang II²⁸⁴. Outro trabalho demonstrou um aumento da concentração do H_2O_2 nas células musculares lisas da aorta do rato após estimulação pela Ang II. Este aumento deveu-se à indução da enzima NAD(P)H oxidase, com produção aumentada de $O_2^{\cdot-}$ e posterior dismutação

deste radical livre, pela superóxido dismutase (SOD)²⁸⁵. Será através da produção destes radicais que a Ang II induz a hipertrofia muscular. Assim, o O₂⁻ activa o p42/MAPK e o H₂O₂ estimula o p38/MAPK nas células musculares lisas, sendo ambas vias de sinalização envolvidas no crescimento celular^{286 287 288}.

Um outro trabalho confirmou a capacidade dos radicais de oxigénio, produzidos após indução da NAD(P)H oxidase pela Ang II, de se comportarem como moléculas transdutoras de sinais de proliferação celular. A fosforilação do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGF-R), molécula central a várias vias de sinalização do crescimento, é uma importante etapa na activação das tirosina-quinases pela Ang II, sendo o O₂⁻ e o H₂O₂ moléculas indispensáveis a essa activação. Dos cinco resíduos de tirosina do EGF-R passíveis de fosforilação, a acção da Ang II, mediada pelos radicais, exerce-se a nível dos Tir1068 e Tir1173. Esta constatação levou os autores a concluir que a resposta hipertrófica das células musculares lisas à Ang II apresenta uma sensibilidade ao estado redox, constituindo a activação do EGF-R um dos componentes iniciais destas vias de sinalização. Estes factos abrem novas perspectivas à terapêutica anti-oxidante na doença vascular^{289 290}.

Para além da NAD(P)H oxidase, a Ang II pode activar a 12-lipoxigenase (12-LO), estando esta enzima igualmente envolvida na hipertrofia das células musculares lisas em resposta à Ang II. Este facto foi demonstrado através da inibição selectiva da 12-LO e pelos efeitos celulares hipertróficos desencadeados pelo 12-HETE, produto directo desta enzima²⁹¹.

4.6 - Peroxidação e proteínas de choque térmico (HSP)

Foi já realçado o papel das *heat shock proteins* (HSP), quer como importantes proteínas protectoras da célula contra diversos factores de stresse, quer como antigénios nos mecanismos inflamatórios/imunológicos da aterosclerose. Será, assim, interessante averiguar uma eventual relação entre a peroxidação lipídica e as HSP. Já em 1994, Zhu e colaboradores, demonstraram que as OxLDL induziam a expressão da HSP70 em células endoteliais humanas em cultura²⁹². Utilizando técnicas de imunofluorescência e *immunoblotting*, demonstrou-se também a indução da HSP70 pelas OxLDL em células musculares lisas humanas, sendo essa indução proporcional à concentração das

OxLDL²⁹³. Um outro estudo demonstrou que as células musculares lisas vasculares, sujeitas à acção do H₂O₂, apresentam um aumento dos níveis da HSP70, sendo este aumento, muito provavelmente, secundário à activação da via de sinalização JAK (*Janus Kinases*) / STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Os autores sugerem que a regulação das HSP70 poderá ser um dos mecanismos através do qual a via da JAK / STAT, induzida pelo H₂O₂, promove o crescimento das células musculares lisas vasculares²⁹⁴. Procurou-se, igualmente, avaliar se a HSP70, induzida pelas OxLDL, protege as células das propriedades citotóxicas das lipoproteínas oxidadas. Utilizando um tipo de célula que permanentemente expressa a HSP70, a *cós-HSP70/10*, verificou-se haver protecção contra determinados estímulos tóxicos, como o H₂O₂, a irradiação ultra violeta e o choque térmico. Curiosamente, quando expostas às OxLDL, estas células mostraram uma viabilidade significativamente reduzida. Após exposição às OxLDL verificou-se um aumento da proteína *Bax* (pró-apoptótica) e uma redução da *Bcl-2* (anti-apoptótica), o que sugere que a hiperexpressão da HSP70 não confere protecção contra a apoptose induzida pelas OxLDL²⁹⁵.

4.7 - Peroxidação e Transdução de sinal

Como já foi referido, muitas das acções dos oxidantes exercem-se através da sua capacidade de desencadear e/ou interferir nas vias de sinalização celular. Vamos tentar abordar, um pouco mais em pormenor, estas acções a nível da célula e a sua participação na aterogénese.

A transdução de sinal ou sinalização celular significa a transmissão da mensagem extra-celular, através da membrana plasmática, até ao interior da célula, utilizando para o efeito proteínas receptoras, de ligação, efectoras, segundas mensageiras, proteínas-quinases e fosfoproteínas. Os processos de sinalização induzem actividades biológicas, tais como a contracção muscular, a expressão de genes, o crescimento celular e a neurotransmissão.

O Ca²⁺ é um segundo mensageiro que regula uma variedade de processos biológicos. Respondendo à interacção ligante-receptor, o nível de Ca²⁺ intracelular, mantido habitualmente em concentrações de 10⁻⁷ M, aumenta rapidamente e desencadeia a activação de proteínas, como a troponina, as

formas α e β da proteína C quinase, as Ca^{2+} calmodulina quinases e a calcineurina. As principais fontes de cálcio para estas vias de sinalização são o espaço extracelular e as reservas intracelulares, localizadas essencialmente no retículo endoplasmático (RE)²⁹⁶.

Verifica-se um aumento do Ca^{2+} intracelular, nas células musculares lisas, em resposta ao tratamento com H_2O_2 , parecendo este aumento ser de origem intracelular, libertado pelo RE, através da formação de trifosfato de inositol (IP_3)²⁹⁷. Tanto o O_2^- como o H_2O_2 têm demonstrado inibir a actividade da bomba de cálcio dependente do ATP a nível do retículo sarcoplasmático (RE das células musculares lisas), resultando essa inibição na saída passiva do ião para o citoplasma, aumentando transitoriamente os seus níveis^{298 299 300}. Diversos trabalhos no animal têm demonstrado a existência de interacções entre os radicais livres de oxigénio e os canais de cálcio, a nível do músculo-esquelético e cardíaco do carneiro³⁰¹ e do coelho³⁰², verificando-se estas acções, mesmo nas concentrações fisiológicas dos oxidantes³⁰³. Para além da libertação do cálcio do RE através da estimulação do IP_3 , outros mecanismos estarão subjacentes à acção dos oxidantes. Por exemplo, o *Tert*-butil hidroperóxido (tBOOH) aumentou o Ca^{2+} a nível dos hepatócitos, sem estimular a formação do IP_3 e o hidroperóxido do ácido linoleico (LOOH) teve acção semelhante nas células endoteliais da aorta do coelho^{304 305}. O LOOH poderá reduzir a recaptação do Ca^{2+} para os *pools* das membranas intracelulares, aumentando assim os níveis citoplasmáticos do Ca^{2+} ³⁰⁶. O tBOOH induziu uma rápida elevação dos níveis do Ca^{2+} nos macrófagos alveolares, parecendo estes efeitos serem resultantes da acção do hidroperóxido na *explosão respiratória* destas células³⁰⁷.

Para além do aumento transitório do Ca^{2+} , por libertação das fontes intracelulares, os oxidantes podem interferir com os mecanismos de transporte associados à membrana plasmática. O H_2O_2 desencadeou uma elevação mantida do Ca^{2+} nas células A7r5 por aumento do transporte do Ca^{2+} extracelular através da membrana plasmática. Este mecanismo foi comprovado através da inibição dos canais de cálcio pelo Ni^{2+} , que impediu o aumento do Ca^{2+} citoplasmático pelo H_2O_2 ³⁰⁸. O papel do Ca^{2+} extra-celular, na estimulação por oxidantes da sinalização celular, foi igualmente estudado por outros autores. Maki demonstrou a indução da expressão do proto-oncogene (c-fos) pelo O_2^- nas

células do epitélio tubular, sendo esta indução inibida pela superóxido dismutase e pela quelação do Ca^{2+} extracelular³⁰⁹.

A fosforilação das proteínas, quer sejam enzimas, receptores, factores de transcrição ou elementos de contracção, é um mecanismo fundamental na transdução de sinal. A fosforilação depende essencialmente da actividade de duas classes de enzimas, as proteínas-quinases e as proteínas-fosfatases, que estimulam e inibem a reacção, respectivamente. A especificidade destas enzimas para determinados aminoácidos classifica-as em *serina / treonina e tirosina quinases / fosfatases*. A estimulação da fosforilação pelos mecanismos oxidativos pode ser conseguida através da activação das proteínas-quinases ou por inibição das proteínas fosfatases.

Não podemos continuar a falar de sinalização intracelular sem uma referência, mesmo que breve, a uma família de proteínas envolvidas nos processos de fosforilação e de transmissão de sinal.

As MAPK (mitogen-activated protein kinases) são proteínas quinases que fazem a transdução de sinais desde a membrana celular até ao núcleo, em resposta aos factores de crescimento, aos agonistas dos receptores associados à proteína G e ao stresse celular. Estão identificados quatro grupos de MAPKs nas células dos mamíferos: as *extracellular signal-regulated kinases 1 e 2* (ERK 1/2, também chamadas p42/44MAPK), as *cJun NH₂-terminal kinases ou stress-activated protein kinase* (JNK ou SAPK respectivamente), as p38MAPK (também chamadas CSBP) e as *Big MAPK 1* (BMK1 também chamada ERK5). Embora todas as MAPKs sejam estruturalmente relacionadas, elas são geralmente activadas por diferentes estímulos e fosforilam diferentes substratos celulares. As ERK1/2 são estimuladas pelos factores de crescimento e estímulos mitogénicos, tendo assim um papel central no crescimento e diferenciação celulares; elas fosforilam e activam factores de transcrição como os Elk-1 e o c-Fos. As p38MAPK e JNK são essencialmente activadas pelo stresse celular, como os choques térmico e osmótico, a irradiação UV, as citocinas pró-inflamatórias e a hipóxia/reoxigenação. As JNK fosforilam e activam factores de transcrição como o c-Jun, o ATF-2 e o Elk-1, enquanto as p38MAPK, fosforilam o ATF-2 e o C/EPT-proteína homologa (CHOP). Em adição, as p38MAPK fosforilam as proteínas de choque térmico, aumentando as suas capacidades protectoras.

Diversos trabalhos demonstraram que os oxidantes estimulam a fosforilação da tirosina. As naftoquinonas fizeram-no a nível das membranas plasmáticas dos hepatócitos do rato³¹⁰ e o H₂O₂ estimulou igualmente a fosforilação da tirosina em vários tipos celulares³¹¹. O H₂O₂ induziu a fosforilação da tirosina do *epidermal growth factor receptor* (EGF-R), activando-o³¹². Num outro trabalho ficou provada, igualmente, a capacidade do H₂O₂ de fosforilar a tirosina do EGF-R, numa forma tempo-dependente, de fosforilar a tirosina das proteínas SHC (proteínas relacionadas com o colagénio e contendo um domínio SH2) e de activar as proteínas Ras e ERKs, grupo de proteínas quinases activadas por mitogénios³¹³. Não está bem definido, ainda, se os radicais livres de oxigénio estimulam a fosforilação da tirosina pela activação da tirosina-quinase ou pela inibição da tirosina-fosfatase. Também a estimulação da fosforilação da serina e da treonina pelos radicais livres foi já demonstrada³¹⁴. Stevenson demonstrou a fosforilação da treonina e da tirosina da *mitogen-activated protein (MAP) kinase*, pelo H₂O₂ e a subsequente indução da actividade quinase. O aumento da MAP quinase foi inibido pelo anti-oxidante N-acetilcisteína³¹⁵. O ácido lisofosfatídico (LPA), produto da fosfolipase D, induz respostas celulares através da ligação a receptores específicos da superfície celular, activando rapidamente a cascata das MAPK (Ras, Raf,-1, ERK) pela fosforilação dos resíduos de tirosina das diferentes proteínas. O LPA possui capacidade para fosforilar a tirosina do EGF-R, necessitando, para o efeito, da presença dos radicais de oxigénio. O mecanismo subjacente à fosforilação pelo LPA será através da inibição da tirosina fosfatase pelos radicais de oxigénio³¹⁶. Conclui-se que, a fosforilação da tirosina do EGF-R contribui para a activação das MAPKs, para a transcrição de genes e para a mitogénese.

Os produtos da acção da fosfolipase A₂ (PLA₂) são importantes mediadores de processos como a inflamação, a resposta imune e a activação da NADPH oxidase. Os radicais de oxigénio activam a PLA₂ através de uma série de eventos que incluem a transdução de sinal.

A peroxidação dos lípidos da membrana conduz à formação de hidroperóxidos que, para além de poderem inactivar determinadas proteínas, alteram as propriedades físicas da membrana; esta alteração da estrutura membranar parece suficiente para activar as fosfolipases extracelulares³¹⁷. Também a hidrólise de ácidos gordos, oxidados ou não, tem sido observada

após tratamento das células com oxidantes, parecendo depender esta hidrólise da peroxidação da membrana pelos radicais livres, sendo inibida por antioxidantes^{318 319 320}. A peroxidação dos lípidos membranares altera a homeostase do Ca^{2+} e esta acção terá um papel primordial na activação da PLA_2 . Os radicais de oxigénio provocam assim a hidrólise dos fosfolípidos, tais como o fosfatidilinositol (PI), desencadeando a libertação de agentes de sinalização como o ácido araquidónico, o diacilglicerol e o fosfoinositido. A hidrólise dos fosfolípidos, estimulada pelos agentes oxidantes, envolve o IP_3 e a PKC e conduz à produção de moléculas segundas mensageiras que, por sua vez, libertam o cálcio e activam a PKC através do diacilglicerol³²¹. O diacilglicerol aumenta a afinidade da PCK para o Ca^{2+} e reduz as necessidades deste ião para a activação da PLA_2 ³²². Em resumo, o stresse oxidativo, através da peroxidação lipídica a nível das membranas celulares, contribui para a activação da PLA_2 , quer por alterações estruturais da membrana, quer por interferência na actividade de diversas enzimas. A activação peroxidativa da PLA_2 representa um possível meio pelo qual, certas hormonas e factores de crescimento, exercem as suas acções, provavelmente por interacção directa dos produtos da peroxidação com a PCK³²³.

Outra acção de relevante importância na sinalização celular é a activação de factores de transcrição. A transdução de sinal pode enviar uma mensagem ao núcleo para transcrição de um determinado gene. Habitualmente, os sinais para o aparelho transcripcional são transmitidos por uma classe de proteínas, chamadas factores de transcrição, que se ligam a sequências específicas do ADN e regulam a actividade da ADN polimerase II. Foi já demonstrada, pelas espécies reactivas de oxigénio, uma capacidade para modular alguns desses factores de transcrição.

O factor de transcrição AP-1 controla a expressão de mediadores do crescimento celular, sendo constituído por um heterodímero das proteínas Fos e Jun, produtos dos proto-oncogenes c-fos e c-jun³²⁴. Várias hormonas, citocinas e factores de crescimento induzem a expressão destes genes. A transdução do sinal pode envolver o Ca^{2+} , a fosforilação das proteínas e a fosfolipase A_2 (PLA_2)^{325 326}. O c-fos mRNA foi induzido por espécies reactivas de oxigénio, geradas pelo sistema xantina / xantina oxidase, em células epidérmicas, epiteliais tubulares proximais e células musculares lisas do rato^{327 328}. A estimulação

destes proto-oncogenes pelas espécies reactivas de oxigénio poderá constituir um meio pelo qual o stresse oxidativo induz a proliferação celular³²⁹.

O NF-kB é um outro factor de transcrição de relevante importância na aterogénese. Encontra-se presente no citoplasma das células eucarióticas, ligado a uma proteína inibitória, a IκB, que impede a sua translocação para o núcleo da célula. Diversos estímulos celulares, incluindo as forças mecânicas, o stresse oxidativo e as citocinas, induzem a fosforilação da IκB e a libertação do NF-kB que pode, assim, entrar no núcleo e iniciar a transcrição de genes envolvidos nos processos inflamatórios, na sobrevivência e na morte celular. Entre as moléculas que vêm os seus genes transcritos pelo NF-kB salientam-se os factores estimulantes das colónias dos granulócitos e macrófagos, o MCP-1, diversas citocinas e moléculas de adesão^{330 331 332}. O H₂O₂, os hidroperóxidos e as OxLDL têm capacidade para activar o NF-kB, desencadeando, com essa activação, o aumento da expressão dos factores acima descritos^{333 334}. Este factor de transcrição foi também activado no rato por uma dieta aterogénica, possivelmente pelo aumento do stresse oxidativo. Os produtos avançados da glicação (AGE), responsáveis pela aterosclerose da diabetes, activaram igualmente o NF-kB^{335 336}.

Utilizando células musculares lisas do porco, avaliaram-se as possíveis acções do produto da peroxidação do ácido linoleico, o 13-HPODE, na regulação da transcrição de determinados genes inflamatórios, reconhecidamente envolvidos na aterogénese. Os autores demonstraram a activação pelo 13-HPODE das MAPKs (ERK, p38 e JNK), da proteína Ras e do NF-kB; a activação deste factor de transcrição correlacionou-se com a transcrição do gene do VCAM-1. Estes efeitos a nível da sinalização celular são inibidos por antioxidantes³³⁷. Outros autores demonstraram a capacidade do 13-HPODE de induzir a expressão do c-fos, c-jun e c-myc e a activação das MAPK nas células musculares lisas, provando o papel dos produtos da peroxidação do ácido linoleico na proliferação celular³³⁸. Avaliaram-se outros produtos da acção da 12-Lipoxigenase (12-LO), nomeadamente na peroxidação do ácido araquidónico, de que resulta o *12-hydroxyeicosatetraenoic acid* (12-HETE). Utilizando células musculares lisas da carótida do rato e um inibidor selectivo da 12-LO, a ribozima, concluiu-se que o 12-HETE medeia a expressão de oncogenes, activa o crescimento através das MAPK e SAPK (Stress-Related Protein Kinases) e

activa factores de transcrição. Através da activação destas cascatas de sinalização, o 12-HETE induz, assim, a expressão de genes responsáveis pela patogénese da aterosclerose³³⁹.

Os *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* são uma família de receptores nucleares, com funções de factores de transcrição, que regulam a diferenciação e a homeostase celulares. Existem três famílias destes receptores: os *Peroxisome proliferator activated receptor* α , β e γ , respectivamente PPAR α , PPAR β e PPAR γ . Os PPAR γ estão relacionados com a diferenciação dos adipócitos e o controlo da captação dos lípidos pelas células, comportando-se como regulador transcripcional de genes envolvidos no metabolismo lipídico celular. As OxLDL podem regular a transcrição dependente dos PPAR γ após ligação aos receptores scavenger. Os principais componentes das OxLDL, responsáveis por estas acções transcripcionais, são o 9-HODE e o 13-HODE, que se comportam como ligantes dos PPAR γ ³⁴⁰. A exposição dos monócitos às OxLDL induz a expressão dos PPAR γ e estes factores de transcrição, por sua vez, induzem a expressão dos CD36, aumentando a capacidade dos monócitos de internalizar as OxLDL³⁴¹. Estes factos estabelecem um novo mecanismo molecular, relacionando as OxLDL e o controle transcripcional de genes e sugere um papel dos PPAR γ na patogénese da aterosclerose.

As espécies reactivas de oxigénio podem ser consideradas moléculas segundas mensageiras quando a interacção ligante-receptor produz radicais livres de oxigénio que, por sua vez, desencadeiam a transdução de determinados componentes moleculares. Várias moléculas têm capacidade para originar espécies reactivas de oxigénio.

O TNF- α , é uma das citocinas com capacidade para induzir a produção de radicais de oxigénio e a transdução de sinal, desencadeada pelo TNF- α , envolve estas moléculas oxidativas. Esta citocina activa os factores de transcrição responsivos ao stresse, NF-kB e AP-1 e também induz o fenómeno da apoptose. Estudos sobre a capacidade citolítica do TNF- α demonstraram um aumento dos TBAR(s) (thiobarbituric acid reacting products), reflectindo os fenómenos oxidativos e a inibição das suas acções citolíticas pelos anti-oxidantes^{342 343}. Foi demonstrado, igualmente, que a N-acetilcisteína inibe e que a diamida estimula a activação do NF-kB, assim como a transcrição do HIV induzida por esta citocina;

como se sabe, a N-acetilcisteína aumenta e a diamida reduz os níveis de GSH intra-celulares³⁴⁴.

A constatação de que muitos antioxidantes bloqueiam a activação do NF- κ B induzida pelo TNF- α , que as interacções entre esta citocina e o respectivo receptor produzem oxidantes e de que os oxidantes activam o NF- κ B, apoia a hipótese dos radicais livres de oxigénio serem considerados segundos mensageiros para a activação deste factor de transcrição^{345 346 347 348}.

A Angiotensina II é uma hormona com propriedades hipertróficas e anti-apoptóticas, que utiliza as espécies reactivas de oxigénio, como moléculas de sinalização relacionadas com o crescimento, nas células musculares lisas vasculares. Está comprovada a capacidade da Ang II de activar as p38MAPK, uma das principais MAPK sensíveis ao estado redox, através do aumento da produção de H₂O₂ intracelular³⁴⁹. Recentemente foi descrita uma proteína, a *cell survival kinase Akt/protein kinase* (PKB), com um importante papel na síntese proteica, na síntese do glicogénio e na regulação do ciclo e do crescimento celular. Esta proteína quinase pode ser activada por uma grande variedade de estímulos, salientando-se o factor de crescimento derivado das plaquetas, o factor de crescimento epidérmico, a insulina, a trombina e o factor de crescimento do nervo. Como já foi dito, a Ang II induz um significativo aumento da produção de radicais de oxigénio nas células musculares lisas e será através do aumento do H₂O₂ intracelular (comportando-se como segundo mensageiro) que a Ang II activa a Akt/pkB e através dela, exerce uma acção hipertrófica nas células musculares lisas³⁵⁰.

O c-myc estimula a proliferação da célula muscular lisa, podendo estar envolvido na aterogénese. Utilizando células musculares lisas das coronárias de coelho, demonstrou-se que as OxLDL induzem a activação das vias de sinalização dependentes do c-myc, tendo o α -tocoferol acção contrária³⁵¹.

Um importante componente nos estádios avançados do desenvolvimento da lesão aterosclerótica é a deposição da matriz celular na parede arterial. Os mediadores que controlam este processo incluem diversos factores que são modulados pelas espécies radicais, quer de oxigénio quer de azoto³⁵². O *Transforming Growth Factors- β* (TGF- β) representa uma família de citocinas que influenciam o crescimento e a diferenciação celulares, a apoptose, os processos inflamatórios e a expressão de genes^{353 354}. O TGF- β induz a expressão de

muitas proteínas da matriz, incluindo o colagénio, a fibronectina, a tenascina e a trombospondina. De forma a exercer todas estas actividades, a forma inactiva do TGF- β deve sofrer activação; diversos estudos demonstraram que um potencial mecanismo para esta activação *in vivo* envolve os radicais livres de oxigénio³⁵⁵.

Os radicais livres de oxigénio podem estar envolvidos, também, no metabolismo ósseo. Assim, o TNF- α , a IL-1, a hormona paratiróide e a vitamina D₃ poderão utilizar os radicais como segundos mensageiros na sinalização celular, estimulando a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Foi demonstrada a reabsorção óssea pelo O₂⁻; assim como o bloqueio desta acção pela superóxido dismutase³⁵⁶. Também o H₂O₂ estimulou a reabsorção óssea pelos osteoclastos do rato, tendo sido demonstrado que estas células ósseas contêm NADPH oxidase, produzindo O₂⁻ durante o processo de reabsorção^{357 358}.

A nível das células musculares lisas, foi também demonstrada a participação das espécies reactivas de oxigénio nos mecanismos de sinalização celular. O sistema Xantina / Xantina oxidase e a Angiotensina II, produzindo ambos O₂⁻, induzem o crescimento e a contracção da célula muscular lisa do rato³⁵⁹. Foi também demonstrado um papel do H₂O₂ na transdução do sinal para o *platelet-derived growth factor* (PDGF), a nível das células musculares lisas do rato³⁶⁰.

Em relação aos potenciais papéis desencadeados pelas espécies reactivas de oxigénio na sinalização celular, podemos concluir que, para além da ideia clássica de considerar os oxidantes como os “vilões” que destroem indiscriminadamente os componentes biológicos, surgem cada vez mais evidências atribuindo aos fenómenos oxidativos funções necessárias ao normal funcionamento celular.

5 - Avaliação da Peroxidação

Vários métodos têm sido empregues para quantificar os produtos da peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres. Incluem a determinação dos dienos conjugados, dos hidroperóxidos lipídicos, dos Thiobarbituric Acid Reacting products-malonaldeído (TBARS-MDA), do Hidroxinonenal (HNE) e dos hidrocarbonetos expirados.

O decréscimo dos PUFA e a formação dos hidroperóxidos pode ser utilizado para a monitorização da peroxidação lipídica³⁶¹.

5.1 – Aldeídos (MDA e HNE)

Nos seres humanos, a lesão oxidativa dos lípidos tem sido mais frequentemente avaliada através da produção do malondialdeído (MDA), utilizando a determinação das substâncias reactivas ao ácido tiobarbiturico (TBARS). Apesar de alguma falta de especificidade, os TBARS-MDA têm sido largamente utilizados, essencialmente devido ao seu baixo custo e facilidade de execução^{362 363}. O método actual para a determinação dos TBARS-MDA utiliza a *high performance liquid chromatography* (HPLC), método que aumenta a especificidade do doseamento.

Para além do MDA, outros aldeídos formam-se da degradação dos hidroperóxidos lipídicos, salientando-se o α,β -aldeído insaturado HNE. A quantificação do HNE, assim como a de outros aldeídos específicos resultantes da degradação dos PUFA, é tecnicamente difícil, pelo que a sua utilização como biomarcadores tem sido limitada. Por outro lado, os aldeídos não são específicos da peroxidação lipídica, sendo também formados pela glicoxidação e pela acção dos radicais livres sobre os aminoácidos^{364 365}.

Na avaliação da oxidação das LDL, estas lipoproteínas são incubadas com uma fonte de radicais livres de oxigénio, mais frequentemente os metais de transição (o Cu é o mais utilizado) e o tempo necessário à oxidação destas lipoproteínas é monitorizado pela medição dos dienos conjugados, dos hidroperóxidos lipídicos ou dos TBARS-MDA. A cinética deste processo pode ser usada para quantificar parâmetros específicos, tais como o *lag phase*, uma medida da susceptibilidade das LDL à oxidação³⁶⁶.

Embora alguns destes métodos constituam abordagens eficazes para a determinação da peroxidação lipídica *in vitro*, apresentam limitações quando se procura avaliar os mecanismos oxidativos no vivo³⁶⁷.

Como já foi dito, o HNE e o MDA são imunogénicos, dando origem a anticorpos monoclonais que, por sua vez, podem ser usados como marcadores da peroxidação dos lípidos e proteínas. Anticorpos anti MDA e HNE reconhecem

as Ox-LDL e algumas proteínas oxidadas nas lesões de aterosclerose humana³⁶⁸.

5.2 – Gases voláteis (etano e pentano)

A peroxidação dos n-3 e n-6 PUFA(s) dá origem à produção de gases voláteis, respectivamente o etano e o pentano, que são exalados na respiração, podendo a sua determinação ser um método quantitativo, não invasivo, da peroxidação lipídica no homem^{369 370}. No entanto, dificuldades técnicas, particularmente com a determinação do pentano na respiração, têm limitado a utilização destes índices da peroxidação lipídica.

5.3 - *Total peroxy radical trapping capacity (TRAP)*

O TRAP mede a capacidade do plasma de resistir à reacção em cadeia dos radicais peróxido, produzidos por agressão térmica. O TRAP pode ser utilizado para obter informação sobre a capacidade antioxidante total do plasma, em vez da avaliação individual dos diversos antioxidantes. O TRAP reflete, em conjunto, a acção antioxidante do urato, da Vit C, da Vit E e dos grupos sulfidrilo das proteínas^{371 372}.

5.4 – F2-Isoprostanos

Marrow et al demonstraram que uma série de compostos prostaglandina-like são produzidos no homem pela peroxidação não enzimática (radicais livres) do ácido araquidónico³⁷³. Esses compostos, os Isoprostanos, representam uma forma fiável de determinação do processo oxidativo, não só *in vitro* mas, mais importante, no vivo.

Para além destas capacidades diagnosticas, os isoprostanos têm, como veremos adiante, importantes propriedades biológicas^{374 375 376 377}

Os fluidos biológicos contendo lípidos, como é o caso do plasma, sofrem rapidamente oxidação, resultando na formação de uma série de compostos PGF₂-like, sendo o mecanismo responsável pela formação destes compostos representado na Figura 1³⁷⁸. Através de reacções químicas, cuja explicação

ultrapassa o âmbito desta revisão, podem ser formados 64 diferentes compostos que, por serem estruturalmente isoméricos com a $\text{PGF}_{2\alpha}$, são colectivamente referidos como F₂-isoprostanos. Para além da incrível facilidade com que os F₂-isoprostanos são formados *in vitro* (no plasma armazenado a 20°C), foi igualmente demonstrada a sua produção no vivo, sendo detectados em quantidades mensuráveis nos fluidos biológicos humanos, analisados imediatamente e não conservados. Os níveis no plasma e na urina de voluntários saudáveis, pelos métodos de determinação utilizados, foram de 35 ± 6 pg/ml e de 1600 ± 600 pg/ml, respectivamente³⁷⁹. Estes níveis não foram afectados pela administração de altas doses de inibidores da cicloxigenase, significando que a produção dos isoprostanos é independente desta enzima.

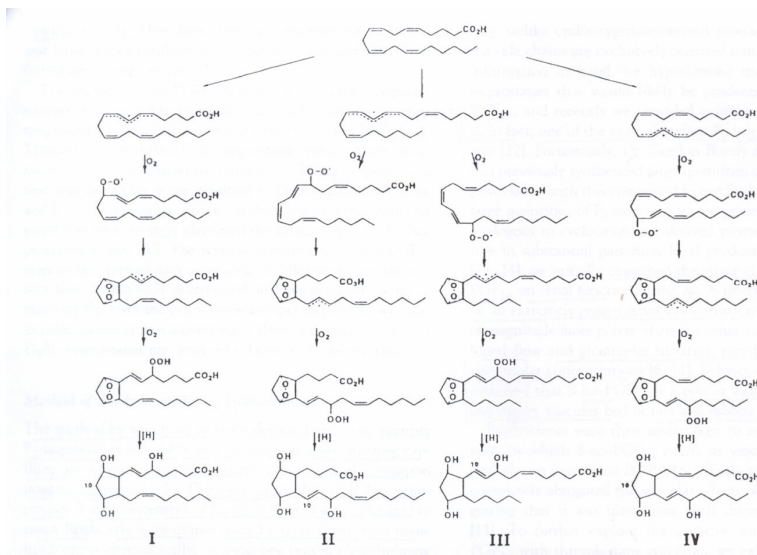


Fig1 - Mecanismo da formação dos F₂-Isoprostanos

Sabendo que apenas pequenas quantidades de ácido araquidónico existem nas células na forma livre, estando a grande maioria esterificada nos fosfolípidos, foi preciso avaliar se os processos químicos que conduzem à produção dos isoprostanos ocorrem também com o ácido araquidónico esterificado. Em fígados de ratos tratados com CCl_4 para indução da peroxidação lipídica, foi possível isolar e identificar, por espectrometria de massa, fosfolípidos contendo F₂-isoprostanos³⁸⁰. Os mesmos trabalhos demonstraram que, após formação nos fosfolípidos, os F₂-isoprostanos são libertados pela acção das fosfolipases. A peroxidação do ácido araquidónico dos

fosfolípidos pode ter importantes repercussões na fluidez e integridade das membranas, uma sequela bem conhecida da lesão oxidativa³⁸¹.

O método pelo qual inicialmente se detectaram e quantificaram os F₂-isoprostanos foi através da espectrometria de massa, tendo sido doseados apenas os compostos na sua forma livre, não esterificada. Para a quantificação dos isoprostanos esterificados nos lípidos tecidulares, primeiro devem ser hidrolisados, quer enzimaticamente, utilizando a PLA₂, quer quimicamente, usando a saponificação alcalina³⁸². Embora o método de espectrometria de massa seja muito sensível e fidedigno, apresenta algumas desvantagens, devido, essencialmente, ao elevado custo dos equipamentos e ao significativo tempo necessário a esta técnica. Para tentar ultrapassar estas limitações, existem actualmente métodos de imunoensaio, mais económicos e rápidos³⁸³.

A cicloxigenase produz quantidades muito pequenas de 8-iso-PGF_{2α}, levantando a questão da possibilidade da determinação do 8-iso-PGF_{2α} nem sempre ser um bom marcador da peroxidação não enzimática^{384 385}. No entanto, a quantidade de 8-iso-PGF_{2α} que pode ser formada pela cicloxigenase será uma quantidade insignificante, comparada à resultante da peroxidação não enzimática³⁸⁶.

Como a maior parte dos estudos parece indicar, a determinação dos isoprostanos constitui um método válido para a avaliação da peroxidação nos organismos vivos. Os níveis destes compostos aumentam dramaticamente, quer na sua forma livre, quer esterificada nos fosfolípidos. Utilizando o CCL₄ como oxidante, os níveis de F₂-isoprostanos esterificados nos lípidos do fígado aumentaram cerca de 80 vezes, enquanto que os níveis de MDA no fígado aumentaram apenas 2,7 vezes³⁸⁷.

Uma outra potencial utilização dos F₂-isoprostanos é a avaliação da peroxidação em determinados órgãos ou tecidos. Enquanto que a determinação dos isoprostanos circulantes reflecte a formação destes compostos em todo o organismo, a medição na sua forma esterificada, nos lípidos tecidulares, permite uma avaliação da lesão oxidativa em tecidos ou órgãos alvo. Voltando ao exemplo da administração do CCL₄ ao rato, os níveis de F₂-isoprostanos esterificados nos lípidos hepáticos e renais aumentaram significativamente, o mesmo não acontecendo no cérebro e coração, sugerindo uma agressão específica de órgão por parte do referido tóxico.

Também no homem, utilizando a espectrometria de massa, é possível a determinação dos F₂-isoprostanos esterificados em fosfolípidos de determinados tecidos. Um dos estudos iniciais no homem, utilizando a medição dos F₂-isoprostanos para avaliar o papel dos radicais livres na fisiopatologia da doença, testou a hipótese de que o stresse oxidativo possa estar envolvido na patogénese da síndrome hepatorenal. Nesta síndrome, a insuficiência renal resulta de uma intensa vasoconstrição, desconhecendo-se, ainda, o ou os verdadeiros responsáveis por esta reacção vascular. Encontraram-se aumentos de 7,8 vezes nas concentrações dos F₂-isoprostanos em indivíduos com síndrome hepatorenal, comparativamente a um grupo controlo³⁸⁸. Neste mesmo trabalho, a infusão de superóxido dismutase em três dos doentes, reduziu em cerca de 50% os níveis circulantes de F₂-isoprostanos, entre os 30 e os 60 minutos após a infusão. Dado que os isoprostanos são potentes vasoconstritores renais, é tentador considerar a possibilidade dos F₂-isoprostanos poderem contribuir para as alterações renais características da síndrome hepatorenal.

Como já se disse atrás, os isoprostanos, para além da sua utilidade diagnóstica, apresentam igualmente relevante actividade biológica. Um dos isoprostanos mais abundantes *in vivo* é o 8-iso-PGF_{2 α} ³⁸⁹. Alguns investigadores avaliaram o efeito da infusão deste isoprostano na função renal do rato; demonstrou-se que o 8-iso-PGF_{2 α} se comporta como um potente vasoconstritor, mais potente do que outros eicosanóides, provocando a redução do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular em cerca de 40 a 45%^{390 391}. O mesmo efeito vasoconstritor foi demonstrado nos vasos pulmonares do rato e do coelho^{392 393}. Segundo alguns autores, esta acção do 8-iso-PGF_{2 α} , a nível da célula muscular lisa vascular, far-se-á através de um receptor específico dos isoprostanos, diferente do utilizado pelo Tromboxano A₂^{394 395 396}. Mais recentemente, com a utilização de ratos transgénicos para o receptor do Tromboxano, verificaram-se respostas vasoconstritoras exageradas aos isoprostanos nos animais que expressavam aumento dos receptores e por outro lado, ausência da resposta vascular e plaquetar nos ratos que não apresentavam receptores para o Tromboxano. Os autores concluem que os efeitos vasoconstritores e moduladores da função plaquetar no rato vivo, não dependem de receptores específicos dos isoprostanos, mas resultam da transdução através do receptor do Tromboxano A₂³⁹⁷.

A nível plaquetar, concentrações de 8-iso-PGF_{2α} da ordem de 1nmol/ L induzem um aumento dose – dependente da agregação irreversível induzida pelo colagénio, ADP, ácido araquidónico e análogos do Tromboxano A₂, que, isoladamente, não conseguem induzir a agregação plaquetar^{398 399}. Um outro trabalho demonstrou igualmente que, em concentrações nanomolares, o 8-iso-PGF_{2α} aumenta a adesividade plaquetar e a expressão do receptor do fibrinogénio, para além de reduzir os efeitos do óxido nítrico sobre a função plaquetar. Estas acções foram inibidas pelo antagonista do receptor do tromboxano A₂⁴⁰⁰.

Um outro isoprostano, o 12-epi-PGF_{2α} estimula a proliferação dos fibroblastos⁴⁰¹.

Um aumento da formação dos F₂-isoprostanos tem sido sistematicamente demonstrado em associação com diversos factores de risco cardiovasculares, como é o caso do tabagismo, da diabetes e da hipercolesterolemia.

Encontraram-se níveis plasmáticos significativamente aumentados de F₂-isoprostanos em indivíduos fumadores, comparativamente aos não fumadores (574±217 versus 242±147 pmol/l; p=0,02), quer na forma livre quer esterificados nos lípidos plasmáticos. Os níveis, na forma livre e esterificada, decresceram cerca de 35% após duas semanas sem fumar (250±156 e 624±214 versus 156±67 e 469±108 pmol/l; p=0,03 e =0,02, respectivamente)⁴⁰².

Na diabetes mellitus, os altos níveis de glucose e a glicação das proteínas, aumentam a oxidação das LDL pelos iões metálicos. Gopaul demonstrou que a concentração média dos 8-iso-PGF_{2α} esterificados, em 39 doentes diabéticos, era cerca de três vezes superior, comparativamente aos não diabéticos⁴⁰³. A oxidabilidade das LDL nos diabéticos foi avaliada mais rigorosamente pela medição dos isoprostanos do que pela determinação dos dienos conjugados⁴⁰⁴. Um rigoroso controlo metabólico traduziu-se numa significativa redução da excreção urinária (± 40%; p<0,05) de 8-iso-PGF_{2α}⁴⁰⁵.

Os 8-iso-PGF_{2α} urinários encontram-se aumentados duas a três vezes nos indivíduos hipercolesterolémicos, comparativamente aos normolipidémicos, correlacionando-se directamente com os níveis de colesterol LDL e inversamente com o conteúdo das LDL em vitamina E⁴⁰⁶. A imunorreactividade dos 8-iso-PGF_{2α} não foi alterada pela administração, durante duas semanas, de

indobufeno ou aspirina, inibidores da cicloxigenase, apesar da completa supressão da excreção dos metabolitos do Tromboxano.

Utilizando peças de endarterectomia carotídea, foi possível identificar os 8-iso-PGF_{2α} nos monócitos e células musculares lisas no tecido aterosclerótico humano⁴⁰⁷. Comparativamente à concentração nos vasos não ateroscleróticos, veia umbilical, os isoprostanos estão presentes em maior quantidade nas lesões de aterosclerose humana (75,9±59,3 versus 11,7±6,2 pg/mg; p< 0,05)⁴⁰⁸.

Utilizando um modelo animal (cão), a excreção urinária de 8-iso-PGF_{2α} manteve-se inalterada após oclusão da artéria circunflexa, mas aumentou significativamente depois da reperfusão por trombólise⁴⁰⁹. Também os doentes com enfarte agudo do miocárdio sujeitos a terapêutica trombolítica apresentaram maiores concentrações urinárias de 8-iso-PGF_{2α}, quando comparados com os indivíduos saudáveis ou com doença coronária estável. Admite-se, presentemente, que a lesão do miocárdio por reperfusão resulta da formação de radicais livres, constituindo o aumento da concentração urinária do 8-iso-PGF_{2α} o reflexo da agressão oxidativa^{410 411}.

Os isoprostanos poderão ser utilizados igualmente, para monitorização terapêutica, como veremos quando nos debruçarmos sobre a terapêutica anti-oxidante. Dependendo das doses e dos antioxidantes utilizados, têm-se encontrado alterações mais ou menos significativas na excreção urinária do 8-iso-PGF_{2α}.

Um estudo realizado em 93 indivíduos com doença coronária e 93 controlos, procurou avaliar a capacidade preditiva dos Isoprostanos relativamente à aterosclerose coronária. Após análise multivariada, os F2-isoprostanos urinários, mostraram ser um factor preditivo da doença coronária aterosclerótica (≥ 131 pmol/mmol; p<0,001)⁴¹².

6 - Protecção anti-oxidativa

Como temos vindo a referir, os radicais livres de oxigénio, como o H₂O₂ e os ácidos gordos oxidados, estão envolvidos, muito provavelmente, na fisiopatologia da aterosclerose. Diversos trabalhos têm procurado identificar mecanismos antioxidantes existentes nos organismos vivos, particularmente nos humanos.

6.1 – Catalase

Num estudo com células musculares lisas enriquecidas em catalase, avaliou-se a resistência destas células à citotoxicidade induzida pelo H_2O_2 e pelo 13-HPODE. Os autores demonstraram que as referidas células eram resistentes aos efeitos do 13-HPODE que, ao ser degradado nos peroxisomas celulares, gera H_2O_2 , posteriormente reduzido pela catalase⁴¹³.

6.2 - Glutathiona peroxidase

A glutathiona peroxidase, tal como vimos anteriormente, é um tripéptido antioxidante que catalisa a oxidação da GSH em glutathiona oxidada (GSSG), transformando o H_2O_2 em H_2O .

Em ratos deficientes em Apo E (Apo E -/-), a ausência da glutathiona peroxidase aumentou a aterosclerose associada à diabetes, através de mecanismos pró-inflamatórios e pró-fibróticos⁴¹⁴.

Compararam-se os níveis séricos de glutathiona de 81 adolescentes do sexo masculino com história familiar de doença coronária prematura, relativamente a um grupo controlo. Para além das LDL e homocisteína elevadas e das HDL baixas, os níveis reduzidos de glutathiona estiveram significativamente associados com a história familiar positiva de doença coronária (OR 0,40; IC 95%; 0,22-0,71; $p=0,002$)⁴¹⁵. Num outro estudo, avaliaram-se os níveis plasmáticos, eritrocitários e urinários de selénio (Se), elemento integrante da enzima glutathiona peroxidase, assim como as concentrações desta enzima no plasma e nos eritrócitos de indivíduos com enfarte agudo do miocárdio (EAM). Comparativamente a um grupo controlo, os doentes apresentaram níveis inferiores de Se plasmático, eritrocitário e urinário ($63,7\pm 12$ $\mu\text{g/l}$, $0,48\pm 0,04$ /g de Hb e $49,6\pm 27,7$ $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente). Como o Se eritrocitário representa uma média da concentração do Se de várias semanas, os baixos níveis no grupo dos doentes podem traduzir a sua reduzida concentração antes do EAM, sugerindo um papel etiológico. Curiosamente, os doentes apresentaram níveis de glutathiona eritrocitária aumentados; os autores interpretam este facto, um pouco inesperado, como traduzindo uma defesa contra o stresse presente

antes do EAM, em provável relação com a aterosclerose coronária⁴¹⁶. Indivíduos com HTA e doença cardíaca apresentaram níveis de Se sanguíneos e plasmáticos significativamente inferiores ($p < 0,05$), comparativamente a um grupo controlo, levando os autores a concluir que um Se baixo pode ser considerado um factor de risco para a HTA e a doença cardíaca crónica⁴¹⁷. Também os níveis de glutathiona se encontravam reduzidos nos doentes, não se podendo excluir que estes níveis reflitam um aumento dos fenómenos oxidativos.

Sabendo-se que a doença cardio-cerebrovascular é a principal causa de morte nos doentes insuficientes renais crónicos (IRC), particularmente sob terapêuticas dialíticas, torna-se essencial analisar alguns trabalhos que avaliaram o stresse oxidativo e os mecanismos antioxidantes neste tipo de doentes. Num estudo em que se analisaram os níveis da glutathiona peroxidase e reductase e da GSH e GSSH, em 233 doentes renais crónicos, dos quais 48 sob terapêutica dialítica (diálise peritoneal), verificou-se uma perturbação nos sistemas antioxidantes, ocorrendo logo numa fase precoce da IR, sendo exacerbada pela evolução da doença e pela diálise, sugerindo que o stresse oxidativo contribui para o desenvolvimento da aterosclerose acelerada destes doentes⁴¹⁸. Também em doentes com IRC em fase pré-dialítica, analisaram-se os níveis de Se (eritrocitário, plasmático e sanguíneo), os níveis da glutathiona peroxidase (eritrocitária e plasmática), da GSH eritrocitária e a concentração do MDA eritrocitário. Encontraram-se alterações nos níveis do Se e da glutathiona peroxidase plasmáticos, compatíveis com a hipótese de que o rim tem um papel importante na homeostase do Se e da glutathiona peroxidase⁴¹⁹.

6.3 – Paroxonase (PON1)

Num trabalho que incluiu 212 homens com uma idade média de 66 anos, verificou-se que os 106 com doença da artéria carótida (estenose > 80%), apresentavam velocidades significativamente inferiores da hidrólise de dois substratos da PON1, o paroxon ($p=0,005$) e o diazoxon ($p=0,019$), relativamente aos 106 indivíduos sem doença carotídea (estenose < 15%). Os autores não encontraram qualquer efeito dependente do genótipo, a menos que a actividade da PON1 fosse igualmente considerada⁴²⁰. Também ao estudar a actividade da PON1, a sua concentração e a distribuição pelos diferentes genes, em 417

indivíduos com doença coronária comprovada por angiografia (115 mulheres; idade média 58,5 anos), comparativamente a 282 indivíduos sem doença, demonstrou-se que a actividade e a concentração da PON1 eram significativamente inferiores nos indivíduos com doença coronária (hidrólise do paroxon - 122,8 versus 214,6 nmol / min⁻¹, p<0,001; concentração - 71,6 versus 89,1 µg/ml, p<0,001); não houve diferenças na distribuição dos polimorfismos genéticos da PON1 (55 e 192)⁴²¹. Num outro estudo em 118 indivíduos, dos quais 64 do sexo feminino e com uma idade média < 45 anos, que tinham sofrido um primeiro acidente vascular cerebral isquémico, o genótipo PON 192RR mostrou-se independentemente associado com um maior risco de AVC isquémico (OR=4,1;IC95%, 1,14 a 14,73)⁴²². Sugerem os autores que, em posteriores estudos epidemiológicos sobre o papel da PON1, se inclua a determinação da actividade da enzima, para além dos polimorfismos genéticos. De salientar que o tabaco, um factor de risco cardiovascular com uma reconhecida capacidade pró-oxidante, inibe a actividade e a concentração da PON1, sendo este efeito reversível com a cessação do tabagismo⁴²³.

6.4 - Superóxido Dismutase (SOD)

Vimos, em capítulo anterior, o mecanismo através do qual a SOD se constitui num dos factores de protecção contra a peroxidação. Como se disse atrás, não existe uma enzima SOD mas várias, nomeadamente a CuZn-SOD, a Mn-SOD e a EC-SOD (extracelular); a primeira encontra-se essencialmente no citoplasma, a segunda na matriz mitocondrial e a terceira, como o nome indica, é extracelular. Como estas enzimas atravessam dificilmente as membranas celulares, exercem as suas acções protectoras essencialmente nos respectivos compartimentos. A EC-SOD contem um átomo de Cu e um de Zn, mas com uma composição em aminoácidos claramente diferente da CuZn-SOD⁴²⁴. Existe em altas concentrações na íntima da parede arterial dos mamíferos, incluindo o homem⁴²⁵. Utilizando ratos a quem faltava a EC-SOD e ratos com aumento da concentração desta enzima, todos sujeitos a uma dieta aterogénica, verificou-se que a concentração da EC-SOD vascular teve pouca influência no aparecimento das lesões de aterosclerose. Os autores concluíram que a EC-SOD e provavelmente, os radicais superóxido extracelulares não terão um papel de

relevo na aterogénese deste modelo animal⁴²⁶. Resultados semelhantes foram partilhadas por outros autores que utilizaram o mesmo modelo animal, levando-os a concluir que os seus dados não excluem a participação dos mecanismos oxidativos na aterogénese e a avançar com algumas explicações: a patogénese da aterosclerose pode seguir vias diferentes neste tipo de animal (rato Apo E nulo); a oxidação das LDL na parede arterial pode ser mediada por outros factores; por último, a produção de radicais livres de oxigénio e as defesas antioxidantes dependem de vários mecanismos que interagem de uma forma complexa, pelo que a remoção de um deles não teria uma acção clínica ou laboratorialmente relevante⁴²⁷. Em contraste com os resultados dos anteriores trabalhos e utilizando, mais uma vez, o rato deficiente em Apo E, avaliou-se a acção de uma Cu/Zn SOD sintética (M40403) na geração de superóxido vascular e na disfunção endotelial. A M40403 reduziu a produção de superóxido basal e após estimulação pela angiotensina, de um modo dependente da concentração. De igual forma, melhorou a vasodilatação dependente do endotélio, o que faz antever algum papel desta forma sintética da Cu/Zn SOD, na terapêutica das doenças vasculares⁴²⁸.

Avaliaram-se crianças com história familiar positiva de doença cardíaca coronária, sem qualquer outro factor de risco cardiovascular, comparativamente a um grupo controlo (constituído por crianças sem antecedentes familiares de doença coronária nem qualquer outro factor de risco), relativamente às actividades da catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e SOD. As crianças com história familiar apresentavam níveis significativamente inferiores de glutathione peroxidase e catalase, sem diferenças estatísticas nas actividades da glutathione reductase e da SOD⁴²⁹.

6.5 - Óxido Nítrico (NO)

O NO inibe a oxidação das LDL, através da inactivação do radical peroxil (LOO^\cdot), por uma reacção de terminação de radicais. O NO inibiu a oxidação das LDL induzida pelo Cu^{2+} e pelos macrófagos^{430 431 432}. Para além da inibição da peroxidação das LDL induzida pelas células inflamatórias, o NO também inibiu a oxidação mediada pelas células endoteliais da aorta do coelho⁴³³.

6.6 - Vitaminas antioxidantes

Antes de analisar em particular as principais vitaminas com acção antioxidante, é oportuno tecer algumas considerações. Em muitos dos ensaios clínicos, os autores agrupam as vitaminas E, C e β -caroteno, denominando-as em conjunto como antioxidantes. Isto implica considerar as diferentes vitaminas como semelhantes e esta assunção não é, muito provavelmente, verdade. A Vit E é o mais importante *scavenger* de radicais peroxil, sendo lipidossolúvel e intracelular. Embora a Vit E seja um excelente dador de electrões para os radicais livres, reduzindo-os, não é um agente redutor biológico generalizado. Em contraste, a Vit C é um cofactor essencial e um importante agente redutor biológico, sendo um dos mais importantes antioxidantes hidrossolúveis nas células, partilhando estas características com o ácido úrico e a glutathione^{434 435}. Quer a Vit E, quer a Vit C possuem um grupo aromático hidroxilo que pode actuar como um dador de electrões, enquanto que o β -caroteno é um hidrocarboneto, o que lhe confere, provavelmente, outras funções para além de antioxidante^{436 437}.

6.6.1 - Alfa-tocoferol (Vit E)

A química e biologia da Vit E têm sido intensamente estudadas nos últimos 50 anos e a maioria dos estudos demonstra, inequivocamente, que o seu principal papel biológico é a protecção antioxidativa. Desde que se reconheceu o papel da oxidação dos lípidos insaturados existentes nas LDL na patogénese da aterosclerose, que a relação entre a Vit E e a doença vascular aterosclerótica tem sido alvo de diversos estudos epidemiológicos, observacionais, prospectivos e clínicos. Apesar do enorme número desses estudos, a relação entre o alfa-tocoferol e a doença vascular continua controversa. Alguns deles demonstraram a capacidade da Vit E de inibir a oxidação das LDL. Numa revisão de seis estudos, a suplementação em Vit E aumentou a resistência à oxidação *in vitro* das LDL⁴³⁸. Também a captação das LDL pelos macrófagos foi reduzida após suplementação com alfa tocoferol⁴³⁹. A Vit E poderá limitar a progressão da aterosclerose através da estabilização da placa, prevenindo a sua ruptura e posterior trombose⁴⁴⁰. A suplementação com Vit E conduzirá a uma redução da

agregabilidade plaquetar, um efeito observado em doentes diabéticos e transplantados cardíacos^{441 442 443 444}. Numa população de doentes com acidente isquémico transitório, verificou-se uma maior redução da adesão plaquetar quando a Vit E foi associada à aspirina, relativamente aos doentes medicados apenas com o ácido acetilsalicílico⁴⁴⁵. O alfa-tocoferol também reduz a expressão de moléculas de adesão, inibindo a ligação dos leucócitos às células endoteliais e a sua posterior migração para o espaço sub-endotelial⁴⁴⁶.

O conceito da interacção entre os antioxidantes defende que mais importante do que os níveis de um determinado antioxidante é a existência de vários antioxidantes. A corroborar este conceito, utilizando modelos animais *in vitro*, demonstrou-se que a Vit C reduz o radical vitamina E (radical tocoferoxil), aumentando a eficiência do alfa-tocoferol^{447 448}.

Também em relação às doses da Vit E utilizadas nos diversos estudos a variabilidade é muita. Doses praticamente impossíveis de conseguir apenas com a alimentação, na ordem dos 100 a 800 UI/dia, têm sido utilizadas. As principais fontes naturais de alfa-tocoferol são os óleos vegetais que, na melhor das hipóteses e numa alimentação equilibrada, fornecem um máximo de 20 a 25 UI /dia. Utilizando doses de Vit E de 60, 200, 400, 800 e 1200 UI/dia, em cinco grupos de indivíduos durante oito semanas, analisou-se a resistência das LDL à oxidação, avaliada através dos TBARS, dos dienos conjugados e dos hidroperóxidos lipídicos. Os autores concluíram que a dose mínima de Vit E para inibir significativamente a susceptibilidade das LDL à oxidação foram as 400 UI/dia⁴⁴⁹.

É igualmente importante salientar que o α -tocoferol existe essencialmente nas suas formas natural e sintética; enquanto que a primeira consiste em apenas um isómero (RRR-AT), o α -tocoferol sintético é uma mistura equimolar de oito isómeros (All-Racemic AT), sendo um o RRR-AT. É com certeza importante comparar as duas formas de Vit E quanto à sua capacidade antioxidante, nomeadamente em relação às LDL. Assim, compararam-se os efeitos de diferentes doses de RRR-AT e All-Racemic AT, 100, 200, 400 e 800 UI/dia, nos níveis de α -tocoferol plasmático e das LDL e na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade. Este estudo demonstrou que, em indivíduos saudáveis, a suplementação com RRR-AT ou All-Rac-AT resultou em aumentos semelhantes na concentração do α -tocoferol no plasma e nas LDL. Também relativamente à

protecção antioxidativa, os efeitos das duas formas da Vit E foram perfeitamente equivalentes, tendo sido o limiar de eficácia, mais uma vez, as 400 UI/dia de RRR-AT ou All-Rac-AT⁴⁵⁰.

Uma possível explicação para os resultados contraditórios dos diferentes estudos com a Vit E poderá ser a falta de definição sobre o momento ideal da sua administração. Um estudo recente avaliou a biodisponibilidade do α -tocoferol em vinte Italianos, a quem foram administrados 300 mg /dia de Vit E, em jejum ou durante uma refeição. Os indivíduos a quem se administrou a vitamina durante a refeição apresentaram maiores níveis plasmáticos de Vit E, assim como uma maior capacidade de inactivação dos peróxidos lipídicos, comparativamente aos que ingeriram o suplemento vitamínico em jejum. Os autores recomendam que os suplementos de α -tocoferol, lipofílico, sejam administrados durante as refeições⁴⁵¹. Num outro estudo procurou-se determinar a relação entre o momento da administração de 800 UI de vit E e 1 G de Vit C, com alguns parâmetros da oxidação lipídica (MDA, TRAP) e da inflamação (PCR, IL-6, PAI-1). A administração das vitaminas antioxidantes antes do pequeno-almoço e antes do jantar inibiu o aumento da Proteína-C-reativa induzido pela refeição, mas apenas a administração antes do pequeno-almoço preveniu o aumento induzido do PAI-1⁴⁵².

As doses de Vit E de 400 a 800 UI são bem toleradas e seguras. Como a Vit E reduz a adesão e a agregação plaquetar, em doses iguais ou superiores a 400 UI/dia, pode verificar-se um prolongamento dos tempos de coagulação, sendo conveniente a sua monitorização nos doentes medicados com anticoagulantes⁴⁵³. A redução da adesão e da agregação plaquetar estará na dependência da incorporação do α -TOH na plaqueta e de um mecanismo dependente da proteína-C-quinase⁴⁵⁴. Provavelmente, o mecanismo subjacente à coagulopatia está relacionado com a inibição da vitamina K, dependente da carboxilase, podendo ser ultrapassada se quantidades suficientes de Vit K estiverem disponíveis^{455 456}. Infusões intravenosas de α -tocoferol foram usadas na década de 80 nos prematuros com menos de 1500 g, tendo-se verificado alguns casos de hepatotoxicidade grave, mas reversível⁴⁵⁷. Esta toxicidade hepática não se observou com as preparações orais utilizadas nas crianças com fibroplasia retrolenticular⁴⁵⁸. No *Cambridge Heart Antioxidant Study* (CHAOS), apenas 0,55% dos participantes abandonaram o estudo devido aos

efeitos adversos, tais como diarreia, dispepsia e rash cutâneo, não havendo diferenças significativas entre os grupos de tratamento activo e placebo. Como efeito adverso significativo, no braço do estudo medicado com Vit E, apenas se verificou um pequeno aumento de AVC hemorrágico⁴⁵⁹. Da revisão da literatura pode concluir-se que, nas doses inferiores a 500 UI/dia, a Vit E não é tóxica e não constitui qualquer risco significativo para a saúde humana⁴⁶⁰. Estudos no animal não encontraram para o α -tocoferol qualquer acção carcinogénica, mutagénica ou teratogénica^{461 462}.

6.6.1.1 - Estudos no animal

A eventual acção antioxidativa e anti-aterosclerótica da Vit E tem sido investigada em diversos modelos animais.

Num estudo com coelhos *Watanabe* hiperlipidémicos, a suplementação em Vit E, numa base percentual (0,5% do peso do animal), reduziu a oxidação *ex vivo* das LDL e conseguiu uma significativa redução de 32% na superfície da lesão aterosclerótica⁴⁶³.

Num estudo em macacos machos, os animais foram suplementados com 108 UI/dia de Vit E natural e monitorizados por ecodoppler carotídeo durante três anos. A alguns foi administrada a Vit E desde o início da experiência e outros foram suplementados apenas quando o exame ecográfico demonstrou o desenvolvimento de aterosclerose. O alfa-tocoferol, quando dado desde o início, reduziu significativamente a progressão das lesões de aterosclerose e a concentração plasmática da Vit E foi proporcional à resistência da artéria carótida à estenose. Os animais suplementados apenas quando se verificou o desenvolvimento das lesões carotídeas, apresentaram uma paragem na progressão e posteriormente, uma regressão das lesões⁴⁶⁴. Os autores chamam a atenção para a variabilidade dos níveis sanguíneos obtidos com a mesma dose de vitamina E, alertando para a necessidade dos estudos incluírem uma avaliação dose-resposta.

Num outro trabalho procurou-se avaliar a função endotelial em coelhos, através da capacidade de relaxamento da aorta em resposta à acetilcolina. Nos animais alimentados com colesterol verificou-se uma redução na capacidade vasodilatadora. A suplementação com 50 UI/dia de Vit E, durante 2 a 4 dias,

reduziu a oxidação das LDL plasmáticas e da parede arterial, determinado pela quantificação dos TBARS e ao fim de 6 dias de suplementação vitamínica, verificou-se uma melhoria na função endotelial⁴⁶⁵.

Em coelhos *New Zealand White* avaliou-se a disfunção endotelial provocada pela hipercolesterolemia e os efeitos da suplementação com α -tocoferol. Os animais foram alimentados com uma dieta deficiente em Vit E (<10 UI / Kg) ou suplementada com esta vitamina (1000 UI / Kg). A exposição da aorta torácica dos animais deficientes em Vit E às Ox-LDL provocou uma inibição do relaxamento induzido pela acetilcolina, enquanto que as aortas dos animais suplementados com α -tocoferol foram resistentes a esta inibição ($p < 0,05$). Os animais que consumiram dieta suplementada apresentaram concentrações de α -tocoferol nas paredes da aorta cerca de cem vezes superiores às concentrações dos animais com dieta sem Vit E, correlacionando-se estas concentrações com as respostas vasculares observadas ($p = 0,0014$). Segundo os autores do estudo, a disfunção endotelial induzida pelas OxLDL deve-se em parte à estimulação da proteína C quinase, que fosforila o isoformo da sintase do óxido nítrico, resultando numa significativa redução da sua actividade. Concluem, dizendo, que a protecção dada pelo α -tocoferol contra a acção das OxLDL, resulta da incorporação da vitamina pela parede arterial e parece depender da inibição da estimulação da proteína C quinase, pelas LDL oxidadas⁴⁶⁶.

Usando ratos deficientes em ApoE (ApoE^{-/-}), determinaram-se as concentrações urinárias, plasmáticas e tecidulares dos isoprostanos após suplementação com Vit E. Às duas semanas, relativamente aos não suplementados, os ratos que receberam Vit E, nas doses de 2000 UI/Kg, apresentaram reduções significativas nos níveis de isoprostanos urinários (879 \pm 58 versus 759 \pm 54 pg/mg creatinina; $p < 0,05$) e plasmáticos (2,04 \pm 0,2 versus 1,25 \pm 0,15 ng/ml; $p < 0,001$). Também as aortas dos primeiros apresentaram concentrações de isoprostanos significativamente inferiores, assim como menores áreas lesionais da parede arterial (4,7 \pm 2,2 versus 15,2 \pm 4,6 % da superfície aórtica; $p = 0,13$), relativamente às aortas dos animais não suplementados⁴⁶⁷. Embora os resultados deste estudo sejam interessantes e encorajadores sobre a acção da Vit E na aterosclerose, temos de salientar as altas doses utilizadas, muito superiores às preconizadas para o uso no homem.

Um outro trabalho, desta vez em hamsters, procurou avaliar se os antioxidantes podem demonstrar propriedades anti-ateroscleróticas no vivo e num pequeno animal. Os animais foram alimentados com uma dieta sem antioxidantes, enriquecida em gordura insaturada e colesterol. Após dez semanas, verificou-se uma redução dos níveis plasmáticos de α -tocoferol ($5,68 \pm 0,3$ para $1,27 \pm 0,15 \mu\text{g} / \text{ml}$) e um aumento significativo das lesões aórticas contendo *foam-cells* (indetectáveis à semana 0 para $60\ 900 \pm 5\ 400 \mu\text{m}^2 / \text{arco aórtico}$). A administração de Vit E ou de probucol suprimiu a oxidação das LDL *in vitro* e inibiu significativamente o número das *foam-cells* da parede arterial. Para valores de colesterol plasmático de $\pm 250 \text{ mg} / \text{dl}$, o α -tocoferol conseguiu uma redução das lesões vasculares de 36%; com colesterolemias desta ordem de grandeza verificou-se uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ de α -tocoferol e o tamanho da lesão vascular ($r = -0,581$; $p < 0,001$). No entanto, os efeitos destes antioxidantes nas lesões aórticas foram muito mais discretos nos animais com maiores concentrações de colesterol. Esta constatação levou os autores a aventar a hipótese dos antioxidantes serem mais eficazes quando em combinação com os hipolipemiantes⁴⁶⁸.

Um outro estudo utilizou coelhos *New Zealand White* distribuídos por três grupos, todos eles alimentados com uma dieta isocalórica contendo 0,1% de colesterol, tendo um dos grupos sido suplementado com gordura saturada, um segundo com gordura monoinsaturada e um terceiro com gordura poliinsaturada. Metade dos indivíduos de cada grupo foram suplementados com 2 500 UI/ Kg de α -tocoferol. Independentemente do tipo de gordura, os animais suplementados com Vit E, apresentaram redução da concentração do colesterol plasmático total de 31% ($p=0,017$), com uma ligeira redução do CHDL ($p=NS$). Verificou-se, igualmente, que os animais alimentados com gordura monoinsaturada apresentaram concentrações significativamente inferiores de colesterol plasmático e menos lesões de aterosclerose do que os animais alimentados com os outros tipos de gordura. Por último, os animais alimentados com gordura poliinsaturada e suplementados com Vit E, apresentaram o mesmo nível de aterosclerose que os animais alimentados com gordura monoinsaturada⁴⁶⁹.

Nem todos os estudos mostraram resultados favoráveis da suplementação com Vit E. Como se sabe, os ratos deficientes em ApoE (ApoE^{-/-}) desenvolvem espontaneamente lesões de aterosclerose nas principais

artérias. Avaliou-se o efeito dos antioxidantes na aterogénese, suplementando quinze ratos ApoE^{-/-} com α -tocoferol e β -caroteno, 500 mg de cada, durante dezasseis semanas, e comparando-os com um grupo de animais não suplementados. No fim do estudo, os ratos suplementados apresentavam níveis cinco vezes maiores de α -tocoferol do que os que não consumiram Vit E. Em relação aos níveis de β -caroteno não se verificaram diferenças, embora o seu metabolito retinil palmitato estivesse em maiores concentrações nos ratos que receberam as vitaminas antioxidantes. Quer o *lag time* para a formação dos dienos conjugados, quer as lesões de aterosclerose nas aortas dos ratos suplementados, mostraram uma discreta e insignificante melhoria relativamente ao grupo controlo ($20\,000 \pm 7\,129$ versus $13\,281 \pm 5\,861 \mu\text{m}^2$; $P=0,4$)⁴⁷⁰.

Utilizando células musculares lisas da aorta do rato procurou-se avaliar os efeitos da Vit E na proliferação celular. Os autores demonstraram que a proliferação celular foi selectivamente inibida por concentrações fisiológicas de α -TOH. É possível que a via através da qual a Vit E consegue este efeito seja prevenindo a translocação da proteína-C-quinase, com a consequente inibição da activação e fosforilação proteica⁴⁷¹.

6.6.1.2 - Estudos avaliando os biomarcadores da oxidação

Sendo os monócitos considerados peças fulcrais no desenvolvimento das lesões de aterosclerose, será pertinente a referência a um trabalho que, utilizando monócitos de homens e mulheres saudáveis, testou o efeito da suplementação com α -TOH (1200 UI/dia) sobre a libertação de radicais livres de oxigénio (superóxido e peróxido de hidrogénio), a oxidação das lipoproteínas e a libertação de citocinas potencialmente aterogénicas (IL-1 β). O α -TOH produziu uma significativa redução na produção de superóxido ($51,7 \pm 3,1\%$ e $60,8 \pm 6,3\%$ em repouso e após LPS, respectivamente; $P < 0,0001$) e de peróxido de hidrogénio ($46,1 \pm 6,7\%$ e $56,3 \pm 12,3\%$ em repouso e após LPS, respectivamente; $P < 0,0001$), assim como uma significativa redução da peroxidação de uma emulsão de lipoproteínas ($47,1 \pm 12,1\%$; $P < 0,0001$ de redução dos TBARS). A suplementação com Vit E resultou, igualmente, numa redução significativa (5 a 10 vezes) dos níveis de IL-1 β , quer nas células em repouso, quer após estimulação com LPS ($80,2 \pm 35,9$ e $76,9 \pm 40,1\%$, respectivamente; $P < 0,0001$)⁴⁷².

Diversos estudos em fumadores, suplementados com doses de 280 a 600 mg/dia, demonstraram que a vitamina E produziu uma significativa redução dos TBARS plasmáticos e urinários^{473 474 475}. Também em não-fumadores, a Vit E tem mostrado reduzir os níveis de TBARS urinários, como ficou demonstrado, entre outros, num estudo, em que se suplementaram homens, durante trinta dias com 100 mg/dia de α -tocoferol⁴⁷⁶.

Determinaram-se os níveis de MDA e dos OxLDL-Ac, em homens saudáveis, antes e depois de dez semanas de suplementação com β -caroteno (30 mg/dia) ou uma combinação de β -caroteno (30 mg/dia) e de vitamina E (400 UI/dia). Os dois suplementos reduziram os níveis de MDA plasmático, o que traduziu uma protecção antioxidativa. Em relação aos OxLDL-Ac verificou-se um aumento dos seus níveis no grupo de indivíduos suplementados com as duas vitaminas. Os autores sublinham o interesse destes resultados, pois seria de esperar que uma redução do MDA se acompanhasse de uma evolução paralela dos OxLDL-Ac⁴⁷⁷.

Analisou-se a resposta do 8-epi PGF_{2 α} urinário, em fumadores crónicos, antes e após cinco dias de terapêutica com vitamina E, nas doses de 100 UI/dia, nos fumadores moderados (15 a 30 cigarros /dia), ou após terapêutica com 800 UI/dia de Vit E, ou 2000 mg/dia de Vit C, ou uma combinação das duas, nos indivíduos que fumavam mais de 30 cigarros /dia. Apenas a Vit C (194,6 \pm 40,9 antes e 137,2 \pm 34,1 depois; P<0,05) ou a combinação desta com a Vit E (171,0 \pm 39,9 antes e 133,5 \pm 29,6 depois; P<0,05) reduziu os níveis urinários do 8-epi PGF_{2 α} ⁴⁷⁸. Num outro estudo, vinte e dois hipercolesterolémicos foram suplementados com 100 mg/dia de α -tocoferol, durante catorze dias, seguidos por igual período em que as doses da Vit E foram aumentadas para 600 mg / dia. A excreção urinária de 8-epi PGF_{2 α} foi significativamente reduzida após suplementação vitamínica (34% e 58%, com 100 e 600 mg/dia, respectivamente; P<0,001)⁴⁷⁹. Uma possível explicação para os resultados díspares destes dois estudos, pode ser o período de terapêutica excessivamente curto do primeiro trabalho.

Tal como outros indicadores da peroxidação lipídica, os níveis de etano e pentano no ar expirado estão elevados nos fumadores. Treze fumadores foram suplementados com 800 mg/dia de vitamina E, durante duas semanas e os níveis de pentano expirado foram determinados antes e depois da

suplementação. Os níveis deste gás eram significativamente ($p < 0,001$) superiores nos grandes fumadores, comparativamente aos não fumadores e a suplementação com Vit E reduziu significativamente ($p < 0,001$) o pentano expirado⁴⁸⁰.

Na grande maioria dos estudos, a Vit E tem demonstrado um efeito protector na oxidação *in vitro* das LDL. Num trabalho relativamente recente, randomizado e controlado por placebo, a suplementação com α -tocoferol, durante oito semanas, em doses de 60, 200, 400, 800 e 1200 UI/dia, foi avaliada em cinco grupos de oito indivíduos cada. A peroxidação das LDL, mediada pelo cobre, foi monitorizada através da formação dos dienos conjugados e dos TBARS. A dose mínima de Vit E necessária para reduzir significativamente a susceptibilidade das LDL à oxidação, prolongando o *lag time* ($P < 0,001$) foi de 400 UI/dia⁴⁸¹. Também num outro estudo, controlado por placebo, em que se utilizaram doses de Vit E de 500, 1000 e 1500 mg/dia, o *lag time* da oxidação das LDL foi significativamente aumentado com todas as doses de Vit E⁴⁸². Uma crítica que se faz a estes dois estudos é que, apesar de se dizerem controlados por placebo, os seus resultados não foram comparados com os do grupo sem terapêutica mas sim com os valores de base, não podendo ser considerados tecnicamente como estudos controlados por placebo!

Uma curiosa constatação é que, em determinadas circunstâncias, a vitamina E pode comportar-se como pró-oxidante; este dado foi já detectado por Stocker e confirmado posteriormente por outros investigadores. Admite-se que esta actividade pró-oxidante do α -tocoferol se manifeste quando outros antioxidantes, como a Vit C e o ubiquinol-10, não estão disponíveis para neutralizar o radical em que a Vit E se transforma. Este assunto será abordado, com maior pormenor, mais à frente^{483 484}.

6.6.1.3 - Estudos observacionais

Convém ter em atenção alguns dados importantes que poderão explicar, em alguma medida, os resultados contraditórios dos diversos estudos com a vitamina E. Os estudos epidemiológicos mais antigos baseiam-se essencialmente na Vit E alimentar, que não ultrapassa, em média, as 20 a 30 UI / dia⁴⁸⁵, mesmo na dieta Mediterrânica, enquanto que a maioria dos ensaios

clínicos utilizam suplementos na ordem das 200 UI / dia. Por outro lado, a determinação de todos os micronutrientes incluídos na dieta, alguns também com propriedades antioxidantes, é praticamente impossível⁴⁸⁶. Sabendo-se que os antioxidantes se potenciam na sua acção protectora, a ingestão alimentar simultânea de outros antioxidantes, para além da Vit E, pode explicar algumas das diferenças encontradas. Por fim, os estudos observacionais levantam hipóteses, mas não têm possibilidade de provar os mecanismos subjacentes⁴⁸⁷.

Nas 33 populações do estudo MONICA / WHO, a mortalidade por doença cardíaca era explicada em apenas 20% pelos factores de risco clássicos (colesterol, HTA, tabagismo) e assim considerou-se que outros factores estariam envolvidos. Nas 16 populações em que foram analisados, os níveis sanguíneos de RRR- α -tocoferol e a relação tocoferol / colesterol correlacionaram-se inversa e significativamente, com as taxas de mortalidade. Este estudo forneceu algumas das evidências, que suportam o papel da antioxidação na doença cardiovascular^{488 489 490}. Gey, um dos autores com mais trabalhos nesta área, chega mesmo a afirmar que, nos estudos realizados em populações Europeias, a mortalidade por doença cardiovascular se correlaciona mais fortemente com a Vit E do que com os clássicos factores de risco, como sejam o colesterol e a tensão arterial⁴⁹¹.

6.6.1.4 - Estudos caso-controlo

Na revisão de alguns destes estudos, encontraram-se em dois deles uma associação inversa e independente entre os níveis séricos de Vit E e o risco de angina pectoris (IC 95%; 1,07 a 6,7; $p=0,02$)^{492 493}. A vitamina C e o caroteno também indiciaram acções favoráveis, mas menos evidentes quando se entrou em consideração com o tabagismo.

Num grande estudo europeu, o EURAMIC, em 683 doentes com enfarte agudo do miocárdio (EAM) e em 727 controlos, determinaram-se os níveis de Vit E e de β -caroteno no tecido adiposo. Os níveis médios do β -caroteno foram 0,07 μ g/g menores nos doentes e o RR de EAM dos que apresentavam os menores valores era de 2,62 (IC 95%; 1,79 a 3,83; $p<0,0001$), não se encontrando qualquer diferença significativa para o α -tocoferol. Contudo, a Vit E parece ter potenciado a acção do β -caroteno, dado que a associação inversa

entre os níveis deste último e a incidência de EAM foi mais significativa nos valores mais altos do α -tocoferol⁴⁹⁴.

Em 50 indivíduos com angina estável, em 50 com angina instável e em 100 controlos saudáveis, foram avaliados os produtos da peroxidação lipídica e os níveis de Vit E. Os hidroperóxidos séricos no grupo dos da angina instável eram significativamente superiores relativamente aos da angina estável e aos saudáveis ($p < 0,001$). Os níveis séricos dos TBARS, de todos os indivíduos com doença coronária, foram também significativamente superiores aos dos controlos ($p < 0,02$). O conteúdo em α -tocoferol das LDL foi menor nos indivíduos com angina instável do que naqueles com angina estável ($p < 0,01$). As LDL destes últimos continham também níveis de Vit E inferiores aos dos controlos ($p < 0,01$). Os níveis de α -tocoferol plasmáticos não mostraram diferenças nos vários grupos. Os autores concluíram que poderá ser útil adicionar a Vit E aos fármacos correntemente utilizados na terapêutica da angina instável⁴⁹⁵.

6.6.1.5 - Estudos de coorte

Este tipo de estudos usa questionários alimentares que permitem calcular os níveis de ingestão de Vit E. Sendo estes inquéritos realizados antes do desenvolvimento da doença, ao contrário dos estudos retrospectivos, estão menos sujeitos a erros de selecção.

O *Nurses` Health Study*, com início em 1980, incluiu mais de 120 000 enfermeiras sem doença cardíaca nem neoplásica conhecidas, com idades compreendidas entre os 30 e os 35 anos. Mais de 80 000 mulheres responderam a um inquérito alimentar e foram seguidas durante 8 anos. Houve 552 casos de EAM não fatal e doença cardíaca fatal; 503 (91%) ocorreram nas que não tomavam suplementos de Vit E, enquanto que aquelas que afirmavam suplementar a sua dieta com α -tocoferol sofreram apenas 49 eventos cardíacos. Relativamente às que não consumiam α -tocoferol, as mulheres com maiores consumos de Vit E, apresentavam um risco relativo de doença coronária maior de 0,66 (95% IC 0,50 a 0,87; $P < 0,001$), mesmo após ajustamento para a idade e o tabagismo^{496 497 498}. As mulheres que obtiveram a Vit E apenas de fontes alimentares, apresentaram uma pequena e não significativa redução do risco relativo de doença cardiovascular, contrariamente às que utilizaram, durante dois

ou mais anos, suplementos de α -tocoferol superiores a 100 mg/dia (RR 0,57; 95% IC 0,41 a 0,78).

O *Health Professionals Follow-Up Study*, um outro estudo de grande escala, incluiu cerca de 40 000 homens de 40 a 75 anos, de uma coorte total de 51 529, sem história de cardiopatia, diabetes ou hipercolesterolemia. Também neste estudo a ingestão de Vit E apenas de fontes alimentares condicionou uma redução não significativa do risco de doença coronária ou morte cardíaca. Os homens que ingeriam maiores quantidades de α -tocoferol, através de suplementos, tinham um risco relativo de EAM fatal e não fatal de 0,77 (95% IC 0,61 a 0,98; P=0,003), sendo este efeito confinado aos que tomavam no mínimo 100 UI / dia durante, pelo menos, dois anos. Para os homens com ingestão de Vit E superior a 250 UI / dia, comparativamente aos que não utilizavam qualquer suplemento, o risco relativo de EAM não fatal, revascularização coronária, ou morte por doença cardíaca, foi de 0,59 (95% IC 0,47 a 0,75; P=0,001)⁴⁹⁹. Tanto no *Nurses` Health Study*, como no *Health Professionals Follow-Up Study*, a ingestão de vitamina C não mostrou ter qualquer efeito protector.

No EPESE (Established Population for Epidemiologic Studies of the Elderly) incluíram-se 11 178 indivíduos, com idades compreendidas entre os 67 e os 105 anos e pertencentes a quatro comunidades Norte-Americanas. Utilizaram-se dois inquéritos alimentares, separados de três anos, com um seguimento de cerca de seis anos. As pessoas definiam-se como utilizadoras de vitamina E e/ou vitamina C apenas quando referiam tomar suplementos individuais de uma ou das duas vitaminas. A suplementação com Vit E (≥ 100 UI/dia) reduziu significativamente o risco de morte por todas as causas (RR 0,66; 95% IC 0,53 a 0,83) e nos que tomavam simultaneamente suplementos das vitaminas E e C, o RR foi de 0,58 (95% IC 0,42 a 0,79). O RR de morte por doença cardíaca nos que tomavam Vit E foi de 0,53 (95% IC 0,34 a 0,84), sendo este risco ainda mais reduzido nas pessoas que declaravam consumos, durante, pelo menos, três anos. O risco de mortalidade por cancro foi reduzido mas de uma forma não significativa (RR 0,41; 95% IC 0,15 a 1,08)⁵⁰⁰.

Num estudo realizado no Quebec, uma coorte de 2313 homens foi inquirida sobre o uso de vitaminas e seguida durante cinco anos. A utilização de suplementos vitamínicos, esteve consistentemente associada a uma menor

incidência de doença cardiovascular, sendo esta relação mais significativa para a Vit E do que para qualquer outra vitamina⁵⁰¹.

Alguns estudos têm avaliado a eventual acção da vitamina E da dieta na incidência da doença cardiovascular e tumoral^{502 503}.

Encontrou-se uma forte correlação inversa entre o consumo de Vit E na dieta e o risco de doença cardiovascular em dezanove populações europeias e cinco não europeias. Uma associação inversa, mas não tão intensa, foi também encontrada para o consumo de vinho tinto. O consumo de Vit E, principalmente a partir de óleos vegetais, foi sugerido como uma possível explicação do paradoxo Francês⁵⁰⁴.

Num estudo Finlandês, em mais de 5 000 indivíduos dos dois sexos, com idades compreendidas entre os 30 e os 69 anos, seguidos durante 14 anos, observou-se uma associação inversa, estatisticamente significativa, entre a vitamina E dietética e a doença cardiovascular. O RR de morte por doença cardíaca dos indivíduos com maiores taxas de consumo de α -tocoferol, relativamente aos que o não consumiam, foi de 0,66 nos homens e de 0,35 nas mulheres⁵⁰⁵.

Num grande estudo prospectivo, o *Iowa Women`s Health Study*, que incluiu 34 486 mulheres pós-menopausicas saudáveis, com idades entre os 55 e os 69 anos, pertencentes a uma coorte de 99 826 mulheres e seguidas durante sete anos, verificou-se uma significativa associação inversa entre a ingestão diária de Vit E alimentar e a morte por doença cardíaca coronária (RR = 0.38 entre os extremos do consumo; P=0,004); os indivíduos que utilizaram suplementos de α -tocoferol não obtiveram benefícios significativos⁵⁰⁶.

Contrariamente aos estudos referidos acima, nenhuma associação significativa foi encontrada entre a Vit E de origem alimentar e a mortalidade por doença cardiovascular, durante 25 anos de follow-up de dezasseis coortes retiradas do *Seven Countries Study*, do *Nurses`Health Study* e do *Allied Health Professionals*⁵⁰⁷.

Num estudo da dieta de 747 residentes em Massachusetts de 60 ou mais anos, seguidos durante 9 a 12 anos, os indivíduos com maior ingestão de Vit C tinham um risco significativo e estatisticamente reduzido, de mortalidade total e mortalidade por causa cardíaca. O consumo de vegetais, também se correlacionou inversamente com as taxas destas mortalidades. A vitamina E e o

beta-caroteno, apresentaram igualmente uma relação favorável com os dois tipos de mortalidade mas sem atingir significado estatístico⁵⁰⁸.

Todos estes trabalhos que avaliam os níveis de Vit E de origem alimentar analisam uma variabilidade muito pequena de consumos e de níveis tecidulares, o que torna as correlações difíceis de realizar. Em alguns países, o consumo do α -tocoferol é quase uniforme através de toda a coorte e as correlações com outros factores são pouco prováveis de encontrar. Por outro lado, os níveis plasmáticos de Vit E aumentam de uma forma mais lenta do que os níveis de consumo, sendo precisos grandes aumentos na ingestão, difíceis de obter apenas através da dieta, para conseguir alterações substanciais dos níveis plasmáticos. É igualmente preciso muito cuidado na interpretação dos resultados dos estudos de coorte. Os enviesamentos são inerentes à selecção dos participantes; por exemplo, as pessoas que consomem dietas ricas em frutos e vegetais, tendem a ter um estilo de vida mais saudável e as dietas ricas em antioxidantes também são mais pobres em gorduras saturadas e colesterol. A menor incidência de doença cardíaca nestes indivíduos, poderá resultar do seu estilo de vida mais saudável e não apenas da ingestão isolada de antioxidantes. Apesar de todas estas limitações, estamos de acordo com Kushi, quando diz que os resultados destes estudos são consistentes com a teoria de que a ingestão da vitamina E, alimentar e especialmente através de suplementos, está associada a uma redução do risco de doença cardíaca coronária.

6.6.1.6 - Estudos que utilizam os níveis sanguíneos da vitamina E

Num estudo, em que se avaliaram os níveis sanguíneos da Vit E em 16 populações Europeias, verificou-se uma significativa correlação inversa entre os seus níveis e o risco de morte por DCV⁴⁹¹. No entanto, numa coorte do estudo MONICA não se encontrou qualquer correlação significativa entre os níveis da Vit E e o risco de EAM⁵⁰⁹. Num estudo Escocês, os níveis sanguíneos de Vit E apresentaram uma relação inversa com o risco de angina⁵¹⁰. No Japão, os níveis sanguíneos do α -tocoferol eram inferiores nos indivíduos com angina (29 com variante anginosa activa, 13 com variante anginosa inactiva e 32 com angina de esforço estável), comparativamente aos indivíduos saudáveis ($P < 0,05$)⁵¹¹.

Em 1974 indivíduos numa coorte de 25 802, determinaram-se os níveis sanguíneos da Vit E. A duração do estudo foi de 16 anos e o sangue foi congelado durante bastante tempo, o que pode ter originado alguma redução dos antioxidantes. Os baixos níveis de α -tocoferol associaram-se a um maior risco de EAM nos indivíduos com colesterolemias superiores a 240 mg/dl (RR 3,01; 95% IC 0,84 a 10,8)⁵¹².

Em 72 indivíduos retirados de uma coorte de 595 Indianos, com idades entre os 50 e os 84 anos, os níveis de Vit E mostraram-se inversa e independentemente relacionados com o risco de DCV, mesmo após ajustamento para a idade, hábitos tabágicos, diabetes, tensão arterial e outros factores de risco tradicionais⁵¹³.

Determinaram-se os níveis séricos de α -tocoferol e β -caroteno em 119 cidadãos Coreanos com diagnóstico angiográfico de DCV e em 249 controlos saudáveis. Apenas os níveis do β -caroteno foram significativa e estatisticamente inferiores ($P < 0,05$) nos doentes, não se verificando diferenças significativas nos níveis do α -tocoferol, quer nos homens quer nas mulheres. De salientar que a vitamina E e o β -caroteno eram exclusivamente de fonte alimentar⁵¹⁴.

Numa revisão já mencionada de Gey e col, em 12 de 16 populações Europeias avaliadas em relação aos factores de risco clássicos, não se verificaram diferenças significativas que justificassem o diferente risco de morte por DCV. Nestas populações, os indivíduos com baixa mortalidade por DCV, apresentavam valores de Vit E séricos entre 27 e 30 $\mu\text{M/L}$ e a relação ($\mu\text{M} / \text{mM}$) vitE / colesterol era de quase 5. Contrariamente, nas pessoas com maiores taxas de DCV, os níveis de α -tocoferol eram de 20 $\mu\text{M/L}$ e a relação Vit E / colesterol era de 3,5⁴⁹¹.

Citando mais uma vez F. Gey, nesta importante amostragem de populações Europeias, em que a incidência dos factores de risco clássicos era muito semelhante, as diferenças significativas na mortalidade por DCV poderão ser explicadas em cerca de 60% pelas diferenças plasmáticas nos níveis da vitamina E e em 90% pela combinação dos níveis das vitaminas E, A e C. Conclui o referido autor que, nas populações estudadas, a mortalidade por DCV está mais fortemente correlacionada com os níveis da vitamina E do que com os factores de risco clássicos, como o colesterol e a tensão arterial!

Numa subanálise do *Atherosclerosis Risk in Communities study* (ARIC), que englobou 231 indivíduos, avaliou-se a relação entre os níveis séricos das vitaminas antioxidantes e a aterosclerose carotídea assintomática, analisada por Eco-Doppler. Apenas os níveis dos carotenóides, luteína e zeaxantina, apresentaram uma relação inversa com a espessura da média e íntima arterial carotídea (EMI), relação essa de significado “borderline”, variando o RR de 0,79 (95% IC 0,64 a 1,00) a 0,77 (95% IC 0,57 a 1,03), dependendo da associação de outros factores de risco⁵¹⁵.

6.6.1.7 - Estudos com imagem arterial

No ARIC, em que se mediu a EMI carotídea a um grupo de 6 318 mulheres e 4 989 homens, com idades entre os 45 e os 64 anos, procurou-se avaliar a influência dos antioxidantes no risco de doença cardíaca. Os autores encontraram um relacionamento inverso entre a EMI carotídea dos indivíduos com idade igual ou superior a 55 anos e o consumo das vitaminas C ($p=0,019$ e $0,035$, mulheres e homens respectivamente) e E ($p=0,033$ e $0,13$, mulheres e homens respectivamente). No entanto, o estudo apresentava algumas limitações, como eram o facto de apenas 5% dos indivíduos ingerirem Vit E na forma de suplementos e não serem especificadas a dose e a duração do consumo⁵¹⁶.

Ao avaliar os níveis de Vit E séricos, ajustados para os lípidos e associada às LDL, num grupo de 64 homens com um primeiro EAM antes dos 45 anos, verificou-se que apresentavam concentrações inferiores às de 35 indivíduos sem doença coronária. Através da angiografia demonstrou-se uma correlação inversa entre o grau de estenose coronária e a concentração de Vit E associada às LDL ($P<0,001$)⁵¹⁷.

O *Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study* (CLAS) foi o primeiro estudo duplamente cego, randomizado, destinado a avaliar a evolução da aterosclerose coronária através da angiografia e realizado em indivíduos com prévia cirurgia de *by-pass* coronário. Para além da administração de fármacos hipolipemiantes (colestipol e niacina), alguns dos indivíduos ingeriam Vit E apenas de origem alimentar e outros consumiam suplementos desta vitamina. Nos indivíduos não medicados com hipolipemiantes e em que os consumos de

Vit E eram superiores a 100 UI /dia demonstrou-se uma menor progressão das lesões carotídeas, avaliadas por ecodoppler, (0,008 versus 0,023 mm/ano; $p=0,03$), não se verificando esta relação com o α -tocoferol naqueles sob terapêutica hipolipemiante⁵¹⁸.

No *Etude sur le Vieillissement Arteriel* (EVA), um estudo longitudinal envolvendo 1187 homens e mulheres, com idades compreendidas entre os 59 e os 71 anos, os níveis da Vit E nos eritrócitos mostraram-se inversamente associados com a espessura da parede arterial, com significado estatístico nos homens ($P<0,05$), mesmo após ajustamento para os factores de risco clássicos. Neste mesmo trabalho, os níveis dos carotenóides não estiveram associados a qualquer benefício⁵¹⁹.

No *Kuopio Ischemic Heart Disease Study* avaliou-se a relação entre os níveis plasmáticos da Vit E e do β -caroteno e a EMI carotídea em 212 homens com elevados níveis de CLDL. Após ajustamento para outras variáveis, verificou-se uma correlação inversa entre a progressão da estenose arterial e os níveis plasmáticos da vit E e do β -caroteno⁵²⁰.

No *Multivitamins and Probucol* (MVP) estudaram-se os efeitos de quatro tratamentos, em 317 indivíduos após angioplastia coronária, na prevenção da reestenose. Os quatro tratamentos consistiam de probucol, um complexo de 700 UI de Vit E, 500 mg de Vit C e 30 000 UI β -caroteno, uma associação do probucol com a mistura das vitaminas, ou placebo. Apenas o probucol mostrou ser eficaz na redução da reestenose ($P=0,003$), admitindo-se que, pelo menos parcialmente, através da sua acção antioxidante⁵²¹.

Um estudo com uma metodologia distinta avaliou os efeitos, a curto prazo, de uma formulação tópica de Vit E sobre a libertação de radicais livres e os fluxos cutâneos na microangiopatia diabética. Um grupo de 40 diabéticos tipo 2 de 45 a 65 anos de idade, com um bom controlo metabólico, foi medicado com uma preparação tópica de acetato de vitamina E (20%), duas vezes ao dia, aplicada numa das pernas e pé, servindo o membro contralateral como controlo; a aplicação da vit E melhorou a microcirculação cutânea (avaliada por Doppler) e reduziu a produção local de radicais livres⁵²².

6.6.1.8 - Estudos de intervenção controlados

Em 60 doentes com angina coronária espástica, com idades compreendidas entre os 41 e os 70 anos e em 60 controlos, avaliou-se a capacidade de 300 mg/dia de α -tocoferol de alterar o espasmo coronário. Antes do tratamento, os indivíduos com angina apresentavam menor vasodilatação dependente do fluxo ($3,1 \pm 1,8$ vs $7,1 \pm 2,5\%$; $p < 0,001$), menores teores plasmáticos de α -tocoferol ($8,9 \pm 1,8$ vs $10,8 \pm 1,8$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0,001$) e maiores níveis de TBARS ($6,6 \pm 1,3$ vs $4,7 \pm 1,0$ nmol/ml ; $p < 0,001$) do que os controlos. A administração de Vit E reduziu os TBARS séricos, restaurou a vasodilatação coronária ($3,1 \pm 1,8$ vs $8,3 \pm 2,0$ %; $p < 0,001$) e acompanhou-se de uma redução dos episódios anginosos⁵²³.

Num outro trabalho, randomizado e controlado por placebo, realizado em 126 indivíduos com EAM, compararam-se os efeitos da administração, durante 28 dias, de 50 000 UI/dia de Vit A, 1 g/dia de Vit C, 400 mg/dia de Vit E e 25 mg/dia de β -caroteno versus placebo. No grupo tratado com esta associação de antioxidantes verificou-se uma redução do tamanho do EAM e dos valores plasmáticos da TGO e dos TBARS⁵²⁴.

Resultados diferentes obtiveram os autores de um outro estudo em mulheres pós-menopáusicas, ao analisarem o efeito da Vit E na rigidez arterial, avaliada pela velocidade da onda de pulso. Após dez semanas de suplementação com 400 UI / dia de α -tocoferol, apesar do aumento significativo dos níveis plasmáticos no grupo das suplementadas, não se verificou qualquer alteração na rigidez arterial entre as mulheres sob terapêutica vitamínica e as que fizeram placebo⁵²⁵.

Entre 1950 e 1970, três ensaios de prevenção secundária avaliaram os efeitos da Vit E no alívio dos sintomas de claudicação intermitente. Um dos estudos, duplamente cego e controlado por placebo, realizou-se em 40 indivíduos não diabéticos, com sintomas pelo menos há 5 anos, a quem se administraram 200 mg/dia de α -tocoferol ou placebo. Os sintomas de claudicação melhoraram em 13 dos 17 doentes sob terapêutica com Vit E e em apenas 2 dos 17 que receberam placebo⁵²⁶.

Num outro estudo, em que os doentes foram divididos em três classes, A, B e C, sendo os sintomas de claudicação mais graves no grupo C, os indivíduos

foram randomizados para receber 400 mg de Vit E, 4 vezes ao dia, ou placebo. Apenas no grupo C se verificou algum impacto do α -tocoferol, com 10 dos 30 indivíduos medicados com Vit E, apresentando melhoria significativa⁵²⁷.

Também em 47 doentes do sexo masculino, com claudicação intermitente, seguidos durante 2 a 5 anos, avaliou-se a acção de 300 mg/dia de α -tocoferol, comparativamente ao placebo. Em 29 dos 32 que receberam a vitamina houve significativa melhoria na distância percorrida ($P < 0,01$), enquanto que o mesmo se verificou em apenas 3 dos 14 medicados com placebo⁵²⁸.

O ATBC foi realizado para avaliar se em grandes fumadores, a suplementação com Vit E ou β -caroteno, ou uma associação das duas vitaminas, reduziria a incidência de cancro do pulmão e de outras neoplasias. Testaram-se igualmente os efeitos da suplementação na incidência das doenças cardiovasculares, nomeadamente na claudicação intermitente e na doença coronária isquémica fatal e não fatal^{529 530}. Seleccionaram-se 26 289 homens sem claudicação intermitente. O aparecimento dos primeiros sintomas de claudicação, durante um período de quatro anos, foi considerado um *end point*. Compararam-se os efeitos de 50 mg/dia de Vit E sintética, 20 mg/dia de β -caroteno, as duas vitaminas simultaneamente ou placebo. Não se verificou qualquer efeito na prevenção do aparecimento dos primeiros sinais de isquémia dos membros inferiores com qualquer dos esquemas terapêuticos. Possíveis explicações para esta ausência de eficácia, comparativamente aos estudos anteriores, são:

- O ATBC avaliou a capacidade da vitamina E em atrasar a ocorrência dos primeiros sinais de claudicação, enquanto que os ensaios anteriores examinaram a sua acção no alívio dos sintomas de isquémia já instituída.

- Este estudo utilizou doses muito pequenas de vitamina E, para além de que todos os participantes no ATBC eram grandes fumadores, requerendo ainda maiores doses de α -tocoferol.

Neste mesmo estudo, os casos de doença coronária primária grave foram reduzidos em 4% no grupo dos medicados com Vit E e aumentaram 1% nos que receberam β -caroteno, comparativamente aos que não receberam qualquer vitamina. A vitamina E reduziu igualmente a incidência da doença coronária fatal em 8%, não tendo o β -caroteno apresentado qualquer efeito neste *endpoint* (nenhuma destas diferenças atingiu significado estatístico)⁵³¹. Por outro lado, nos

1862 homens com prévio EAM, os eventos coronários graves não foram reduzidos por qualquer das vitaminas, havendo mesmo aumento não significativo do risco de doença coronária fatal nos grupos que receberam quer o β -caroteno ou o α -tocoferol isoladamente, quer a associação das duas vitaminas. Os autores não recomendaram a utilização do β -caroteno e/ou da Vit E em grandes fumadores e com prévio EAM⁵³². Uma explicação para estes resultados inesperados, é de que o efeito antioxidante do α -tocoferol limita ou anula por completo o pré-condicionamento, ou seja, a protecção do miocárdio contra a isquémia nos curtos períodos de isquémia / reperfusão. Com efeito, nos animais, o pré-condicionamento é mediado pelas espécies reactivas de oxigénio, podendo ser inibido pelos antioxidantes.

Ainda a propósito do ATBC, uma análise sobre a prevenção da recorrência da angina pectoris, não encontrou qualquer efeito protector significativo para qualquer das vitaminas⁵³³.

O *Cambridge Heart Antioxidant Study* (CHAOS) é um estudo de prevenção secundária em doentes com doença cardíaca estabelecida. Os *endpoint(s)* primários foram a combinação de morte cardiovascular e EAM não fatal ou EAM não fatal isoladamente. Incluiu 2002 indivíduos com DCV angiograficamente comprovada, randomizados para Vit E ou placebo. Do grupo dos que fizeram Vit E, 546 receberam 800 UI/dia de α -tocoferol e os restantes 400 UI/dia. Após 510 dias de tratamento, os indivíduos sob tratamento activo evidenciaram uma redução significativa do *endpoint* combinado de morte por DCV e EAM não fatal (RR 0,53; 95% IC 0,34 a 0,83; p=0,005). Este efeito deveu-se a uma redução significativa do EAM não fatal (RR 0,32; 95% IC 0,17 a 0,59; p<0.001), com um aumento não significativo da mortalidade cardiovascular (18%)⁴⁵⁹. Em relação às mortes por DCV, uma posterior análise mostrou que 6 pertenciam ao grupo *compliant*, 21 ao grupo *non compliant* e 32 ao grupo placebo. Os autores concluíram, dizendo, que os indivíduos medicados com α -tocoferol, cerca de um quarto da população total, contribuíram com apenas 6 das 59 mortes devidas à doença cardíaca isquémica⁵³⁴.

O estudo do *Gruppo Italiano per lo Studio Della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico* (GISSI) foi também um estudo de prevenção secundária, que incluiu 11 324 doentes com passado de EAM nos últimos três meses. Os *endpoint(s)* primários foram morte, EAM não fatal ou AVC e a população do estudo foi

dividida em quatro grupos: um dos grupos recebia 300 mg/dia de Vit E sintética, outro 0,9 g /dia de uma mistura de n-3 PUFA, outro uma mistura de Vit E e n-3 PUFA e outro nenhuma terapêutica. Comparativamente ao grupo sem terapêutica, os indivíduos medicados com os n-3 PUFA ou a Vit E, viram o seu risco relativo para os endpoint(s) primários reduzido em 15% e 11% respectivamente, tendo apenas o grupo dos PUFA atingido significado estatístico ($p= 0,023$)⁵³⁵.

A discrepância de resultados entre o GISSI e o CHAOS tem sido fruto de algumas explicações, como as de Brown, um dos autores do CHAOS⁵³⁶:

- Os indivíduos do GISSI ingeriam uma dieta Mediterrânica rica em antioxidantes, enquanto no CHAOS os participantes alimentavam-se de uma dieta Inglesa, pobre em frutos e vegetais.

- Cerca de 50% dos indivíduos do GISSI estavam medicados com estatinas.

- Nos participantes do CHAOS há uma maior frequência do polimorfismo do gene da sintase do óxido nítrico, que se associa a disfunção endotelial; como um dos mecanismos protectores da Vit E poderá ser a melhoria da resposta vascular dependente do endotélio / óxido nítrico, este facto poderá explicar, parcialmente, as diferenças encontradas.

- Também o facto de no CHAOS ter sido utilizada Vit E natural, nas doses de 400 a 800 UI e no GISSI se administrarem apenas 300 mg de Vit E sintética pode ter contribuído para os diferentes resultados.

O *Linxian China* é um estudo de prevenção primária que avaliou o efeito de quatro combinações de micronutrientes sobre a mortalidade total e a mortalidade por cancro. Englobou 29 584 pessoas de 40 a 69 anos, residentes em Linxian, China. Os participantes foram randomizados para receber placebo, ou retinol e zinco, ou riboflavina e niacina, ou Vit C e molibdeno, ou Vit E sintética (30 UI), β -caroteno (15 mg) e selénio (50 μ g). Esta região da China tem uma das mais altas taxas de cancro do esófago e estômago e uma dieta pobre em diversos micronutrientes. Dos quatro regimes vitamínicos testados, só a combinação das vitaminas E, β -caroteno e selénio apresentou redução significativa da mortalidade total de 9% (RR 0,91; IC 95% 0,84 a 0,99) principalmente devida a uma redução de 13% na incidência de cancro (RR 0,87; IC 95% 0,75 a 1,00); este efeito começou a ser evidente ao fim de 1 a 2 anos de

suplementação. Houve igualmente uma redução não significativa na mortalidade cerebrovascular (RR 0,90; IC 95% 0,76 a 1,07), sendo de referir que a dose de Vit E sintética foi apenas de 30 UI⁵³⁷.

O *Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention study* (ASAP) é um estudo em que se procurou avaliar a eficácia das vitaminas E e C na progressão da aterosclerose carotídea, avaliada através da EMI por ecodoppler, em indivíduos dos dois sexos (mulheres pós-menopáusicas), hipercolesterolémicos (CT igual ou superior a 5 mmol /L), alguns deles fumadores. Formaram-se quatro grupos; um, de indivíduos que receberam placebo, outro dos que foram medicados com Vit E, um terceiro em que receberam Vit C e um quarto em que os participantes receberam uma associação das duas vitaminas. As doses utilizadas foram 272 UI /dia de Vit E e 500 mg /dia de Vit C. Ao fim de três anos, comparados com o grupo placebo, só o grupo suplementado com a combinação das duas vitaminas apresentou uma redução da progressão da aterosclerose carotídea, particularmente nos homens fumadores, embora estes resultados se possam verificar mesmo nos homens não fumadores (0,018 e 0,011 mm/ano, respectivamente; $p=0,008$). Este efeito protector não se verificou nas mulheres. O maior efeito verificado nos homens fumadores, pode ter sido devido ao facto de estes indivíduos apresentarem níveis basais de α -tocoferol e β -caroteno substancialmente inferiores, podendo assim beneficiar mais da suplementação. Por outro lado, o facto das mulheres apresentarem maiores níveis de vitaminas C e E e menores espessuras da média e íntima carotídeas, no início do estudo, explicarão, em parte, a ausência de efeito da suplementação vitamínica⁵³⁸.

Recentemente, no *Heart Outcomes Prevention Evaluation Study* (HOPE), incluíram-se 2545 mulheres e 6996 homens, com 55 ou mais anos de idade e um alto risco de doença cardiovascular (DCV prévia ou diabetes, para além de um outro factor de risco). Os indivíduos foram randomizados para receber 400 UI/dia de Vit E ou placebo e ramipril ou placebo. O *endpoint* primário foi um composto de EAM, AVC e morte por causas cardiovasculares. Ao fim dos 4,5 anos de seguimento médio, não houve diferença significativa no número de mortes cardiovasculares, entre o grupo que esteve medicado com Vit E e o grupo placebo⁵³⁹. Numa subanálise deste estudo, avaliaram-se os efeitos do ramipril e da Vit E na aterosclerose carotídea, através de ecodoppler. Enquanto

que o ramipril manifestou um efeito benéfico na progressão da aterosclerose, a vitamina E não teve qualquer acção⁵⁴⁰.

Um outro estudo avaliou a protecção cardiovascular da sinvastatina mais niacina, das vitaminas C e E, nas doses de 1000 mg/dia e 800 UI/dia respectivamente, da sinvastatina/niacina mais Vit C e E ou placebo, em 160 indivíduos dos dois sexos, com doença coronária, baixos níveis de colesterol HDL e colesterol LDL normal. O grupo medicado com sinvastatina/niacina apresentou um aumento do colesterol HDL₂, tendo sido este efeito atenuado no grupo sob a terapêutica combinada com sinvastatina/niacina e vit C e E. Verificou-se uma regressão da estenose coronária (0,4%; $p < 0,001$) e uma redução significativa da DCV (morte, EAM, AVC ou revascularização) nos doentes medicados apenas com os fármacos hipolipemiantes ($p = 0,03$). A associação das vitaminas C e E à sinvastatina/niacina atenuou significativamente os efeitos benéficos destes fármacos, em termos de avaliação angiográfica e aumentou, sem significado estatístico, o risco de DCV. Estes efeitos inesperados das vitaminas antioxidantes, poderão ser explicados pela acção a nível do CHDL₂, aumentado significativamente pelos hipolipemiantes em 65% ($p < 0,001$), sendo este aumento atenuado pela associação dos antioxidantes (28%; $p = 0,02$)⁵⁴¹.

Num outro estudo, avaliou-se a alteração das lipoproteínas em 153 doentes coronários e com baixo CHDL, randomizados para sinvastatina+niacina (10 a 20 mg /dia e 1g/dia, respectivamente), ou antioxidantes, vitaminas E (400 UI 2id), C (500 mg 2id), β -caroteno (12,5 mg 2 id) e selénio (50 μ g 2id), ou sinvastatina+niacina+antioxidantes, ou placebo. Quer o grupo dos hipolipemiantes, quer o da associação hipolipemiantes/antioxidantes, apresentaram significativas reduções do colesterol total, dos triglicéridos e do CLDL ($p < 0,001$). Em relação ao CHDL, especialmente o HDL₂, o aumento induzido pelos hipolipemiantes foi significativamente superior ao da terapêutica combinada com os antioxidantes (42 versus 0%; $p < 0,001$). Também no primeiro grupo se verificou um aumento selectivo das Lp(A-I). Esta acção das vitaminas antioxidantes poderá dever-se ao facto de induzirem um aumento do colesterol VLDL, dos triglicéridos e da actividade da proteína de transferência dos ésteres de colesterol^{542 543}. Por outro lado, como a Vit E é transportada pelas lipoproteínas, nomeadamente pelas HDL, pode interferir com o transporte

reverso do colesterol, resultando numa redução da semivida plasmática das HDL⁵⁴⁴.

A vitamina E tem sido também avaliada em grupos específicos de doentes, como é o caso dos doentes insuficientes renais crónicos (IRC). A doença cardiovascular aterosclerótica é a causa mais comum de morbi e mortalidade nestes doentes. O stresse oxidativo tem sido responsabilizado pelo aumento da DCV nos IRC em diálise. Algumas evidências suportam esta afirmação: a activação dos leucócitos pelas membranas de diálise; a depleção de antioxidantes, tais como o ácido ascórbico, a vitamina E, a glutathione, a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase; o aumento dos níveis do MDA sérico e dos glóbulos vermelhos, das plaquetas e das células mononucleares; o aumento da oxidação das VLDL e das LDL e o aumento dos títulos dos OxLDL-Ac dos indivíduos em hemodiálise^{545 546 547 548 549 550 551 552 553}.

Num estudo realizado em doentes IRC em terapêutica dialítica, 16 em hemodiálise e 17 em diálise peritoneal, avaliaram-se os efeitos de 800 UI/dia de Vit E na susceptibilidade oxidativa das LDL. Os autores demonstraram que a suplementação vitamínica durante doze semanas aumentou significativamente os níveis do α -tocoferol plasmático ($p < 0,001$) e associado às LDL ($p < 0,003$), verificando-se igualmente um significativo prolongamento do *lag time* na produção dos dienos conjugados, quando as LDL foram oxidadas pelo cobre ($p < 0,02$)⁵⁵⁴.

Também na medicina desportiva têm sido avaliados os efeitos da suplementação com vitamina E. Diversos estudos demonstraram que o exercício físico, particularmente o chamado “endurance”, pode promover a formação de radicais livres e um aumento dos fenómenos peroxidativos. Um artigo de revisão publicado no *Sports Medicine* faz uma análise de diversos estudos em que se utilizaram suplementos de Vit E em diversas modalidades desportivas⁵⁵⁵. Em atletas universitários verificou-se uma significativa redução do pentano expirado, após suplementação com 1200 UI/dia de α -tocoferol, durante duas semanas⁵⁵⁶. Num outro estudo, realizado em ciclistas, verificou-se que os níveis de TBARS se encontravam aumentados no fim duma corrida e que a suplementação com 300 mg/dia, durante quatro semanas, reduzia significativamente os níveis dos TBARS em repouso e após exercício⁵⁵⁷. No entanto, têm surgido algumas contradições nos resultados dos estudos que avaliam o efeito do exercício nos

níveis de peroxidação. Por exemplo, num estudo em que se avaliaram os níveis de peroxidação, após um exercício exaustivo em ciclistas treinados, os autores não encontraram qualquer alteração dos TBARS-MDA⁵⁵⁸. Também num outro trabalho, desta vez em corredores da maratona, verificou-se uma redução dos níveis de TBARS-MDA depois da corrida⁵⁵⁹. Uma possível explicação para estes resultados discordantes é que alguns dos estudos não terão em consideração as alterações do volume plasmático; a hemoconcentração pode provocar um aumento das concentrações depois do exercício intenso.

Da revisão da maioria dos estudos conclui-se que, em indivíduos treinados, os sistemas antioxidantes são estimulados pelo exercício⁵⁶⁰, verificando-se a activação das enzimas antioxidantes, a mobilização da Vit E e o aumento da excreção dos peróxidos lipídicos pela urina, protegendo o organismo da lesão oxidativa. Por outro lado, o exercício intenso em pessoas não treinadas ou mal nutridas, pode causar lesão oxidativa, devido aos insuficientemente preparados sistemas antioxidantes. Para a maioria dos autores, a administração de 100 mg/dia de α -tocoferol poderá ser benéfica nos atletas de alta competição, para prevenir os fenómenos oxidativos que acompanham o exercício violento; nos atletas de “fim-de-semana” ou não treinados, doses superiores, na ordem dos 200 mg/dia, poderão ser mais eficazes^{561 562}.

A disfunção do endotélio está associada à hipercolesterolemia, ao tabagismo e ao envelhecimento. Num estudo clínico avaliaram-se os efeitos da suplementação com 1000 UI/dia de Vit E na disfunção endotelial, avaliada através da vasodilatação induzida pelo fluxo, utilizando para o efeito uma grande artéria de voluntários saudáveis com perturbação da vasomotricidade. Os autores não encontraram qualquer acção benéfica a nível do endotélio, admitindo, no entanto, que esses resultados não excluía uma acção benéfica da Vit E a nível da doença vascular⁵⁶³. Alguns estudos clínicos, em oposição ao anterior, têm demonstrado um aumento da vasodilatação, dependente do endotélio, na sequência da administração do α -tocoferol a indivíduos com elevado risco coronário^{564 565 566 567}.

No animal, a Vit E tem demonstrado efeitos benéficos a nível endotelial. A suplementação de coelhos com α -tocoferol, para além de aumentar a resistência das LDL à oxidação, induziu um relaxamento da aorta torácica⁵⁶⁸. Em contraste com este último resultado, a utilização de doses supra-fisiológicas de α -tocoferol,

inibiu o relaxamento aórtico e estimulou a proliferação da íntima⁵⁶⁹. Estes efeitos anti-NO podem estar na dependência das acções pró-oxidantes da Vit E, que serão abordadas mais adiante.

6.6.1.9 - Vitamina E e Tabaco

O Tabagismo é um factor de risco major para uma variedade de doenças humanas, tais como as doenças cardiovasculares, as doenças pulmonares obstrutivas crónicas e as neoplasias, das quais a do pulmão é a mais frequente. Alguns estudos, sugerem que dietas ricas em vegetais e frutos podem reduzir o risco de neoplasias e de doenças cardiovasculares, atenuando o desenvolvimento da aterosclerose⁵⁷⁰.

Um estudo sobre a prevalência e a extensão da aterosclerose nos fumadores e não fumadores, vítimas de trauma, mostrou que os primeiros têm duas vezes mais, lesões avançadas, do que os não fumadores⁵⁷¹. De acordo com a teoria da modificação oxidativa das LDL, grande parte dos estudos demonstraram que as LDL dos fumadores são mais susceptíveis à oxidação⁵⁷². Um trabalho demonstrou que, a exposição do plasma ao fumo do tabaco, provocou a depleção dos antioxidantes, incluindo o ácido ascórbico, o ácido úrico, o ubiquinol-10, o α -tocoferol e o β -caroteno, e induziu a peroxidação lipídica, demonstrada pela formação dos hidroperóxidos⁵⁷³.

A suplementação com Vit E na dose de 800 mg/dia, durante duas semanas, em fumadores saudáveis, induziu uma redução na concentração do gaz pentano do ar expirado e um aumento na concentração da glutathione peroxidase plasmática. Os autores concluíram que, em concentrações plasmáticas, conseguidas com a dieta comum, a Vit E não previne o aumento da peroxidação lipídica induzida pelo tabaco, mas que doses farmacológicas desta vitamina inibem significativamente os fenómenos oxidativos nos fumadores⁵⁷⁴.

Utilizando a cromatografia gasosa determinou-se o etano expirado em fumadores e não fumadores, imediatamente após fumar e posteriormente, a intervalos de uma hora. A concentração deste gaz apresentou uma curva ascendente, imediatamente após o acto de fumar e um declínio até aos níveis basais após três horas, nos fumadores, e uma hora, nos não-fumadores. Compararam-se as concentrações do etano no ar expirado, de fumadores e de

não fumadores saudáveis, três horas depois do último cigarro, tendo sido encontrados valores significativamente mais elevadas nos primeiros (2,90 +/- 0,52 versus 1,11 +/- 0,26 pmol/min/Kg; $p < 0,05$)⁵⁷⁵. Também em relação a este marcador da peroxidação lipídica, diversos trabalhos procuraram avaliar o efeito da suplementação com a vitamina E, isoladamente ou em associação com outros antioxidantes. Um estudo em dez fumadores, publicado no CHEST, demonstrou que a combinação de 6 mg de β -caroteno, 200 UI de Vit E e 250 mg de Vit C, quatro vezes ao dia, durante três semanas, resultou numa redução da peroxidação lipídica avaliada através do etano expirado (4,06 +/-1,49 versus 2,90 +/-1,29 pmol/min/Kg; $p < 0,05$)⁵⁷⁶. Um outro estudo demonstrou que, ao contrário da combinação das vitaminas C, E e β -caroteno, a Vit E sozinha não reduziu significativamente o etano expirado em fumadores⁵⁷⁷.

Comparou-se a excreção urinária de 8-epi-PGF_{2 α} em indivíduos fumadores e não fumadores, após suplementação com Vit E (100 a 800 UI/dia) ou Vit C (2 G/dia), ou a sua combinação, durante cinco dias. A administração da Vit C e da combinação de 800 UI de Vit E com Vit C induziram uma significativa redução na excreção urinária de 8-epi-PGF_{2 α} , (pré 194,6 +/- 40,9; pós 137,2 +/- 34,1; $p < 0,05$ e pré 171,0 +/- 39,8; pós 133 +/- 29,6 pmol/mmol; $p < 0,05$, respectivamente) o mesmo não se verificando com a administração isolada de qualquer dose da Vit E⁵⁷⁸. Resultados semelhantes foram obtidos, num outro estudo, relativamente à falta de capacidade da Vit E, em doses até 1200 mg /dia, em reduzir a excreção urinária de 8-epi-PGF_{2 α} . Os autores avançam três possíveis explicações para estes resultados: um tamanho inadequado da amostra, o não cumprimento da medicação e a falta de especificidade dos métodos analíticos utilizados. Relativamente à primeira hipótese, de facto a detecção de uma pequena alteração na excreção dos 8-epi-PGF_{2 α} pode requerer uma amostra com maior número de indivíduos; o não cumprimento da terapêutica é pouco provável, dado o aumento uniforme verificado nos níveis da Vit E (20,6 +/- 4,9 e 42,3 +/-11,2 μ mol/L; $p < 0,001$); também a utilização da excreção dos 8-epi-PGF_{2 α} tem sido validada em numerosos estudos. Talvez que a explicação mais provável seja a de que a suplementação com Vit E só terá benefícios significativos, quando existem de base, altos índices de peroxidação lipídica e baixos teores de Vit E. Apesar de um aumento dos fenómenos

oxidativos nos fumadores moderados, este aumento poderá não ser suficiente para que a acção do α -tocoferol seja significativa⁵⁷⁹.

Um outro estudo comparou, com um grupo controlo, a acção da Vit E sobre os fenómenos oxidativos e inflamatórios existentes em indivíduos diabéticos e em fumadores. Curiosamente, as esperadas altas concentrações dos TBARS nos diabéticos e nos fumadores não se acompanharam de um aumento da susceptibilidade à oxidação *in vitro* das LDL, o que fez os autores admitir uma ausência de correspondência entre este parâmetro e os fenómenos peroxidativos *in vivo*. Para além dos TBARS, também os níveis da *IL-1 receptor antagonist* (IL-1RA) estavam aumentados nos diabéticos e nos fumadores, comparativamente aos indivíduos do grupo controlo. A suplementação com 600 UI/dia de α -tocoferol conduziu a uma significativa redução dos TBARS nos diabéticos (0,77 +/- 0,22 e 0,63 +/- 0,21; $p < 0,01$) e nos fumadores (0,74 +/- 0,14 e 0,56 +/- 0,15; $p < 0,05$). Em relação aos níveis da IL-1RA, apenas nos fumadores se verificou uma correcção após suplementação com Vit E (0,16 +/- 0,08; $p < 0,05$ *versus* grupo controlo). Nos diabéticos, não houve normalização deste parâmetro inflamatório, o que poderá ser atribuído a uma permanente estimulação inflamatória, na provável dependência da hiperglicemia⁵⁸⁰. Ainda em relação aos mecanismos anti-inflamatórios da Vit E, incubaram-se células endoteliais (CE) humanas com CLDL e procurou-se investigar o efeito do α -tocoferol na expressão de moléculas de adesão e na adesão dos monócitos. A Vit E mostrou ter um efeito inibitório na expressão das moléculas de adesão e na adesão celular às células endoteliais induzida pelas LDL ($p < 0,05$). Esta acção pode ter sido exercida através da sua acção antioxidativa ou por regulação directa da expressão da ICAM-1⁵⁸¹.

6.6.2 - Vitamina C (ácido ascórbico ou ascorbato)

A vitamina C é o antioxidante predominante no plasma. É uma vitamina hidrossolúvel, capaz de remover os radicais livres do plasma, protegendo as LDL da oxidação e é capaz de regenerar a vitamina E quando esta se transforma em radical⁵⁸². As principais fontes de vitamina C na dieta são os citrinos, os morangos, o melão, os tomates, a couve e os vegetais verdes. Embora em menor número do que com a Vit E, existem vários estudos em que a Vit C,

isoladamente ou em associação, foi avaliada em termos de capacidade antioxidativa e/ou de protecção da doença vascular.

Estudos *in vitro* apontam para a capacidade do ascorbato de inibir a oxidação das LDL pelas células vasculares e neutrófilos, assim como em sistemas acelulares^{583 584 585 586}. O ácido ascórbico protege as LDL da oxidação essencialmente por inactivação dos radicais livres no meio aquoso⁵⁸⁷. Os radicais ascorbato, formados nestas reacções, são reduzidos de novo em ascorbato por dismutação, redução química (glutathione), ou redução enzimática (reductase da tioredoxina). Como se disse atrás, o ascorbato pode impedir também a actividade pró-oxidante da Vit E, reduzindo o radical α -tocoferoxil em α -tocoferol, actuando como co-antioxidante^{588 589}.

A Vit C foi já avaliada em relação à disfunção endotelial. Na dose única de 2 g, a vitamina C melhorou a vasorreatividade arterial em fumadores crónicos (N=10; $p < 0,05$), em doentes com hipercolesterolemia (N=11; $p = 0,001$) e com doença coronária (N=23; $p = 0,003$)^{590 591 592}. Os mecanismos pelos quais esta vitamina protege o óxido nítrico (NO) e a função vasomotora do endotélio, são vários. Por um lado, ao reduzir os radicais superóxido e as OxLDL, impede que estas espécies inactivem o NO. Devido ao baixo ritmo de reacção entre a Vit C e o superóxido, ela deverá ser administrada em altas doses para competir com este radical na sua ligação ao NO⁵⁹³. O ascorbato pode manter a vasodilatação dependente do endotélio poupando os tióis intracelulares, substâncias com capacidade de estabilizar o óxido nítrico^{594 595}. Um outro mecanismo poderá estar na dependência de um aumento da síntese e actividade biológica do NO, nas células endoteliais, pelo aumento da tetrahydrobiopterina intracelular⁵⁹⁶.

Diversos estudos confirmaram a relação entre o incremento do stresse oxidativo vascular, a inactivação do NO e a perda da capacidade vasodilatadora existente nos doentes com insuficiência cardíaca congestiva. Para este efeito, poderão contribuir os níveis alterados das enzimas vasculares SOD e xantina-oxidase, que se encontram, respectivamente, reduzidos e aumentados^{597 598}.

Em 55 doentes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC), isquémica e não isquémica, procurou-se avaliar o papel do stresse oxidativo na disfunção endotelial que a acompanha, a produção de superóxido pelos polimorfonucleares neutrófilos e os efeitos antioxidantes da Vit C⁵⁹⁹. Os autores concluíram que os radicais livres e os TBARS estavam significativamente aumentados na ICC,

isquémica e não isquémica ($p < 0,01$ e $< 0,005$, respectivamente), encontrando-se igualmente aumentada a produção de radicais livres pelos neutrófilos ($p < 0,005$). A Vit C reduziu a concentração dos radicais livres e os TBARS ($p < 0,05$), a produção do superóxido pelos neutrófilos ($p < 0,05$) e melhorou a dilatação induzida pelo fluxo ($p < 0,05$).

Num outro estudo administrou-se a Vit C em perfusão endovenosa única (25 mg / min) e oralmente durante quatro semanas (2 g/dia). Através das duas vias, a Vit C aumentou a disponibilidade do NO e restaurou a vasodilatação mediada pelo fluxo, endotélio dependente, em quinze indivíduos com ICC ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente)⁶⁰⁰.

Estes efeitos benéficos sobre o endotélio foram confirmados por outros estudos realizados em doentes com ICC e miocardiopatia dilatada^{601 602}, em indivíduos com claudicação intermitente⁶⁰³ e em transplantados renais⁶⁰⁴.

A suplementação com Vit C, tem demonstrado outros importantes efeitos em trabalhos experimentais, como a melhoria da sensibilidade dos baroreceptores em pacientes com ICC, nas doses de 4 g/dia durante quatro semanas⁶⁰⁵ e na prevenção da vasoconstrição induzida pela hiperóxia⁶⁰⁶ e da disfunção endotelial da diabetes⁶⁰⁷.

Na ICC, o aumento da inflamação sistémica e do stresse oxidativo, associam-se à disfunção endotelial e a um incremento da apoptose das células endoteliais. O tratamento com Vit C inibiu a apoptose das células endoteliais *in vivo* em 34 doentes dos dois sexos, com ICC, contribuindo para a preservação da função vasomotora endotelial ($p < 0,005$)⁶⁰⁸.

Embora múltiplos trabalhos tenham demonstrado o interesse dos radicais livres e dos antioxidantes na ICC, pouco se sabe sobre a sua função na regulação da fisiologia cardíaca. Em 10 indivíduos com função ventricular esquerda normal, avaliou-se a resposta à dobutamina, antes e depois de uma infusão intracoronária de Vit C. Em concentrações intracoronárias de 1 a 10 mmol/L, a Vit C não teve qualquer efeito sobre a função contráctil basal, mas potenciou a resposta inotrópica positiva à dobutamina em $22 \pm 4\%$ ($p < 0,01$). Embora se tratassem de indivíduos sem ICC, a maioria apresentava doença coronária, HTA ou diabetes, condições associadas com o stresse oxidativo, sendo assim possível que o ascorbato tenha melhorado a resposta do fluxo sanguíneo coronário à estimulação β -adrenérgica⁶⁰⁹.

A doença arterial coronária (DAC) acompanha-se de um aumento do stresse oxidativo vascular arterial e da disfunção endotelial, podendo esta contribuir para as suas manifestações clínicas. Em 281 doentes coronários, determinaram-se, por pletismografia, a vasodilatação dependente e independente do endotélio. Os 91 doentes que sofreram novos acidentes coronários, comparados com os restantes, tinham menor resposta vasodilatadora à acetilcolina ($p < 0,001$) e ao nitroprussiato de sódio ($p < 0,05$), mas beneficiaram mais da perfusão de Vit C, a 24 mg/min ($p < 0,01$). Concluiu-se que, a atenuada vasodilatação pela acetilcolina ($p = 0,001$), o efeito da Vit C ($p = 0,001$) e a idade ($p = 0,016$), se comportaram como predictores independentes de futuros eventos cardiovasculares⁶¹⁰, tendo sido igualmente demonstrado por outros autores o efeito endotelial benéfico da vit C na DAC⁶¹¹.

O enfarte agudo do miocárdio (EAM) caracteriza-se por altos índices de stresse oxidativo⁶¹² e pela presença de micropartículas procoagulantes circulantes, com origem nas células endoteliais e plaquetas, possuindo grande potencial pró-trombótico e pró-inflamatório. Em 61 doentes com EAM, alguns dos quais recebendo, para além da terapêutica convencional, 1 g/dia de Vit C, durante cinco dias, verificou-se nestes últimos uma redução superior a 10% ($p = 0,01$) das micropartículas procoagulantes, tendo essa redução atingido valores de 70% nos indivíduos com diabetes e dislipidemia⁶¹³.

Num dos primeiros estudos prospectivos desenhados para avaliar a relação entre diversos nutrientes e a DCV, o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), que incluiu 11 349 homens e mulheres, demonstrou-se uma associação inversa entre a suplementação com 50 mg / dia de Vit C, pelo menos, e o risco de mortalidade por DCV (RR de 0,58; 95% IC 0,41 a 0,78 e RR de 0,75; 95% IC 0,55 a 0,99, nos homens e mulheres, respectivamente)⁶¹⁴. No entanto, o benefício encontrado poderá ter estado na dependência da presença concomitante de Vit E, de folato e/ou de outros micronutrientes nas preparações multivitamínicas utilizadas. Num outro estudo prospectivo, o *Health Professionals Follow-up study*, que incluiu 39 910 homens, verificou-se um RR de 0,83 (95% IC 0,64 a 1,08; $p = 0,15$) para a doença cardíaca coronária, entre os que receberam os mais altos suplementos de Vit C (média de 1162 mg/dia), comparativamente aos que receberam menores doses da vitamina (média de 92 mg/dia). Contudo, após ajustamento para a ingestão de outros

antioxidantes (carotenóides e Vit E), o RR foi substancialmente alterado, tornando-se discreta mas positivamente associado com o risco de doença coronária RR 1,25 (95% IC 0,91 a 1,71; $p=0,98$)⁴⁹⁹. No *Iowa postmenopausal women*, estudo prospectivo que englobou 34 486 mulheres, durante 7 anos, a suplementação com Vit C não reduziu o risco de morte por doença coronária⁶¹⁵.

No *Kuopio Heart Study*, quando comparados com os que apresentavam níveis normais e após ajustamento para os factores de risco clássicos, os homens com baixos níveis de Vit C ($<11,4 \mu\text{mol/l}$) apresentaram um RR de EAM de 2,5 (1,3 a 5,2; $p=0,0095$)⁶¹⁶.

Como já foi referido atrás, o *Linxian study*, realizado na China e que incluiu mais de 29 000 pessoas, distribuiu os participantes no estudo em diferentes grupos, suplementados com diferentes combinações de micronutrientes. Os indivíduos que receberam uma associação de VitC e molibdénio, nas doses de 125 mg/dia e 30 mg/dia, respectivamente, evidenciaram uma redução, embora não significativa, das mortalidades cerebrovascular e total⁶¹⁷.

Também a potencial capacidade da ingestão de Vit C, de alterar o curso da doença aterosclerótica, tem sido avaliada com a utilização da ecotomografia e da angiografia. Num estudo, que incluiu homens e mulheres com mais de 55 anos, verificou-se que os indivíduos com menor ingestão de Vit C apresentavam uma espessura da parede arterial carotídea significativamente maior do que aqueles que consumiam maiores quantidades da referida vitamina ($p= 0,019$ e $0,035$ nas mulheres e nos homens, respectivamente)⁶¹⁸.

Num estudo de dois anos, realizado em 156 homens com prévia cirurgia coronária, uma maior ingestão alimentar ou suplementar de Vit C não alterou a evolução da aterosclerose coronária avaliada angiograficamente⁶¹⁹.

Em 40 doentes transplantados cardíacos a utilização de 500 mg de Vit C associados a 400 UI de Vit E, em duas administrações diárias durante um ano, atrasou significativamente ($p=0,008$) a progressão da aterosclerose coronária⁶²⁰.

Da revisão bibliográfica realizada, conclui-se que os grandes estudos controlados demonstraram que a evidência de um eventual efeito cardioprotector da Vit C, é fraca e inconsistente. Em alguns estudos em que a Vit C esteve inversamente associada à DCV, esta relação poderá ter estado na dependência de outros factores associados à alta ingestão da vitamina.

Em relação aos efeitos secundários, diversos mecanismos fisiológicos controlando a absorção do ácido ascórbico, as suas concentrações nos tecidos, o seu metabolismo e a eliminação renal, tornam pouco provável uma intoxicação com a Vit C. O receio da formação de cálculos urinários de oxalato não tem fundamento, pois o homem, em contraste com alguns animais, não metaboliza o ascorbato em dióxido de carbono. Comprova-se, assim, que a ingestão oral de grandes quantidades de Vit C é segura e sem significativa iatrogenia⁶²¹.

6.6.3 - Carotenóides

Mais de 600 compostos carotenóides foram já identificados, dos quais cerca de 40 existem em certos alimentos. O β -caroteno, o α -caroteno, o licopeno, a β -criptoxantina, a luteína e a zeaxantina são os compostos carotenóides mais abundantes.

O β -caroteno é um potente antioxidante e integra as LDL. Encontra-se na alga *Dunaliella* sob vários isómeros (cis e trans) e com diferentes propriedades biológicas.

De acordo com diversos estudos epidemiológicos segundo os quais as populações que consomem grandes quantidades de β -caroteno e de outros antioxidantes naturais (dieta Mediterrânica rica em fruta fresca e vegetais) apresentavam menor incidência de aterosclerose, diversos trabalhos demonstraram que uma mistura natural de β -caroteno se associou com menores concentrações de produtos de oxidação plasmáticos, podendo conferir alguma protecção contra a oxidação das LDL^{622 623 624}.

Dada a importância da aterosclerose na morbi-mortalidade da diabetes, determinou-se a susceptibilidade oxidativa das LDL e o efeito do β -caroteno natural, em indivíduos com diabetes não insulino-dependente. Demonstrou-se que as LDL dos diabéticos eram significativamente mais susceptíveis à oxidação do que as dos não-diabéticos ($p < 0,01$) e apresentavam uma composição em lípidos e vitaminas antioxidantes significativamente alterada ($p < 0,05$). A suplementação com β -caroteno durante três semanas aumentou o conteúdo das LDL em β -caroteno ($0,296 \pm 0,020$ para $0,968 \pm 0,133$ $\mu\text{g}/\text{mg}$; $p < 0,01$) e a resistência à oxidação das lipoproteínas ($p < 0,01$), podendo contrariar o desenvolvimento acelerado da aterosclerose⁶²⁵.

Estes resultados estão de acordo com os de outros estudos⁶²⁶.

Em 39 doentes com síndromes coronárias agudas, em 50 com doença coronária estável e em 50 controlos, determinaram-se os níveis plasmáticos de diversos carotenóides oxigenados - luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, e hidrogenados - alfa-caroteno, beta-caroteno e licopeno. Os níveis da luteína, da zeaxantina e da β -criptoxantina, estavam significativamente reduzidos nos participantes com síndromes coronárias agudas e correlacionaram-se com os hábitos tabágicos, com o índice de massa corporal e com o baixo CHDL⁶²⁷.

No *Health Professionals Follow-up Study* verificou-se um menor risco de desenvolvimento de doença coronária nos homens que consumiam uma dieta rica em carotenóides. Esta correlação negativa foi mais evidente nos actuais (RR 0,30; IC 0,11 a 0,82) e antigos fumadores (RR 0,60; IC 0,38 a 0,94)⁶²⁸.

De acordo com estes resultados está um grande estudo caso-controlo, Europeu, em que existiu uma associação inversa entre os níveis de carotenóides do tecido adiposo e o risco de enfarte agudo do miocárdio não fatal, o mesmo se verificando num outro estudo Norte-americano, relativamente aos níveis séricos do β -caroteno ($p=0,02$); também neste a associação foi mais forte nos indivíduos fumadores ou ex-fumadores^{629 630}.

Numa posterior análise do EURAMIC, a associação inversa verificada para o β -caroteno, foi anulada quando se entrou em conta com o licopeno do tecido adiposo⁶³¹. Os níveis deste carotenóide estavam inversa e significativamente associados com o EAM não fatal, não só nos fumadores mas também nos não fumadores.

Em 4802 participantes do estudo de Roterdão, com idades compreendidas entre os 55 e os 95 anos, sem doença cardíaca coronária de base e seguidos durante quatro anos, o risco de desenvolver enfarte agudo do miocárdio foi significativamente inferior nos indivíduos que consumiam maiores quantidades de β -caroteno (RR 0,55; IC 0,34 a 0,83; $p=0,013$). Esta relação foi ainda mais significativa quando a ingestão era decorrente de suplementos e não apenas de fontes alimentares⁶³².

Diversos ensaios clínicos têm demonstrado uma ausência de relação protectora entre o β -caroteno e a doença cardiovascular. No *Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Lung Prevention Study* (ATBC), um ensaio duplamente cego que

utilizou o β -caroteno nas doses de 20 mg /dia ou o α -tocoferol nas doses de 50 mg / dia, realizado em 29 133 Finlandeses do sexo masculino, os indivíduos que receberam o β -caroteno, apresentaram uma mortalidade por doença cardíaca isquêmica 8 % maior, comparativamente aos que receberam placebo⁶³³. No mesmo estudo, não se verificou qualquer diferença na incidência do EAM não fatal⁶³⁴.

Num outro ensaio clínico, com a duração de oito anos e realizado em 1188 homens e 532 mulheres, determinou-se a relação entre o β -caroteno e o cancro da pele, excluindo o melanoma. As concentrações plasmáticas iniciais deste carotenóide estavam inversa e significativamente relacionadas com a morte por doença cardiovascular (RR 0,57; IC 0,44 a 0,82), embora a suplementação com 50 mg / dia de β -caroteno não tivesse tido qualquer efeito benéfico na referida mortalidade (RR 1,16; IC 0,82 a 1,64)⁶³⁵.

Num estudo de prevenção primária multicêntrico, randomizado, duplamente cego e controlado por placebo, *The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial* (CARET), realizado em 18 314 indivíduos fumadores, ex-fumadores e ainda outros expostos ao asbesto, avaliou-se a influência da combinação de 20 mg/dia de β -caroteno, com 25 000 UI/dia de retinol (vitamina A), na incidência do cancro do pulmão e da DCV. O RR da ocorrência de cancro do pulmão nos indivíduos suplementados, foi de 1.28 (IC 1,04 a 1,57), o de morte pelo mesmo cancro de 1.46 (IC 1,07 a 2,00), o de morte por DCV de 1.26 (IC 0,99 a 1,61) e o de mortalidade total de 1.17 (IC 1,03 a 1,33), relativamente ao grupo controlo. Os autores concluíram que, a combinação terapêutica utilizada, apresentou efeitos adversos na incidência e mortalidade por cancro do pulmão e DCV^{636 637}. Tentando explicar estes resultados, os autores do estudo adiantam a hipótese de que, para reverter factores de risco exógenos ou metabólicos, podem ser necessários longos períodos de tempo, até aos dez anos, e que os estudos que procuram avaliar a eficácia de potenciais agentes profiláticos, para poderem ser conclusivos, deverão ter uma duração correspondente. Por outro lado, os indivíduos expostos ao fumo do tabaco e/ou ao asbesto sofrem uma contínua agressão oxidativa, que pode não ser compensada pelas doses ou pelos antioxidantes utilizados. Aparentemente,

estes resultados não terão estado na dependência da pequena alteração dos níveis de triglicérides, provocada pelo tratamento antioxidante⁶³⁸.

No *Physicians`Health Study*, os homens suplementados com 50 mg de β -caroteno, em dias alternados, durante 12 anos, também não obtiveram qualquer benefício em termos de risco de doença cardiovascular⁶³⁹.

Algumas justificações têm sido adiantadas para explicar os diferentes resultados, entre os estudos clínicos e os observacionais, desde o simples “acaso”, ao insuficiente tempo de *follow-up* e ao facto de, nos estudos observacionais, se analisar o conteúdo alimentar em β -caroteno, enquanto nos ensaios clínicos se utilizaram suplementos deste antioxidante. Outros investigadores defendem que quando o β -caroteno é suplementado em grandes fumadores, as doses utilizadas podem não ser as suficientes para contrariar a lesão cardiovascular causada pelo stresse oxidativo inerente ao tabaco. No entanto, no *Physicians`Health Study* apenas 11% dos homens eram fumadores e a ausência de efeito do β -caroteno, verificou-se quer nos fumadores quer nos não fumadores. Também, como já foi dito, o β -caroteno é apenas um dos muitos carotenóides com propriedades antioxidantes; para alguns autores, a suplementação com este carotenóide pode inibir a absorção de outros carotenóides potencialmente importantes⁶⁴⁰.

Podemos assim concluir, com base nos estudos clínicos, que a suplementação com β -Caroteno não reduz o risco de doença cardíaca, sendo necessário averiguar se os resultados benéficos encontrados nos estudos observacionais dependem de outros carotenóides, ou de outros factores alimentares, ou do estilo de vida.

No HPS, *Heart Protection Study*, 20 536 indivíduos dos dois sexos, com idades compreendidas entre os 40 e os 80 anos e antecedentes de doença coronária, outra doença arterial oclusiva, ou diabetes, foram randomizados para receber suplementação com vitaminas antioxidantes (600 mg de Vit E, 250 mg de Vit C e 20 mg de β -Caroteno), versus placebo. No grupo tratado com vitaminas antioxidantes, os seus níveis plasmáticos aumentaram significativamente e não se registaram efeitos secundários de relevo. No entanto, não se obtiveram reduções significativas na mortalidade ou na incidência da doença vascular (doença coronária major e doença vascular fatal e não fatal) nem de cancro⁶⁴¹.

O SU.VI.MAX.study (*SUpplementation en Vitamines et Mineraux AntioXydants*) foi um estudo de prevenção primária, duplamente cego, randomizado e controlado por placebo, desenhado para testar a eficácia da suplementação diária com antioxidantes (Vit C 120mg; Vit E 30mg e β -Caroteno 6mg) e minerais (selênio 100 μ g e zinco 20mg), na redução das principais causas de morte prematura nos países industrializados, nomeadamente cancro e DCV. O estudo começou em França, em 1994, incluiu 13 017 homens e mulheres com idades entre os 35 e os 60 anos e os seus resultados foram publicados em 2004. Apenas nos participantes do sexo masculino, a suplementação com antioxidantes reduziu a incidência de cancro (RR 0,69; IC 95% 0,53 a 0,91) e a mortalidade por todas as causas (RR 0,63; IC 95% 0,42 a 0,93)^{642 643}.

Uma meta-análise de ensaios randomizados para avaliar a relação entre o consumo de vitaminas antioxidantes e a mortalidade cardiovascular, sete com Vit E (81 788 participantes, com doses de 50 a 800 UI / dia) e oito com β -caroteno (138 113 indivíduos, nas doses de 15 a 50 mg), não encontrou qualquer redução significativa da mortalidade cardiovascular ou do acidente vascular cerebral nos que utilizaram a vitamina E e nos que utilizaram o β -caroteno, verificou-se um pequeno, mas significativo, aumento das mortalidades cardiovascular (RR 1,1; IC 95% 1,1 a 1,3; p=0,003) e total (RR 1,07; IC 95% 1,02 a 1,11; p=0,003)⁶⁴⁴.

O WACS (*The Women's Antioxidant and Cardiovascular Study*), é um estudo randomizado, duplamente cego e controlado por placebo, que incluiu 8 000 profissionais de saúde, de 40 ou mais anos de idade, com antecedentes de EAM, angina pectoris, revascularização coronária, AVC, AIT, endarterectomia carotídea ou cirurgia arterial periférica. As participantes foram randomizadas para receber Vit E (600 UI em dias alternados), Vit C (500 mg/dia), β -Caroteno (50 mg em dias alternados) ou placebo. Posteriormente, 5 442 das participantes foram randomizadas para receber ácido fólico/vit B6/vit B12 ou placebo. O *endpoint* primário foi o conjunto de EAM e de AVC não fatais, a necessidade de revascularização coronária e a mortalidade por DCV^{645 646}. Não se verificou qualquer efeito favorável nem com a Vit C (RR1,02; IC95% 0,92 a 1,13; p=0,71), nem com a Vit E (RR 0,94; IC95% 0,85 a 1,04; p=0,23) nem com o β -caroteno (RR 1,02; IC 95% 0,92 a 1,13; p=0,71). Uma discreta redução no *endpoint*

combinado verificou-se no sub-grupo de mulheres com prévia doença vascular cardíaca (RR 0,89; IC95% 0,79 a 1,00; p=0,04)⁶⁴⁷.

O WHS (*Women's Health Study*) é um estudo randomizado, duplamente cego e controlado por placebo, desenhado para avaliar os potenciais benefícios e riscos de baixas doses de aspirina e da vit E, 600 UI em dias alternados, na prevenção primária da DCV e do cancro. Inclui um total de 39 876 mulheres, de 45 ou mais anos, distribuídas por quatro grupos terapêuticos: aspirina + placebo da vit E; placebo da aspirina + vit E; aspirina + vit E; placebo + placebo⁶⁴⁸. Este estudo está ainda a decorrer.

Da revisão de trabalhos sobre os possíveis efeitos protectores vasculares das vitaminas antioxidantes, conclui-se que, a maioria dos estudos randomizados e controlados por placebo, não apresentam argumentos que justifiquem a prescrição de suplementos artificiais destas vitaminas, sendo preferível encorajar uma alimentação equilibrada que inclua vegetais verdes, fruta e óleos vegetais^{649 650 651}.

6.7 - Probucol

O probucol é um fármaco hipolipemiante, sobre o qual tem existido alguma controvérsia no que se refere à sua acção anti-aterosclerótica. Se o seu efeito a nível do colesterol total se caracteriza por uma redução benéfica, também a nível do colesterol HDL induz uma redução nos seus níveis, sendo este um efeito indesejado em termos de perfil lipídico. No entanto, para além da acção a nível dos lípidos, o probucol possui uma outra acção provavelmente não menos importante: a acção antioxidante.

Esta acção foi demonstrada num trabalho publicado em 1987, em que se utilizaram coelhos *Watanabe*, um modelo de hiperlipidemia familiar. As LDL isoladas dos coelhos suplementados com probucol apresentavam significativa resistência à oxidação pelo cobre, sendo igualmente menos reconhecidas e captadas pelos macrófagos, relativamente às lipoproteínas dos animais não suplementados. Também a percentagem da superfície total da aorta torácica ocupada com placas foi significativamente menor nos animais tratados (7,0% ± 6,3% versus 54,2% ± 18,8%; p< 0,01)⁶⁵².

Em coelhos *New Zealand White*, tornados hipertensos pela coarctação cirúrgica da aorta e nos quais se verificou um aumento significativo dos produtos de oxidação do colesterol, nos animais suplementados com probucol, este aumento foi significativamente inferior quando comparado com o verificado nos animais não tratados (7-cetocolesterol, $p=0,0002$; 7β -OH, $p=0,00006$; α -epoxy, $p=0,0001$)⁶⁵³.

Num outro trabalho avaliaram-se os efeitos do probucol na oxidação das lipoproteínas e na formação das lesões de aterosclerose em quatro locais diferentes da aorta. Curiosamente, não houve redução dos lípidos oxidados na parede aórtica, verificando-se, no entanto, uma inibição da formação das lesões na maioria das localizações estudadas. Este último achado fez supor que a acção antioxidativa do probucol, não terá sido o principal mecanismo de acção⁶⁵⁴.

Contrariamente aos resultados descritos acima, ratos deficientes em Apo E, suplementados com probucol, evidenciaram uma significativamente maior progressão das placas de aterosclerose aórtica, quando comparados com os animais não suplementados. Os autores consideram estes resultados não totalmente explicados pelas alterações do perfil lipídico (redução do CHDL e ApoA1) e inesperados, dada a forte actividade antioxidante do probucol⁶⁵⁵.

Em indivíduos hipercolesterolémicos, dos dois sexos, com aterosclerose femoral, o probucol não conseguiu induzir qualquer regressão das lesões avaliadas por angiografia. Para os autores, os potenciais efeitos antioxidantes do fármaco, foram anulados pela redução do CHDL (particularmente das HDL_{2b}). Estas lipoproteínas contêm uma importante enzima antioxidante, a paroxonase, e uma redução desta classe de lipoproteínas, condicionará uma redução da sua concentração e actividade enzimática⁶⁵⁶.

O probucol também foi avaliado a nível da vasorreatividade. Em indivíduos dislipidémicos, comparou-se a resposta vasomotora coronária à acetilcolina antes e depois de tratamento dietético, de lovastatina e colestiramina, ou de lovastatina e probucol durante um ano; os indivíduos medicados com probucol mostraram um significativo aumento da vasodilatação ($p < 0,01$)⁶⁵⁷.

6.8 - Coenzima Q10 (CoQ)

A CoQ encontra-se largamente difundida na natureza, estando presente em muitos tecidos animais (sardinhas, bovinos, leite, queijo) e vegetais (favas, nozes, amêndoas, espinafres, vegetais verdes)⁶⁵⁸. A síntese da CoQ necessita do aminoácido tirosina e da acetil CoA, passando pelo ácido mevalónico, com uma via comum à síntese do colesterol. Com efeito, esta via sintética encontra-se igualmente sujeita à HMGCoA reductase, pelo que as estatinas reduzem as concentrações da CoQ⁶⁵⁹. Os níveis plasmáticos normais são de $0,79 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$, sendo difícil avaliar a importância relativa da biossíntese endógena e da ingestão exógena.

Doentes sob nutrição parenteral total apresentaram níveis baixos da CoQ, não se sabendo se por carência alimentar da própria enzima ou dos seus precursores⁶⁶⁰.

A CoQ é um cofactor essencial da cadeia respiratória mitocondrial acoplada à fosforilação oxidativa. Este facto foi já demonstrado em 1976 por Kishi, quando, com a administração de adriamicina, inibiu a respiração mitocondrial, sendo este efeito prevenido pela suplementação com CoQ⁶⁶¹.

A acção antioxidante da CoQ foi inicialmente demonstrada em membranas artificiais, organelos subcelulares, células em cultura, órgãos isolados perfundidos e modelos clínicos.

Um estudo explorou a capacidade antioxidante da CoQ, utilizando mitocôndrias desprovidas da enzima por extracção química. Os lípidos destes organelos celulares apresentaram maior vulnerabilidade à oxidação, tendo recuperado a resistência normal pela reincorporação da coenzima⁶⁶².

Extraindo a CoQ a membranas mitocondriais, e expondo-as à acção oxidativa da radiação gama, verificou-se uma redução significativa dos ácidos gordos polinsaturados, sendo este efeito anulado pela adição de CoQ ao meio de cultura⁶⁶³.

Num outro estudo, em que se utilizaram cardiomiócitos de rato, demonstrou-se que a protecção oferecida pela CoQ contra a toxicidade da adriamicina foi superior à oferecida pela Vit E. Nesta experiência, a peroxidação lipídica nos cardiomiócitos foi mais intensamente reduzida pela Vit E do que por

doses iguais de CoQ, mas esta última foi mais eficaz na preservação da capacidade contráctil do miócito⁶⁶⁴.

Sabe-se que a exposição à adriamicina conduz à deterioração das funções sistólica e diastólica cardíacas. Esta deterioração está na dependência de uma cardiomiopatia, por stresse oxidativo, particularmente evidente com doses iguais ou superiores a 400 mg/m²⁶⁶⁵.

Num estudo realizado em doentes tratados com adriamicina, com doses superiores a 400 mg/m² e previamente suplementados com CoQ, não ocorreram quaisquer sinais de cardiotoxicidade⁶⁶⁶.

A CoQ tem demonstrado propriedades protectoras da função ventricular esquerda em relação à lesão de isquémia/reperfusão, quer no animal, quer no homem^{667 668}. A sua capacidade antioxidante tem sido responsabilizada pela acção protectora do miocárdio. Esta molécula, lipossolúvel, tem capacidade de neutralização dos radicais livres, manifesta um sinergismo com a Vit E, através da redução do radical $\alpha\text{-TO}^\cdot$, com regeneração do $\alpha\text{-TOH}$, contrariando assim a peroxidação mediada pela Vit E^{669 670}.

A acção da CoQ foi também avaliada na preservação da vasorreatividade. Utilizando corações de ratos sujeitos à acção da isquémia/reperfusão e do H₂O₂, avaliou-se a capacidade de dilatação coronária com e sem CoQ, tendo-se verificado que esta molécula preserva a função vasodilatadora do endotélio⁶⁷¹.

Em diabéticos tipo 2, avaliaram-se os efeitos combinados do fenofibrato (200 mg / dia) e da CoQ (200 mg / dia), na função vasodilatadora da microcirculação do antebraço. A combinação destes fármacos melhorou significativamente a vasodilatação dependente e independente do endotélio, parecendo estes efeitos estar na dependência de um aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico. O efeito vasodilatador, que não se verificou com a administração isolada de qualquer dos fármacos, foi independente das alterações lipídicas, da pressão arterial, dos níveis de homocisteína e dos isoprostanos, estando correlacionado com a HbA(1c) e, possivelmente, na dependência da estimulação sinérgica dos PPAR(s)⁶⁷².

Em ratos deficientes em Apo E, testou-se a hipótese, da suplementação com CoQ poder inibir a oxidação lipídica aórtica e a aterosclerose. A administração de CoQ aumentou a sua concentração na aorta, reduziu o

conteúdo deste vaso em LOOH e inibiu a progressão das lesões de aterosclerose⁶⁷³.

A CoQ actua como antioxidante, fundamentalmente na sua forma reduzida (CoQH₂). Nesta forma, a CoQ reduz as espécies perferil (Fe⁺⁺⁺ - O₂⁻), prevenindo o ataque radical sobre os ácidos gordos. Através deste mecanismo, o CoQH₂ impede a formação dos radicais alcoxi e peroxi⁶⁷⁴.

Ao actuar como antioxidante nas reacções descritas a CoQ transforma-se no radical ubisemiquinona. Este radical é estabilizado pela ligação a determinadas proteínas, como a SOD e a catalase, que inibem o O₂⁻ e o H₂O₂ resultante da autoxidação da ubisemiquinona⁶⁷⁵.

6.9 - Isoflavonas

Os fitoestrogénios são compostos vegetais com fracas actividades estrogénica e antiestrogénica⁶⁷⁶. Tem havido um forte interesse no consumo dos fitoestrogénios, relativamente à prevenção das doenças cardiovasculares e neoplásicas⁶⁷⁷. As isoflavonas, Genisteína e Daidzeína, encontram-se predominantemente nos produtos derivados da soja, essencialmente na forma de gliconas, Genistina e Daidzina. Após ingestão, a genistina e a daidzina são hidrolisadas no intestino, pela acção bacteriana, em Genisteína e Daidzeína⁶⁷⁸. A Genisteína e a Daidzeína, assim como alguns dos seus metabolitos (Equol), possuem actividades antioxidantes, contrariando a peroxidação dos lípidos das membranas e das lipoproteínas^{679 680 681 682}.

Determinaram-se os efeitos da soja dietética no homem, *in vivo*, a nível dos biomarcadores da peroxidação lipídica (F2-isoprostanos) e da resistência das LDL à oxidação. Compararam-se duas dietas, uma contendo soja e isoflavonas e outra, igualmente com soja, mas à qual se extraíram as isoflavonas. Obtiveram-se maiores níveis de isoflavonas nos indivíduos alimentados com a primeira dieta, com níveis plasmáticos significativamente menores de F2-isoprostanos (326 ± 32 versus 405 ± 50 ng / L; p=0,028) e uma maior resistência das LDL à oxidação (*lag time* 48 ± 2,4 versus 44 ± 1,9 min; p=0,017)⁶⁸³.

A acção antioxidante das isoflavonas pode-se revelar de significativa importância na redução do risco da aterosclerose, da doença cardiovascular e do cancro.

6.10 - Estatinas

Num trabalho de Shishehbor e colaboradores, a terapêutica com estatinas reduziu significativamente (25%; $p=0,02$) os níveis da nitrotirosina, NO_2Tyr , um marcador do stresse oxidativo dependente do ON⁶⁸⁴. Esta acção antioxidativa foi independente do efeito hipolipemiante.

A capacidade das estatinas para inibir a isoprenilação de determinadas proteínas, envolvidas nos processos de oxidação / antioxidação da parede vascular, será um dos mecanismos subjacentes às suas propriedades antioxidantes. A utilização de culturas celulares, permitiu demonstrar que os inibidores da HMG-CoA reductase inibiram a formação do superóxido e aumentaram a produção de ON pelas células endoteliais, através da supressão da isoprenilação das proteínas Rac e Rho^{685 686}. A proteína Rac é um componente do complexo NAD(P)H oxidase vascular e leucocitário e a inibição, pelas estatinas, da sua isoprenilação, impede a sua translocação membranar e a formação do superóxido⁶⁸⁷. A proteína GTPase Rho está igualmente envolvida nas vias de sinalização celular, necessitando da isoprenilação para ser activa. A inibição deste processo nas células endoteliais, pelas estatinas, resulta no aumento da produção do ON e da sua acção antioxidante⁶⁸⁸.

A terapêutica com 10 mg/dia de atorvastatina, em indivíduos hipercolesterolémicos, provocou uma significativa inibição da oxidação das proteínas, traduzida na redução dos níveis de CITyr , diTyr , e NO_2Tyr (30%, 25% e 32%, respectivamente; $p<0,02$). Segundo os autores, estes efeitos foram independentes das alterações lipídicas e da PCR, sendo muito provavelmente um efeito de classe⁶⁸⁹.

Em 115 doentes insuficientes renais crónicos em hemodiálise, homens e mulheres, verificou-se que, nos medicados com estatinas a actividade da mieloperoxidase era significativamente menor (17,7 *versus* 26,6 $\Delta\text{OD630}/\text{min}$ por mg proteína; $p<0,05$)⁶⁹⁰.

Diversos trabalhos no animal têm vindo a confirmar a acção anti-oxidante das estatinas^{691 692}.

Esta propriedade das estatinas poderá depender igualmente do aumento da expressão da enzima paroxonase, efeito este inibido pelo mevalonato. A sinvastatina aumentou significativamente a actividade transcripcional do gene da PON1, em células humanas HepG2, *in vitro*, assim como os níveis séricos e a actividade desta enzima em homens e mulheres medicados com a referida estatina ($81,9 \pm 25,0$ versus $76,7 \pm 25,9$ mg/l e $92,3 \pm 23,9$ versus $81,5 \pm 24,5$ U/ml, respectivamente)⁶⁹³.

Conclui-se, que os inibidores da HMG-CoA reductase possuem potentes efeitos antioxidantes, independentes da sua acção hipolipemiante, com importantes implicações na prevenção e terapêutica das doenças vasculares.

6.11 - Outras moléculas antioxidantes

6.11.1 - Fármacos

Num trabalho publicado na Revista Portuguesa de Cardiologia, avaliaram-se, através da resistência do plasma à oxidação pelo Cu, os efeitos antioxidantes de alguns fármacos anti-hipertensores - quatro antagonistas β -adrenérgicos (pindolol, propranolol, atenolol e metoprolol) e um antagonista dos canais do cálcio (nifedipina). Verificou-se que o pindolol, o propranolol e a nifedipina tinham propriedades antioxidantes, quando adicionados ao sistema 15 minutos antes da incubação do plasma com o Cu, apresentando a nifedipina, para além deste efeito profiláctico, a capacidade de interromper a lipoperoxidação já iniciada⁶⁹⁴.

A nicanartina tem uma forte afinidade para as LDL, atingindo concentrações de $0,1\mu\text{M}$ nestas partículas, e a sua ligação com as lipoproteínas retarda a formação dos hidroperóxidos. Para além da sua acção antioxidante, a nicanartina normaliza as concentrações do colesterol total e das LDL.

Os radicais livres oxidam a hemoglobina em hemina, molécula com potente acção catalisadora da oxidação lipídica; ligando-se à hemina, a cloroquina e a desferroxamina impedem a sua acção pró-oxidante^{695 696 697}.

A desferroxamina melhorou a vasodilatação dependente do endotélio em indivíduos com doença coronária ($p=0,01$), aparentemente por um mecanismo protector do Óxido Nítrico endotelial⁶⁹⁸.

6.11.2 - Hormonas sexuais

A *dehidroepiandrosterona (DHEA)* é a hormona esteróide mais abundante e possui uma grande variedade de efeitos fisiológicos. A concentração desta hormona reduz-se consideravelmente com o envelhecimento, chegando a atingir níveis de 10%, relativamente às concentrações da DHEA dos jovens^{699 700 701}.

Esta redução faz supor algum tipo de relação com as doenças do envelhecimento e, particularmente, com a aterosclerose.

Estudos no animal demonstraram um efeito benéfico da DHEA na diabetes, na obesidade e no cancro^{702 703 704}.

Alguns estudos epidemiológicos demonstraram uma acção anti-aterogénica da DHEA e da sua forma sulfatada (DHEAS)^{705 706}.

Apesar dos efeitos biológicos da DHEA, aparentemente benéficos, pouco se sabe acerca dos seus mecanismos de acção. Estudos *in vitro*, demonstraram que esta hormona tem uma acção antioxidante, protegendo as LDL da peroxidação induzida por radicais livres de oxigénio e por metais de transição^{707 708 709 710}.

No homem, cerca de 90% da DHEA, está ligada à albumina, encontrando-se uma pequena parte nas HDL e nas LDL, protegendo os lípidos destas partículas contra a peroxidação. Com o envelhecimento, a redução do conteúdo em DHEA das LDL pode traduzir-se numa maior sensibilidade aos ataques oxidativos⁷¹¹.

Determinaram-se as alterações induzidas pelo envelhecimento nas concentrações da DHEA e DHEAS, das HDL e das LDL e avaliou-se a susceptibilidade das LDL à oxidação, através da formação dos dienos conjugados, dos hidroperóxidos lipídicos e dos TBARS. Verificaram-se reduções significativas nas concentrações destes esteróides com a idade ($p<0,02$), sendo quase indetectáveis a partir dos 65 anos, acompanhando-se de um aumento da susceptibilidade à oxidação. *In vitro*, a adição de DHEA ao plasma dos mais idosos, restaurou o conteúdo das LDL nesta hormona, reduzindo

significativamente ($p < 0,05$) a oxidação das lipoproteínas. Os autores admitiram que a protecção da Vit E contra a oxidação e a eliminação directa dos radicais livres, produzidos durante a peroxidação das LDL, constituíram prováveis mecanismos antioxidantes da DHEA⁷¹².

Os *estrogénios* e a sua relação com a aterosclerose e a DCV, têm sido objecto de múltiplos estudos, com resultados nem sempre concordantes. Estando fora deste nosso trabalho a discussão sobre os eventuais benefícios, ou malefícios, da terapêutica hormonal substitutiva na prevenção da DCV, vamos tecer algumas considerações sobre a acção nos mecanismos oxidativos.

Em coelhas alimentadas com dieta hipercolesterolemiantes e tratadas com estradiol durante 33 semanas, houve um menor desenvolvimento de lesões de ateroma arterial, relativamente às que não receberam o estrogénio. O estradiol não causou qualquer efeito nos níveis lipídicos, pelo que estes não poderão justificar os resultados obtidos⁷¹³.

Em macacas anexectomizadas e alimentadas com dieta rica em colesterol, a terapêutica hormonal substitutiva com 17β -estradiol, isoladamente ou associado à progesterona, durante 30 meses, inibiu significativamente o desenvolvimento da aterosclerose coronária. Mais uma vez, o efeito anti-aterogénico foi independente das variações do perfil lipídico⁷¹⁴.

Administrando peróxido de hidrogénio na carótida de ratos fêmeas ovariectomizadas desencadeou-se, após 6 a 24 H, a apoptose das células endoteliais (CE), seguida da regeneração destas células e da formação da neo-íntima. A terapêutica estrogénica substitutiva atenuou o efeito apoptótico do H_2O_2 (menor % de CE apoptóticas, $p < 0,05$), sendo este efeito obtido com concentrações plasmáticas de estradiol consideradas fisiológicas ($< 100\text{pg/ml}$)⁷¹⁵.

Em mulheres pós-menopausadas, determinou-se o *lag time* para a oxidação das LDL, antes e após infusão intra-arterial de 17β -estradiol, de 3 semanas de estrogénios transdérmicos e um mês após descontinuação da terapêutica hormonal. O *lag time* aumentou com a infusão intra-arterial e com a formulação transdérmica, retornando aos valores de base após um mês de descontinuação. Este estudo demonstrou um efeito antioxidante de níveis fisiológicos de estrogénios, podendo contribuir para uma acção anti-aterogénica⁷¹⁶. Não se verificaram alterações significativas do perfil lipídico.

6.11.3 - Álcool

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre um moderado consumo de álcool e uma menor morbi/mortalidade por doença coronária^{717 718}. Relativamente ao acidente vascular cerebral (AVC), provavelmente pela heterogeneidade da própria doença, quando comparada com a cardiopatia isquémica, os resultados não são tão evidentes. No entanto, em quantidades moderadas e consumido regularmente, o álcool parece ter algum efeito benéfico na redução do sub-tipo isquémico do AVC^{719 720}. No que diz respeito a eventuais diferenças na capacidade protectora das várias bebidas alcoólicas, embora ainda não completamente esclarecidas, o vinho tinto poderá ter um efeito mais significativo⁷²¹.

Para além de outros mecanismos protectores comuns a todas as bebidas alcoólicas, nomeadamente a nível do perfil lipídico, com aumento do colesterol HDL e um equilíbrio trombose/fibrinólise mais favorável, o vinho tinto poderá ter outros efeitos específicos, nomeadamente a nível da oxidação e da inflamação^{722 723}.

O vinho possui diversos compostos polifenólicos com propriedades antiaterogénicas, dos quais se salientam o resveratrol e os flavonóides catequina, epicatequina e queracetina. Estes compostos não se encontram exclusivamente no vinho, estando presentes no chá, no café nos frutos e nos vegetais^{724 725}. Os flavonóides têm a capacidade de reagir com os radicais superóxido, hidroxilo e peróxido, inactivando-os e inibindo o processo da peroxidação das LDL.

Os polifenóis do vinho, existentes também no extracto do sumo de uva, inibiram a proliferação das células musculares lisas vasculares ($p < 0,05$ a $< 0,01$, dependendo da concentração) e reduziram a susceptibilidade das LDL à oxidação *in vitro* e *in vivo*, avaliada através dos TBARS, dos dienos conjugados e dos hidroperóxidos lipídicos ("p" de 0,004 a 0,0004)^{726 727 728 729 730}. A acção antioxidante dos compostos polifenólicos do vinho, tem sido uma das explicações para o clássico *paradoxo francês*^{731 732 733}.

O NF- κ B é um factor de transcrição sensível ao estado *redox* e é responsável pela activação de diversos genes envolvidos nos mecanismos inflamatórios e imunológicos como as citocinas, as moléculas de adesão e as

proteínas pró-coagulantes. Um dos muitos estímulos que induzem a activação do NF-kB é a OxLDL⁷³⁴.

Através de uma refeição rica em gordura provocou-se uma forte lipémia pós-prandial, à custa dos triglicéridos das quilomicra, verificando-se nas células mononucleares periféricas um aumento significativo ($p < 0,05$), proporcional à lipémia, da activação do NF-kB. O consumo de vinho tinto, mas não o de vodka, inibiu a activação deste factor de transcrição ($p < 0,05$), apoiando a existência de eventuais diferenças entre os dois tipos de bebidas alcoólicas. Como o vinho tinto se acompanhou de um maior aumento dos triglicéridos pós-prandiais, que mostraram aumentar significativamente a activação do NF-kB ($p < 0,05$), não foi através do efeito lipídico que se verificou a inibição do NF-kB. Dada a sensibilidade deste factor de transcrição aos fenómenos *redox*, demonstrou-se que alguns dos antioxidantes existentes no vinho, queracetina e succinato de α -tocoferol, inibiram significativamente a activação do NF-kB ($p < 0,05$)⁷³⁵.

O vinho tinto inibiu a expressão do MCP-1 em artérias de ratos com alimentação rica em colesterol ($p < 0,05$), tendo esta acção sido parcialmente atribuída aos seus efeitos antioxidantes⁷³⁶.

A catequina e a vitamina E, constituintes do vinho tinto, preveniram o desenvolvimento das estrias gordas em hamsters hipercolesterolémicos e o desenvolvimento das lesões precoces em coelhos^{737 738}.

Em coelhos hipercolesterolémicos, o vinho tinto e os produtos vinícolas não alcoólicos, preveniram a formação da placa, apesar de um significativo aumento do colesterol LDL⁷³⁹.

A formação de neovasos é um importante factor do crescimento e da instabilidade da placa. Os compostos polifenólicos do vinho tinto reduziram a angiogénese, ao inibirem a proliferação e a migração das células endoteliais e musculares lisas ($p < 0,05$). Diversos trabalhos demonstraram que, pelo menos parcialmente, estes efeitos estão na dependência de mecanismos *redox* com inibição dos factores angiogénicos VEGF e Metaloproteinase 2^{740 741}.

As VLDL são as lipoproteínas que mais frequentemente estão associadas ao consumo de vinho. Alguns autores estudaram, em células mononucleares, o efeito das VLDL na activação do NF-kB. O tratamento das células Thp-1 e de células endoteliais com VLDL nativas, induziu a activação do NF-kB ($p < 0,05$)⁷⁴². Também as VLDL oxidadas induziram a activação do NF-kB ($p < 0,05$)⁷⁴³. Os

antioxidantes presentes no vinho tinto (queracetina e α -tocoferol) inibiram esta activação ($p < 0,05$), enquanto que o etanol não teve qualquer efeito.

Em indivíduos dos dois sexos, o consumo de álcool esteve associado à redução de diversos parâmetros inflamatórios, nomeadamente da PCR e dos leucócitos^{744 745}.

6.11.4 - Chá

O chá também tem demonstrado uma acção anti-aterogénica, parcialmente dependente dos seus componentes antioxidantes^{746 747}.

Em 22 homens saudáveis, não fumadores, determinaram-se as concentrações sérica de MDA-LDL e urinárias de 8-epi-prostaglandina F2 α , após duas semanas de consumo de sete chávenas/dia de chá verde. Não se verificou qualquer alteração significativa dos níveis plasmáticos do CLDL (110 ± 33 versus 113 ± 28 mg/dl, $p = \text{NS}$) mas, relativamente ao MDA-LDL, a sua concentração foi significativamente reduzida (84 ± 45 versus 76 ± 40 UI/L, $p < 0,05$). A concentração urinária do 8-epi-prostaglandina F2 α não sofreu qualquer alteração⁷⁴⁸.

6.11.5 - Ácido úrico

Um estudo realizado em homens de meia-idade com um alto risco cardiovascular, fumadores e não fumadores, avaliou os principais determinantes da resistência à oxidação lipídica induzida pelo cobre. Os autores utilizaram o TRAP, que permite medir a capacidade antioxidante total do plasma. O ácido úrico foi responsável por uma variação de 44% do TRAP nos fumadores, e de 21% nos não fumadores, constituindo-se no principal determinante da capacidade antioxidativa plasmática e da resistência do soro à oxidação⁷⁴⁹.

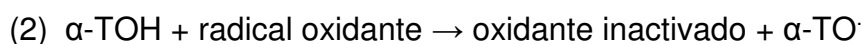
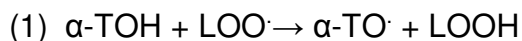
Em adultos saudáveis e durante a realização de exercício aeróbico, avaliaram-se os efeitos do aumento da concentração plasmática do ácido úrico. Administrou-se 0,5 g de ácido úrico e determinaram-se os níveis de F2-isoprostanos de base, imediatamente após terminar o exercício, e 20 minutos depois. A administração do ácido úrico, impediu o aumento dos F2-isoprostanos desencadeado pelo exercício. Os autores concluíram que o ácido úrico apresentava propriedades antioxidantes de significado biológico no vivo⁷⁵⁰.

O homem apresenta maiores níveis de ácido úrico do que a maioria dos outros animais, devido à ausência da enzima uricase que transforma o ácido úrico em alantóina. Devido às propriedades antioxidantes, o ácido úrico pode ser parcialmente responsável pela esperança de vida, relativamente longa, dos humanos^{751 752}.

Para além de ser um inibidor primário de radicais, o urato, sequestrando o ferro, protege o ácido ascórbico da oxidação por este ião e actua como co-antioxidante.

7 - Acção pró-oxidante da vitamina E

O α -tocoferol (α -TOH) actua como antioxidante dando um hidrogénio a um radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$) e transformando-se num radical menos activo que o primeiro, o radical α -tocoferoxil ($\alpha\text{-TO}\cdot$) (1). Alternativamente, o α -TOH pode reagir directamente com um radical iniciador da cadeia de peroxidação, impedindo a formação do $\text{LOO}\cdot$ (2). O $\text{LOO}\cdot$ também pode ser eliminado através de uma reacção radical-radical com o $\alpha\text{-TO}\cdot$ (3).



A actividade antioxidante descrita dá origem ao período de forte inibição da peroxidação, denominado *lag time*. Quando a Vit E é completamente consumida, a velocidade de peroxidação lipídica aumenta significativamente⁷⁵³.

Segundo a teoria da peroxidação lipídica, a protecção antioxidante fornecida pela Vit E às lipoproteínas de baixa densidade, impedirá que estas partículas desencadeiem o processo de aterosclerose. As LDL serão resistentes à peroxidação dos seus ácidos gordos enquanto o seu conteúdo em α -TOH não se esgotar. Seria assim de esperar que as lipoproteínas existentes nas lesões/placas de aterosclerose se apresentassem desprovidas de Vit E.

Para testar esta hipótese investigou-se o estado *redox* e o conteúdo em Vit E das lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) existentes nas placas de aterosclerose de peças de endarterectomia. Verificou-se que, mesmo mantendo quantidades normais de α -TOH, os lípidos de todas as lipoproteínas apresentavam-se

substancialmente oxidados. Concluiu-se assim que, nos estádios avançados de aterosclerose, as lipoproteínas apresentam elevados índices de peroxidação, apesar do seu conteúdo em Vit E não estar reduzido⁷⁵⁴.

Estes resultados estão de acordo com os de outro estudo que também incluiu homogeneizados das íntimas de peças de endarterectomia, com lesões avançadas de aterosclerose, em que se verificou a coexistência de grandes quantidades de α -TOH e de lípidos oxidados⁷⁵⁵.

Consoante as condições de oxidação utilizadas, altera-se o comportamento da vit E, que passa de antioxidante a substância indutora da peroxidação.

Em condições de moderada intensidade oxidativa a peroxidação das LDL aumenta com a suplementação em α -TOH, reduzindo-se quando a Vit E é consumida^{756 757}.

Socorrendo-nos da literatura vamos tentar compreender estas acções antagónicas da Vit E, explicadas pela teoria da *Peroxidação Mediada pelo α -tocoferol* (PMT).

A actividade pró-oxidante da Vit E tem sido evidenciada com diferentes oxidantes como os radicais peroxil, os iões Cu^{2+} , os radicais hidroxilo, a peroxidase e a mieloperoxidase⁷⁵⁸.

O radical peroxil aquoso, o $\text{ROO}\cdot$, ao contactar com uma partícula lipoproteica reage directamente com os lípidos da superfície ou com o α -TOH. Embora os lípidos da superfície estejam presentes em maiores concentrações, o α -TOH é várias vezes mais reactivo com o $\text{ROO}\cdot$, pelo que este reage preferencialmente com a Vit E⁷⁵⁹. Desta reacção resulta o radical $\alpha\text{-TO}\cdot$ que fica retido no interior da partícula LDL, não podendo sofrer uma reacção de terminação radical-radical (ver reacção 3), a menos que um segundo $\text{ROO}\cdot$ entre na lipoproteína oxidada. A primeira reacção é uma acção protectora do α -TOH; o comportamento do $\alpha\text{-TO}\cdot$ dela resultante determina se o resultado final é uma reacção pró, ou antioxidante.

O fluxo de radicais aquosos, ou seja, a frequência com que os radicais $\text{ROO}\cdot$ entram em contacto com as LDL, determina o efeito pró ou antioxidante do α -TOH. Sob condições de alto fluxo, as reacções de terminação entre o $\alpha\text{-TO}\cdot$ e o $\text{ROO}\cdot$ são frequentes, resultando na prevenção da peroxidação lipídica e num rápido consumo de α -TOH. Se, pelo contrário, é pequena a frequência com que

os ROO[·] entram em contacto com as LDL, condição de baixo fluxo, as reacções de terminação radical-radical são raras, acumulando-se o α -TO[·]; este radical, menos polar do que o α -TOH, penetra na lipoproteína, acedendo ao núcleo da LDL. Esta transferência de radicais do exterior para o interior da lipoproteína denomina-se *actividade de transferência de fase do α -TOH*⁷⁶⁰.

A actividade de transferência de fase da Vit E é mais pronunciada para radicais moderadamente reactivos, tais como o ROO[·], enquanto que os radicais mais reactivos, como o OH[·], reagem directamente com os lípidos das LDL (particularmente os polinsaturados), oxidando-os⁷⁶¹.

Nas LDL o OH[·] reage predominantemente com o H dos lípidos, em concentrações 100 a 200 vezes superiores às do α -TOH, enquanto que o ROO[·] reage preferencialmente com a Vit E.

Independentemente da natureza do radical oxidante, sob condições normais, o α -TO[·] é o radical mais estável e predominante das LDL. Uma vez no interior da lipoproteína e na ausência de outros radicais, o α -TO[·] pode reagir com os lípidos e desencadear a formação de ROO[·]. O α -TOH rapidamente inactiva o ROO[·], produzindo LOOH, enquanto regenera o α -TO[·] permitindo a continuação do ciclo. Se o α -TO[·] não for eliminado, uma grande proporção dos lípidos da LDL pode ser oxidada sem perda substancial da Vit E. A capacidade do α -TO[·] de actuar como molécula transportadora da cadeia da peroxidação lipídica, refere-se à actividade de transferência de cadeia do α -TOH. Dada a menor reactividade do α -TO[·] frente ao LOO[·], ele é o radical predominante numa lipoproteína contendo Vit E em processo de oxidação. A relativa estabilidade do α -TO[·] significa também, que o processo de peroxidação mediada pelo α -TOH representa uma forma retardada de peroxidação. No entanto, a presença da Vit E aumenta a reactividade da lipoproteína. Quanto mais α -TOH existir, mais provável é a reacção com o ROO[·] e a lipoperoxidação⁷⁶².

A actividade de transferência de cadeia da Vit E depende do tamanho da lipoproteína; em condições idênticas de início da peroxidação lipídica, a extensão da cadeia da peroxidação, definida como a relação entre o ritmo de formação de hidroperóxidos e o ritmo de geração de radicais, reduz-se com a redução do tamanho da lipoproteína (VLDL > LDL > HDL)^{763 764}. Esta ordem reflecte um aumento na relação entre a superfície e o volume da partícula e do tempo de residência do α -TO[·] na superfície da lipoproteína. A permanência na

superfície aumenta a probabilidade do $\alpha\text{-TO}\cdot$ participar nas reacções de terminação de radical, reduzindo a actividade de transferência de cadeia e a extensão da peroxidação lipídica.

O $\alpha\text{-TOH}$ afecta a susceptibilidade oxidativa dos lípidos das LDL induzida por uma variedade de radicais oxidantes.

Por exemplo, o início da peroxidação induzida pela lipoxigenase, pela tirosina, ou pelo Cu^{2+} , ocorre apenas na presença do $\alpha\text{-TOH}$. Quando em condições de baixo fluxo de radicais, estes oxidantes provocam maior acumulação de hidroperóxidos nas LDL contendo Vit E do que nas lipoproteínas sem $\alpha\text{-TOH}$ ⁷⁶⁵. A oxidabilidade dos lípidos das LDL aumenta proporcionalmente ao conteúdo em $\alpha\text{-TOH}$. O replecimento *in vitro* com o $\alpha\text{-TOH}$ das LDL desprovidas de Vit E restaura a susceptibilidade oxidativa destas lipoproteínas.

Utilizando lipoproteínas de um indivíduo com uma síndrome familiar de deficiência de Vit E demonstrou-se que as suas LDL, destituídas de $\alpha\text{-TOH}$, tinham uma resistência à oxidação semelhante ao das LDL experimentalmente empobrecidas nesta vitamina. Este resultado confirmou, no vivo, o papel pró-oxidante do $\alpha\text{-TOH}$ ⁷⁶⁶.

Em condições de altos fluxos de $\text{ROO}\cdot$ ou $\text{OH}\cdot$, o $\alpha\text{-tocoferol}$ deixa de ter uma actividade pró-oxidante, passando a antioxidante. Esta alteração de comportamento verifica-se com menores fluxos do $\text{OH}\cdot$ do que do $\text{ROO}\cdot$. À medida que o fluxo de radicais aumenta, as reacções de terminação/anulação de radicais tornam-se cada vez mais intensas, reduzindo a possibilidade do $\alpha\text{-TO}\cdot$ induzir e promover a peroxidação lipídica, comportando-se a Vit E como um antioxidante⁷⁶⁷.

A teoria da Peroxidação Mediada pelo $\alpha\text{-tocoferol}$ defende, assim, que o $\alpha\text{-TOH}$ induz a entrada de radicais nas LDL e que, enquanto a lipoproteína tiver $\alpha\text{-TOH}$, o $\alpha\text{-TO}\cdot$ é o principal radical responsável pela cadeia da peroxidação lipídica. Segundo a mesma teoria, a eliminação do $\alpha\text{-TO}\cdot$, mais do que do $\text{LOO}\cdot$, representa uma estratégia para a inibição da peroxidação lipídica das LDL e de outras lipoproteínas.

Quando a formação do $\alpha\text{-TO}\cdot$ está na dependência de determinadas enzimas, como a lipoxigenase e a mieloperoxidase, a inibição destas enzimas constitui uma via alternativa ou suplementar para a defesa anti-oxidante.

7.1 – α -TOH e a peroxidação das lipoproteínas da parede vascular

Poucos estudos têm procurado avaliar a relação entre o α -TOH e a peroxidação lipídica a nível da parede do vaso.

Em ratos knockout para a Apo E, a suplementação com Vit E reduziu os níveis de isoprostanos na aorta⁷⁶⁸.

Em coelhos hiperlipidémicos os níveis da Vit E correlacionaram-se com os hidroperóxidos, os hidróxidos dos ésteres de colesterol e os triacilgliceróis (produtos formados pela peroxidação das lipoproteínas). A suplementação com co-antioxidantes reduziu a peroxidação lipídica aórtica⁷⁶⁹.

Num outro estudo, os autores demonstraram que, em indivíduos com aterosclerose, os níveis de α -TOH da parede vascular estavam positivamente correlacionados com a peroxidação lipídica dos tecidos⁷⁷⁰.

Em fumadores crónicos, através da cinética da peroxidação das LDL *in vitro*, catalisada pelo cobre, e da concentração plasmática dos F2-isoprostanos, estudaram-se os efeitos da dieta rica em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e da suplementação com Vit E. A suplementação com 800 UI/dia de Vit E induziu a peroxidação lipídica traduzida pelo aumento dos níveis de F2-isoprostanos plasmáticos (188.2 ± 10.9 nmol/L; $p < 0,001$)⁷⁷¹. Os PUFA, ao fornecerem grandes quantidades de linoleato oxidável, podem ter aumentado o fluxo de radicais livres disponíveis para a síntese de isoprostanos a partir do ácido araquidónico. Por outro lado, a incorporação do linoleato nas membranas celulares pode ter criado um microambiente lipídico mais fluido, permitindo uma difusão mais rápida dos radicais livres. A adição da Vit E aumentou a disponibilidade do α -TOH tecidual, que terá funcionado como pró-oxidante.

Estes estudos são compatíveis com a hipótese de que, pelo menos parcialmente, a peroxidação lipídica na íntima dos vasos resulta de um desequilíbrio entre o α -TOH e os co-antioxidantes⁷⁷².

7.2 - Coantioxidantes para o α -TOH

A prevenção da peroxidação duma determinada lipoproteína, de acordo com a teoria PMT, depende da destruição/eliminação do α -TO \cdot . Esta eliminação pode resultar de uma reacção de terminação/anulação de radicais (α -TO \cdot +

LOO \cdot → produto não radical) ou da redução do α -TO \cdot por uma outra molécula, que se comporta como co-antioxidante. O co-antioxidante reduz o α -TO \cdot transformando-se, ele próprio, em radical, que depois deve abandonar a lipoproteína para o meio aquoso envolvente^{773 774}.

Dependendo do radical resultante do co-antioxidante (X \cdot), a regeneração do α -TOH resultará, ou não, na protecção antioxidativa da LDL. O radical deve ser pouco reactivo com os ácidos gordos, deve ser capaz de sair rapidamente da partícula lipoproteica, ou de transferir imediatamente a sua característica de radical para outra espécie capaz de abandonar rapidamente a lipoproteína^{775 776}.

É o equilíbrio entre o α -TOH e os co-antioxidantes, mais do que a Vit E isoladamente, que determina a protecção ou a susceptibilidade à oxidação das lipoproteínas.

7.2.1 - CoQ₁₀H₂

As LDL contém pequenas quantidades de CoQ₁₀H₂, a forma reduzida de Q₁₀^{777 778}. O CoQ₁₀H₂ é o primeiro antioxidante a ser consumido quando uma solução de partículas LDL, desprovidas de ascorbato, é exposta a um metal de transição, a um ROO \cdot , a neutrófilos humanos activados, etc^{779 780}.

O CoQ₁₀H₂ é um antioxidante lipossolúvel e, nas LDL, comporta-se como um co-antioxidante para o α -TOH. Ele pode eliminar o α -TO \cdot através do radical semiquinona, dando origem ao radical superóxido, que abandona a partícula da lipoproteína ou anula outro α -TO \cdot ⁷⁸¹.

A nível da aorta de ratos Apo E $^{-/-}$, a co-suplementação com Vit E e CoQ₁₀H₂ foi significativamente ($p \leq 0,05$) mais anti-aterogénica do que a suplementação com a Vit E. Os tratamentos com a Vit E, a CoQ₁₀H₂ e com a associação das duas moléculas reduziram significativamente o colesterol aórtico, mas só no grupo da co-suplementação se verificou uma redução significativa ($p < 0,05$) dos hidroperóxidos lipídicos da parede vascular⁷⁸².

Em indivíduos saudáveis, a suplementação com CoQ₁₀H₂, durante 5 dias, aumentou de seis a sete vezes o conteúdo das LDL em CoQ₁₀H₂ e a resistência destas lipoproteínas à oxidação iniciada pelo ROO \cdot ou um metal de transição⁷⁸³.

A co-suplementação com CoQ₁₀H₂ e Vit E atenuou significativamente a oxidação das LDL induzida pela Vit E.

A peroxidação dos lípidos das LDL pelo α -tocoferol tem lugar através de uma reacção em cadeia de radicais livres, podendo cada molécula de α -TOH dar origem a 20-40 moléculas de LOOH. Embora as quantidades de CoQ₁₀H₂ nas LDL sejam extremamente reduzidas, como este antioxidante tem capacidade para eliminar dois radicais, o resultado final será uma redução da peroxidação em 40 a 80 vezes^{784 785 786}.

No plasma humano, o consumo de CoQ₁₀H₂ durante a oxidação induzida pelos radicais peroxil depende do tipo de oxidante utilizado. Se se usar um ROO \cdot aquoso verifica-se o consumo de ascorbato antes do CoQ₁₀H₂, verificando-se uma inversão nesta ordem com a utilização de um ROO \cdot lipofílico^{787 788}.

7.2.2 - Ascorbato

Entre os antioxidantes aquosos o ascorbato, a forma reduzida da vit C, é o que mais eficazmente inibe a peroxidação lipídica *in vitro*. Esta actividade depende da intercepção e anulação directa de determinados radicais aquosos e da sua actividade como co-antioxidante relativamente à Vit E^{789 790}.

A adição de ascorbato às LDL sujeitas à peroxidação induzida por um ROO \cdot aquoso teve como resultado a cessação imediata do consumo do α -TOH e dos fenómenos oxidativos. Esta acção esteve na dependência da capacidade do ascorbato em regenerar o α -TOH a partir do α -TO \cdot , com formação de um radical pouco reactivo, o ascorbil^{791 792}.

Assim, o ascorbato comporta-se como um agente transferidor de fase facilitando a exportação de radicais, de dentro para fora da lipoproteína.

7.2.3 - Óxido Nítrico (ON)

Como vimos em capítulo anterior, o ON pode-se comportar como pró ou como antioxidante.

Enquanto os seus níveis não caem para concentrações críticas, o ON inibe as reacções de propagação da peroxidação lipídica e protege da oxidação os antioxidantes de baixo peso molecular, como o α -TOH.

O “par antioxidante” ON / α -TOH apresentou maior capacidade antioxidativa do que o α -TOH isoladamente ou associado ao ascorbato⁷⁹³.

8 - Oxidação / Antioxidação e Genética

Na patogénese de doenças complexas como a aterosclerose estão muito provavelmente envolvidos factores ambientais e de susceptibilidade genética. É difícil determinar o peso relativo de cada um e as relações existentes entre o que é herdado e o que é adquirido. Assim, a contribuição genética para uma determinada doença pode variar segundo o nível de exposição ambiental, e este terá diferentes efeitos no indivíduo consoante o seu “currículo genético”.

Em 52 homens e 51 mulheres jovens, saudáveis, não fumadores e sem influência de qualquer antioxidante, determinaram-se os TBARS plasmáticos ($2,32 \pm 0,11$ nos H e $1,87 \pm 0,09$ nmol/mL na M; $p < 0,01$) e os F2-isoprostanos urinários (292 ± 5 nos H e 164 ± 25 pg/mg de creatinina nas M; $p < 0,05$), demonstrando-se que o stresse oxidativo era superior no homem do que na mulher pré-menopausica. Os níveis plasmáticos da superóxido dismutase, da catalase e da vitamina E não explicaram as diferenças entre os dois sexos. Nos homens, a suplementação durante quatro semanas com 300 mg de Vit E e 600 mg de Vit C reduziu significativamente os níveis dos marcadores da oxidação ($p < 0,01$ e $< 0,05$ dos TBARS e dos F2-isoprostanos, respectivamente)⁷⁹⁴.

Em 1337 membros de 40 famílias do *San António Family Heart Study*, homens e mulheres, com idades entre os 15 e os 85 anos, demonstrou-se que o *total antioxidant status* (TAS), depois de ajustado para co-variáveis, era em 51% dependente de factores genéticos ($p < 0,001$), verificando-se igualmente uma significativa interacção entre o tabaco e a genética ($p < 0,05$). Nos fumadores, os genes contribuíram em 83% para a variabilidade do TAS e nos não fumadores, em apenas 49%⁷⁹⁵. Segundo os autores, esta diferença poderá estar relacionada com uma maior oxidação induzida pelo tabaco, ou com uma inibição dos mecanismos antioxidantes nos fumadores. Também é possível que o mecanismo pelo qual o tabaco induz o stresse oxidativo esteja sob controlo genético, e/ou que a resposta antioxidante ao stresse oxidativo dele dependente seja geneticamente regulada. É igualmente admissível que o tabaco esgote as defesas antioxidantes extrínsecas e revele as intrínsecas, genéticas.

No mesmo estudo, o TAS foi significativamente inferior nas mulheres ($1,675 \pm 0,004$ versus $1,805 \pm 0,005$ mmol/L ; $p < 0,001$), reduzindo-se de uma forma notória com a idade nos homens ($p < 0,01$). Esta diferença entre os dois sexos, contrariada pela maior susceptibilidade dos homens à doença vascular aterosclerótica, é, no mínimo, inesperada. Para os autores, o maior nível do TAS pode reflectir uma resposta a um maior stresse oxidativo nos homens.

Um trabalho realizado em Hong Kong comparou o TAS numa população chinesa, com baixa incidência de doença cardiovascular, com o de uma população de indivíduos caucasianos. A capacidade antioxidante plasmática total dos chineses foi significativamente superior à dos caucasianos, contrariamente à incidência e mortalidade por doença coronária e à concentração do colesterol, com muito maior expressão nestes últimos. Segundo os autores, as principais substâncias plasmáticas que contribuíram para o TAS foram a albumina, o ácido úrico, o ascorbato, o α -tocoferol e a bilirrubina, por ordem decrescente de importância⁷⁹⁶.

Dos possíveis genes responsáveis pela variação do TAS salientam-se como mais importantes:

- O gene da paroxonase (PON1) que, como vimos atrás, é uma importante enzima antioxidante associada às Lipoproteínas HDL.

Baixos níveis de actividade da PON1 estiveram associados com a doença carotídea e a extensão da estenose coronária ($p < 0,05$). A variação da PON1 devida aos polimorfismos do seu gene, PON1₁₉₂ e PON1₅₅, poderá ter contribuído para a variabilidade do TAS e da doença vascular^{797 798}.

- O gene da mieloperoxidase (MPO), uma enzima produzida pelas células fagocíticas activadas e capaz de produzir espécies reactivas, tais como o radical tirosil, é outro possível responsável pela variabilidade do estado *redox*.⁷⁹⁹

- Genes com potenciais capacidades para alterar os níveis da TAS são os das lipoxigenases e os das superóxido dismutases.

Tal como existe um grande número de factores ambientais que influenciam o TAS, é igualmente provável que existam múltiplos genes, alguns por identificar, com capacidade de alterar o nosso estado *redox*.⁸⁰⁰

Em ratos Ath-1 demonstrou-se que o componente genético controlava a acumulação dos peróxidos lipídicos nos tecidos e as respostas celulares a estes produtos da oxidação lipídica. Segundo os autores do trabalho, a oxidação

lipídica poderá ser influenciada por vários genes, envolvidos uns na produção (lipoxigenase) e outros na eliminação (heme oxigenase, superóxido dismutase, glutathiona) dos radicais livres de oxigénio. O mesmo estudo chamou a atenção para a relação entre a modulação genética do stresse oxidativo e a activação de genes inflamatórios envolvidos na aterogénese⁸⁰¹.

9 - Inflamação e Aterosclerose

Presentemente é consensual o papel da inflamação no desencadear e na progressão das lesões de aterosclerose, acumulando-se evidências sobre os mecanismos inflamatórios subjacentes às complicações vasculares, nomeadamente síndromes coronárias agudas e sobre a sua importância como indicadores diagnósticos e prognósticos⁸⁰².

Será certamente oportuna uma alusão, ainda que sumária, a algumas moléculas com acções extremamente importantes nos mecanismos inflamatórios e imunológicos, magistralmente discutidos e explicados por Russel Ross⁸⁰³.

9.1 - Factores de crescimento e citocinas

Embora as citocinas sejam classicamente consideradas como mediadores da imunidade e inflamação e os factores de crescimento como indutores da proliferação celular, estes papéis nem sempre são tão distintos, podendo a mesma molécula comportar-se como regulador inflamatório e do crescimento. Para aumentar a complexidade destes processos, os factores de crescimento podem inibir a proliferação celular e comportar-se como factores quimiotáticos.

O *platelet-derived growth factor* (PDGF), o *basic fibroblast growth factor* (bFGF), o *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF), o *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), a *interleukin-1* (IL-1), o *tumour necrosis factor α* (TNF α) e o *transforming factor β* (TGF β) são alguns dos factores de crescimento mais importantes. Todas estas moléculas podem induzir a proliferação do músculo liso. Não se encontram habitualmente presentes em quantidades significativas na parede arterial normal, estando a sua expressão significativamente aumentada nas lesões de aterosclerose.

A quimiotaxia é um processo crítico na inflamação em geral e no desenvolvimento da aterosclerose e reestenose em particular. É um processo necessário para atrair os leucócitos circulantes para o espaço sub-endotelial e as células musculares lisas da média para a íntima da parede arterial. Os *colony-stimulating factors* (CSFs), o *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), as *oxidized low-density lipoprotein* (OxLDL) e o TGF β induzem a quimiotaxia dos monócitos e a sua transmigração endotelial, enquanto que o PDGF e o IGF-1 induzem a quimiotaxia das células musculares lisas.

As citocinas IL-1, TNF α , interferão gama (IFN gama) e a IL-2, juntamente com os CSFs, são moduladores da resposta inflamatória a nível do endotélio.

Nos estadios mais avançados da aterogénese as lesões adquirem uma capa fibrosa, irrigada por uma rede de capilares e vénulas. A formação destes pequenos vasos está na dependência de determinados factores angiogénicos, tais como o *fibroblast growth factor* (bFGF), e desempenham um papel decisivo quanto à fissuração e/ ou à ruptura da placa, causando hemorragia para o lúmen do vaso e desencadeando os fenómenos trombóticos.

Todos estes factores que têm vindo a ser referidos não actuam isoladamente na aterogénese; através de uma autêntica rede de interacções celulares, a libertação de uma molécula induz a expressão de uma outra molécula numa célula alvo, podendo esta activação estender-se de uma forma parácrina às células vizinhas.

Um exemplo deste tipo de interacção é o que se passa quando a IL-1 e o TNF α , libertados pelos macrófagos activados nas lesões de aterosclerose, induzem a expressão do gene do PDGF nas células musculares lisas^{804 805}.

Peças de endarterectomia carotídea humana contêm quantidades aumentadas do RNA mensageiro para o PDGF e para o *c-fms*, o proto-oncogene que codifica o receptor do M-CSF nos macrófagos e células musculares lisas⁸⁰⁶.

Existem diversas defesas fisiológicas controladoras das citocinas e dos factores de crescimento.

A maioria destas moléculas pró-inflamatórias tem uma semi-vida plasmática curta devida, em parte, à sua ligação a proteínas, tais como a α 2 macroglobulina. Esta proteína liga-se e impede a acção do PDGF, do TGF β , da IL-1, da IL-6 e do b-FGF.

A heparina produzida pelas células endoteliais e musculares lisas inibe a migração e a proliferação destas últimas células.

Outras proteínas da matriz tais como a fibronectina e a laminina também têm capacidade para alterar o fenótipo das células musculares lisas e a sua capacidade para responder aos factores quimiotácticos e de crescimento. Estas moléculas modificam os receptores de adesão inter-celulares, tais como as integrinas, que, ao serem inibidas, interferem nas respostas celulares aos factores de crescimento e às citocinas.

Os leucócitos responsáveis pelas defesas do organismo localizam-se nas lesões iniciais de aterosclerose, não só nos animais de experiência mas também nos humanos. Estas células não se ligam ao endotélio normal mas, após uma dieta aterogénica, as células endoteliais começam a exprimir moléculas de adesão que permitem a ligação dos glóbulos brancos⁸⁰⁷.

Uma dessas moléculas é a *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) que se liga aos monócitos e linfócitos T, os principais tipos de células inflamatórias existentes nas placas de aterosclerose. A reforçar o papel desta molécula de adesão, macacos *Knockout* para o gene da VCAM-1 mostraram uma progressão significativamente menor das lesões de aterosclerose⁸⁰⁸.

Estas moléculas de adesão encontram-se em maiores concentrações nos locais mais propensos ao desenvolvimento das lesões de aterosclerose, tais como as ramificações arteriais, locais aonde se verificam as maiores alterações do fluxo. A ausência do normal *shear stress* (tensão de cisalhamento) laminar acompanha-se de uma reduzida produção local de Óxido Nítrico endotelial, que, como se sabe, apresenta propriedades vasodilatadoras, anti-inflamatórias e reduz a expressão da VCAM-1⁸⁰⁹.

Os fluxos alterados e o aumento do stresse da parede arterial promovem a produção de proteoglicanos pelas células musculares lisas, tendo estas moléculas capacidades para reter as lipoproteínas e facilitar a sua oxidação⁸¹⁰.

O MCP-1 é responsável pela migração dos monócitos, assim como outros factores quimiotácticos atraem os linfócitos⁸¹¹. Uma vez na íntima arterial, os monócitos, sob a acção do M-CSF, transformam-se em macrófagos, capazes de induzir e perpetuar as respostas inflamatórias⁸¹².

Como já foi dito, os macrófagos possuem diversos receptores para as OxLDL, permitindo a acumulação intracelular destas lipoproteínas modificadas e transformando-se nas características *foam-cells*.

Os linfócitos T activados produzem diversas citocinas inflamatórias, tais como o INF-gama e o TNF- β , que estimulam os macrófagos, as células endoteliais e as células musculares lisas⁸¹³.

À medida que o processo inflamatório progride, os monócitos / macrófagos, os linfócitos T e outras células arteriais produzem peróxidos lipídicos, factores quimiotácticos, moléculas de adesão e citocinas, que ampliam e perpetuam o processo inflamatório e a formação da lesão⁸¹⁴. Verifica-se igualmente a libertação de mediadores fibrogénicos, incluindo factores de crescimento, que promovem a replicação das células musculares lisas; estas células produzem a matriz extracelular, característica das lesões ateroscleróticas mais avançadas⁸¹⁵.

Os fenómenos inflamatórios contribuem igualmente para o desencadear das complicações trombóticas da placa de aterosclerose. A maioria dos trombos arteriais tem origem na ruptura da capa fibrosa da placa, um processo complexo para o qual dá uma importante contribuição a produção pelos macrófagos das metaloproteinases, com propriedades proteolíticas.

As placas ateroscleróticas instáveis apresentam um grande número de células inflamatórias, tais como os macrófagos, com uma expressão aumentada de metaloproteinases da matriz (MMP). Destas enzimas proteolíticas salientam-se a MMP-1 ou colagenase-1, a MMP-3 ou estromelisina-1 e a MMP-9, ou gelatinase-B.

Para além de produzirem enzimas proteolíticas, os macrófagos induzem a apoptose das células musculares lisas por contacto celular directo, através da interacção Fas (CD95, expresso nas células musculares lisas) / Fas-L (Fas-Ligante, presente nos macrófagos activados)⁸¹⁶ e da activação dos próprios receptores TNF⁸¹⁷.

O INF-gama, produzido pelos linfócitos T, inibe a produção de colagénio pelas células musculares lisas, contribuindo para o enfraquecimento da placa de ateroma, favorecendo a ruptura e a posterior trombose^{818 819}.

Ao produzirem factor tecidual, os macrófagos contribuem decisivamente para as complicações trombóticas da placa⁸²⁰.

Níveis circulantes elevados de marcadores inflamatórios, tais como a proteína C reactiva (PCR), a amilóide sérica A (SSA), a IL-6 e o antagonista do receptor da IL-1, estão habitualmente presentes nos eventos vasculares isquémicos, nomeadamente nas síndromes coronárias agudas, correlacionando-se com o prognóstico. Para além de poderem reflectir a necrose do miocárdio, a lesão por reperfusão e a extensão da aterosclerose, estas proteínas de fase aguda têm um papel activo nos mecanismos inflamatórios e imunológicos.

Todos estes factores inflamatórios necessitam para a sua expressão da prévia transcrição dos respectivos genes, dependendo da activação de factores transcricionais extremamente importantes nos processos inflamatórios, dos quais se salienta o NF- κ B.

Este factor de transcrição tem um papel central no início e na manutenção do processo de aterosclerose. A sua activação é controlada por uma família de inibidores (I κ Bs), que se ligam ao NF- κ B e o retêm no citoplasma, impedindo a sua translocação nuclear. Diversos estímulos activam este factor de transcrição através da fosforilação dos I κ Bs e posterior libertação do NF- κ B, que, por sua vez, activa um conjunto de genes alvo (citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão) e o gene do próprio I κ B.

A estimulação do I κ B inibe a activação do NF- κ B e a expressão dos genes dele dependentes. Este mecanismo de auto-regulação permite que a activação do NF- κ B seja transitória e que a célula activada regresse ao estado de repouso⁸²¹.

A activação do NF- κ B depende de vários indutores, entre os quais alguns dos factores de risco cardiovascular clássicos. Salientam-se o stresse oxidativo⁸²², as dislipidemias (particularmente as LDL nativas e oxidadas mas também as VLDL)^{823 824 825 826}, a HTA, a Ag II^{827 828 829}, a diabetes e os AGE^{830 831}, a homocisteína^{832 833} e as infecções^{834 835}.

Para além de coordenar a expressão de um grande número de genes inflamatórios, o NF- κ B induz outros de moléculas protectoras. Assim, a activação do NF- κ B desencadeia uma resistência à apoptose, através da expressão de inibidores das proteínas pró-apoptóticas e da supressão da activação das caspases⁸³⁶. Na aterogénese, a indução de genes supressores da apoptose é um importante mecanismo na prevenção da morte celular induzida pela inflamação.

Sendo a aterosclerose um processo segmentar que atinge locais preferenciais da árvore arterial, é interessante reconhecer que a expressão do NF-kB tem uma predilecção pelas zonas mais vulneráveis à aterogénese.

Este facto foi demonstrado num trabalho em que se utilizaram aortas de rato e em que se verificou um significativo aumento do NF-kB na porção ascendente e no arco aórtico⁸³⁷.

Os mecanismos, pelos quais as forças exercidas pelo fluxo sanguíneo nas células endoteliais da parede activam determinadas moléculas, como o NF-kB, merecem a continuação de intensa investigação.

9.2 - Marcadores Inflamatórios e o risco de DCV

Estudos epidemiológicos de grande escala realizados em homens e mulheres, aparentemente saudáveis, mostraram uma relação positiva entre os níveis das proteínas de fase aguda e a ocorrência de futura doença cardiovascular.

Em estudos prospectivos demonstrou-se um risco vascular aumentado em indivíduos com níveis basais altos de IL-6 e TNF- α ^{838 839 840 841}, ICAM-1, selectina-P e selectina E^{842 843 844} e proteínas de fase aguda tais como a PCR, o fibrinogénio e a SAA^{845 846 847 848 849 850 851}.

A diabetes e a obesidade acompanham-se frequentemente da elevação dos marcadores inflamatórios sendo esta associação explicada, em parte, pela capacidade do tecido adiposo de sintetizar citocinas pró-inflamatórias.

Uma perturbação da imunidade inata pode fazer a ligação entre a obesidade, a aterosclerose acelerada e a insulino resistência⁸⁵². De acordo com esta hipótese, os níveis elevados da IL-6 e da PCR estão associados ao desenvolvimento da aterosclerose e ao surgimento da diabetes 2, mesmo em indivíduos sem insulino resistência⁸⁵³.

9.2.1 - Proteína-C-Reactiva (PCR)

Para utilização clínica o biomarcador mais frequentemente avaliado é a PCR, um marcador de fase aguda e membro da família das pentraxinas, pertencentes à imunidade inata. Ao contrário de outras proteínas / citocinas, a

PCR apresenta uma longa semi-vida, conferindo-lhe uma estabilidade nos seus níveis séricos sem grande variação circadiana⁸⁵⁴.

A PCR é de síntese essencialmente hepática, sob a influência de citocinas tais como a IL-6 e o TNF- α . Estas moléculas, fortemente pró-inflamatórias, são sintetizadas pelo tecido adiposo, o que pode justificar o relacionamento existente entre a obesidade abdominal e a doença cardiovascular.

A PCR é facilmente determinada em ambulatório através de métodos altamente sensíveis, com uma boa relação custo-eficácia, com resultados sobreponíveis no plasma fresco e congelado⁸⁵⁵.

Os métodos comuns para a determinação da PCR possuem um limite inferior de deteção de 3 a 8 mg / L, sem sensibilidade para a previsão do risco vascular.

Diversos métodos ditos de “alta sensibilidade” ou “ultra sensíveis” estão comercialmente disponíveis e têm sido utilizados nos estudos clínicos⁸⁵⁶.

Quando se utiliza a PCR como marcador de risco vascular, deve evitar-se a sua determinação nas duas ou três semanas após uma infecção ou outra doença aguda.

Indivíduos com doenças inflamatórias crónicas, tais como a artrite reumatóide ou o lúpus eritematoso disseminado, apresentam níveis da PCR acima dos considerados normais, o que limita a sua utilização como marcador de risco vascular.

No entanto, na maioria das situações, os níveis de PCR determinados por métodos de alta sensibilidade mantêm-se estáveis ao longo do tempo.

A determinação desta proteína por métodos de alta sensibilidade, em homens e mulheres americanos, mostrou que menos de 2% de todos os valores encontrados eram superiores a 1,5 mg/L um nível indicador de doença inflamatória clinicamente relevante. Uma segunda determinação dentro de 2 a 3 semanas deve ser realizada para excluir a possibilidade de uma infecção recente⁸⁵⁷.

A PCR está envolvida em múltiplos e importantes mecanismos inflamatórios e imunológicos. Activa o complemento, induz a expressão de moléculas de adesão e do factor tecidual, facilita a captação das LDL pelos macrófagos, aumenta a produção do MCP-1 e da IL-8 e estimula o recrutamento dos monócitos para a parede arterial^{858 859 860 861 862}.

Reforçando a sua acção na aterogénese, a PCR para além de estimular a produção de factores quimiotácticos, é ela própria quimiotáctica para os monócitos e opsoniza as lipoproteínas com Apo B, facilitando a sua captação celular e a formação das *foam-cells*. Os principais receptores macrofágicos para os complexos lipoproteínas-PCR são o PCR-R (PCR-receptor) e o CD32⁸⁶³.

Curioso é o efeito anti-quimiotáctico da PCR sobre os neutrófilos, podendo ser esta uma possível explicação para a quase ausência de neutrófilos nas lesões de aterosclerose⁸⁶⁴.

Dada a importância da angiotensina na patogénese da aterosclerose, avaliaram-se os efeitos da PCR humana recombinada, nas doses de 0 a 100 µg/ml, na transcrição do gene e na expressão da proteína do receptor da angiotensina-1 (AT₁-R), em células musculares lisas humanas. A PCR aumentou significativamente a concentração dos AT₁-R (p<0,001) e as acções da Ag, nomeadamente na migração (p<0,01), na proliferação celular (p<0,01) e na produção de radicais livres de oxigénio (p<0,01)⁸⁶⁵.

Existem múltiplos estudos que demonstram o valor da PCR como factor preditivo de futura doença cardiovascular.

Os sobreviventes de síndromes coronárias agudas com PCR elevada no momento da alta, apresentaram maior frequência de episódios coronários recorrentes relativamente aos indivíduos com valores menos elevados⁸⁶⁶.

Contrariamente aos doentes com EAM ou angina instável, os que apresentaram coronariopatia grave e angina pectoris estável tiveram menor incidência de PCR elevada⁸⁶⁷.

Em 32 doentes com angina pectoris estável, 31 com angina instável e 29 com enfarte agudo do miocárdio, a PCR estava aumentada (> 3 mg/L) em 13% dos primeiros, em 65% dos segundos e em 76% dos doentes com EAM⁸⁶⁸.

Resultados semelhantes, foram encontrados numa outra avaliação em que, os valores da PCR à entrada, eram significativamente superiores nos doentes com SCA (20,8±8,8 mg/L), relativamente aos doentes com AE (4,1±0,8 mg/L) e aos controlos sem doença (5,1±1,8 mg/L) (p<0,05)⁸⁶⁹.

Níveis de PCR > 3mg/L estavam presentes em menos de 10% dos indivíduos sem doença coronária, em menos de 20% dos que apresentavam angina estável ou variante anginosa, em mais de 65% dos que tinham angina instável e em mais de 90% dos que sofreram um EAM com prévia angina

instável. Contrariamente a estes últimos, nos doentes com EAM não precedido por angina instável, a prevalência de PCR elevada foi inferior a 50%^{866 870}. A ausência de PCR elevada em mais de 30% dos doentes com angina instável e em mais de 50% dos que sofreram um EAM não precedido por angina instável sugere uma heterogeneidade da acção dos mecanismos inflamatórios nas síndromes coronárias⁸⁷¹.

Estudos *in vitro* demonstraram que a produção de IL-6 por monócitos de indivíduos com angina instável e níveis séricos elevados de PCR e de IL-6, excedia significativamente a produção da mesma citocina pelos monócitos de indivíduos clinicamente semelhantes, mas com valores normais de PCR e de IL-6⁸⁶⁶.

Estas diferenças verificadas no grau de resposta inflamatória e na relação desta com a doença clínica poderão ter uma base genética; certos haplotipos do gene responsável pelo complexo IL-1 / antagonista receptor IL-1, correlacionaram-se com exageradas respostas inflamatórias e com a gravidade da doença coronária aterosclerótica⁸⁷².

Num estudo realizado em 917 doentes com angina instável ou EAM nas últimas 72 h, determinaram-se os níveis séricos da troponina T, da PCR e do fibrinogénio e avaliou-se o seu valor preditivo de futura morte cardíaca. Relativamente à PCR, determinada às 12 e às 24 h, a morte por causa cardíaca esteve presente em 5,7% dos participantes com níveis inferiores a 2 mg/L, em 7,8% dos que apresentavam valores entre 2 e 10 mg/L ($p=0,29$) e em 16,5% nos indivíduos com valores superiores a 10 mg/L ($p=0,001$). O maior risco de morte cardíaca, nos doentes com níveis mais elevados de PCR, continuou a verificar-se durante anos⁸⁷³.

Em 450 indivíduos com EAM sem elevação de ST, determinaram-se nas primeiras 72 h os níveis de Troponina I, PCR e do BNP. A simultaneidade da presença de valores elevados de uma, duas ou três destas variáveis, conferiu um RR de morte, EAM e/ou IC de, respectivamente, 2,1 ($P=0,006$), 3,1 ($P<0,001$) e 3,7 ($P=0,001$)⁸⁷⁴.

Em peças de aterectomia de trinta e nove doentes coronários comprovou-se por imunorreactividade a presença de PCR, a sua correlação com a PCR sérica e com a instabilidade da placa. Verificou-se igualmente uma co-localização arterial desta proteína com o p22^{phox}, um componente essencial da

NADH/NADPH oxidase. A co-incubação das células musculares lisas da artéria coronária humana com a PCR, resultou no aumento da expressão da proteína p22^{phox} e da formação de espécies reactivas de oxigénio. Concluíram os autores que a expressão da PCR nas artérias coronárias se associava com características histológicas e clínicas de instabilidade da placa, possuindo esta proteína de fase aguda um efeito pró-oxidante nas células musculares lisas⁸⁷⁵.

A determinação dos níveis séricos da PCR, em estudos de prevenção primária, tem-se mostrado igualmente preditivo da doença cardiovascular.

Estudos epidemiológicos prospectivos em adultos e idosos, demonstraram que os níveis elevados da PCR se comportaram como factor de risco para a doença coronária, o AVC e a doença arterial periférica sintomática⁸⁷⁶.

Num estudo prospectivo em mais de 1500 homens com idades compreendidas entre os 40 e os 59 anos, os que apresentavam níveis basais de PCR no maior tercil tiveram um RR de 2,13 (IC 95%; 1,38 a 3,28) de eventos vasculares, após ajustamento para outros factores de risco, relativamente aos que apresentavam menores níveis⁸⁷⁷.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados em indivíduos do sexo feminino^{878 879}.

Em indivíduos saudáveis não diabéticos, a PCR e a IL-6 mostraram estar positivamente relacionadas com a resistência à insulina ($p < 0,00005$)⁸⁸⁰.

No *Women`s Health Study*, conduzido em mulheres saudáveis pós-menopáusicas, as que desenvolveram doença cardiovascular tinham maiores níveis de PCR de base ($p = 0,0001$) do que as participantes que se mantiveram livres de doença. As mulheres com maiores níveis de PCR apresentaram um RR de DCV de 4,8 (95% IC 2,3 a 10,1; $p = 0,0001$)⁸⁸¹.

Os estudos *MONICA/KORA*, que avaliaram prospectivamente mais de 10 000 homens e mulheres saudáveis, com idades compreendidas entre os 35 e os 74 anos, demonstraram uma correlação positiva entre os valores basais da PCR (2,5 versus 1,5 e 2,8 versus 1,4 mg/L, homens e mulheres, $p < 0,001$) e da IL-6 (3,0 versus 2,1 e 3,4 versus 1,9 pg/ml, homens e mulheres, $p < 0,001$) com a ocorrência de futura doença cardíaca coronária⁸⁸².

No *Cardiovascular Health Study*, que incluiu 4510 idosos, determinaram-se os níveis séricos de vários biomarcadores da inflamação e da hemostase e a sua possível relação com a ocorrência da doença cardiovascular. Durante os 9

anos de duração do estudo ocorreram 1700 eventos, verificando-se uma correlação entre alguns dos biomarcadores e a doença vascular. Os participantes que apresentavam níveis elevados de IL-6, PCR, D-dímeros, homocisteína, leucócitos, factor VIII e Lp(a), tinham um RR de vir a sofrer de patologia vascular de, respectivamente, 1,16 (1,09 a 1,23), 1,16 (1,09 a 1,23), 1,13 (1,05 a 1,21), 1,17 (1,09 a 1,25), 1,06 (1,00 a 1,12), 1,06 (1,00 a 1,12) e 1,07 (1,00 a 1,13)⁸⁸³.

Em 14 719 mulheres sem doença cardiovascular e com síndrome metabólica, a simultaneidade de níveis elevados da PCR potenciou significativamente o risco cardiovascular. Quando presentes pelo menos três elementos da síndrome metabólica, a incidência de doença cardiovascular das mulheres com PCR > ou < a 3,0 mg/L foi, respectivamente, de 5,9 e 3,4 por mil pessoas-ano ($p < 0,001$)⁸⁸⁴. No mesmo estudo, as participantes com 0, 1, 2, 3, 4 e 5 elementos da síndrome metabólica, tinham valores médios de PCR de, respectivamente, 0,68, 1,09, 1,93, 3,01, 3,88, e 5,75 mg/L ($P < 0,0001$).

No *West of Scotland Coronary Prevention Study* (WOSCOPS), em mais de 6000 homens de meia idade e depois da estratificação para a presença ou ausência de síndrome metabólica, verificou-se uma correlação significativa entre os níveis de PCR (> ou < a 3 mg/L) e o risco de futura doença coronária. Nos indivíduos com baixa PCR /sem síndrome metabólica, alta PCR / sem síndrome metabólica, baixa PCR / com síndrome metabólica e alta PCR / com síndrome metabólica, o RR de doença coronária foi, respectivamente, de 1,0, 1,6, 1,6 e 2,8 (todos os valores com $p < 0,05$)⁸⁸⁵.

Também em 1640 homens e mulheres com idade média de 50 ± 10 A e com síndrome metabólica, as concentrações da PCR foram significativamente inferiores nos indivíduos com uma melhor, comparativamente aos que apresentavam uma pior condição cardiorrespiratória ($p \leq 0,001$)⁸⁸⁶.

Determinaram-se os níveis da hsPCR em 27 939 mulheres saudáveis e o seu valor preditivo relativamente à ocorrência de EAM, AVC, revascularização coronária e morte cardiovascular. Os níveis da PCR foram divididos em quintis, <0,5, 0,5 a <1, 1 a <2, 2 a <3, 3 a <4, 4 a <5, 5 a <10, 10 a <20 e ≥ 20 mg/L e o RR de vir a sofrer de doença cardiocerebrovascular foi, respectivamente, de 1,0, 2,2, 2,5, 3,1, 3,7, 4,2, 4,9, 6,3, e 7,6 ($p < 0,001$). Depois de ajustado para o Score

de Risco de Framingham (SRF), o respectivo risco foi de 1,0, 1,6, 1,6, 1,7, 1,9, 2,2, 2,3, 2,8 e 3,1 ($p < 0,001$)⁸⁸⁷.

Resultados semelhantes foram obtidos no *Physicians Health Study* em que, após ajuste para o SRF, o RR de futuro EAM para níveis de PCR < 1 , de 1 a 3 e > 3 mg/L foi, respectivamente, de 1,0, 1,7 e 2,2⁸⁸⁸.

Avaliou-se a relação entre a PCR e a espessura da média-íntima carotídea em 1051 indivíduos dos dois sexos, sem doença cardiovascular, dislipidémicos, tendo-se encontrado uma associação positiva entre as duas, ($p < 0,0001$) que se manteve apenas para os homens após análise multivariada ($p < 0,0007$)⁸⁸⁹. Este facto aponta para uma possível utilização da PCR na avaliação da aterosclerose sub-clínica.

Em 47 doentes com artrite reumatóide, determinaram-se os valores da VS e da PCR, assim como a sua possível relação com a espessura da média-íntima carotídea. Não se verificou qualquer relação entre a VS e as alterações vasculares, mas já em relação à PCR, foi encontrada uma correlação positiva entre os valores desta proteína e a espessura da média-íntima ($p = 0,009$). Os autores concluíram que nesses doentes com AR, a intensidade da resposta inflamatória, avaliada pelos níveis da PCR, se correlacionou com a aterosclerose sub-clínica⁸⁹⁰.

Para além de se comportar como um método simples e eficaz para avaliar a inflamação de baixo grau e prever a ocorrência de futura doença vascular, a PCR pode, igualmente, ajudar na decisão da terapêutica, farmacológica ou não, particularmente na prevenção primária do EAM e do AVC. Como veremos, diversos estudos experimentais e clínicos têm demonstrado potencial acção antiinflamatória de alguns hipolipemiantes, particularmente das estatinas e dos fibratos, pelo que estes fármacos poderão ser especialmente eficazes nos indivíduos que apresentem uma inflamação crónica de baixo grau.

O primeiro estudo a demonstrar a capacidade da PCR para seleccionar os indivíduos que mais beneficiariam da terapêutica com estatinas foi o *Cholesterol and Recurrent Events study* (CARE), um estudo de prevenção secundária, que demonstrou uma significativa relação entre os níveis da PCR e a doença coronária recorrente ($p = 0,05$)⁸⁹¹. A redução do risco conseguida com a pravastatina foi superior nos doentes que apresentavam valores de PCR de base mais elevados, verificando-se uma redução significativa dos valores desta

proteína de fase aguda nos doentes medicados com a estatina (-17,4%; $p=0,004$), não sendo a redução explicada pelas alterações dos valores do colesterol^{892 891}. Estudos clínicos com outras estatinas (cerivastatina, lovastatina, sinvastatina e atorvastatina) obtiveram resultados semelhantes na redução dos valores séricos da PCR^{893 894 895 896}. Destes estudos, o *Pravastatin Inflammation CRP Evaluation* (PRINCE) foi especialmente desenhado para avaliar a acção antiinflamatória das estatinas, traduzida pelas alterações da PCR sérica. Incluiu 2884 participantes dos dois sexos, alguns com doença vascular conhecida (1182) e outros em prevenção primária (1702). Os indivíduos foram randomizados para receber 40 mg/dia de pravastatina ou placebo. Apesar de 30% estarem igualmente medicados com ácido acetilsalicílico, os participantes que receberam a pravastatina, comparativamente aos que tomaram o placebo, viram os níveis de PCR reduzidos em 16,9% no grupo da prevenção primária ($p<0,001$) e em 13,1% no grupo de prevenção secundária ($p<0,005$). Este efeito foi observado logo às 12 semanas e foi independente de outros factores de risco, nomeadamente do sexo, da idade, dos hábitos tabágicos, do índice de massa corporal, dos valores dos lípidos ou da existência de diabetes⁸⁹⁷.

Num importante estudo de prevenção primária, o *Air Force / Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study* (AFCAPS/TexCAPS), com 5742 indivíduos distribuídos por quatro grupos com base nos valores iniciais dos lípidos e da PCR, os níveis desta proteína foram avaliados no início e após terapêutica com lovastatina. Esta estatina, para além de reduzir os níveis de PCR em 14,8% ($p<0,001$), independentemente das alterações do colesterol, reduziu significativamente os eventos coronários nos indivíduos com valores iniciais de colesterol LDL superiores a 149,1 mg/dl ($p=0,005$). O referido fármaco, reduziu também a doença coronária nos que apresentavam valores do LDL inferiores a 149,1 mg/dl mas com níveis de PCR superiores a 1,6 mg/L (RR 0,58; IC 95% de 0,34 a 0,98; $p=0,04$). Em contraste, a lovastatina não beneficiou os participantes com baixos valores de LDL e PCR^{898 899}.

Do AFCAPS/TexCAPS puderam ser extraídas importantes conclusões:

1 – Confirmação do valor da PCR como factor de risco de futura doença coronária e a utilidade da avaliação conjunta dos lípidos e da PCR na previsão do risco vascular.

2 – Demonstração da eficácia das estatinas nos indivíduos aparentemente saudáveis e com dislipidemias que não obrigam a terapêutica farmacológica, mas com valores elevados da PCR (cerca de metade dos EAM e dos AVC ocorrem neste tipo de indivíduos).

Embora em menor número, existem estudos que demonstram o valor preditivo da PCR relativamente à doença cérebro-vascular, independentemente dos factores de risco clássicos^{900 901 902}.

No estudo de Framingham, os níveis basais da PCR comportaram-se como um significativo e independente factor preditivo do acidente vascular cerebral (AVC), chamando mais uma vez a atenção para o papel determinante dos mecanismos inflamatórios na instabilidade da placa e na ocorrência da doença clínica. Os indivíduos do sexo masculino e feminino com PCR no maior quartil apresentaram um RR de AVC de 2,0 ($p=0,027$) e de 2,7 (0,0003), respectivamente⁹⁰³.

Em 6 603 homens seguidos durante 19 anos avaliou-se a relação entre 5 marcadores inflamatórios (α 1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, orosomucoide e fibrinogénio), o colesterol e a doença cardiocerebrovascular. Os indivíduos com hipercolesterolemia (> 251 mg/dl) e com pelo menos dois dos marcadores de inflamação no maior quartil, tinham um RR de morte vascular de 2,4 (IC 95% 1,8 a 3,3), de doença cardíaca de 2,3 (IC 95% 1,8 a 3,0) e de AVC isquémico de 2,1 (IC 95% 1,4 a 3,3) relativamente aos que apresentavam colesterol normal e menos de dois marcadores elevados. Enquanto que a hipercolesterolemia isolada se comportou como factor de risco independente para a doença coronária - RR 1,5 (IC 95% 1,2 a 1,9), apenas os indivíduos com elevação simultânea do colesterol e dos marcadores de inflamação é que tinham um maior risco relativo de AVC - 1,9 (IC 95% 1,3 a 2,8)⁹⁰⁴. Os autores sugeriram que a inflamação pode ter tido maior significado como factor de risco do AVC isquémico do que do EAM e apontaram este facto como uma possível explicação para os resultados contraditórios dos estudos que procuraram avaliar a relação entre a hiperlipidemia e o risco de AVC.

Em 1033 homens e mulheres participantes do *Rotterdam Scan Study*, com idades compreendidas entre os 60 e os 90 anos, procurou-se uma possível relação da PCR com a doença cerebral de pequenos vasos, utilizando a imagiologia de Ressonância Magnética Nuclear. Os maiores níveis da PCR

associaram-se positiva e significativamente a uma maior incidência e progressão das lesões peri-ventriculares e sub-corticais - RR 3,1 (IC de 95%; 1,3 a 7,2) e RR 2,5 (IC de 95%; 1,1 a 5,6) respectivamente⁹⁰⁵.

Em 2979 homens e mulheres com doença coronária estável, incluídos no *Bezafibrate Infarction Prevention*, o risco de AVC isquémico foi de 4,1% por mil pessoas /ano no menor *tercil* de PCR (<2,3 mg/L), de 5,9% por mil pessoas /ano no *tercil* médio (2,3 a 5,4 mg/L) e de 10,5% por mil pessoas /ano nos que apresentavam a proteína no maior *tercil* (>5,4 mg/L), diferenças estas estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Depois de ajustados para outros factores de risco, os valores da PCR no maior *tercil* associaram-se a um RR de 2,16 (95% IC, 1,32 a 3,53)⁹⁰⁶.

Será curioso comparar o poder preditivo da PCR com o de outros marcadores do risco vascular.

Diversos estudos prospectivos compararam a eficácia da homocisteína e da PCR, relativamente ao poder preditivo do risco vascular. Em todos eles, os níveis da PCR no percentil superior apresentaram maior capacidade de previsão da doença do que os correspondentes níveis de homocisteína^{907 908 909 910}.

Num estudo de coorte em 28 263 mulheres pós-menopausadas, saudáveis, determinaram-se os níveis da homocisteína, da lipoproteína (a), da PCR, de outros parâmetros inflamatórios e dos lípidos (CT, CLDL e CHDL) e a sua capacidade relativa na previsão do risco. Numa análise multivariada apenas a PCR, RR 1,5 (IC 95% 1,1 a 2,1) e a relação colesterol total / colesterol HDL, RR 1,4 (IC 95% 1,1 a 1,9), se comportaram como marcadores / factores de risco vascular independentes⁹¹¹.

A associação significativa ($p < 0,05$) entre a PCR e um maior risco vascular, manteve-se ao longo de quinze anos, facto demonstrado num estudo recente⁹¹².

No *Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 22* (PROVE IT-TIMI 22), vários factores de risco estiveram independentemente associados a concentrações mais elevadas da PCR. Foi o caso da idade >65 A, do sexo feminino (com ou sem terapêutica de substituição hormonal), do índice de massa corporal >25 Kg/m², do tabagismo, da concentração do CLDL > 70 mg/dl, da glicose > 110 mg/dl, do CHDL < 50 mg/dl, dos triglicerídeos > 150 mg/dl e da intensidade da terapêutica com estatinas⁹¹³.

9.2.2 - Determinação da PCR para avaliação do risco cardiovascular

Apesar da associação existente entre os níveis elevados da PCR e o risco cardiocerebrovascular, a dificuldade está na estratificação desse risco ao longo do espectro dos valores da proteína.

Uma hipótese será dividir os valores da PCR de uma determinada população em percentis. Esta metodologia foi utilizada em quatro estudos realizados nos Estados Unidos (Physicians Health Study, Women's Health Study, Women's Health Initiative e o Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study)^{914 915 916 917 918}.

Na avaliação do risco global, a determinação simultânea dos níveis da PCR e dos lípidos poderá potenciar o valor preditivo destes últimos.

Em homens saudáveis participantes do *Physicians Health Study*, em que se utilizaram na previsão do risco global a determinação dos níveis do colesterol e da PCR, verificou-se uma maior capacidade preditiva do risco, comparativamente à utilização isolada dos lípidos ($p < 0,003$)⁹¹⁹. Os valores considerados foram, para a PCR, $\leq 0,72$, $0,72$ a $1,69$ e $> 1,69$ mg/L, para o CT < 191 , 191 a 223 e > 223 mg/dl e para a relação CT / CHDL, $< 3,78$, $3,78$ a $5,1$ e $> 5,1$.

Em 27 939 mulheres americanas saudáveis, com 45 ou mais anos de idade, a distribuição por quintis dos valores da PCR foi $\leq 0,49$, $> 0,49$ a $1,08$, $> 1,08$ a $2,09$, $> 2,09$ a $4,19$ e $> 4,19$ mg/L. Em relação ao colesterol LDL a mesma população foi também dividida em quintis: $< 97,6$, $> 97,6$ a $115,4$, $> 115,4$ a $132,3$, $> 132,2$ a $153,9$ e $> 153,9$ mg / dl. A PCR comportou-se como um significativo factor preditivo da doença vascular ($p < 0,001$), independentemente de outros factores de risco e da terapêutica substitutiva hormonal⁹²⁰. A PCR foi mesmo um predictor de risco mais potente do que o CLDL (RR de $1,4$ a $2,3$ e $0,9$ a $1,5$, respectivamente $p < 0,001$) e os autores recomendaram que, na previsão de futura doença vascular, fossem determinados simultaneamente a PCR e o CLDL.

Outros autores preferem dividir os valores séricos da PCR em tercis, < 1 , 1 a 3 e > 3 mg/L, traduzindo, respectivamente, baixo, moderado e alto risco cardiovascular (Fig 2). Indivíduos com CLDL < 130 mg/dl e PCR > 3 mg/L,

representarão um grupo de alto risco cardiovascular, frequentemente sub-diagnosticado e sub-tratado (Fig 2)⁹²¹.

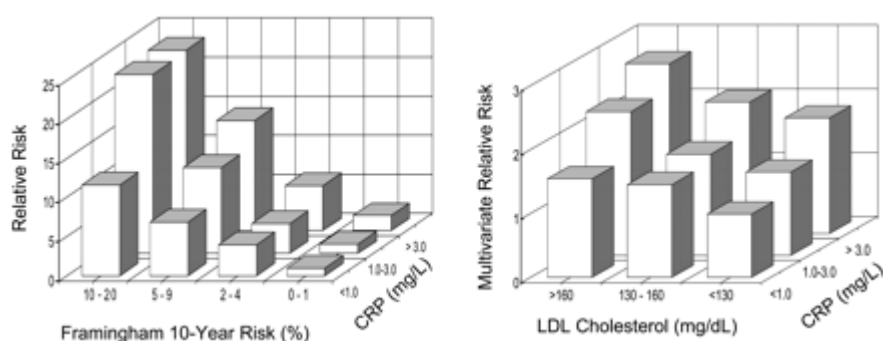


Fig 2: Valor prognóstico da PCR, independentemente do valor do C-LDL.

Os valores da PCR podem ter significado prognóstico mesmo entre os indivíduos considerados de baixo risco segundo os factores de risco clássicos.

Em mulheres pós-menopausicas saudáveis, os níveis da PCR foram um forte predictor do risco de qualquer doença vascular entre as não fumadoras, RR 4,5 ($p=0,001$), sem HTA, RR 2,8 ($p=0,03$), sem diabetes, RR 4,9 ($p=0,001$), sem dislipidemia, RR 3,9 ($p=0,002$) e sem história familiar de doença cardiovascular precoce, RR 6,6 ($p=0,001$)⁹²².

Também entre as mulheres com valores de CLDL inferiores a 130 mg / dl, as que apresentavam valores de PCR no maior quartil, viram o seu risco de futuro EAM, AVC e revascularização coronária, significativamente aumentado RR 4,1 (IC 95% de 1,7 a 11,3, $p=0,002$). Esta relação manteve-se depois de ajustado para o tabagismo, a idade, o índice de massa corporal, a HTA, a diabetes e a história familiar de doença coronária prematura - RR 3,1 (IC 95% de 1,1 a 8,3; $p=0,03$). Para todas as mulheres, a utilização da PCR em adição ao colesterol total e à relação CT/CHDL traduziu-se, respectivamente, num aumento da área sob a *receiver-operating-characteristic curve* (ROC) de 0,59 para 0,66 e de 0,64 para 0,68 ($p<0,001$)⁹¹¹.

Nas pessoas com baixo CLDL/alta PCR há uma grande prevalência da síndrome metabólica devendo ser determinada a glucose sérica em jejum⁹²³.

Uma recente metanálise de catorze estudos de coorte debruçou-se sobre a utilidade da determinação da PCR na avaliação global do risco. Nesta análise, ajustada para o tabagismo e para a maioria dos outros factores de risco

tradicionais, os indivíduos com níveis mais elevados de PCR tinham um risco de futura doença vascular duas vezes superior.

Depois de todas estas evidências, fica a dúvida sobre a indicação de tratar com hipolipemiantes os indivíduos que, apesar de normolipidémicos, apresentem valores elevados de PCR. Embora a análise de estudos como o AFCAPS/TexCAPS sugira que a terapêutica com estatinas pode ser eficaz nos indivíduos com baixos valores de LDL (< 149 mg / dl) e elevados de PCR (> 1,6 mg/L), a diferença no número de eventos vasculares entre o grupo placebo e o da estatina foi pequeno.

A PCR tem-se correlacionado com a mortalidade por todas as causas no idoso, considerando alguns autores que pode ser um marcador inespecífico de mau prognóstico.

Dadas as implicações em termos de saúde pública da prescrição de estatinas ou de outros hipolipemiantes a todos os indivíduos com baixo LDL/alta PCR⁹²⁴, aguardam-se os resultados de alguns estudos de prevenção primária planeados para responder a esta questão^{925 926}.

Muito recentemente um destes estudos, o JUPITER Trial, foi interrompido ao fim de 1,9 anos por redução significativa dos *end-points* primários no grupo da rosuvastatina. Neste estudo foram incluídos 17 802 indivíduos saudáveis dos dois sexos, com níveis de LDL inferiores a 130 mg/dl e de hsPCR iguais ou superiores a 2 mg/L, distribuídos por dois grupos, um medicado com 20 mg/dia de rosuvastatina e o outro com placebo. O *end point* primário era uma combinação de EAM, AVC, necessidade de revascularização arterial, hospitalização por angina instável ou morte por causas cardiovasculares. A frequência da combinação de eventos para o grupo do fármaco e o do placebo foi, respectivamente, de 0,77 e 1,36 por 100 pessoas-ano - RR para a rosuvastatina de 0,56 (IC 95% 0,46 a 0,69; p<0,00001). O RR para as diversas sub-categorias de eventos foi de 0,46 (IC95% 0,30 a 0,70; p=0,0002) para o EAM, de 0,52 (IC95% 0,34 a 0,79; p=0,002) para o AVC, 0,53 (IC95% 0,40 a 0,70; p<0,00001) para a necessidade de revascularização e a angina instável, de 0,53 (IC95% 0,40 a 0,69; p<0,00001) para a combinação de EAM, AVC e morte por causa cardiovascular e de 0,80 (IC95% 0,67 a 0,97; p=0,02) para a morte por qualquer causa. Terá havido uma maior incidência de diabetes no grupo da

rosuvastatina, não se tendo verificado qualquer associação significativa entre este fármaco e a ocorrência de miopatia ou doenças neoplásicas⁹²⁷.

Entretanto e de acordo com um estudo recente⁹²¹, sugere-se o seguinte:

- Para os indivíduos com CLDL superior a 160 mg/dl, para os quais o ATP III aconselha uma intervenção terapêutica, uma PCR elevada deve reforçar a necessidade de aderir aos esquemas terapêuticos propostos.

- Quando o CLDL se encontra entre os 130 e os 160 mg/dl, uma PCR elevada indica um risco global elevado e deve reforçar a adesão às recomendações do ATP III.

- Nos indivíduos com CLDL inferior a 130 mg/dl, uma PCR elevada implica um risco substancialmente maior do que o indicado pelo valor isolado do CLDL, colocando-os no nível de risco dos indivíduos com valores mais elevados desta fracção lipídica.

De acordo com o *CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease* a evidência para a determinação da PCR por técnicas de alta sensibilidade, na avaliação do risco da doença vascular, apresenta as seguintes características⁹²⁸:

- A PCR pode ser utilizada nos indivíduos com risco global de doença cardíaca coronária entre os 10 e 20% aos 10 anos, podendo, quando elevada, obrigar a outros objectivos terapêuticos. Os benefícios desta estratégia continuam por confirmar (Classe IIa, nível de evidência: B).

- Os valores da PCR podem ser úteis na avaliação global do risco em prevenção primária. Os benefícios continuam por confirmar (Classe IIb, nível de evidência: C).

- Os valores da PCR podem ser úteis na motivação dos indivíduos para alteração do seu estilo de vida. Também esta indicação necessita de confirmação (Classe IIb, nível de evidência: C).

- Indivíduos com níveis de PCR marcada e persistentemente elevados (> 10 mg/L), devem ser avaliados para possíveis causas não cardiovasculares de elevação desta proteína (Classe IIa, nível de evidência B).

- Outros marcadores inflamatórios, para além da PCR, como citocinas e outros, não devem ser utilizados para a determinação do risco coronário (Classe III, nível de evidência: C).

- A determinação da PCR na doença coronária estável, ou nas síndromes coronárias agudas, pode ser útil como marcador independente do prognóstico para doença recorrente, incluindo morte, EAM e reestenose após intervenção coronária per-cutânea. Benefícios igualmente não confirmados (Classe IIa e nível de evidência: B).

- A aplicação das medidas de prevenção secundária não devem depender da determinação da PCR (Classe III e nível de evidência:A).

- Não está indicada a determinação seriada da PCR para avaliar o efeito da terapêutica (Classe III e nível de evidência:C).

Outras moléculas relacionadas com a inflamação parecem possuir igualmente um poder preditivo de futura doença vascular.

9.2.3 - Moléculas quimiotáticas (Quimiocinas)

São proteínas de baixo peso molecular capazes de induzir a migração e a atracção dos leucócitos circulantes para os locais de inflamação⁹²⁹. São produzidas por múltiplas células em resposta a estímulos inflamatórios e imunológicos^{930 931}. De acordo com a posição dos resíduos de cisteína na região amino-terminal, dividem-se em quatro sub-grupos (CC, CXC, CX₃ e C)^{932 933}. Os principais estímulos para a sua produção são as citocinas pró-inflamatórias, particularmente a IL-1 e o TNF- α , os produtos bacterianos, tais como LPS, e os vírus.

As quimiocinas exercem as suas acções através da ligação a receptores celulares específicos (CCR, CXCR, CX₃R e CR) que, por sua vez, estão na dependência das proteínas-G.

O *Monocyte chemo-attractant protein-1* (MCP-1) também conhecido por CCL2 é o protótipo das quimiocinas CC. É um potente factor quimiotático para os monócitos (também para os eosinófilos, os basófilos e os linfócitos), atraindo-os para o espaço sub-endotelial, aonde se transformam em macrófagos e potencialmente, em *foam-cells*, iniciando e/ou ampliando a reacção inflamatória da parede vascular. O MCP-1 é produzido pelas células endoteliais, pelas células musculares lisas e pelos macrófagos, em resposta a estímulos aterogénicos. Está envolvido na patogénese de diversas doenças cardiovasculares, tais como a aterosclerose e a insuficiência cardíaca congestiva

^{934 935}. Em doentes com EAM e elevação do segmento ST, os níveis basais de MCP-1 estavam significativamente aumentados, relativamente aos de um grupo controlo (1099,65 versus 880,93 pg/ml; $p < 0,05$). Os níveis séricos desta quimiocina atingiram os valores mais altos, 3 H após a admissão (1308,00 pg/ml $p < 0,01$)⁹³⁶. Esta quimiocina induziu também a expressão do factor tecidual pelas células musculares lisas, contribuindo para o desequilíbrio pró-coagulante da placa aterosclerótica⁹³⁷.

9.2.4 – Interleucina-8 (IL8)

Esta citocina é produzida por um número considerável de células tais como monócitos/ macrófagos, células T, fibroblastos, células endoteliais, plaquetas, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e células epiteliais, em resposta a diversos estímulos inflamatórios como as OxLDL e os radicais livres^{938 939}. A IL8 é produzida pelos macrófagos após indução pela IL-1 α , IL-1 β e TNF- α e a sua concentração sérica poderá traduzir a activação dos monócitos/ macrófagos, que se pensa estar na génese da formação da placa de aterosclerose^{940 941}.

A IL8 é uma das quimiocinas CXC com uma forte atracção sobre os neutrófilos, estando envolvida na patogénese de diversas doenças cardiovasculares^{942 943}. É também quimiotáctica para os linfócitos T e os basófilos e induz a libertação das enzimas lisosómicas⁹⁴⁴.

Embora inicialmente se pensasse que a acção quimiotática da IL8 se exerceria única e exclusivamente sobre os neutrófilos, alguns estudos apontam para uma possível acção sobre os monócitos⁹⁴⁵.

Diversos trabalhos têm demonstrado uma associação entre os níveis séricos da IL-8, a patogénese e a actividade das vascularites inflamatórias^{946 947} e a trombose vascular, arterial e venosa^{948 949}. Verificou-se uma maior libertação de IL8 pelos monócitos circulantes de indivíduos com hipercolesterolemia familiar, relativamente a controlos não dislipidémicos. A libertação de IL8, foi ainda maior nos que apresentavam xantomas e/ou xantelasmas e nos fumadores⁹⁵⁰. Existe, também, uma associação entre os níveis séricos desta quimiocina e a obesidade⁹⁵¹

Num estudo prospectivo, realizado em indivíduos dos dois sexos, aparentemente saudáveis, as concentrações séricas da IL8 correlacionaram-se

positivamente com o risco de futura doença cardíaca coronária (3,5 pg/ml nos que desenvolveram doença versus 3,1 pg/ml nos sem doença; $p=0,001$). O risco aumentou proporcionalmente ao aumento dos valores da IL8. Os indivíduos com valores no quartil mais alto apresentaram um RR de 1,72 (IC 95% 1,34 a 2,21, $p<0,0001$), relativamente ao quartil mais baixo, mantendo-se essa relação após ajustamento para os factores de risco tradicionais, RR 1,58 (IC 95%, 1,19 a 2,09, $p=0,002$) e para a PCR e os leucócitos, RR=1,77 (IC 95%, 1,21 a 2,60, $p=0,001$)⁹⁵².

Outros estudos avaliaram o valor prognóstico da IL8 em indivíduos com doença coronária, com resultados nem sempre concordantes^{953 954 955 956}. Também relativamente ao AVC isquémico parece haver uma relação entre a IL8 e a patogénese e/ou incidência da doença⁹⁵⁷, o mesmo acontecendo na doença isquémica arterial periférica⁹⁵⁸.

9.2.5 - Cell adhesion molecules (CAM)

As CAM regulam um conjunto de importantes funções biológicas no campo da embriogénese, da reparação dos tecidos e do crescimento e diferenciação celulares⁹⁵⁹. Estas moléculas, ao estimularem a adesão das células inflamatórias e a sua posterior migração sub-endotelial, são capazes de induzir e/ou ampliar a inflamação vascular.

As selectinas E e P reduzem a velocidade dos leucócitos circulantes e induzem a sua aproximação ao endotélio. A posterior adesão à superfície endotelial requiere a interacção entre as integrinas leucocitárias e as ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 endoteliais^{960 961}.

Em homens saudáveis do *Physicians Health Study* (PHS), após análise multivariada, verificou-se uma associação entre os níveis elevados da ICAM-1, a pressão arterial sistólica e a ocorrência futura de EAM – RR 1,8 (IC 95%, 1,1 a 2,8; $p=0,02$)^{962 963}.

Em 28 263 mulheres saudáveis pós-menopausadas, a ICAM-1 apresentou-se como um significativo predictor do risco cardiovascular - no maior quartil RR 2,6 (IC95% 1,3 a 5,1; $p<0,004$), relativamente ao menor quartil⁹¹¹.

No *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), os níveis da ICAM e da selectina-E correlacionaram-se positivamente com a aterosclerose carotídea

avaliada por eco-doppler, RR de 2,64 (IC95% 1,4 a 5,01) e RR de 2,03 (IC95% 1,4 a 3,62) respectivamente. A ICAM-1 associou-se igualmente a um maior risco de futura doença cardiovascular, RR 5,53 (IC95% 2,5 a 12,21)⁹⁶⁴.

Em indivíduos com doença coronária documentada, os níveis elevados da ICAM-1 ($p=0,015$), da VCAM-1 ($p<0,0001$) e da selectina-E ($p=0,003$) estiveram igualmente associados a um maior risco de futura doença coronária. Quando se incluíram, simultaneamente, os marcadores inflamatórios e as moléculas de adesão, apenas a VCAM manteve uma relação independente com futuros eventos cardiovasculares ($p=0,003$)^{965 966}.

Os níveis da VCAM-1 não estiveram associados a um maior risco cardiovascular no PHS nem no ARIC^{967 968}.

A ICAM-1 encontra-se nas células hematopoiéticas e nos fibroblastos, enquanto que a VCAM-1 está presente essencialmente nas células endoteliais e musculares lisas activadas das placas ateroscleróticas. Assim, os níveis elevados da VCAM-1, poderão traduzir lesões mais avançadas de aterosclerose, potenciando o valor preditivo da PCR na ocorrência de futura morte por doença cardiovascular⁹⁶⁶.

A selectina-P correlacionou-se com um maior risco cardiovascular em indivíduos do sexo feminino independentemente de outros factores de risco (83,2 com eventos cardiovasculares versus 69,3 ng/ml nos sem doença; $p=0,003$)⁹⁶⁹. Cada aumento do quartil da selectina-P, acompanhou-se de um aumento de 28% do risco cardiovascular ($p=0,03$) e o risco das mulheres no maior quartil foi de 2,2 relativamente às do menor quartil ($p=0,01$).

No *British Regional Heart Study*, os níveis basais da ICAM-1, da VCAM-1 e da selectina-E, encontravam-se mais elevados nos indivíduos que posteriormente desenvolveram doença cardíaca coronária; após ajustamento para os factores de risco tradicionais esta relação perdeu significado estatístico⁹⁷⁰.

9.2.6 - Interferão-gama (INFgama)

Com os trabalhos de Isaacs e Lindenmann, em vertebrados, ficou a saber-se que a maioria das células infectadas por um vírus produz uma substância, o

interferão, que lhes confere resistência à posterior colonização por qualquer outro vírus.

Os interferões são citocinas; distribuem-se pelo tipo I, que inclui os $\text{INF}\alpha$ de origem leucocitária e os $\text{INF}\beta$ de origem fibroblástica, e os do tipo II ou $\text{INF}\gamma$, produzido pelos linfócitos T após activação por um antigénio.

O $\text{INF}\gamma$, produzido essencialmente pelos linfócitos CD4 Th1, inicialmente denominado factor de activação dos macrófagos (devido à sua função mais conhecida) estimula, para além dessas células, os linfócitos citotóxicos e as células NK, bem como a sua própria síntese pelos linfócitos T activados⁹⁷¹. Pode influenciar o desenvolvimento da aterosclerose por diversos mecanismos; inibe a produção da 15-lipoxigenase, reduz a oxidação das LDL, reduz a expressão dos receptores para as lipoproteínas modificadas (incluindo as OxLDL), induz a apoptose das células musculares lisas, reduz a produção da matriz extracelular e, através da redução da proteína transportadora ABCA1, inibe o transporte reverso do colesterol pelas HDL^{972 973 974 975 976 977 978}.

Com todas estas acções é difícil prever se o $\text{INF}\gamma$ inibe ou induz a aterosclerose.

No rato Apo E^{-/-}, a administração intra-peritoneal de $\text{INF}\gamma$ induziu um aumento das lesões de aterosclerose na aorta ascendente ($119,98 \pm 18,536$ versus $59,396 \pm 20,017 \mu\text{m}^2$ $p=0,038$), apesar de uma redução em 15% nos níveis do colesterol ($p=0,02$)⁹⁷⁹.

Em ratos Apo E^{-/-} e com deleção do gene do $\text{INF}\gamma$, as lesões de aterosclerose foram inferiores e o seu conteúdo lipídico reduzido em 59% ($p<0,0001$), relativamente às dos animais sem deficiência da citocina⁹⁸⁰.

Resultados semelhantes foram demonstrados num trabalho recente, através da desnudação cirúrgica das artérias ilíacas de ratos. A lesão provocou a proliferação da neo-íntima, que foi significativamente atenuada nos animais com deleção do gene do $\text{INF}\gamma$ ($p<0,05$). As lesões arteriais deste grupo de animais apresentaram também uma menor infiltração por macrófagos e do conteúdo em colagénio⁹⁸¹.

Diversos trabalhos têm demonstrado a existência do $\text{INF}\gamma$ nas lesões de aterosclerose do homem e do animal⁹⁸².

Células T de placas ateroscleróticas humanas, estimuladas para a produção de citocinas, mostraram um predomínio nítido de $\text{INF}\gamma$ ⁹⁸³.

Em 106 indivíduos com lesões carotídeas identificadas por doppler, 67 sujeitos a endarterectomia, verificou-se uma relação entre as células sanguíneas periféricas positivas para diversas citocinas, entre as quais o INF-gama, e as indicações clínicas e imagiológicas para a terapêutica cirúrgica⁹⁸⁴.

Em doentes submetidos a endarterectomia carotídea, os níveis intracelulares de INFgama correlacionaram-se, igualmente, com a evolução da doença vascular contralateral⁹⁸⁵.

9.2.7 – Interleucina-1 (IL1)

Esta citocina é produzida por diversos tipos celulares (macrófagos/*foam cells*, células endoteliais e musculares lisas) em resposta a estímulos inflamatórios.

A sua isoforma principal, a IL1 β , é sintetizada como uma pró-molécula e posteriormente transformada na sua forma activa pela enzima conversora da IL1 β (ICE)⁹⁸⁶. A outra isoforma, a IL1 α , não necessita de activação.

A IL1 liga-se a receptores transmembranares, *Toll-Like Receptor*, (TLRs) conduzindo à activação do factor de transcrição NF-kB e à produção de várias moléculas pró-inflamatórias, incluindo a própria IL1⁹⁸⁷.

A IL1 tem um inibidor endógeno, o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), induzido igualmente pelos estímulos inflamatórios e limitando a acção desta potente citocina.

A IL1 induz a proliferação das células musculares lisas ao potenciar a acção dos factores de crescimento, que, por sua vez, aumentam a expressão da IL1, criando um verdadeiro ciclo de retrocontrolo positivo. Ao induzir a produção da IL6, a IL1 constitui-se como uma das principais moléculas pró-inflamatórias⁹⁸⁸.

9.2.8 - Tumour necrosis factor α (TNF- α)

O TNF- α é produzido essencialmente pelos monócitos/macrófagos e tem uma acção na activação das defesas do organismo e na reparação dos tecidos, embora a sua produção descontrolada possa ter consequências desastrosas⁹⁸⁹.

Os receptores desta citocina são do tipo I (p55) e do tipo II (p75) e pertencem a uma grande família de receptores que incluem o CD95/Fas, o *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptores I e II*, o CD40, o receptor do factor de crescimento do nervo e outros⁹⁹⁰.

Os TRAIL(s) possuem no ambiente citoplasmático uma proteína, conhecida como *domínio de morte*, que, após combinação do receptor com o TNF- α , activa as caspases e a cascata da apoptose⁹⁹¹.

O TNF- α encontra-se presente nas células endoteliais, nas musculares lisas e nos macrófagos das lesões de ateroma e a ligação aos seus receptores nas referidas células, induz a expressão da IL1 β e de outras importantes moléculas inflamatórias, através da activação do NF-kB⁹⁹⁰.

Confirmando as suas propriedades de defesa do organismo, o TNF- α foi citoprotector na miocardite viral aguda do rato⁹⁹².

Diversos trabalhos demonstraram a associação desta citocina com a insuficiência cardíaca e com a isquemia e a reperfusão do miocárdio^{993 994 995 996}

Em 94 doentes com coronariopatia estável, 39 dos quais com hipercolesterolemia, 22 com hiperlipidemia mista e 33 normolipidémicos, quando comparados com 20 indivíduos saudáveis, verificou-se uma associação positiva entre os níveis de TNF- α e a doença coronária ($p < 0,001$). Os níveis séricos desta citocina correlacionaram-se positivamente com os níveis dos triglicédeos ($p < 0,001$) e negativamente com os valores do CHDL ($p < 0,001$)⁹⁹⁷.

A utilização do etanercept, um receptor recombinante e inactivador do TNF- α , em doentes com ICC, traduziu-se numa significativa melhoria da estrutura e função ventricular esquerdas ($p < 0,05$)⁹⁹⁸.

Cerca de 9 meses depois do primeiro EAM, os participantes do CARE, com níveis elevados do TNF- α , apresentaram um maior risco de recorrência de enfarte agudo do miocárdio. Os indivíduos com níveis desta citocina no maior quartil ($> 4,17$ pg/ml) tinham um RR de 2,7 de doença coronária recorrente fatal e não fatal (IC 95% de 1,4 a 5,2; $p = 0,004$)⁹⁹⁹.

Em homens saudáveis de meia-idade, fumadores, a aterosclerose carotídea, avaliada por eco-doppler, esteve positivamente associada com os níveis plasmáticos do TNF- α ($p < 0,01$)¹⁰⁰⁰

9.2.9 – Interleucina-6 (IL6)

É uma importante citocina produzida por vários tipos celulares tais como as células T, os monócitos/ macrófagos, os fibroblastos, os hepatócitos, as células endoteliais, os neurónios e as células musculares lisas, em resposta ao TNF- α e à IL1 β . As suas principais funções são a indução da produção pelos hepatócitos das proteínas de fase aguda, a estimulação do crescimento e a diferenciação dos linfócitos B e T, dos megacariócitos, dos hepatócitos e das células progenitoras hematopoiéticas¹⁰⁰¹. Faz a importante ligação entre a resposta inflamatória aguda e a reacção sistémica que a acompanha, conhecida como “resposta de fase aguda”¹⁰⁰².

A nível hepático transforma a normal síntese proteica na produção dos reagentes de fase aguda tais como a PCR, a SAA e o fibrinogénio. Estas proteínas, para além de constituírem excelentes marcadores da inflamação, participam activamente nas respostas inflamatórias. As acções da PCR foram já abordadas. Em relação às outras proteínas, a SAA, que pode ver os seus níveis séricos aumentarem centenas de vezes, liga-se às HDL, interferindo com algumas das suas acções anti-ateroscleróticas, e o fibrinogénio, quando aumentado, induz um estado pró-coagulante¹⁰⁰³.

A IL6, ao induzir a resposta de fase aguda, constitui-se como uma importante ponte de ligação entre a inflamação e/ou a infecção e a doença cardiovascular.

No PHS, os participantes que apresentavam os níveis séricos de IL-6 no maior percentil, tiveram um RR de futura doença cardiovascular de 2,3 (IC 95% de 1,3 a 4,3; $p=0,005$), comparativamente aos indivíduos com os níveis mais baixos desta citocina¹⁰⁰⁴. Neste mesmo estudo, a PCR mostrou-se fortemente relacionada com a IL-6 ($p<0,001$), mas a relação entre esta citocina e o futuro risco manteve-se, mesmo depois de ajustado para os valores da PCR ($p<0,001$).

Indivíduos com síndromes coronárias agudas e valores séricos elevados da IL6, à entrada e nas primeiras 48 h, apresentaram um maior risco de complicações coronárias intra-hospitalares¹⁰⁰⁵.

Em 134 doentes com angina instável ou EAM, os níveis séricos de IL-6 foram significativamente superiores aos de um grupo com angina estável ($p<0,05$)¹⁰⁰⁶.

No *Fast Revascularization during Instability in Coronary artery disease*, os doentes com síndromes coronárias agudas, não sujeitos a terapêuticas invasivas e com níveis séricos de IL6 iguais ou superiores a 5 ng/L, apresentaram maiores taxas de mortalidade relativamente aos que tinham valores inferiores - RR de 3,47 (IC 95% de 1,94 a 6,21)¹⁰⁰⁷.

Também em mulheres com mais de 65 anos portadoras de doença cardiovascular, os níveis elevados de IL6 associaram-se a uma elevada taxa de mortalidade por todas as causas - RR de 4,6 (IC 95% de 2 a 10,5)¹⁰⁰⁸.

Em 320 doentes coronários que aguardavam realização de “bypass” electivo, avaliou-se a relação entre os polimorfismos do promotor do gene da IL6, 174G>C e o número de vasos coronários severamente atingidos ($\geq 75\%$). Um número significativamente maior de indivíduos com doença dos três vasos tinha um genotipo 174GG, comparativamente aos que apresentavam um genotipo 174GC ou 174CC. Os maiores níveis séricos de IL6 estavam também presentes nos indivíduos com o genotipo 174GG e os menores nos do genotipo 174CC¹⁰⁰⁹.

Particularmente importante é a capacidade da IL6 de poder orientar a terapêutica; os doentes com síndromes coronárias agudas e com níveis elevados de IL6, beneficiaram de uma terapêutica invasiva precoce, com redução absoluta da mortalidade aos 12 meses de 5,1% ($p=0,004$). Nos doentes com baixos níveis de IL6 não se verificou uma diferença significativa entre as terapêuticas invasiva e a conservadora¹⁰⁰⁷.

9.2.10 – Interleucina-3 (IL3)

Diversos estudos demonstraram que a IL3, comportando-se como factor de crescimento hematopoiético¹⁰¹⁰, pode actuar nas células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de adesão, tais como as selectinas E e P, que promovem a adesão das células T^{1011 1012 1013}.

Diversos trabalhos demonstraram o envolvimento da IL3 na formação de novos vasos¹⁰¹⁴.

Em peças de arterectomia carotídea humana, demonstrou-se a presença de IL3 nos linfócitos T presentes na placa, contribuindo para a manutenção do

processo aterosclerótico, quer directamente por activação das células musculares lisas, quer indirectamente por aumento da produção de VEGF¹⁰¹⁵.

9.2.11 – Interleucina-18 (IL18)

Esta interleucina, produzida essencialmente pelos macrófagos e células de Kupffer, tem um papel central nos processos inflamatórios e na imunidade inata e adquirida, decorrente da sua capacidade para induzir a produção de INF-gama pelos linfócitos e células natural Killer. Actua igualmente de uma forma sinérgica com a IL12 na indução das respostas T_H1^{1016 1017 1018 1019}. Inicialmente conhecida como factor inductor do INF-gama, tem sido identificada nas placas de aterosclerose carotídea humana aonde, aparentemente, estimula a produção local de INF-gama^{1020 1021}.

Diversos estudos no animal demonstraram que a estimulação dos receptores da IL18 nas células endoteliais, musculares lisas e nos monócitos/macrófagos, desencadeia a expressão da IL1 β , da IL8, das moléculas de adesão, das metaloproteinases da matriz, do GM-CSF, do TNF α e da sintetase do óxido nítrico^{1022 1023 1024 1025}.

A administração intraperitoneal desta interleucina a ratos Apo E^{-/-} induziu um aumento do tamanho da lesão na aorta ascendente (50642 \pm 12515 versus 112399 \pm 13223 μm^2 ; p=0,004) e no arco aórtico (6,2 \pm 0,9% versus 3,1 \pm 0,3% da área; p=0,006), assim como do número das células T na placa (50 \pm 5 versus 11 \pm 3 células; p< 0,0001) não se verificando estes efeitos nos ratos deficientes em INF-gama¹⁰²⁶.

Em ratos Apo E^{-/-}, a inibição da IL18 pela *IL18 binding-protein*, um inibidor endógeno desta citocina, reduziu a progressão da lesão e alterou a composição da placa, com redução das células inflamatórias e do conteúdo lipídico e com aumento das células musculares lisas e do colagénio, transformando-a num fenótipo mais estável¹⁰²⁷.

Também em ratos, aos quais se provocou a desnudação endotelial da artéria carótida esquerda por cateter, verificou-se o aumento da expressão da IL18 nas células musculares lisas (p<0,01), quer nas pertencentes à média, quer nas que proliferaram e/ou migraram para a neo-íntima da artéria lesada. Os níveis séricos desta citocina encontravam-se igualmente elevados nos ratos

sujeitos à lesão vascular (113 ± 18 pg/mL; $p < 0,01$) e o seu tratamento com IgG anti-IL18, reduziu significativamente a formação da neo-íntima (27%, $p < 0,01$)¹⁰²⁸. O mesmo Ac reduziu a expressão do INFgama ($p < 0,001$), da IL6 ($p < 0,01$), da IL8 ($p < 0,01$) e a activação do NF-kB arteriais.

Em 40 doentes dos dois sexos, com idades de $60,2 \pm 8,8$ A, com angina instável, participantes no *Endothelial Dysfunction, Inflammation and Thrombosis in Acute Coronary Syndromes* (EDIT-ACS), e em 20 indivíduos saudáveis, verificou-se uma associação positiva entre os maiores níveis da IL18 e a PCR ($11,9 \pm 4,2$ vs $6,8 \pm 3,4$ mg/l, $p < 0,01$), o factor Von Willebrand (166% vs 150%, $p = 0,08$) e os parâmetros da activação plaquetar ($p < 0,04$). Verificou-se igualmente uma associação entre os valores desta citocina e a dilatação mediada pelo fluxo (5% versus 8,5%, para o 4º e o 1º quartil), assim como um maior número de estenoses coronárias (numero médio de vasos atingidos 2,5 vs 1,1, $p < 0,001$)¹⁰²⁹.

Em placas ateroscleróticas carotídeas humanas, verificou-se uma correlação positiva entre os níveis de IL18 existentes na placa e a instabilidade desta ($p < 0,01$)¹¹²³.

Em 366 indivíduos com $64,8 \pm 9,1$ A, sem DCV, os níveis séricos da IL18 correlacionaram-se positivamente ($p < 0,001$) com a espessura da média-íntima carotídea, avaliada por ultrassonografia em 12 segmentos arteriais diferentes, independentemente dos factores de risco clássicos e dos níveis séricos da IL6 e da PCR¹⁰³⁰.

Num estudo mais recente em que se avaliaram 1111 indivíduos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 27 e os 77 A, os valores séricos da IL18 correlacionaram-se com outros marcadores inflamatórios, IL6, PCR, fibrinogenio e leucócitos (0,11 a 0,23, todos com $p < 0,001$) e com os factores de risco convencionais, relação abdómen/anca, índice massa corporal, TA, triglicérideos, CHDL (inversamente) e grau de tabagismo (0,18 a 0,29, todos com $p < 0,001$). Os valores da IL18 foram significativamente superiores nos homens do que nas mulheres ($p < 0,0001$). Após ajustamento para os factores de risco convencionais, não se manteve uma relação significativa entre os níveis da IL-18 e a espessura da média-íntima carotídea¹⁰³¹.

Resultados semelhantes foram obtidos num estudo em que se avaliou a relação entre os níveis da IL18, o score de cálcio e a placa aórtica, em 2231

indivíduos da população geral. Embora em análise univariada se verificasse uma relação significativa ($p < 0,01$), após análise multivariada a mesma associação perdeu significado estatístico¹⁰³².

Os níveis séricos desta citocina, estavam elevados em indivíduos com enfarte agudo do miocárdio e com doença coronária estável e instável ($p < 0,0001$) e correlacionaram-se positivamente com a ocorrência de morte por doença cardiovascular - RR de 1,46 no maior quartil (IC 95% de 1,21 a 1,76; $p < 0,0001$)¹⁰³³. Esta relação foi independente de outros factores de risco, incluindo a fracção de ejeção e de outros marcadores inflamatórios, tais como a PCR, o fibrinogénio e a IL6 – RR 3,3 do maior para o menor quartil (IC 95% de 1,3 a 8,4; $p = 0,01$)¹⁰³⁴.

Num estudo observacional, que incluiu cerca de 60 doentes, os níveis séricos de IL18 estavam significativamente elevados nos que tinham EAM ou angina instável, comparativamente aos doentes com angina estável e aos indivíduos saudáveis ($p = 0,01$) e correlacionaram-se com a fracção de ejeção ventricular esquerda ($p = 0,01$)¹⁰³⁵.

Em 267 doentes com EAM com elevação de ST, submetidos a intervenção coronária percutânea, os níveis séricos de IL18 estavam significativamente aumentados, comparativamente a um grupo controlo ($p < 0,0001$). Os doentes com $IL18 \geq 560$ pg/ml, apresentaram maiores níveis de CK-MB, maior incidência de choque cardiogénico, menor fracção de ejeção ventricular esquerda, e maior incidência de insuficiência cardíaca congestiva e mortalidade aos 30 dias, do que os indivíduos com valores < 560 pg/ml ($p < 0,0001$ para todos)¹⁰³⁶.

Em 27 doentes com síndromes coronárias agudas, a elevação dos níveis da IL18, antecedeu a elevação da CK-MB nos 15 casos de enfarte agudo do miocárdio, comportando-se como um meio auxiliar de diagnóstico. Os seus valores não se correlacionaram com os valores da CK-MB nem com a fracção de ejeção ventricular¹⁰³⁷.

Em 1288 indivíduos com doença coronária e seguidos durante 5,8 anos, os níveis séricos basais de IL18 foram preditivos da mortalidade cardiovascular, ocorrida nos primeiros 4 anos - RR 2,96 (IC95%, 1,54 a 5,70, $p < 0,001$)¹⁰³⁸.

Em 107 homens e mulheres com idades de 65 ± 12 A, com síndromes coronárias agudas, a relação entre os níveis séricos da IL18/ IL10, medidos à

entrada, comportou-se como um factor preditivo independente, de um composto de morte de causa cardíaca, recorrência de angina instável e/ou de EAM, arritmias graves e revascularização urgente, durante o período de hospitalização - RR 1,74 (IC 95% 1,09 a 2,78). O valor preditivo desta relação foi superior ao dos valores séricos isolados da IL18, RR 1,46 (IC 95% 0,93 a 2,27) e da IL-10, RR 1,63 (IC 95% 1,04 a 2,56)¹⁰³⁹.

Um outro estudo, avaliou a relação IL18/IL10, como factor preditivo da doença coronária recorrente durante um ano. Em 186 doentes dos dois sexos, com 65±12 anos e com síndromes coronárias agudas, verificou-se uma relação positiva entre os maiores valores desta relação, determinações realizadas à entrada do estudo, e a ocorrência de um composto de EAM fatal e não fatal e de angina instável - RR 1,91 (IC 95% 1,37 a 2,65; p<0,001)¹⁰⁴⁰.

Mais recentemente, nos estudos prospectivos MONICA/KORA, realizados em mais de 10 000 homens e mulheres saudáveis com idades superiores a 35 e inferiores a 74 A, compararam-se os valores basais da IL18 de 382 indivíduos que desenvolveram DCC, com os de 1980 participantes que não vieram a sofrer de DCC. Contrariamente aos estudos anteriores, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (172,4 versus 161,3 pg/mL, P=0.114)⁸⁸².

Numa população de 82 Japoneses diabéticos tipo 2, os níveis séricos e urinários da IL18 estavam significativamente elevados relativamente aos não diabéticos (179±62 versus 121±55 pg/ml, no soro p<0,001; 97±159 versus 47±54 pg/ml, na urina p=0,035), e os seus níveis séricos correlacionaram-se com a proteinúria (p<0,001), com a PCR (p=0,031) e com a espessura da média-íntima carotídea (0,042). Os autores concluíram que a IL18 pode ser um factor preditivo da progressão da nefropatia diabética e da doença vascular¹⁰⁴¹.

9.2.12 - Interleucina-10 (IL10)

Esta interleucina, produzida pelas células CD4 Th₂, é considerada uma potente molécula antiinflamatória¹⁰⁴².

Um dos mecanismos subjacentes a esta acção da IL10, é a sua capacidade de inibir o factor de transcrição NF-kB, com a consequente redução da produção de múltiplas e importantes moléculas inflamatórias¹⁰⁴³.

A IL10 inibiu igualmente as respostas dos monócitos induzidas pelo CD40-CD40L e a produção do óxido nítrico induzido^{1044 1045}.

Em ratos nulos para os receptores LDL, LDL^{-/-}, transplantados com medula de ratos transgênicos para a IL10, verificou-se uma redução da área da placa aterosclerótica, comparativamente aos que receberam medula de ratos aplasiados (77129 ± 56 versus $144955 \pm 81 \mu\text{m}^2$; $p < 0,0001$)¹⁰⁴⁶.

A acção protectora da IL10 contra o desenvolvimento da aterosclerose tem sido demonstrada em outros modelos animais^{1047 1048}.

Os níveis séricos de IL10 estavam reduzidos nos indivíduos com angina instável, comparativamente aos que apresentavam doença anginosa estável (28,4 versus 14,0; IC 95% 9,8 a 19; $p < 0,0001$)¹⁰⁴⁹.

Em 547 indivíduos pertencentes ao grupo placebo do *c7E3 Anti Platelet Therapy in Unstable Refractory angina* (CAPTURE), os níveis séricos elevados da IL-10 ($>3,5 \text{ pg/ml}$ $n=276$) associaram-se a um menor risco de morte e de EAM não fatal - RR 0.33 (IC 95%, 0,25 a 0,76; $p=0.002$), encontrando-se inversamente correlacionados com o níveis da PCR ($p < 0,001$). Os valores elevados da IL10 conferiram protecção aos indivíduos que apresentavam valores elevados da PCR, com um risco relativo de doença cardíaca de 0,25, relativamente aos que apresentavam elevados níveis de PCR e baixos de IL10 (IC 95%; 0,10 a 0,63; $p=0.003$)¹⁰⁵⁰.

Em 65 homens com DCC documentada, os níveis séricos da IL10 estiveram associados com a melhoria da vasorreatividade dependente do endotélio, avaliada por pletismografia a nível dos vasos do antebraço ($p < 0,02$)¹⁰⁵¹.

Em homens e mulheres com 85 ou mais anos e com baixas concentrações séricas de IL10, o risco relativo de AVC fatal foi de 2,94 (IC 95%, 1,01 a 8,53) relativamente aos que apresentavam os valores mais elevados. Por cada aumento de 500 pg/ml de IL10, verificou-se uma redução de 36% na incidência de AVC fatal, RR 0,64 (IC 95% 0,39 a 1,00). Os resultados mantiveram-se após ajustamento para o sexo, a diabetes 2, a HTA e a utilização de AINE(s)¹⁰⁵².

Utilizando uma técnica de análise estatística, em que se reduzem numerosas variáveis interdependentes a um número relativamente reduzido de *clusters* independentes, compostos de variáveis fisiopatologicamente

relacionadas, estudaram-se 320 doentes dos dois sexos, entre os 58 e os 74 anos de idade, com síndromes coronárias agudas, procurando eventuais relações entre um *cluster* pró-inflamatório (PCR e fibrinogénio), outro de inflamação local/disfunção endotelial (IL18 e ICAM-1) e outro antiinflamatório (IL10 e CHDL), com o risco de eventos coronários recorrentes (morte de causa cardíaca, EAM não-fatal e angina instável). Todas as variáveis estudadas foram determinadas à entrada do estudo. Numa análise multivariada, apenas o *cluster* antiinflamatório se comportou como factor preditivo de ausência de doença, com um OR de 0,65 (IC 95%; 0,48 a 0,88)¹⁰⁵³.

9.2.13 - Transforming growth factor- β (TGF- β)

É uma citocina antiinflamatória com acção supressora do crescimento e da função celular, parecendo ser um inibidor da aterogénese.

Em aortas humanas, a expressão do RNA mensageiro para o TGF- β foi superior nas áreas mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões de aterosclerose¹⁰⁵⁴.

Em ratos deficientes em Apo E, demonstrou-se que a eliminação ou a supressão da via de sinalização do TGF- β , através da utilização de anticorpos monoclonais ou de receptores recombinantes solúveis do TGF- β , aumentou a área da placa (82215 ± 9593 versus $45601 \pm 5803 \mu\text{m}^2$; $p < 0,005$), o número de células inflamatórias a nível da parede (3745 ± 309 versus 2379 ± 510 células/mm²; $p = 0,03$), a instabilidade da placa por redução do conteúdo em colagénio ($12,3 \pm 1,6\%$ versus $26,8 \pm 3,0\%$; $p = 0,0002$) e a aterotrombose^{1055 1056}.

Alguns estudos clínicos demonstraram reduzidos níveis de TGF- β em indivíduos com angina instável¹⁰⁵⁷.

9.2.14 - Integrinas

A LFA-1 (CD11a/CD18), a Mac-1 (CD11b/CD18) e a VLA-2 (CD49b/CD29), são moléculas envolvidas na interacção das células apresentadoras de Ag com as células efectoras e endoteliais.

A LFA-1 apresenta grande afinidade para as ICAM 1, 2 e 3 e participa na adesão dos leucócitos às células endoteliais e na sua migração trans-endotelial,

assim como na interacção entre as células apresentadoras de Ag e as células T, com activação e proliferação destas últimas.

As diferentes integrinas apresentam importantes semelhanças estruturais, possuindo todas módulos de cerca de 200 aminoácidos, denominados domínios-I. Estes são constituídos por uma cadeia β e duas cadeias α e apresentam uma grande semelhança estrutural com o domínio-A do factor von Willebrand¹⁰⁵⁸.

A cadeia β possui no seu fragmento C-terminal uma sequência denominada MIDAS (metal ion dependent adhesion site), aparentemente indispensável à interacção das integrinas com as moléculas de adesão¹⁰⁵⁹.

A intervenção terapêutica sobre as integrinas poderá ter um papel de relevo na modulação dos mecanismos inflamatórios e imunológicos, incluindo a aterosclerose.

Ao inibir a ligação da LFA-1 às ICAM(s) foi possível interferir na evolução das doenças inflamatórias e na rejeição de enxertos¹⁰⁶⁰.

9.2.15 - CD40

Diversos estudos têm demonstrado o papel da díade CD40-CD40 ligante (CD40L ou CD154) na aterosclerose, na trombose e na inflamação¹⁰⁶¹.

O CD154 é uma proteína transmembranar relacionada com o TNF- α , estando presente nas células T CD4, nos mastócitos, nos basófilos, nas plaquetas e nas células musculares lisas^{1062 1063}.

O receptor CD40 encontra-se constitutivamente expresso nas células B, nos monócitos, nos macrófagos, nas células dendríticas e nas células endoteliais¹⁰⁶⁴.

A ligação do CD40 às células endoteliais e aos monócitos induz a síntese de moléculas de adesão, de citocinas, de quimiocinas, do factor tecidual e activa as metaloproteinases da matriz^{1065 1066}.

Por sua vez, o CD154 vê aumentada a sua expressão nas plaquetas dos trombos recém-formados¹⁰⁶⁷.

Indivíduos com moderada hipercolesterolemia apresentaram mais CD154 plaquetar, relativamente aos normolipidémicos ($12,6 \pm 2,6$ versus $8,2 \pm 1,4$ intensidade média de fluorescência [MFI]; $p < 0,001$), podendo esta diferença

explicar parcialmente as tendências pró-inflamatória, pró-aterogénica e pró-trombótica das hipercolesterolemias¹⁰⁶⁸.

Oitenta indivíduos dos dois sexos com hipercolesterolemia, apresentaram níveis aumentados de CD154 soluvel (sCD154), relativamente ao grupo dos normolipidémicos ($8,3 \pm 5,2$ versus $2,4 \pm 1,3$ ng/mL, $P < 0,0001$). O sCD154 mostrou-se positivamente relacionado com o factor VIIa nos hiper e nos normolipidémicos ($p < 0,0001$ e $p = 0,0023$, respectivamente), com a activação plaquetar nos hiper e normolipidémicos ($p = 0,024$ e $p = 0,0087$, respectivamente) e com os fragmentos 1+2 da protrombina, mais uma vez nos hiper e nos normolipidémicos ($p < 0,0001$ e $p = 0,0154$, respectivamente)¹⁰⁶⁹.

Estudos com animais *knockout* para o CD40, demonstraram que a deficiência no CD154 confere uma significativa redução das lesões de aterosclerose¹⁰⁷⁰.

Também em animais com lesões estabelecidas de aterosclerose e alimentados com uma dieta rica em colesterol, a administração de um anticorpo anti CD40L condicionou um aumento do tecido fibroso da placa de aterosclerose¹⁰⁷¹.

Doentes com angina instável, apresentaram níveis de sCD154 significativamente superiores aos dos doentes com angina estável ($p < 0,05$) e dos controlos ($p < 0,001$)¹⁰⁷².

130 mulheres aparentemente saudáveis do *Women Health Study* (WHS) e que posteriormente tiveram EAM, AVC ou morte cardiovascular, apresentaram níveis basais de sCD154 mais elevados do que um grupo de mulheres, em tudo semelhantes, mas que não apresentaram nenhum evento cardiovascular ($2,68$ versus $2,09$ ng/ml; $p = 0,02$). Esta relação manteve-se após ajustamento para os factores de risco clássicos¹⁰⁷³.

Determinaram-se os níveis séricos do sCD154 em 1088 doentes dos dois sexos, com SCA, submetidos posteriormente a angioplastia coronária, e avaliou-se o seu valor prognóstico e como factor preditivo da resposta à terapêutica com abciximab. Nos seis meses de seguimento, os participantes medicados com placebo e com níveis superiores a $5,0 \mu\text{g} / \text{L}$, tiveram um risco de morte ou EAM não fatal, de $2,71$ (IC 95% de $1,51$ a $5,3$; $p = 0,001$). O risco aumentado dos participantes com níveis elevados do sCD154, foi significativamente reduzido pelo tratamento com o abciximab (RR0,37; IC 95% $0,2$ a $0,68$; $p = 0,001$)¹⁰⁷⁴.

9.2.16 - Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

O VEGF é um factor de crescimento produzido pelas células tumorais, epiteliais e outras, sendo responsável pela angiogénese fisiológica, pela cicatrização e pela angiogénese patológica que existe na progressão tumoral, na retinopatia diabética e na artrite reumatóide¹⁰⁷⁵.

As acções do VEGF exercem-se através de dois receptores tirosina-quinases, o Flt-1 e o KDR. Enquanto que o KDR parece localizar-se unicamente às células endoteliais, o Flt-1 encontra-se igualmente nos monócitos e nas células musculares lisas^{1076 1077}.

Entre as acções exercidas nas células endoteliais pelo VEGF destacam-se a quimiotaxia, a mitogénese e o aumento da permeabilidade vascular¹⁰⁷⁸.

O VEGF e a neovascularização, possuem um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose e na progressão da placa através do fornecimento de nutrientes, de oxigénio e da acumulação de células inflamatórias, assim como na sua ruptura e posterior trombose^{1079 1080}.

A densidade dos neovasos e de hemorragias é significativamente superior nas placas sintomáticas, relativamente às assintomáticas^{1081 1082}.

A restenose dos *stents* que conduz à falência desta terapêutica de revascularização estará, pelo menos parcialmente, na dependência do VEGF e da neovascularização; a expressão deste factor de crescimento na parede vascular é aumentada pelos factores de coagulação, pelos radicais livres e pelo *shear stress*^{1083 1084}.

Num trabalho realizado em cerca de 190 indivíduos e em que se analisaram os níveis plasmáticos do VEGF, verificou-se haver uma relação positiva entre os seus níveis e diversos factores de risco cardiovascular, tais como a HTA, o colesterol, a glicose, a diabetes e o índice de massa corporal. No mesmo estudo, houve uma correlação positiva e significativa entre os níveis plasmáticos do VEGF e a presença de microalbuminúria (traduzindo disfunção endotelial)¹⁰⁸⁵.

Diversos trabalhos têm demonstrado uma correlação positiva entre a expressão tecidual do VEGF e a gravidade das lesões de aterosclerose coronária e carotídea^{1086 1087}.

Foi já demonstrada uma potencial aplicação do VEGF no tratamento do enfarte agudo do miocárdio, nomeadamente através das *stem cells* mesenquimatosas hiperexpressando este factor de crescimento¹⁰⁸⁸.

9.2.17 - Phospholipase A2 (PLA₂)

A PLA₂ representa uma família de enzimas que hidrolizam os fosfolípidos e geram lisofosfolípidos e ácidos gordos. Estão presentes nas células musculares lisas, durante o processo da aterogénese, em resposta à IL1 β e à activação simultânea do NF-kB e do PPAR γ ¹⁰⁸⁹.

A PLA₂ associada às lipoproteínas, também conhecida por *acetilhidrolase do factor activador das plaquetas* (PAF), circula associada às LDL e pode contribuir para a aterogénese através da hidrólise dos fosfolípidos oxidados. Inibe os fenómenos trombóticos e inflamatórios ao impedir a activação das plaquetas, dos monócitos e dos macrófagos pela hidrólise do PAF.

No *West of Scotland Study*, os níveis basais da PLA₂ de 580 homens que vieram a sofrer enfarte agudo do miocárdio não fatal, morte por doença coronária e/ou processo de revascularização, foram significativamente superiores aos apresentados por 1160 homens que não tiveram qualquer manifestação de doença ($2,37 \pm 0,52$ versus $2,27 \pm 0,57$ mg/L; $p < 0,001$). Os valores desta enzima no maior quintil ($> 2,72$ mg/L), estiveram associados a um maior risco coronário - RR de 1,18 (IC 95% de 1,05 a 1,33; $p = 0,005$)¹⁰⁹⁰.

Em mulheres normolipidémicas, os níveis basais de PLA₂ encontravam-se mais elevados nas que vieram a desenvolver EAM, AVC ou morte por doença cardiovascular¹⁰⁹¹. No entanto, os níveis da PLA₂ encontravam-se fortemente correlacionados com os níveis de LDL e após ajustamento para os valores dos lípidos e / ou outros factores de risco, o efeito preditivo desta enzima perdeu significado estatístico.

Em 7983 indivíduos dos dois sexos, com idade igual ou superior a 55 anos, os que tinham os valores da PLA₂ no segundo, terceiro e quarto quartis, apresentaram um risco de DCC, respectivamente, de 1,39 (IC 95%; 0,92 a 2,1), 1,99 (IC 95%; 1,32 a 3,00) e 1,97 (IC 95%; 1,28 a 3,02), relativamente aos do primeiro quartil ($p = 0,01$). Em relação ao AVC isquémico, o risco respectivo foi de

1,08 (IC 95% 0,55 a 2,11), 1,58 (IC 95%, 0,82 a 3,04) e de 1,97 (IC 95%, 1,03 a 3,79) ($p=0,03$)¹⁰⁹².

Em quinze indivíduos com moderada aterosclerose coronária, avaliada através da angiografia e da ecografia intravascular, e em que se estudou também a função endotelial, determinaram-se os níveis da PLA₂ associada às lipoproteínas, do seu produto lisofosfatidilcolina, e da PCR, a nível da artéria coronária esquerda e do seio coronário. Comparativamente a um grupo controlo, a produção da PLA₂ na circulação coronária foi significativamente superior (519 ng/min, 198 a 1276 ng/min, versus - 529 ng/min, - 872 a - 79 ng/min; $p=0,001$) e a sua produção, correlacionou-se com o volume de ateroma ($p=0,04$). A produção da lisofosfatidilcolina foi também significativamente superior nos doentes (199 ng/min, - 592 a 470 ng/min, versus - 505, - 1119 a 0 ng/min, $p=0,03$) e correlacionou-se com a disfunção endotelial ($p=0,005$). Relativamente à PCR não houve diferenças significativas dos seus níveis¹⁰⁹³.

9.2.18 - Mieloperoxidase (MPO)

A MPO, existente nas lesões ateroscleróticas humanas, é uma enzima presente em grande quantidade nos neutrófilos e nos monócitos, com capacidade oxidativa das LDL, facilitando a sua captação pelos macrófagos e a formação das *foam-cells*¹⁰⁹⁴.

Doentes coronários, apresentaram valores leucocitários e sanguíneos de MPO significativamente superiores, comparativamente a indivíduos sem doença coronária ($p<0,001$). Após análise multivariada, que incluiu os factores de risco clássicos e o *score* de risco de Framingham, os níveis da MPO, no maior versus menor quartil, conferiram um risco relativo de doença coronária de 11,9 (IC 95% de 5,5 a 25,5) e de 20,4 (IC 95% 8,9 a 47,2) respectivamente para a MPO leucocitária e sanguínea¹⁰⁹⁵.

Em 1090 doentes com síndromes coronárias agudas, os níveis de mieloperoxidase correlacionaram-se positiva e significativamente com o risco de morte e/ou EAM, nos seis meses seguintes (2,25; IC 95%; 1,32 a 3,82; $P=0,003$)¹⁰⁹⁶.

As propriedades pró-inflamatórias da mieloperoxidase, com activação das metaloproteinases e degradação da matriz extracelular, contribuíram para a

desestabilização da placa. A MPO transformou as metaloproteinases de pró-enzimas na sua forma proteoliticamente activa, através da produção dum agente oxidante, o ácido hipocloroso¹⁰⁹⁷.

9.2.19 - Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A)

Para além de ser um activador específico do factor de crescimento insulina-like, que é um mediador pró-aterogénico, esta enzima é uma metaloproteinase.

Em oito indivíduos vítimas de morte cardíaca súbita, o PAPP-A encontrava-se em maior quantidade nas zonas de ruptura ou erosão das placas instáveis relativamente às placas estáveis ($18,5 \pm 8\%$ versus $3,2 \pm 1,9\%$; $p=0,01$)¹⁰⁹⁸.

Os níveis circulantes de PAPP-A mostraram-se mais elevados em doentes com angina instável (14,9 ml/L) ou EAM (20,6 ml/L), do que nos indivíduos com angina estável ou sem doença coronária ($p<0,001$)¹⁰⁹⁸.

9.2.20 - Proteína Amilóide-A Sérica (SAA)

Um estudo prospectivo avaliou a relação entre vários marcadores inflamatórios, entre os quais a SAA, e o risco de futura doença cardiovascular em 28 263 mulheres saudáveis pós-menopausicas. Níveis séricos de SAA no maior (1,17 mg/dl), relativamente aos do menor quartil (0,25 mg/dl), condicionaram um RR de futura doença vascular (morte por doença cardíaca coronária, EAM não fatal, AVC ou necessidade de revascularização) de 3,0 (IC 95% de 1,5 a 6; $p=0,002$)⁹¹¹.

9.2.21 - Metaloproteinases (MMPs)

São uma família de proteinases com semelhanças estruturais, diferindo na especificidade do substracto e na origem celular.

São secretadas na forma de pré-MMP, necessitam da activação por proteólise, são inibidas por inibidores específicos (TIMPs) e a sua principal função é a clivagem da matriz extracelular (MEC).

Agrupam-se em *Colagenases, Gelatinases, Stromelisinases e MMPs membranares*, segundo a sua estrutura e a especificidade do substrato, embora se admita haver uma sobreposição deste último entre as diversas proteinases.

As MMPs estão envolvidas em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, a ovulação, a remodelação óssea, a cicatrização, a inflamação e a metastização neoplásica^{1099 1100 1101}.

São cada vez mais numerosas, as evidências que atribuem às MMPs um papel relevante na doença cardíaca, nomeadamente no *remodeling*, na dilatação ventricular esquerda e na insuficiência cardíaca¹¹⁰². Estas proteinases estão presentes no miocárdio, são produzidas pelos fibroblastos, pelas células inflamatórias e pelos cardiomiócitos¹¹⁰³, encontram-se predominantemente na sua forma latente e são activadas em diversas condições patológicas^{1104 1105 1106 1107}.

Em 400 indivíduos de ambos os sexos, com idade média de 54,3 anos, com factores de risco cardiovascular mas sem doença vascular clínica, os níveis séricos da MMP-10 correlacionaram-se positivamente com os do fibrinogénio ($p < 0,001$), os da PCR ($p < 0,01$) e com a espessura da média-íntima carotídea ($p < 0,01$). A associação com a espessura da parede carotídea manteve-se após análise de regressão múltipla, para controlo dos factores de risco tradicionais e dos outros marcadores inflamatórios. Após ajustamento para a idade e o sexo, os níveis da MMP-10 correlacionaram-se positivamente com a presença de placas carotídeas ($p < 0,01$). Os autores concluíram que os níveis séricos da MMP-10 podem ser úteis para identificar a aterosclerose subclínica¹¹⁰⁸.

Em 134 doentes com síndromes coronárias agudas, angina instável e EAM, os níveis séricos de MMP-9 foram significativamente superiores aos apresentados pelos doentes com angina estável¹⁰⁰⁶.

Determinaram-se os níveis de MMP-9 no líquido pericárdico de 28 doentes com angina estável e em 16 com EAM, sujeitos a cirurgia cardíaca. Relativamente aos doentes com angina estável, os níveis de MMP-9 foram significativamente superiores nos casos de EAM e nestes, superiores nos doentes em que ocorreu ruptura do septo ventricular¹¹⁰⁹.

9.3 - Acção pró-aterosclerótica da Infecção e da Inflamação

Um dos mecanismos pelo qual a infecção e a inflamação podem desencadear a lesão vascular e a aterosclerose, é através da produção de diversas proteínas de fase aguda, cuja missão fundamental é a protecção do hospedeiro contra as agressões e a facilitação da reparação das lesões. No entanto, quando presentes em altos níveis por longos períodos de tempo, as proteínas de fase aguda podem provocar consequências indesejáveis no hospedeiro, sendo um exemplo clássico desta agressão o desenvolvimento da amiloidose secundária a situações de infecção / inflamação crónica.

Foram já abordadas as possíveis acções pró-ateroscleróticas das várias citocinas, dos factores quimiotácticos e de crescimento e das moléculas de adesão intercelular.

A infecção e a inflamação podem perturbar o metabolismo das lipoproteínas produzindo perfis lipoproteicos altamente aterogénicos, com um aumento dos triglicédeos e uma redução do CHDL.

Embora os níveis do CLDL estejam reduzidos nos quadros inflamatórios, estas lipoproteínas adquirem predominantemente o fenótipo pequeno e denso, mais susceptível às alterações oxidativas.

Num estudo realizado em 238 indivíduos com idades entre os 40 e os 68 anos e com doença coronária angiograficamente comprovada, avaliou-se a relação entre as alterações lipídicas pró-aterogénicas e a seropositividade para a *C. pneumoniae*, o lipopolissacárido da Clamídea e do CMV e a infecção por *Helicobacter pylori* (HP) avaliada pelo teste da urease respiratória. Após análise multivariada, a infecção pelo HP mostrou estar positiva e significativamente associada com um CHDL baixo ($p=0,002$), uma CHDL / C-total baixa ($p=0,005$), uma Apo A1 baixa ($p=0,02$) e uma Apo B elevada ($p=0,02$)¹¹¹⁰.

A alteração lipídica mais frequentemente associada aos quadros infecciosos e inflamatórios é a hipertrigliceridemia, podendo resultar de um aumento da síntese das VLDL ou de uma redução da sua clearance.

Em doentes com infecção por HIV e SIDA verificou-se um aumento das VLDL e dos triglicédeos¹¹¹¹.

Experiências no animal com baixas doses de lipopolissacárido (LPS), a mimetizar a infecção por Gram-negativos, mostraram uma rápida estimulação da

produção das VLDL, por aumento da lipólise do tecido adiposo, da síntese hepática dos ácidos gordos e da redução da sua oxidação. O resultado destas acções foi um aumento dos ácidos gordos para a esterificação em triglicerídeos e a produção das VLDL no fígado ^{1112 1113}.

O ácido lipoteicóico (LTA), que reproduz a infecção por Gram-positivos, induziu em ratos um aumento da síntese hepática das VLDL e uma hipertrigliceridemia ¹¹¹⁴.

A utilização de altas doses de LPS não aumentou a síntese hepática das VLDL mas reduziu a sua clearance por inibição da lipoproteína lipase ¹¹¹⁵.

Nas infecções verifica-se uma redução da Apo E, o que reduz ainda mais a clearance das VLDL ¹¹¹⁶.

Os efeitos das toxinas LPS e LTA sobre o metabolismo lipídico, são mediados através das citocinas, como o TNF, a IL-1, a IL-6 e o INF- α . As duas primeiras são moléculas chave nas infecções bacterianas e a IL-1 é o principal mediador da inflamação não infecciosa; o INF- α é activado essencialmente pelas infecções virais. Todas estas moléculas pró-inflamatórias estimulam a produção das VLDL e a hipertrigliceridemia nos animais de experiência ^{1117 1118 1119 1120 1121}.

Na infecção e na inflamação as VLDL estão igualmente alteradas na sua composição.

Após administração de LPS e TNF a hamsters machos, as VLDL, as IDL e as LDL, viram aumentado o seu conteúdo em ceramida, em glucosilceramida e em esfingomiéline, assim como a sua aterogenicidade ¹¹²².

Nas lipoproteínas LDL, também se verificaram alterações durante os processos infecciosos e inflamatórios. Em doentes com SIDA, verificou-se uma redução dos níveis destas lipoproteínas e um predomínio das partículas LDL pequenas e densas mais susceptíveis à oxidação ¹¹²³.

O *Platelet-activating factor* (PAF) é um fosfolípido pró-inflamatório produzido durante a infecção e a inflamação pelas plaquetas, leucócitos e células endoteliais. Esta molécula induz a activação das células inflamatórias, o aumento da permeabilidade vascular e a hipotensão arterial; é degradada pela PAF acetilhidrolase (PAF-AH) que catalisa a hidrólise do grupo acetil ¹¹²⁴. A PAF-AH hidrolisa também os ácidos gordos dos fosfolípidos e encontra-se ligada principalmente às lipoproteínas LDL (60 a 70%) e às HDL.

O papel da PAF-AH na aterosclerose não se encontra completamente esclarecido. Por um lado parece ter uma acção protectora ao hidrolizar o PAF e outros fosfolípidos oxidados pró-inflamatórios. Por outro, hidrolisa a fosfatidilcolina em lisofosfatidilcolina, uma molécula responsável por alguns dos efeitos mais importantes das OxLDL, como a quimiotaxia dos monócitos e a indução das moléculas de adesão¹¹²⁵.

Se o resultado final destas acções da PAF-AH é a indução ou a inibição do desenvolvimento da aterosclerose, depende das circunstâncias existentes em determinado momento (por ex: aumentos agudos ou prolongados de PAF-AH).

A *Secretory nonpancreatic phospholipase A2* (sPLA2) é outra proteína de fase aguda que se encontra aumentada nas situações infecciosas e/ou inflamatórias e que, ao hidrolisar os fosfolípidos, particularmente a fosfatidiletanolamina, liberta os ácidos gordos polinsaturados¹¹²⁶. Esta enzima é regulada pelos mediadores inflamatórios e ao hidrolizar os fosfolípidos e ao libertar os ácidos gordos polinsaturados, favorece a oxidação das LDL e aumenta a sua aterogenicidade¹¹²⁷.

A administração de LPS resultou no enriquecimento das LDL em triglicerídeos, colesterol, esfingomiéline e ceramida. Nas LDL, o aumento do conteúdo em esfingolípido resultou da acção da palmitoiltransferase, a enzima chave da síntese hepática destes lípidos^{1128 1129}.

A esfingomiéline é o substrato para a produção da ceramida pela esfingomiélinase da parede arterial¹¹³⁰. Numa infecção, as citocinas induziram a secreção de esfingomiélinase pelos macrófagos e células endoteliais, com aumento da produção de ceramida¹¹³¹.

O LPS, o TNF e a IL-1 aumentam a expressão do mRNA e a actividade hepática da glucosilceramida sintetase, a enzima que catalisa a primeira glucosilação da via dos glucoesfingolípido. As LDL dos animais a quem se administrou LPS viram o seu conteúdo enriquecido, para além da esfingomiéline e da ceramida, em glucosilceramida¹¹³².

As LDL ricas em ceramida e glucosilceramida apresentam maior capacidade para agregar e serem captadas pelos macrófagos, conduzindo à formação das *foam-cells*^{1133 1134}.

Os níveis do colesterol HDL encontram-se reduzidos na infecção e na inflamação crónicas, conferindo-lhes um maior risco cardiovascular^{1135 1136}.

A composição das HDL encontra-se igualmente alterada, com o seu conteúdo reduzido em ésteres de colesterol e enriquecido em colesterol livre, triglicerídeos e esfingolípidos¹¹³⁷. Existe também uma redução do conteúdo em Apo AI e da paroxonase (PON) e um aumento do conteúdo em Apo J e SAA (serum amyloid A)^{1138 1139 1140}.

Devido a todas estas alterações presentes nas situações de stresse infeccioso e/ou inflamatório, estas lipoproteínas são conhecidas como *HDL de fase aguda*.

Acompanhando as alterações das HDL, verificam-se modificações plasmáticas de proteínas como a *lecithin:cholesterol acyltransferase* (LCAT), a *cholesterol ester transfer protein* (CEPT), a *hepatic lipase* (HL) e a *phospholipid transfer protein* (PLTP), que interferem com o metabolismo e a função destas lipoproteínas^{1141 1142 1143 1144}.

Como vimos no capítulo sobre a protecção antioxidativa, as HDL apresentam capacidades antioxidantes que se poderão alterar nas HDL de fase aguda.

A PAF-AH catalisa a hidrólise dos fosfolípidos oxidados; na resposta de fase aguda, a actividade desta enzima altera-se de uma forma não uniforme, dependendo da espécie animal estudada e do tipo de estimulação inflamatória.

O LPS, o TNF e a IL-1 aumentaram a actividade da PAF-AH no plasma e nas HDL dos roedores^{1145 1146}, enquanto nos humanos infectados com o HIV este aumento verificou-se nas LDL¹¹⁴⁷.

Nos coelhos injectados com *óleo de croton* verificou-se uma redução da actividade da PAF-AH plasmática¹¹⁴⁸.

Outra importante enzima antioxidante das HDL é a PON, capaz de hidrolisar os fosfolípidos das OxLDL. Ao contrário da PAF-AH, que tem uma especificidade para os fosfolípidos com cadeia *acyl* curta, a PON apresenta uma predilecção pelos fosfolípidos de cadeia *acyl* mais longa.

Durante a infecção e a inflamação, a actividade da PON reduziu-se no animal e no homem, pelo que as HDL de fase aguda perderam as suas propriedades antioxidantes^{1149 1150}.

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda que fixa o cobre e que também está associada às HDL. Durante a inflamação / infecção esta proteína vê os seus níveis aumentar, o que poderia significar uma acção protectora em

relação à oxidação. Porém, alguns estudos demonstraram a capacidade da ceruloplasmina de induzir a oxidação das LDL ^{1151 1152}.

Esta acção contraditória poderá depender da integridade estrutural da ceruloplasmina; se esta estiver intacta poderá oxidar as LDL, mas se sofrer uma proteólise, com remoção de um dos sete átomos de cobre, perde a sua capacidade oxidante ¹¹⁵³.

O nível plasmático da ceruloplasmina correlacionou-se positivamente com a doença cardiovascular conferindo um RR, no maior quartil, de 2,1 (IC 95% 1,3 a 4,2; $p < 0,005$); desconhece-se, no entanto, se se comportou como anti ou pró-oxidante ¹¹⁵⁴.

A transferrina é a principal proteína transportadora do Ferro e encontra-se igualmente ligada às HDL. A redução dos seus níveis na infecção e/ou inflamação pode reduzir o conteúdo desta proteína nas HDL, tornando-as menos eficazes na prevenção da oxidação.

Também o transporte reverso do colesterol (TRC) poderá estar alterado nas HDL de fase aguda.

Durante a infecção e a inflamação há uma redução do conteúdo das HDL em apo A1 e da actividade da PLTP. Como as HDL e a Apo A1 são indispensáveis para o TRC, a sua redução interfere com a normal remoção do colesterol. Por sua vez, a PLTP medeia a transferência dos fosfolípidos e do colesterol entre as lipoproteínas ricas em triglicerídeos e as HDL, pelo que uma redução da sua actividade resulta em níveis reduzidos de HDL e do TRC ¹¹⁵⁵.

A actividade da LCAT também se encontra reduzida na infecção / inflamação, com a consequente redução da esterificação do colesterol e da sua migração para o núcleo das HDL. Estas alterações reduzem os gradientes de colesterol livre entre a periferia das HDL e as células carregadas de colesterol, inibindo a difusão passiva deste ¹¹⁴¹.

As actividades plasmáticas da CEPT e da HL estão igualmente reduzidas, inibindo a transferência do colesterol das HDL para as lipoproteínas ricas em triglicerídeos e a transformação das grandes HDL nas pequenas pré- β HDL ¹¹⁴².

Os níveis plasmáticos da sPLA₂ aumentaram durante a infecção e ao hidrolisar os fosfolípidos das HDL, reduziram o fluxo de colesterol das células para as lipoproteínas ¹¹⁵⁶.

Como vimos, o conteúdo das HDL em SAA e em Apo J aumenta durante o stresse infeccioso/inflamatório^{1157 1139}. As HDL enriquecidas em SAA desaparecem mais rapidamente da circulação do que as normais e ligam-se mais aos macrófagos do que aos hepatócitos¹¹⁵⁸. Deste processo resulta maior entrada do colesterol nos macrófagos e a sua transformação em *foam-cells*.

A Apo J (clusterina) é uma glicoproteína produzida por uma grande variedade de células e entre as suas principais funções inclui-se o transporte dos lípidos, a protecção da membrana plasmática, a regulação do complemento, a secreção endócrina e a indução da apoptose¹¹⁵⁹.

Os níveis desta apoproteína aumentam durante a infecção/inflamação, fixando os ácidos gordos tóxicos e prevenindo a oxidação dos fosfolípidos das LDL e da membrana plasmática; esta apoproteína encontra-se nas lesões ateroscleróticas particularmente nas células musculares lisas¹¹⁶⁰.

Como as células musculares lisas são um dos elementos celulares das lesões de aterosclerose e a Apo J parece regular a diferenciação destas células, esta apoproteína poderá ter capacidade de induzir a reorganização da parede arterial¹¹⁶¹.

Todas estas alterações das lipoproteínas e do metabolismo lipídico, que se verificam nas situações infecciosas / inflamatórias, constituem uma possível explicação para a relação epidemiológica existente entre a infecção / inflamação e a aterosclerose.

9.4 - Infecção e aterosclerose

A hipótese da infecção como causadora da aterosclerose foi já defendida nos finais do século XIX e princípios do século XX. Frothingham escreveu que “a esclerose da idade avançada pode representar o somatório de lesões provocadas por agentes infecciosos e metabólicos”¹¹⁶².

Diversos organismos têm sido responsabilizados pela patogénese da aterosclerose, como o *herpes simplex vírus* (HSV), o citomegalovírus (CMV), os vírus da hepatite, a *Chlamydia pneumoniae* e o *Helicobacter pylori*^{1163 1164 1165 1166}.

Em placas de aterosclerose humana têm sido encontrados sinais de infecção por agentes microbianos, como a *Chlamydia pneumoniae*; este agente

pode induzir a libertação do lipopolissacárido (LPS) e de proteínas de choque térmico (HPS) que estimulam a produção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais, células musculares lisas vasculares e leucócitos^{1167 1168 1169}.

O TLR4 é o receptor transmembranar do LPS que inicia a resposta imune inata às bactérias Gram negativas, incluindo a *C pneumoniae* e o *H. pylori*. Encontra-se nos cardiomiócitos, nos macrófagos, nas células endoteliais e musculares lisas. O LPS, ao ligar-se a este receptor, activa a transcrição do NF- κ B e a síntese das citocinas, dos factores quimiotácticos e de outras moléculas anti-microbianas¹¹⁷⁰.

Uma resposta enérgica a um agente microbiano traduz uma defesa eficaz contra a infecção, mas pode conferir um maior risco para o desenvolvimento futuro de lesões de aterosclerose.

Corroborando esta hipótese, indivíduos com o polimorfismo Asp299Gly TLR4 (polimorfismo do receptor TLR4 com menor capacidade de desencadear a cascata inflamatória em resposta ao LPS), manifestaram um menor risco de desenvolver aterosclerose carotídea (OR 0,54; IC 95% 0,32 a 0,98; p=0,05) e menor espessura da média-íntima da artéria carótida comum (coeficiente de regressão -0,07; IC 95% -0,12 a 0,02; p=0,01)¹¹⁷¹. Esta variante genética da imunidade inata torna as pessoas susceptíveis à infecção disseminada por Gram negativos, mas confere-lhes uma protecção anti-aterosclerótica.

Os estudos epidemiológicos procurando relacionar a infecção com a doença cardiovascular têm dado resultados contraditórios.

Num estudo prospectivo, realizado em 213 indivíduos com mais de 65 anos e com EAM não fatal ou morte por causa cardíaca coronária e em 405 controlos, avaliaram-se as diferenças nas serologias (IgG) do HSV, do CMV e da *C pneumoniae*. O único organismo que mostrou diferenças significativas dos títulos da IgG entre as duas populações, particularmente nos fumadores, foi o HSV - RR de 2,0 (IC 95% 1,1 a 3,6). Relativamente à *C pneumoniae* só os altos títulos de IgG (1:1024) estiveram associados a um maior risco - RR 2,2 (IC 95% 1,1 a 4,4)¹¹⁷².

Outros estudos retrospectivos e prospectivos não conseguiram ainda esclarecer a possível relação entre a infecção por *Chlamydia pneumoniae* e a doença cardiovascular^{1173 1174 1175}. Determinadas características da infecção por este organismo, como sejam as reinfecções, as reactivações, as diferenças entre

os serótipos e as respostas dos hospedeiros, ao condicionarem títulos mais ou menos elevados da IgG, poderão explicar as diferentes associações verificadas.

Um estudo realizado em 31 doentes com angina instável, mostrou que o perfil antigénico do organismo infeccioso pode apresentar uma maior correlação com a doença coronária do que a simples seropositividade¹¹⁷⁶.

Num estudo de coorte, em que se seguiram durante 10 anos 6051 indivíduos, procuraram-se eventuais relações entre os níveis séricos de endotoxina, dos anticorpos contra as bactérias responsáveis pela infecção periodontal e dos marcadores de inflamação, com o risco de DCV. Títulos elevados de Ac(s) comportaram-se como factores preditivos independentes da doença vascular, tendo os indivíduos que apresentavam os valores no percentil 4, um RR de 3,95 (IC 95%, 1,13 a 3,08). Os que apresentavam simultaneamente altos títulos de Ac(s) e níveis séricos elevados de PCR ou de IL-6, tinham RR(s) de 3,01 (IC 95%, 1,27 a 7,09) e de 3,11 (IC95%, 1,42 a 6,83), respectivamente. Os RR(s) dos participantes que possuíam altos níveis de endotoxémia foram de 1,82 (IC95%, 1,22 a 2,73) e de 3,92 (IC95%, 1,99 a 7,74), de 3,54 (IC95%, 1,78 a 7,03) e de 2,26 (IC95%, 1,13 a 4,52) se simultaneamente apresentassem níveis elevados de PCR, IL-6 ou de TNF- α , respectivamente. Estas associações não foram independentes dos níveis lipídicos, embora os indivíduos com uma relação elevada endotoxina / CHDL apresentassem um RR de 1,92 (IC95% 1,19 a 3,08), mesmo após análise multivariada^{1177 1178}.

No *Azithromycin in Acute Coronary Syndromes* (AZACS), realizado em doentes com EAM ou angina instável, os autores avaliaram se a azitromicina, durante 5 dias, reduziria a incidência da doença isquémica recorrente, nomeadamente o EAM e/ou a necessidade de revascularização. Os doentes do grupo da antibioterapia, relativamente aos medicados com placebo, não obtiveram qualquer redução na incidência da doença isquémica recorrente (IC 95% 0,72 a 1,24; $p=0,664$)¹¹⁷⁹.

Num outro estudo, em indivíduos com doença coronária estável e título de IgG para *C pneumoniae* superior ou igual a 1:16, o *Weekly Intervention With Zithromax for Atherosclerosis and Related Disorders* (WIZARD), estudaram-se os efeitos da terapêutica com azitromicina durante 12 semanas. Aos 14 meses não se verificou qualquer redução significativa no risco de ocorrência de qualquer dos *end-points* primários - morte por todas as causas, recidiva de EAM

não fatal, revascularização coronária e angina de peito, 7% (IC 95% de -5% to 17%; $P = 0,23$)¹¹⁸⁰.

Em cerca de 4000 indivíduos com doença coronária estável, avaliou-se o efeito da azitromicina, na dose de 600 mg / semana, durante 12 meses. Não se verificou qualquer redução significativa no risco de virem a sofrer do *end-point* combinado de morte por doença cardíaca coronária, EAM não fatal, revascularização coronária e hospitalização por angina instável – redução do risco em 1% (IC 95% de -13 a 13%)¹¹⁸¹.

No *Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy* (PROVE-IT), a gatifloxacina, na dose de 400 mg / dia, administrada inicialmente durante 15 dias e depois nos primeiros 10 dias de cada mês, não reduziu a incidência da mortalidade por todas as causas, do EAM, da angina instável, da revascularização nem do AVC isquémico - RR 0,95 (IC 95% 0,84 a 1,08; $P=0,41$)¹¹⁸².

Num estudo, avaliou-se a susceptibilidade aos antibióticos da *C pneumoniae* existente nos monócitos humanos circulantes, que se julga serem responsáveis pelo seu transporte do aparelho respiratório para a parede do vaso, aonde, presumivelmente, desencadearão as lesões de aterosclerose. Os autores concluíram que os antibióticos (azitromicina ou rifampicina), não inibiram as clamídeas intra-celulares, pelo que questionam a utilidade das terapêuticas anti *C pneumoniae*, na prevenção da infecção vascular e da aterosclerose¹¹⁸³.

A presença concomitante da positividade serológica (IgG) para a *C. pneumoniae*, para o CMV e/ou para o Herpes Simplex (HSV-1) e níveis elevados da PCR, traduziu uma resposta inflamatória mais intensa e mostrou um particular significado como factor preditivo de futura doença coronária^{1184 1185}.

Outros autores defendem que a coinfeção por diversos microorganismos, mais do que a acção isolada de uma determinada bactéria ou vírus, poderá estar na génese das lesões de aterosclerose¹¹⁸⁶.

Em 218 indivíduos submetidos a angiografia coronária, determinaram-se as serologias (IgG) para diversos vírus e bactérias (Cytomegalovirus, Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, vírus da hepatite A e herpes simplex virus-1) e avaliou-se a disfunção endotelial através da administração intracoronária de

acetilcolina. A positividade simultânea para múltiplos agentes patogénicos, correlacionou-se positivamente com a gravidade das alterações angiográficas e com a disfunção endotelial – RR 1,3 (IC 95% 1,05 a 1,6; $p=0,018$). Concluiu-se que, a disfunção endotelial poderá constituir um mecanismo pelo qual os microorganismos desencadeiam a doença vascular¹¹⁸⁷. O mesmo estudo, mostrou que os indivíduos que possuíam IgG positiva para cinco agentes infecciosos, apresentavam maior incidência de doença da artéria coronária do que os que apresentavam positividade apenas para um microorganismo - RR 5 (IC 95% 2,2 a 11,2; $p<0,0001$).

Muito importante na relação entre os agentes infecciosos e a aterosclerose parece ser o tipo de resposta imune, essencialmente humoral e/ou celular, manifestada pelo hospedeiro.

Este aspecto foi avaliado num trabalho realizado em indivíduos dos dois sexos, sujeitos a angiografia coronária e em que se avaliaram os anticorpos IgG anti-CMV e a resposta dos linfócitos T aos antígenos do CMV. Verificaram-se quatro tipos de resposta imunológica: um grupo de indivíduos não manifestou qualquer imunidade humoral nem celular (Ac-/Tc-), um segundo grupo com predomínio da imunidade humoral (Ac+/Tc-), um outro que manifestou uma imunidade essencialmente celular (Ac-/Tc+) e um quarto grupo de indivíduos com um tipo de imunidade combinada (Ac+/Tc+). A prevalência da doença coronária, nas mulheres, foi significativamente maior nas que apresentaram uma imunidade dos tipos Ac+/Tc- ($p<0,005$) e Ac+/Tc+ ($p<0,003$), relativamente às que manifestaram uma imunidade do tipo Ac-/Tc-¹¹⁸⁸. Os autores explicam estes resultados, admitindo que a resposta celular possa ter sido mais eficaz na erradicação do CMV, ou a própria resposta humoral ter tido um papel activo no desencadear da doença vascular.

Num estudo prospectivo, realizado em 826 homens e mulheres Italianos, com idades compreendidas entre os 40 e os 79 anos, avaliou-se a relação entre a progressão da aterosclerose carotídea, por doppler de alta resolução e a presença de infecção crónica (respiratória, urinária, dental, etc). Todas as infecções crónicas conferiram um maior risco de desenvolvimento de lesões de aterosclerose carotídea, mesmo após ajustamento para os factores de risco clássicos, RR 4,08 (IC 95% 2,42 a 6,85; $p<0,0001$). A aterosclerose era mais

desenvolvida nos indivíduos com uma resposta inflamatória mais intensa (PCR, α 1-antitripsina, VCAM, ICAM, Selectina-E)¹¹⁸⁹.

Um facto que dificulta a avaliação da possível aterogenicidade dos agentes infecciosos é o diagnóstico das infecções crónicas. Por exemplo, a prevalência da infecção por *C. pneumoniae* aumenta com a idade, atingindo cerca de 50% dos adultos em todo o mundo, estando bem documentadas as infecções crónicas e recorrentes. Sendo a cultura deste microorganismo difícil, o diagnóstico da infecção é realizado através dos testes serológicos, incapazes de distinguir as infecções crónicas persistentes das prévias exposições.

Admite-se, embora com alguma controvérsia, que os anticorpos IgA e IgG anti-Clamídea, persistentemente elevados traduzam uma infecção crónica¹¹⁹⁰.

Novos testes para a detecção da infecção crónica por *C. pneumoniae*, como a PCR (polymerase chain reaction), permitirão a identificação do microorganismo nas células mononucleares do sangue periférico.

9.5 - Autoimunidade e aterosclerose

O Lúpus Eritematoso Disseminado (LED) é o paradigma das doenças autoimunes; caracteriza-se por múltiplas alterações imunológicas que condicionam, entre outras agressões, uma intensa inflamação vascular.

Os indivíduos com LED desenvolvem aterosclerose acelerada. Diversos trabalhos têm demonstrado uma elevada taxa da doença e da mortalidade cardiovascular nestes doentes^{1191 1192}.

Embora os clássicos factores de risco cardiovasculares (HTA, CLDL e a própria corticoterapia) contribuam decisivamente para a aterosclerose nos doentes com LED, a doença lúpica possui características que lhe conferem um maior risco vascular^{1193 1194 1195 1196}.

Um estudo recente em doentes com LED, demonstrou uma apoptose acelerada das células endoteliais e que as células progenitoras endoteliais (CPE), assim como as células angiogénicas mielomonocíticas circulantes, responsáveis pela reparação do endotélio, após lesão, estavam fenotípica e funcionalmente alteradas. Os doentes com LED tinham concentrações de CPE significativamente reduzidas, comparativamente aos controlos (310 \pm 50 /mL versus 639 \pm 102) e uma reduzida capacidade das suas CPE em se transformar

em células endoteliais maduras e de sintetizar níveis adequados de VEGF e de *hepatic growth factor* (HGF). Estas alterações estarão na dependência do INF- α e justificarão parcialmente a aterosclerose acelerada dos doentes lúpicos¹¹⁹⁷.

A autoimunidade e a síndrome antifosfolipídica (SAF) têm um importante papel no aumento da aterogênese. Diversos estudos em doentes com LED têm demonstrado uma associação entre os anticorpos anticardiolipina (aCL) e a incidência da DCV, não obstante os aCL se associem a baixos níveis de colesterol total, mas também de CHDL e de Apo A1¹¹⁹⁸.

A β 2-glicoproteína I é uma proteína plasmática constituída por cinco domínios, cada um com cerca de 60 aminoácidos. Já em 1990, diversos autores demonstraram que os aCL se fixavam à cardiolipina (CL) na presença da β 2-glicoproteína I^{1199 1200 1201}. O quinto domínio possuirá a capacidade de se fixar aos fosfolípidos, enquanto que o quarto apresentará o possível epítipo para os aCL.

Os anticorpos anti- β 2-glicoproteína I, representam a maior população de anticorpos antifosfolípidos nos indivíduos com SAF secundário ao LED, associando-se a fenómenos trombóticos arteriais e venosos. Estes autoanticorpos podem aumentar a captação das OxLDL pelos macrófagos. Embora a β 2-glicoproteína I possa inibir a captação intracelular das lipoproteínas oxidadas, os complexos OxLDL- β 2-glicoproteína I e anti- β 2-glicoproteína I serão mais facilmente captados pelos macrófagos¹²⁰².

Alguns trabalhos sugeriram que a β 2-glicoproteína I competia com as OxLDL na ligação às células endoteliais e aos monócitos¹²⁰³. Esses mesmos trabalhos demonstraram que a β 2-glicoproteína I está presente nas placas de aterosclerose, simultaneamente com os linfócitos CD4.

É possível que esta glicoproteína se comporte como um auto-antigénio e como se encontra em circulação ligada aos lípidos (OxLDL e HDL), deverá penetrar nas lesões de ateroma ligada a estas lipoproteínas.

Resumindo, a β 2-glicoproteína I possui diversas propriedades extremamente importantes na aterosclerose: ao ligar-se às OxLDL e /ou competindo com elas pelos receptores scavenger, pode ser anti-aterogénica ao inibir a captação destas lipoproteínas modificadas pelos macrófagos; na presença de anticorpos anti β 2-glicoproteína I, essa competição com as OxLDL desaparece, facilitando a formação das *foam-cells*¹²⁰⁴.

Em ratos deficientes em receptores LDL, demonstrou-se que a imunidade contra a β 2-glicoproteína I contribuiu para o desenvolvimento da aterosclerose aórtica ($26000 \pm 5700 \mu\text{m}^2$ versus $2250 \pm 700 \mu\text{m}^2$, respectivamente imunizados e não imunizados) ^{1205 1206}.

Outro alvo potencial dos anticorpos antifosfolípidos parece ser o ácido lisobifosfatídico, abundantemente expresso na membrana interna dos endosomas maduros. Estes anticorpos poderão ligar-se aos endosomas e conduzir à acumulação de colesterol nestas formações vesiculares das células ^{1207 1208}. Estas alterações no transporte do colesterol poderão estar na dependência das alterações de exportação das proteínas pelos endosomas. Em indivíduos com LED, a ligação dos anticorpos anti-fosfolípidos ao ácido lisobifosfatídico e à cardiolipina, está dependente da β 2-glicoproteína I.

Os Ac anti-OxLDL (OxLDL-Ac) têm sido detectados em indivíduos com síndrome anti-fosfolípídica primária e secundária ao LED ^{1209 1210}.

Os anticorpos IgG anti MDA-Lp(a) (anti MDA-Lp(a)) estavam presentes em 37% de indivíduos com SAF e em 6% dos controlos ¹²¹¹. Nos portadores de SAF verificou-se uma correlação entre os MDA-Lp(a)-Ac e os OxLDL-Ac, existindo uma reactividade cruzada entre as duas famílias de anticorpos.

Em indivíduos com LED, os anticorpos anti-cardiolipina (aCL) reagiram com as MDA-LDL ^{1212 1213}.

A oxidação da cardiolipina originará epítomos para os aCL, sendo alguns destes epítomos comuns à β 2-glicoproteína I e às OxLDL ¹²¹⁴.

A infusão de OxLDL, mas não a de LDL, agravou as manifestações clínicas da SAF experimental ¹²¹⁵ e a utilização de IgG purificada aCL confirmou a reacção com as OxLDL, sugerindo que alguma fracção dos aCL terá actividade OxLDL-Ac ¹²¹⁶.

Os anticorpos anti OxLDL farão parte da família dos anticorpos anti-fosfolípidos e deverão ser avaliados como potencial marcador da SAF.

9.6 - Antigénios na Aterogénese

9.6.1 - OxLDL

As LDL contém cerca de 700 moléculas de fosfolípidos, 600 de colesterol livre, 1600 de ésteres de colesterol, 185 de triglicerídeos e 1 de apolipoproteína B, constituída por 4536 aminoácidos¹²¹⁷.

Como vimos em capítulo anterior, as LDL podem sofrer modificações oxidativas com formação de moléculas pró-inflamatórias, nomeadamente quando retidas pelos proteoglicanos da parede arterial. As mais importantes são a Apo B100 alterada, os hidroperóxidos lipídicos, os lisofosfolípidos (lisofosfatidilcolina), os ácidos gordos oxidados, os oxisteróis, o colesterol oxidado, os compostos carbonil e os aldeídos¹²¹⁸.

Os ácidos gordos polinsaturados dos ésteres de colesterol, dos fosfolípidos e dos triglicerídeos, sofrem a acção oxidativa dos radicais livres, participando posteriormente na sinalização celular. Por exemplo, os 9- e 13-hidroxi-octadecadienóico (9-HODE e 13-HODE) activam os PPAR γ e, através destes, induzem a expressão do CD36, aumentando a captação das OxLDL e a formação das *foam-cells*¹²¹⁹.

Os lípidos oxidativamente modificados induzem a expressão de moléculas de adesão, de factores quimiotácticos, de citocinas e de outros mediadores inflamatórios^{1220 1221 1222}.

As OxLDL são fortemente imunogénicas, podendo induzir a activação das células T circulantes. Os clones de linfócitos T de placas de aterosclerose humana reconheceram as OxLDL, com proliferação do DNA e produção de citocinas^{1223 1224}.

Os linfócitos do sangue periférico de indivíduos com doença cardíaca isquémica, mostraram uma reactividade às OxLDL e autoanticorpos contra as OxLDL estavam presentes no soro humano^{1225 1226}.

A activação das células T pelas OxLDL foi dependente dos monócitos e ocorreu essencialmente com baixas concentrações das OxLDL, sendo inibida quando estas lipoproteínas atingiram níveis mais elevados^{1227 1228}.

As citocinas Th1 (IL-1 β , IL-6, TNF) dominam nas lesões avançadas de aterosclerose, admitindo-se que os lípidos PAF-like e a lisofosfatidilcolina das OxLDL sejam os principais indutores da sua produção¹²²⁹.

As OxLDL induziram a quimiotaxia para os monócitos e os linfócitos T, promoveram a diferenciação dos monócitos em macrófagos, estimularam a interação entre os mononucleares e as células endoteliais e activaram estas últimas células^{1230 1231 1232}.

Estas lipoproteínas oxidadas induziram as HSP e, através destas, promoveram reações inflamatórias¹²³³.

Aparentemente, os efeitos pró-inflamatórios das OxLDL, estarão na dependência dos lípidos PAF-like, particularmente da lisofosfatidilcolina^{1234 1235 1236}.

A ligação dos OxLDL-Ac com as OxLDL foi inibida pelas fosfatidilcolinas oxidadas e pela 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfocolina (OxPAPC), sugerindo serem estas moléculas importantes epítomos antigénicos das OxLDL^{1237 1238}.

Também as VLDL e as IDL apresentam potencial aterogénico, particularmente depois de oxidadas. As beta-VLDL, mesmo não oxidadas, terão demonstrado potencial pró-inflamatório^{1239 1240}.

9.6.2 - Células endoteliais (CE)

Níveis elevados de anticorpos anti CE (CE-Ac) estão presentes em diversas doenças autoimunes, nomeadamente no LED, na artrite reumatóide e nas vascularites^{1241 1242 1243}.

Os CE-Ac mostraram-se positivamente associados à HTA ($p=0,029$) e à aterosclerose ($p=0,042$)¹²⁴⁴. A relação entre o título de CE-Ac e a HTA poderá estar na dependência do aumento da endotelina¹²⁴⁵.

As células endoteliais de diferentes tecidos (artérias, veias, vasos de diferentes calibres), ainda que do mesmo órgão, são fenotipicamente heterogéneas^{1246 1247}.

Diversos trabalhos têm procurado identificar os antigénios endoteliais contra os quais se formam os CE-Ac. Alguns, atribuíram ao componente proteico das CE(s) a responsabilidade de induzir a produção de anticorpos, enquanto

outros consideraram serem os fosfolípidos os determinantes antigénicos destas células^{1248 1249 1250}.

O sulfato de heparano proteoglicano, ou molécula heparina-like membranar, comportou-se como um dos principais epítomos antigénicos constitutivos das CE^{1251 1252}.

Alguns dos CE-Ac reconheceram antigénios não constitutivos da membrana mas aderentes a ela, tais como o DNA, as histonas, os complexos DNA/histonas, a proteinase 3 e a β 2-glicoproteína I. Estas duas últimas moléculas podem lesar as células endoteliais através da ligação simultânea à membrana celular e a anticorpos específicos^{1253 1254 1255}.

O soro com altos títulos de CE-Ac reagiu com as OxLDL e com o seu principal fosfolípido oxidado, a lisofosfatidilcolina¹²⁵⁶.

O PAF (platelet activating factor) é um fosfolípido pró-inflamatório, presente nas CE(s) e fosfolípidos PAF-like estão igualmente presentes nas OxLDL¹²⁵⁷.

Os anticorpos anti-PAF correlacionaram-se positivamente com as lesões iniciais de aterosclerose carotídea ($p=0,02$ a $p=0,009$) e com a HTA *border-line* (0,0007), comportando-se como marcadores de doença cardiovascular precoce¹²⁵⁸. O PAF poderá ser, assim, um dos epítomos antigénicos para os CE-Ac.

As *heat shock proteins* (HSP) são proteínas com funções de reparação celular e de protecção de outras proteínas. São predominantemente intracelulares, podendo igualmente expressar-se na superfície das células endoteliais lesadas e no soro de indivíduos saudáveis^{1259 1260}.

As HSP presentes na superfície das CE(s) podem constituir um importante alvo para os CE-Ac, havendo uma associação positiva entre os anticorpos anti-HSP e os anti-células endoteliais ($p=0,02$)¹²⁴⁴.

Os CE-Ac(s), ao reconhecerem estes e outros antigénios, podem contribuir para a activação/disfunção endotelial e para o desenvolvimento da doença cardiovascular.

Os CE-Ac podem induzir a expressão das moléculas de adesão e aumentar a produção do MCP-1 e das IL-1 β , IL-6 e IL-8 nas CE(s). Através destas acções, os CE-Ac podem induzir a adesão dos polimorfonucleares e dos

monócitos à parede vascular, seguida da migração para o espaço sub-endotelial, que se admite ser um dos fenómenos iniciais da lesão aterosclerótica ^{1261 1262}.

Os anticorpos anti-CE também poderão induzir a apoptose das CE(s), provavelmente através do aumento da expressão da fosfatidilserina na superfície celular ¹²⁶³.

9.6.3 - Heat Shock Proteins (HSP(s))

As HSP são uma família de aproximadamente 25 moléculas, com uma estrutura altamente conservada e com funções de protecção celular. Estas proteínas de fase aguda encontram-se nas células procarióticas e eucarióticas, quer numa forma constitutiva, quer como resposta ao stresse. São classificadas, segundo o seu peso molecular, em 100, 70, 60 e 40 KD.

Na resposta à agressão por toxinas, radicais livres, isquémia, stresse mecânico e térmico, as HSP associam-se a outras proteínas celulares e protegem-nas da desnaturação ^{1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274}.

As células respondem ao stresse por mecanismos adaptativos que limitam as lesões e previnem a morte celular. Por exemplo, a hipertermia moderada desencadeia um estado transitório de *termotolerância*, em relação directa com os níveis das HSP. O choque térmico activa a cascata das proteínas quinases, incluindo as SAPK/JNK, conduzindo à produção de ceramida; esta comporta-se como uma molécula segunda mensageira, activando as caspases, que, ao actuarem em substratos proteicos específicos, desencadeiam a apoptose.

Numa fase precoce do processo apoptótico, as HSP preveniram a morte celular através da inibição das quinases e da formação das caspases ^{1275 1276}.

Estas proteínas têm uma notável constância filogenética. As HSP 60 das micobactérias, da Chlamídiæ e da E. coli, apresentam uma homologia superior a 95% a nível do DNA e da proteína. Como as HSP60 constituem importantes componentes antigénicos dos microorganismos, quase todos os seres humanos reagem humoral e celularmente contra estas proteínas. Devido à grande semelhança estrutural entre as HSP, há o risco de reactividade cruzada entre as proteínas animais e humanas.

Os ratos, os coelhos e os seres humanos, expressam HSP60 nas células endoteliais das zonas mais susceptíveis à aterosclerose, constituindo um pré-

requisito para a intervenção das células T e/ou dos anticorpos desencadeados por infecções ou vacinações prévias. Em células endoteliais foi possível estimular a expressão simultânea de HSP60 e de moléculas de adesão (*intercellular adhesion molecule-1 – ICAM-1; endothelial leukocyte adhesion molecule-1 – ELAM-1; vascular cell adhesion molecule-1 – VCAM-1*)¹²⁷⁷.

Diversas evidências suportam o papel das *heat shock protein* como indutoras de reacções imunológicas, capazes de iniciar e/ou amplificar o processo aterogénico¹²⁷⁸.

A imunização de coelhos normocolesterolémicos com micobactérias mortas pelo calor, ou com HSP recombinante, provocou a infiltração da íntima pelos mononucleares, predominantemente CD4+, nos locais da árvore arterial mais frequentemente envolvidos na aterosclerose¹²⁷⁹.

Também no coelho, se demonstrou que as lesões de aterosclerose desencadeadas pela imunização com HSP65, resolveram espontaneamente ao fim de trinta e duas semanas, enquanto a mesma imunização associada a uma dieta hipercolesterolémica não mostrou qualquer regressão¹²⁸⁰. Este facto apontou para uma acção potenciadora do colesterol em relação aos mecanismos inflamatórios.

A imunossupressão de coelhos com anticorpo monoclonal anti células T e prednisolona, inibiu significativamente o desenvolvimento de aterosclerose induzida pela imunização com HSP65 ($p < 0,01$)¹²⁸¹.

No homem verifica-se que a maioria dos indivíduos possuem anticorpos e células T que reconhecem os epítomos da HSP60 microbiana (bactérias, parasitas, vírus), podendo ocorrer uma reactividade cruzada entre estes antigénios e a HSP60 humana. Quando a célula endotelial sofre a acção da hipertensão arterial, do tabagismo, dos radicais de oxigénio e das infecções, expressa na sua superfície, como mecanismo inicialmente protector, a HSP, que, ao ser reconhecida pelos anticorpos anti-HSP microbiana, desencadeia os mecanismos inflamatórios vasculares e a aterogénese. Esta reactividade cruzada dependerá do reportório individual de células B e T e do complexo de histocompatibilidade major (MHC), o que justificará, parcialmente, as diferentes susceptibilidades dos indivíduos à aterosclerose.

Em indivíduos com idades compreendidas entre os 60 e os 79 anos, verificou-se uma relação positiva e independente entre os títulos dos anticorpos

anti HSP65 e a presença de lesões ateroscleróticas carotídeas ($p < 0,05$). Os autores sugeriram que a concentração dos anti-HSP65 pode ser diagnóstica e prognosticamente útil na avaliação da aterosclerose¹²⁸².

Em 391 homens e mulheres, com uma idade média de 57 anos, com doença coronária e em que se realizou estudo angiográfico, verificou-se uma significativa associação entre os níveis de IgG anti HSP60 e a presença e severidade da coronariopatia ($p = 0,0009$)¹²⁸³.

Admite-se que a resposta autoimune dirigida às HSP(s) possa activar o sistema imunitário da placa de aterosclerose e conduzir à sua progressão.

9.7 - Inflamação e HTA

Apenas como uma breve alusão, refere-se que os mecanismos inflamatórios poderão participar na patogénese da HTA e na relação entre esta e a aterosclerose. Por exemplo, a Angiotensina II (AII), para além das suas propriedades vasoconstritoras, apresenta potencial pró-inflamatório, induzindo a produção de superóxido e de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, MCP-1, VCAM-1) pelas células endoteliais e musculares lisas^{1284 1285 1286}.

9.8 - Inflamação e Diabetes

Igualmente de forma breve, recorda-se que a hiperglicemia, através da formação dos produtos terminais da glicação (AGE), induz significativas alterações em algumas macromoléculas.

Ao ligar-se a determinados receptores de superfície das células endoteliais, tais como os RAGE (receptores dos AGE), as proteínas modificadas pelos AGE aumentam a produção de citocinas e de outros indutores da inflamação. A diabetes também induz os mecanismos inflamatórios através dos processos oxidativos^{1287 1288}. Em crianças com excesso de peso e síndrome metabólica, verificaram-se níveis elevados da PCR ($p < 0,0001$), da IL-6 ($p < 0,0001$) e dos Isoprostanos ($p < 0,001$), comparativamente a crianças de peso normal e a obesas mas sem síndrome metabólica¹²⁸⁹.

A obesidade, frequentemente associada à insulinoresistência, à diabetes e à dislipidemia, acompanha-se de exagerada acumulação de gordura visceral.

Este tecido adiposo visceral possui grande potencial para sintetizar citocinas, como o TNF- α e a IL-6, estimulando a produção de PCR, os mecanismos inflamatórios e a aterogénese ^{1290 1291}.

Em consonância com este facto, está um trabalho realizado em indivíduos saudáveis, em que se encontraram relações entre a PCR, a IL-6 e o TNF- α , não apenas com a HTA e a dislipidemia, mas também com a resistência à insulina e com os marcadores de disfunção endotelial ($p < 0,00005$)¹²⁹². Estas associações poderão explicar a relação entre a resistência à insulina, a obesidade (particularmente a central) e o risco de doença cardiovascular.

Num estudo de coorte realizado em mais de 2000 indivíduos, dos dois sexos, os níveis plasmáticos de selectina-E correlacionaram-se positiva e independentemente, com o risco de diabetes tipo 2. Os homens e mulheres, com os níveis desta proteína nos maiores tercís, tinham riscos relativos de 2,63 (1,79 a 3,88) e de 1,71 (1,07 a 2,75) respectivamente. Nos mesmos indivíduos, os níveis de ICAM-1 correlacionaram-se também com um risco acrescido da doença, embora de uma forma não independente de outros factores de risco da diabetes. Estes dados suportam uma relação entre a diabetes, a disfunção endotelial e a inflamação¹²⁹³.

Num outro estudo, realizado em 100 diabéticos tipo 2, 50% com doença cardiovascular, a PLA₂ associada às LDL e a mieloperoxidase, foram significativamente superiores nos indivíduos diabéticos com DCV, comparativamente ao grupo controlo (valores médios de 400,1 e 528,21 e desvios padrão de 92,58 e 17,98, respectivamente)¹²⁹⁴.

Procurou-se avaliar se a associação entre a inflamação e/ou os seus marcadores, com o risco de desenvolver diabetes tipo 2, difere consoante o sexo. Compararam-se as concentrações basais da PCR e da IL-6, em 527 diabéticos (305 homens e 222 mulheres), com as de 1698 não diabéticos (889 homens e 809 mulheres) pertencentes ao *Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease* (MONICA) /*Cooperative Research in the Region of Augsburg* (KORA) studies. As concentrações elevadas da PCR apresentaram uma associação mais forte com o risco de diabetes 2 nas mulheres, relativamente aos homens - RR 7,60 (IC 95% 4,43 a 13,04) versus 1,84 (IC 95% 1,27 a 2,67; $p < 0,001$). Após ajustamento para os factores de risco

metabólicos, a associação entre a PCR e a diabetes manteve-se significativa apenas no sexo feminino¹²⁹⁵.

10 - Efeitos imunomoduladores e antiinflamatórios dos Hipolipemiantes

Sendo a aterosclerose uma doença crónica e com uma progressão ao longo de décadas, seria de esperar que fossem necessários longos períodos de tratamento com os fármacos hipolipemiantes para que se verificasse uma redução do risco vascular. No entanto, o que se verifica nos grandes ensaios clínicos com as estatinas, é que os benefícios são evidentes ao fim do primeiro ou do segundo ano do estudo!

Os estudos que avaliaram a evolução das lesões vasculares por métodos imagiológicos, mostraram que a redução do risco vascular não se acompanhava de uma significativa redução das placas de aterosclerose.

A aterosclerose, não é mais considerada uma doença em que o principal mecanismo é uma redução estática do lúmen das artérias, mas um somatório de alterações da motilidade endotelial, da coagulação e dos mecanismos inflamatórios.

Todos estes factos despertaram o interesse dos investigadores sobre possíveis efeitos extra-lipídicos dos hipolipemiantes, nomeadamente sobre as suas acções imunomoduladora e antiinflamatória.

Antes de rever os potenciais efeitos imunomoduladores dos principais fármacos hipolipemiantes, estatinas e fibratos, é bom não esquecer que a simples redução dos níveis das lipoproteínas terá, muito provavelmente, uma acção benéfica em termos inflamatórios. Para isso vamos recordar os mecanismos pelos quais os lípidos se comportam como moléculas sinalizadoras da inflamação.

As prostaglandinas e os leucotrienos, globalmente denominados eicosanóides, são moléculas formadas por ácidos gordos e com significativos efeitos inflamatórios. Formam-se essencialmente a partir do ácido araquidónico (20:4n6), embora outros ácidos gordos como o 20:3n6 e o 20:5n3 possam igualmente ser transformados nestes mediadores inflamatórios.

Prostaglandinas – Resultam da acção da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) sobre os ácidos gordos polinsaturados, quase sempre o 20:4n6. A sua

síntese resulta de uma série de reacções de oxidação, com a passagem por diversos metabolitos intermediários, tais como a prostaglandina G₂ (PGG₂), a prostaglandina H₂ (PGH₂), o tromboxano A₂ (TxA₂), a prostaglandina D₂ (PGD₂), a prostaglandina E₂ (PGE₂) e a prostaglandina I₂ (PGI₂). A PGE₂ está associada aos sinais inflamatórios clássicos como o rubor, o calor, o tumor e a dor, e é produzida pelos leucócitos polimorfonucleares.

Existem duas isoformas da cicloxigenase: a COX-1, que se encontra constitutivamente expressa na maioria das células, e a COX-2, responsiva a vários estímulos e responsável pela produção dos prostanóides inflamatórios¹²⁹⁶.

Dependendo do ácido gordo original, as prostaglandinas são classificadas em prostaglandinas série-2 (PGH₂, PGD₂, PGE₂, PGI₂) quando derivam do 20:4n₆, em prostaglandinas da série-1 quando o substrato é o 20:3n₆ e em prostaglandinas da série-3 quando é o 20:5n₃ que lhes dá origem.

As principais prostaglandinas inflamatórias destas últimas séries são, respectivamente, a PGE₁ e a PGE₃.

Leucotrienos – Estas moléculas são eicosanóides produzidas pela acção da lipoxigenase (LO) e igualmente com uma potente actividade inflamatória. As principais lipoxigenases são a 5-LO, a 12-LO e a 15-LO, embora os leucotrienos mais importantes do ponto de vista imunológico/inflamatório sejam sintetizados através da 5-LO.

Numa primeira etapa, o 20:4n₆ é convertido em ácido 5-hidroperoxi-6,8,11,14-eicosatetraenóico (5-HpETE) e depois, também sob a acção da 5-LO, em leucotrieno A₄ (LTA₄). Este eicosanóide constitui um substrato para a síntese de importantes moléculas. Nos macrófagos e neutrófilos, o LTA₄ é convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄), pela acção da hidrolase, enquanto que nos eosinófilos é transformado em leucotrieno C₄ (LTC₄) sob a acção da LTC sintetase¹²⁹⁷.

Os leucotrienos, tal como as prostaglandinas, agrupam-se de acordo com o seu substrato de ácidos gordos. Quando produzidos a partir do 20:4n₆ (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄), designam-se por leucotrienos da série-4, enquanto que os derivados do 20:5n₃ (LTA₅, LTC₅, LTD₅ e LTE₅) são designados por leucotrienos da série-5.

Como dissemos, o principal substracto para a síntese dos eicosanóides é o ácido araquidónico presente na dieta, podendo ser sintetizado a partir de outros ácidos gordos n-6, particularmente o ácido linoleico (18:2n6).

As células inflamatórias adquirem o 20:4n6 dos fosfolípidos e dos ésteres do colesterol das lipoproteínas plasmáticas¹²⁹⁸.

A confirmar esta hipótese, a inibição da captação das LDL plasmáticas pelos fibroblastos humanos, eliminou a incorporação do 20:4n6 nestas células e a produção de prostaglandinas¹²⁹⁹.

A incorporação dos fosfolípidos das lipoproteínas pelos monócitos realizou-se através da endocitose pelos *receptores scavenger* BI¹³⁰⁰.

Outro facto curioso é que as células inflamatórias possuem fosfolípidos, como a fosfatidilcolina, cuja função principal é a de constituírem reservatórios de 20:4n6. Nos neutrófilos, o ácido araquidónico está incorporado na fosfatidilcolina e no lisofosfatidilinositol, embora estes *pools* sofram algum grau de remodelação ao longo do tempo^{1301 1302}.

Diversas moléculas podem induzir a síntese dos eicosanóides, como a bradicinina, a AgII, o estradiol e os próprios eicosanóides, quase sempre através da via do NF-kB^{1303 1304 1305 1306 1307}.

Todos estes indutores inflamatórios estimulam a acção das fosfolipases e a libertação selectiva do ácido araquidónico das membranas celulares. A fosfolipase mais frequentemente envolvida na síntese dos eicosanóides é a fosfolipase A2¹³⁰⁸. A hidrólise do 20:4n6 em resposta aos estímulos inflamatórios ocorre de uma forma selectiva, não se verificando a hidrólise de outros ácidos gordos insaturados.

Diversos estudos têm avaliado as propriedades dos lípidos no tratamento das doenças inflamatórias.

Os AINE(s), ao inibirem unicamente a COX, deixam livre a via da 5-LO e a produção do LTB4, molécula altamente pró-inflamatória. Teoricamente, ao interferir no metabolismo das gorduras de uma forma dietética e/ou farmacológica e assim reduzir o substracto para a produção das prostaglandinas e dos leucotrienos, conseguir-se-á uma acção antiinflamatória mais global.

Os ácidos eicosapentanóico (20:5n3) e docosahexanóico (22:6n3), presentes essencialmente nos peixes, têm sido dos ácidos gordos mais utilizados na terapêutica das doenças inflamatórias^{1309 1310}.

O 20:5n3 compete com o ácido araquidónico para a incorporação nos *pools* membranares, reduzindo a produção dos eicosanóides altamente inflamatórios e dando origem preferencialmente às prostaglandinas da série-3 e aos leucotrienos da série-5, com muito menor capacidade pró-inflamatória.

O ácido gordo 22:6n3 não é convertido em qualquer eicosanóide, mas possui uma acção antiinflamatória por aumentar a concentração do 20:5n3 através de uma reacção de retro-conversão, não se podendo, no entanto, excluir uma acção imunomoduladora independente do 20:5n3.

Diversos estudos têm avaliado o papel dos óleos de peixe, ricos em 20:5n3 e 22:6n3 no tratamento das doenças inflamatórias ^{1311 1312}.

Apoiando a acção antiinflamatória destes ácidos gordos, em indivíduos saudáveis dos dois sexos e em doentes com artrite reumatóide, demonstrou-se a sua capacidade em suprimir a produção do TNF- α e da IL-1 β pelas células mononucleares ^{1313 1314 1315}.

Outra importante acção antiinflamatória exercida pelos ácidos gordos polinsaturados n-3, foi a sua capacidade em inibir a função de apresentação de antígeno e conseqüentemente, a imunidade celular ^{1316 1317}.

Num estudo realizado em homens, em que se utilizaram suplementos de 3 gramas de óleo de peixe durante 21 dias, conseguiu-se reduzir a expressão das moléculas de classe II do MHC e das moléculas de adesão a nível dos monócitos periféricos ¹³¹⁸.

O ácido α -linolénico (18:3n3) é produzido pelas plantas e é um precursor metabólico dos ácidos gordos n-3 (20:5n3 e 22:6n3). A industrialização da agricultura tem levado à progressiva substituição do 18:3n3 pelo ácido linoleico (18:2n6), devido à maior estabilidade conferida aos alimentos por este último ácido gordo ¹³¹⁹. Calcula-se que o *ratio* dos ácidos gordos n-6 / n-3 consumidos pelo homem, evoluiu de 1:1 a 1:2 nas dietas primitivas até 20 a 50:1 nas actuais ¹³²⁰.

Como os ácidos gordos n-6 são precursores directos do ácido araquidónico, esta alteração radical na proporção entre eles e os n-3, na dieta humana, pode contribuir para o aumento da incidência das doenças cardiovasculares e auto-imunes.

Diversos estudos em doentes com artrite reumatóide e nefrite lúpica demonstraram que o enriquecimento dietético em ácidos gordos n-3 e/ou ácido

linolénico, conduziu a uma melhoria dos parâmetros inflamatórios e da situação clínica^{1321 1322 1323}.

Uma palavra sobre o azeite e o seu principal ácido gordo, o ácido oleico (18:1n9), que chega a constituir 85% do conteúdo em ácidos gordos deste óleo vegetal¹³²⁴. Demonstrou-se já uma acção benéfica do consumo do azeite em doentes com artrite reumatóide e uma associação inversa entre o seu consumo e a incidência desta doença reumatismal^{1325 1326}.

Depois desta revisão, necessariamente curta, sobre os efeitos pró-inflamatórios dos lípidos e das lipoproteínas, não será difícil aceitar que, ao interferir de uma forma favorável no metabolismo lipídico e ao reduzir o substrato para a síntese de importantes moléculas inflamatórias, os hipolipemiantes possuam uma acção antiinflamatória e imunomoduladora, tanto mais importante quanto mais potente a sua acção metabólica.

Mas será a sua acção hipolipemiante a única explicação para os efeitos antiinflamatórios e imunorreguladores destes fármacos?

11 - Estatinas

Um dos primeiros trabalhos a chamar a atenção para os possíveis efeitos extra-lipídicos das estatinas foi o de Jon Kobashigawa, em 97 transplantados cardíacos, com hipercolesterolemia, publicado em 1995. Cerca de 50% dos participantes foram medicados com pravastatina e os outros com colestiramina. Aos doze meses do estudo, o grupo da pravastatina apresentava níveis significativamente mais baixos de colesterol ($p < 0,001$), uma menor incidência de rejeição cardíaca acompanhada de compromisso hemodinâmico ($p = 0,005$), uma maior sobrevida ($p = 0,025$) e uma menor incidência de vasculopatia coronária ($p = 0,049$)¹³²⁷. Para os autores, embora os benefícios encontrados possam ter sido parcialmente explicados pelo melhor perfil lipídico conseguido com a estatina, não houve uma relação entre os níveis de colesterol e os efeitos vasculares verificados.

11.1 – Efeitos pleiotrópicos

Para compreender melhor os mecanismos de acção das estatinas e os seus possíveis efeitos extra-lipídicos vamos recordar, de uma forma necessariamente resumida, o processo pelo qual estes fármacos exercem a sua acção na síntese do colesterol.

As estatinas inibem de uma forma reversível e dose-dependente a enzima chave da síntese do colesterol, a reductase da hidroximetil-glutaril coenzima A (HMG-CoA reductase), e reduzem a formação do mevalonato. Para compensar a redução dos níveis intracelulares de colesterol, o hepatócito aumenta a expressão membranar dos receptores LDL.

Para além da redução do mevalonato, os inibidores da HMG-CoA reductase inibem a formação de outros metabolitos, alguns deles implicados em múltiplas e importantes acções fisiológicas. Destes, salientam-se as moléculas isoprenóides, o farnesil-pirofosfato e o geranylgeranyl-pirofosfato, indispensáveis na isoprenilação de algumas proteínas reguladoras das funções celulares (Fig 3).

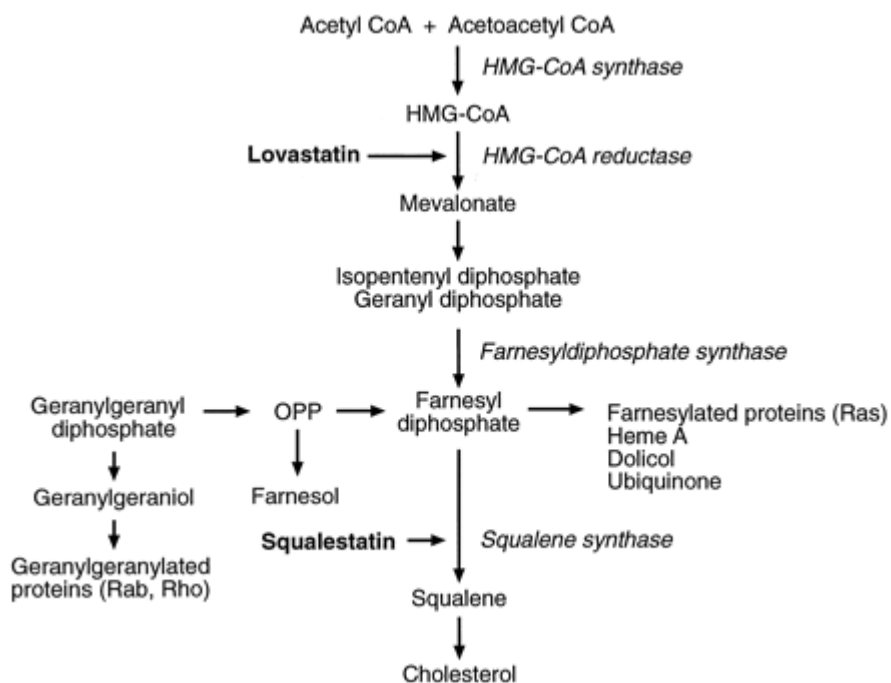


Fig 3

Por exemplo, a farnesilação ou isoprenilação da proteína Ras, é necessária à sua actividade sobre a proliferação e a diferenciação celulares e a geranilação das proteínas G monoméricas, permite a organização do citoesqueleto, a produção de radicais livres, a progressão do ciclo celular (Rho, Rac, Cdc42), o transporte vesicular (Rab), a divisão celular e a activação plaquetar (Rap)^{1328 1329 1330}.

Assim, a inibição da isoprenilação das proteínas de sinalização celular, como as pequenas proteínas de ligação-GTP Rho, Ras e Rac, impede a sua ligação às membranas, a sua passagem para o núcleo e as suas múltiplas acções biológicas na coagulação, na quimiotaxia, na adesão e na proliferação celulares¹³³¹.

Outra acção antiinflamatória das estatinas, é exercida através da inibição da geranilgeranilação das proteínas da família Rho e posterior activação dos *Peroxisome Proliferator Activated Receptors α* , que como veremos, inibem a activação dos factores de transcrição NF-kB e AP-1¹³³².

Utilizando células endoteliais e musculares lisas humanas, foi possível demonstrar que as estatinas, a atorvastatina, a simvastatina e a lovastatina, inibiram a activação dos factores de transcrição NF-kB (concentração da estatina 0,1 a 1 $\mu\text{m/L}$; $p=0,04$ para todas as estatinas), AP-1 (concentração 10 $\mu\text{m/L}$; Atorva $p=0,001$; Simva e Lov $p=0,016$) e HIF-1 α (hypoxia-inducible factor)¹³³³. Estes factores de transcrição, particularmente o NF-kB e o AP-1, são responsáveis pela transcrição de genes envolvidos em importantes mecanismos inflamatórios, tais como os das metaloproteinases, das citocinas, dos factores quimiotácticos, das moléculas de adesão e da sintase do óxido nítrico induzível.

Estes efeitos foram revertidos na sua maioria pela adição do mevalonato e/ou dos isoprenóides, admitindo-se que a alteração nos níveis destes metabolitos seja a responsável pelas acções extra-lipídicas das estatinas, comumente denominadas acções ou efeitos pleiotrópicos.

A adesão dos monócitos às células endoteliais é uma das mais importantes etapas da aterogénese. Num fluxo sanguíneo normal, a cerivastatina (concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$), através da redução da expressão das integrinas, inibiu significativamente a adesão dos mononucleares às células endoteliais da veia umbilical humana ($p<0,005$)¹³³⁴.

Diversos estudos no animal confirmaram o papel das moléculas isoprenóides no controlo da inflamação.

Utilizando no ratinho o modelo de inflamação local, provocado pela injeção subcutânea de ar e *carragenan*, avaliou-se a acção da lovastatina, da pravastatina e da sinvastatina (inibidores da síntese de esteróis e não esteróis) e da squalestatina (inibidor selectivo da síntese dos esteróis) na produção de quimiocinas e na migração dos leucócitos. Apenas a inibição da HMG-CoA reductase pelas estatinas (todas nas doses de 10mg/Kg) foi capaz de reduzir significativamente a migração dos leucócitos ($p < 0,05$), devido à inibição da produção da IL-6, do MCP-1 e do RANTES ($p < 0,05$). A inibição da síntese dos esteróis pela squalestatina, não demonstrou qualquer efeito antiinflamatório apesar da significativa redução do colesterol. O efeito das estatinas foi revertido pela administração concomitante do mevalonato, apontando para os compostos não-esteróis, como moléculas chave na regulação da produção das citocinas e das quimiocinas¹³³⁵. Para os autores, estas moléculas não esteróis terão sido os isoprenóides, envolvidos na transcrição de importantes genes da inflamação.

Resultados semelhantes foram obtidos noutra estudo realizado também no ratinho deficiente em Apo E, em que a sinvastatina (10 a 100 mg/Kg) mostrou propriedades antiinflamatórias agudas, semelhantes às da indometacina ($p < 0,0001$) e reduziu significativamente a acumulação de colesterol e o aumento das lesões de aterosclerose aórticas ($p < 0,02$). Os autores chamam a atenção para o facto de as estatinas não terem efeitos significativos a nível dos lípidos, quer no rato normal quer no rato deficiente em Apo E, pelo que os efeitos antiinflamatórios verificados não podem ser explicados pela redução do colesterol¹³³⁶.

Será importante avaliar se as diferenças na hidrofília/lipofília das estatinas têm influência nas suas propriedades pleiotrópicas.

Em indivíduos hipercolesterolémicos, compararam-se os efeitos de doses equipotentes da atorvastatina, da sinvastatina e da pravastatina, nos níveis plasmáticos da PCR, do factor de Von-Willebrand, do fibrinogénio, dos dímeros e dos fragmentos de protrombina 1+2. Após 3 meses de terapêutica, todas as estatinas apresentaram efeitos semelhantes nos parâmetros inflamatórios e hemostáticos avaliados, independentemente das diferenças químicas e farmacológicas¹³³⁷.

De seguida vamos abordar alguns dos principais efeitos pleiotrópicos das estatinas.

11.1.1 - Endotélio

A disfunção endotelial caracteriza-se por alterações da hemostase, da permeabilidade vascular, do tonus vascular e da proliferação das células musculares lisas.

As alterações do tónus vascular caracterizam-se por uma resposta vasoconstritora à acetilcolina, contrariamente à vasodilatação fisiológica¹³³⁸. Geralmente, esta resposta paradoxal associa-se aos factores de risco cardiovasculares (dislipidemia, HTA, tabagismo, diabetes, hiperhomocisteinémia e idade)^{1339 1340}.

Relativamente às alterações lipídicas, têm sido responsabilizadas as lipoproteínas remanescentes ricas em triglicéridos, a Lp(a) e as lipoproteínas oxidadas^{1341 1342 1343 1344 1345 1346}.

As estatinas mostraram ser capazes de aumentar a perfusão do miocárdio, quer no animal, quer no homem^{1347 1348 1349 1350 1351}. Este efeito, aparentemente de classe, será devido à libertação do óxido nítrico após estimulação da NO sintetase endotelial (constitutiva)¹³⁵².

Macacos profilacticamente tratados com sinvastatina e posteriormente sujeitos a isquemia cerebral focal, apresentaram maior débito sanguíneo cerebral, menor área de isquemia e menos sequelas neurológicas, comparativamente aos animais que não tinham sido tratados com o referido fármaco ($p < 0,01$). Este efeito protector foi anulado pela administração de mevalonato e/ou de geranylgeranyl-pirofosfato e não se verificou nos animais deficientes em NO sintetase endotelial, resultando de um efeito directo das estatinas sobre a síntese do NO ($p < 0,05$)¹³⁵³.

Para alguns autores, a resposta endotelial às estatinas, estará limitada aos indivíduos que apresentam elevação dos níveis plasmáticos da dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor circulante da NO sintetase endotelial¹³⁵⁴.

11.1.2 - Neo-vascularização

A terapêutica pró-angiogénica, tem vindo a adquirir importância crescente, na tentativa de preservar a integridade e a função dos tecidos isquémicos¹³⁵⁵. Através da *vasculogénese* (células progenitoras das células endoteliais com origem na medula óssea) e da *angiogénese* (células endoteliais com origem nos vasos pré-existentes), o organismo será capaz de formar focos de neovascularização para a recuperação dos tecidos isquémicos^{1356 1357}.

A neovascularização tem um importante papel na progressão da placa de aterosclerose, fornecendo nutrientes e oxigénio e favorecendo a acumulação dos monócitos. A angiogénese parece estar igualmente envolvida na ruptura da placa e nos fenómenos hemorrágicos e trombóticos^{1358 1359 1360}.

Foi já demonstrada uma maior densidade de neovasos nas placas sintomáticas, comparativamente às assintomáticas¹³⁶¹.

Doentes com angina instável apresentaram células progenitoras endoteliais (CPE) em número significativamente superior, quando comparados com doentes com angina estável (24,5±2,6 versus 13,3±2,9, $p<0,05$). Estes números correlacionaram-se positivamente com os níveis séricos de PCR ($p<0,05$)¹³⁶².

Em indivíduos com doença coronária estável, a atorvastatina, na dose de 40 mg/dia, quadruplicou o número de CPE ($p<0,05$), a sua capacidade migratória ($p=0,009$), assim como o número de células progenitoras hematopoiéticas, origem das CPE ($p<0,05$)¹³⁶³.

Num modelo de vascularização da córnea, no rato, a sinvastatina potenciou significativamente a angiogénese ($p<0,05$)¹³⁶⁴.

Em ratos e utilizando segmentos arteriais lesionados por balão, a sinvastatina (0,2 ou 1 mg/Kg) aumentou em 2,5 vezes o número das CPE circulantes ($p<0,001$), promoveu a sua adesividade ao lúmen arterial e acelerou significativamente a reendotelização (12,3±1,8 versus 5,4±1,1 mm²; $p<0,01$, de área reparada)¹³⁶⁵.

O mecanismo subjacente à estimulação, pelas estatinas, da proliferação e diferenciação das CPE, será o utilizado pelo VEGF, ou seja, a activação da via PI 3 quinase /Akt e da Sintetase endotelial do Óxido Nítrico (eNOS), efeito inibido pelo mevalonato (a activação da Akt deve-se à inibição da formação do

mevalonato)^{1366 1367 1368 1369}. As estatinas, tal como o VEGF, podem induzir a diferenciação dos monócitos e/ou dos precursores das células hematopoiéticas, CD34, em CPE e mobilizá-las da medula ósea para os locais de isquemia¹³⁶³.

No entanto, estes resultados não são consensuais, dado que estudos que utilizaram a cerivastatina e a sinvastatina, mostraram que estes fármacos inibiram significativamente a proliferação induzida por factores de crescimento, *in vivo* e *in vitro*, das células endoteliais ($p < 0,05$)^{1370 1371}.

A cerivastatina (10 a 25 ng/mL) demonstrou um efeito antiproliferativo em células endoteliais de microvasos, estimuladas por factores de crescimento (VEGF e bFGF), ao induzir uma paragem do ciclo celular na fase de transição G1/S ($p < 0,001$); este efeito esteve na dependência de um aumento do p21^{Waf1/Cip1}, um inibidor das quinases, dependentes das ciclinas e que é suprimido pela RhoA geranilada¹³⁷⁰.

Uma possível explicação para estes resultados contraditórios, é avançada por um trabalho que demonstrou que a cerivastatina e a atorvastatina, dependendo das doses utilizadas, têm efeitos bi-fásicos sobre a angiogénese. As estatinas em baixas doses ($< 0,01 \mu\text{mol/L}$), através da activação da proteína quinase endotelial Akt e da sintetase do óxido nítrico endotelial, estimularam a formação de novos vasos, enquanto que em altas doses ($\geq 0,05 \mu\text{mol/L}$), por inibição da geranilação da proteína Rho e estimulação da apoptose das células endoteliais, inibiram essa formação¹³⁷². De salientar que, no homem, os níveis séricos das estatinas variam entre 0,002 e 0,05 $\mu\text{mol/L}$ para a cerivastatina (0,2 a 0,8 mg/dia) e entre 0,002 e 0,2 $\mu\text{mol/L}$ para a atorvastatina (10 a 80 mg/dia)¹³⁷².

Também a confusão por vezes existente, entre vasculogénese e angiogénese, poderá contribuir para os resultados discordantes de alguns estudos, assim como as diferentes situações fisiopatológicas testadas. Se a capacidade pró-angiogénica das estatinas tem potenciais efeitos protectores na isquemia cardíaca, pode ser deletéria na parede vascular ao favorecer a instabilidade da placa.

Doses terapêuticas da sinvastatina reduziram significativamente a formação de novos vasa-vasorum (VV), num modelo experimental da aterosclerose ($p < 0,05$), aparentemente por melhoria da função endotelial dos VV e redução da hipóxia^{1373 1374}.

11.1.3 - Coagulação e fibrinólise

Estudos clínicos com estatinas têm dado resultados contraditórios sobre a sua potencial acção anti-trombótica¹³⁷⁵. Contudo, a determinação nesses estudos dos níveis séricos do PAI-1, poderá não traduzir exactamente o que se passa em termos de coagulação e fibrinólise a nível da parede do vaso.

Alguns trabalhos demonstraram que as estatinas, através da redução da síntese do PAI-1 e do aumento da produção do t-PA, melhoraram a actividade fibrinolítica das células endoteliais em cultura^{1376 1377}. Esta acção estaria dependente da inibição da isoprenilação da proteína Rho e era anulada pela adição do geranylgeranilpirofosfato.

As estatinas também poderão controlar os mecanismos da trombose através da expressão do factor tecidual (FT).

O FT é produzido pelas células endoteliais activadas pela trombina (que induz a rápida activação da RhoA e da p38MAPkinase), conferindo à superfície endotelial propriedades trombogénicas, e pelos monócitos / macrófagos. O resultado final é a deposição de fibrina na placa de aterosclerose.

As estatinas reduziram a expressão do FT, nas células endoteliais e nas mononucleares, através da inibição da isoprenilação das proteínas G, das quinases (RhoA/Akt) e do NF- κ B^{1378 1379}.

No estudo ATROCAP (Atorvastatin and Thrombogenicity of the Carotid Atherosclerotic Plaque), procurou-se avaliar os efeitos da atorvastatina a nível da ulceração, da trombose, da inflamação e dos factores trombogénicos (FT e Inibidor do Factor Tecidual (TFPI)), em indivíduos com estenose carotídea bilateral e submetidos a endarterectomia em dois tempos, antes e 4 a 5 meses depois, da terapêutica com a referida estatina nas doses de 20 mg/dia. No grupo da atorvastatina, relativamente ao grupo placebo, as placas apresentavam menor actividade trombogénica e inflamatória, com menor propensão à ruptura e trombose¹³⁸⁰.

Através destes mecanismos, é possível que as estatinas reduzam a formação do trombo nas placas erosionadas e os fenómenos vasculares oclusivos agudos.

11.1.4 - Proliferação celular

Vários trabalhos em células neoplásicas de neuroblastoma^{1381 1382}, melanoma¹³⁸³, mesotelioma maligno¹³⁸⁴, do pâncreas¹³⁸⁵, mioblastos¹³⁸⁶, linfomatosas¹³⁸⁷, leucémicas¹³⁸⁸, prostáticas¹³⁸⁹, vesicais¹³⁹⁰, mamárias^{1391 1392}, do cólon¹³⁹³ e de hepatocarcinoma¹³⁹⁴ demonstraram um possível efeito anti-tumoral das estatinas.

As estatinas poderão exercer estas acções anti-neoplásicas através de vários mecanismos.

Interrompendo a progressão do ciclo celular na fase G1, por redução da farnesilação do oncogene p21^{Ras 1395 1396 1397}.

Provocando um aumento de alguns inibidores (CKI) das quinases tributárias das ciclinas (CDK), como é o caso da p27^{Kip1}, ligada à CDK-2 e à CDK-4^{1398 1399}. A proteína G monomérica Rho, para exercer a sua acção inactivadora sobre a p27^{Kip1} necessita de ser geranilgeranilada^{1400 1401}. A acumulação da sua forma não prenitada, no citoplasma das células, contribui para a inactivação das CDK(s).

Através deste mecanismo indutor da p27^{Kip1}, a sinvastatina inibiu a proliferação das células musculares lisas induzida pelo PDGF¹⁴⁰².

Uma outra acção das estatinas é a redução da angiogénese, essencial para o crescimento tumoral e das metástases. Dado que a prenitação das proteínas *ras* estimula a produção do VEGF (vascular endothelial growth factor), necessário para a formação de novos vasos, ao interferir com a isoprenilação as estatinas comportam-se como fármacos anti-proliferantes¹⁴⁰³.

Este efeito anti-proliferativo também foi demonstrado em células não tumorais, como as células tubulares renais, atrasando a evolução para a glomerulosclerose¹⁴⁰⁴.

Os inibidores da HMG CoA reductase estimularam a apoptose, através do aumento da expressão da proteína Bax (pró-apoptótica), das caspases e da diminuição da expressão da Bcl-2 (anti-apoptótica)^{1405 1406 1407 1408}.

A atorvastatina, a sinvastatina e a lovastatina, contrariamente à pravastatina, induziram significativamente ($p < 0,05$) a apoptose das células musculares lisas e reduziram o espessamento da neóintima e a reestenose vascular. Este efeito esteve na dependência da inibição da prenitação da p21-

Rho B e foi anulado pela adição do mevalonato, do farnesil-pirofosfato e do geranylgeranylpirofosfato¹⁴⁰⁹.

As estatinas também poderão exercer a sua acção anti-proliferativa, por inibição das MAPK^{1410 1411}.

Alguns trabalhos têm demonstrado diferenças entre as estatinas lipofílicas e as hidrofílicas na proliferação das células musculares lisas.

A pravastatina, hidrofílica, aumentou o número de células musculares lisas e o conteúdo em colagénio das placas ateromatosas de coelhos *Watanabe* ($p < 0,05$)¹⁴¹². A fluvastatina, lipofílica, por um possível efeito pró-apoptótico reduziu o número de células musculares lisas.

Estudos *in vitro* têm avaliado o efeito anti-proliferativo das estatinas lipofílicas a nível das células musculares lisas, após estimulação pelo PDGF. Este factor de crescimento exerce a sua acção activando a RhoA, um inibidor da ciclina p27^{kip1}, que bloqueia o ciclo celular. Ao inibir a actividade da RhoA, a estatina restaurou a actividade inibidora do p27^{kip1} no ciclo celular. A adição do geranylgeranylpirofosfato anulou o efeito da estatina¹⁴¹³.

A razão para as diferentes acções das estatinas lipofílicas e hidrofílicas, não é ainda conhecida.

Presentemente, uma questão que se põe é a da utilidade clínica das estatinas na prevenção / terapêutica de certas neoplasias, nomeadamente em combinação com outros fármacos.

Em 6 605 participantes do AFCAPS/TexCAPS, verificou-se uma redução estatisticamente significativa ($p=0,04$), da incidência de melanoma nos indivíduos medicados com a lovastatina, comparativamente aos que receberam o placebo¹⁴¹⁴.

Este resultado está de acordo com a inibição pela lovastatina das propriedades metastáticas das células do melanoma¹⁴¹⁵.

A combinação do cisplatínio com a lovastatina, aumentou de uma forma dose-dependente, o efeito anti-neoplásico, tanto na proliferação *in vitro* das células de melanoma como na sobrevivência de macacos inoculados com estas células¹⁴¹⁶.

A utilização de células de carcinoma do cólon permitiu demonstrar uma acção pró-apoptótica da lovastatina e um efeito antineoplásico sinérgico entre

este fármaco e os antiinflamatórios não esteróides¹⁴¹⁷. Estas acções foram inibidas pelo mevalonato e pelo geranilpirofosfato.

Na extensão até aos oito anos do 4S, verificou-se a separação das curvas de mortalidade por neoplasia (3,1% no grupo placebo versus 2,3% no grupo da sinvastatina) sem atingir significado estatístico¹⁴¹⁸.

11.1.5 - Metabolismo ósseo / Osteoporose

A terapêutica actual da osteoporose consiste em inibir a reabsorção óssea pelo bloqueio da actividade osteoclástica; um outro meio para evitar a perda da massa óssea é através do aumento da actividade dos osteoblastos.

Foi já demonstrada uma acção pró-osteoblástica de diversas estatinas.

As estatinas aumentaram a transcrição do gene da *bone morphogenetic protein* (BMP-2), induziram a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos e o crescimento ósseo. Os inibidores da HMG CoA reductase estimularam o crescimento ósseo da calote craniana e a injeção intraperitoneal de 10mg/Kg de sinvastatina, durante trinta e cinco dias, aumentou em cerca de 39% o volume do osso trabecular dos ratos fêmeas¹⁴¹⁹.

Este efeito a nível da BMP-2 e do crescimento ósseo, parece estar limitado às estatinas lipofílicas e é inibido pelo mevalonato¹⁴²⁰.

Os inibidores da HMG CoA reductase, poderão aumentar a massa óssea não só por estimulação da actividade osteoblástica mas também pela inibição dos osteoclastos. Diversas estatinas inibiram significativamente os osteoclastos ($p < 0,001$) e viram esta sua acção anulada pela adição do mevalonato e /ou do geranilpirofosfato^{1421 1422}.

Tal como para as acções anti-neoplásicas interessa saber se estes resultados *in vitro* e no animal têm significado na prevenção e/ou tratamento da osteoporose do homem.

A partir de uma base de dados com mais de 90 000 indivíduos, com idade superior a 50 anos e seguidos entre 1980 e 1989, verificou-se que os medicados regularmente com estatinas, apresentavam uma redução significativa do risco de fractura - RR 0,55 ($p < 0,001$). Este efeito manteve-se, mesmo após ajustamento para o índice de massa corporal, o tabagismo, o uso de corticóides e/ou de estrogénios e foi comum à atorvastatina, à cerivastatina, à fluvastatina, à

pravastatina e à sinvastatina; os indivíduos medicados com fibratos não obtiveram qualquer protecção anti-fractura¹⁴²³.

Num estudo, em que se avaliaram 1 222 indivíduos com fractura do colo do fémur e um grupo controlo de quase 5 000 pessoas comparáveis em termos de idade e sexo, verificou-se uma redução de 71% no risco de fractura dos utilizadores regulares de estatinas, RR 0,29 (IC 95% 0,10 – 0,81), não se tendo verificado qualquer efeito ósseo dos outros hipolipemiantes (resinas, probucol e niacina)¹⁴²⁴.

Quarenta e uma mulheres pós-menopausicas e medicadas com pravastatina, atorvastatina, sinvastatina ou fluvastatina, apresentaram uma densidade óssea a nível da coluna e do fémur, significativamente superior à de cem mulheres, em tudo semelhantes, mas não medicadas com estes fármacos ($p < 0,001$ e $< 0,05$, respectivamente). Este efeito manteve-se mesmo após ajustamento para a altura, o peso, a estrogenerapia de substituição e o tabagismo¹⁴²⁵.

Outros estudos têm mostrado resultados contrários.

No *Women's Health Initiative Observational Study*, realizado em cerca de 90 000 mulheres com idades compreendidas entre os 50 e os 79 anos, as utilizadoras de estatinas não apresentaram qualquer redução no risco de fracturas a nível da anca, RR 1,22 (95% IC; 0,83 a 1,81), dos membros inferiores e do punho, RR 1,04 (IC; 0,85 a 1,27). Relativamente à densidade óssea, também não houve qualquer melhoria significativa¹⁴²⁶.

Na avaliação dos marcadores do metabolismo ósseo, diversos estudos não mostraram qualquer acção favorável por parte das estatinas^{1427 1428}.

11.1.6 - Infecção e sépsis

Numa revisão de 388 infecções por Gram-negativos e *S. aureus*, verificou-se que os indivíduos previamente medicados com estatinas apresentaram significativa redução da mortalidade total (6 versus 28%, $p = 0,002$) e da mortalidade atribuída à infecção (3 versus 20%, $p = 0,01$); esta redução manteve-se após análise multivariada¹⁴²⁹.

A redução das moléculas isoprenóides e da isoprenilação de diversas proteínas, como as integrinas, as moléculas de adesão e outras, poderá ter

estado subjacente às acções dos inibidores da HMG-CoA reductase. Uma das mais importantes poderá ter sido a inibição da expressão do NO induzível e o aumento do NO constitutivo, com a consequente estabilização endotelial e a redução da vasodilatação exagerada subjacente ao *shock* séptico (distributivo)¹⁴³⁰.

11.1.7 - Activação neurohormonal

Na insuficiência cardíaca (IC), a activação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona constitui um mecanismo fisiológico adaptativo, que procura manter a perfusão de órgãos nobres. No entanto, o prolongar e/ou o exagero desta activação neurohormonal, conduz ao agravamento da falência de bomba.

Diversos estudos no animal, têm demonstrado a capacidade das estatinas para normalizar a activação simpática ($p < 0,05$), contribuindo, assim, para a terapêutica da insuficiência cardíaca^{1431 1432}.

Num estudo realizado em 551 doentes com insuficiência cardíaca sistólica (Fracção Ejeção < 40%), demonstrou-se uma associação significativamente benéfica, entre a terapêutica com estatinas e a melhoria da sobrevida ($p < 0,001$). Este efeito protector foi independente do valor do colesterol, da etiologia da IC e da utilização de outros fármacos¹⁴³³.

11.1.8 - Inflamação

A capacidade de alterar os mecanismos inflamatórios e o curso da aterosclerose, de uma forma independente das modificações lipídicas, é um dos objectivos do nosso trabalho pelo que iremos debruçarmo-nos um pouco mais sobre estes efeitos das estatinas.

Vários trabalhos têm demonstrado a capacidade das estatinas para reduzir os níveis plasmáticos da PCR^{1434 1435}.

No CARE, realizado em 4159 sobreviventes de EAM, com níveis de colesterol total <240 mg/dl e CLDL entre 115 e 175 mg/dl, ficou demonstrado que os indivíduos com taxas elevadas de PCR e SAA, traduzindo uma inflamação subjacente, apresentaram a melhor resposta clínica ao tratamento com

pravastatina (40 mg/dia). Dividiram-se 708 participantes do estudo (metade com doença coronária recorrente ou morte e um grupo controlo), em quatro grupos, consoante apresentassem ou não os dois parâmetros inflamatórios no maior percentil e fossem medicados com pravastatina ou placebo. Verificou-se um aumento significativo na incidência da doença coronária através dos diferentes grupos. Comparados com os doentes de menor risco, os dois marcadores abaixo do maior percentil e medicados com pravastatina, os de risco mais elevado, constituído por todos os que apresentavam a PCR e a SAA no maior percentil e medicados com placebo, apresentaram um RR de doença coronária recorrente, fatal ou não fatal, de 2,8 (IC 95%, 1,3 a 6,0; $p=0,007$). A associação verificada entre a inflamação e o risco coronário, deixou de ser significativa nos indivíduos sob terapêutica com a estatina ($p=0,5$). Em todos os grupos, a terapêutica com a pravastatina reduziu o risco de EAM recorrente ou de morte em 28% ($p=0,03$). Nos participantes com os marcadores inflamatórios no maior percentil, a estatina reduziu em 54% o número de eventos coronários recorrentes, enquanto que nos restantes a redução foi de 25%; este efeito foi independente dos níveis plasmáticos das lipoproteínas¹⁴³⁶.

Uma outra análise do mesmo estudo demonstrou que, nos participantes que se mantiveram livres de doença cardiovascular ao longo dos cinco anos de seguimento, os níveis plasmáticos da PCR foram significativamente reduzidos em 37,8%, nos que foram medicados com a pravastatina, relativamente aos que receberam placebo ($p=0.002$)¹⁴³⁷.

O *Air Force / Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study* (AFCAPS/TexCAPS), é um estudo de prevenção primária em cerca de 6 600 homens (45-73 A) e mulheres (55-73 A), com níveis médios de colesterol LDL de 149,1 mg/dl e uma relação colesterol total / CHDL média de 5,96. Também neste estudo, os níveis basais da PCR comportaram-se como um factor preditivo independente do primeiro evento coronário agudo ($p=0,01$). A lovastatina, nas doses de 20 a 40 mg/dia, reduziu significativamente os níveis da PCR em 14,8% (IC 95% 12,5 a 17,4; $p<0,001$), e o risco coronário, nos participantes que apresentavam níveis de LDL ou uma relação CT/HDL inferiores à média e simultaneamente, níveis séricos de PCR superiores a 1,6 mg/L - respectivamente RR 0,58 (IC 95% 0,34 a 0,98; $p=0,04$) e RR 0,47 (IC 95% 0,27 a 0,85; $p=0,02$)¹⁴³⁸. Os autores concluíram que, em prevenção primária, a

avaliação da PCR pode constituir um método válido para decidir sobre a terapêutica com estatinas.

Utilizando a hsPCR (highly sensitive assay for C-reactive protein) em indivíduos com dislipidemia mista (LDL>130 mg/dl e triglicérides > 200 e < 600 mg / dl), tratados com sinvastatina (20 mg/dia), ou pravastatina (40 mg/dia), ou atorvastatina (10 mg/dia), durante seis semanas, verificou-se uma redução significativa da hsPCR ($p<0,025$), independentemente da estatina utilizada e da alteração do CLDL¹⁴³⁹.

O *Pravastatin Inflammation / CRP Evaluation* (PRINCE), é um estudo prospectivo, em que um dos objetivos primários foi a avaliação dos efeitos antiinflamatórios das estatinas. Trata-se de um estudo randomizado e duplamente cego, incluindo 1 702 homens e mulheres sem história de doença cardiovascular (coorte de prevenção primária) e um grupo de 1 182 indivíduos com doença cardiovascular (coorte de prevenção secundária). Os participantes foram medicados com 40 mg/dia de pravastatina ou placebo durante cerca de 24 semanas. Às 24 S, no grupo de prevenção primária, a pravastatina reduziu os níveis da PCR em 16,9% ($P<0,001$), não se verificando qualquer alteração deste marcador inflamatório no grupo placebo. Este efeito era já evidente às 12 semanas, com redução da PCR de 14,7% ($P<0,001$) e foi independente do sexo, da idade, dos hábitos tabágicos, do índice de massa corporal, dos lípidos, da diabetes e da medicação com aspirina e/ou terapêutica hormonal de substituição. Nos indivíduos em prevenção secundária e medicados com a pravastatina também se verificaram reduções significativas da PCR às 12 e às 24 S (14,3% e 13,1% respectivamente; $P<0,005$)¹⁴⁴⁰.

No *Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering* (MIRACL), indivíduos com angina instável ou EAM sem onda Q, foram randomizados para o tratamento com 80 mg/dia de atorvastatina ou placebo, com início nas 24 a 96 H após o internamento, durante 16 semanas. Foram avaliados os níveis séricos da PCR, da SAA e da IL6 à entrada e às 16 S; os três marcadores inflamatórios encontravam-se inicialmente elevados, imediatamente após o evento, tendo-se reduzido progressivamente, quer no grupo da estatina quer no do placebo. No entanto, comparada com o placebo, a atorvastatina reduziu significativamente os níveis da PCR (-83% versus -74%, $P<0,0001$) e da SAA (-80% versus -77%, $P<0,0006$)¹⁴⁴¹.

Em doentes com doença coronária estável, a PCR (>3,8 mg/L) comportou-se como um marcador de risco para a isquemia induzida pelo esforço, RR 4,2 (IC 95% 1,6 a 11; p=0,004), tendo esta associação perdido significado nos doentes medicados com estatinas¹⁴⁴².

Em 3745 doentes com síndromes coronárias agudas, avaliou-se a relação entre os níveis do CLDL, da PCR e o risco de EAM ou de morte por doença coronária, após tratamento com 80 mg de atorvastatina ou 40 mg de pravastatina. Os indivíduos que obtiveram níveis de PCR inferiores a 2 mg/L, apresentaram menor número de eventos coronários do que aqueles em que os níveis eram superiores a 2 mg/L, independentemente dos níveis do CLDL (2,8 versus 3,9 /ano; p=0,006). Nos doentes com CLDL pós-terapêutica superior a 70 mg/dl, o número de eventos foi de 4,6 / 100 pessoas-ano quando a PCR era superior a 2 mg/L e de 3,2 quando a PCR era inferior a 2 mg/L (p<0,001). O número correspondente de eventos, nos que obtiveram níveis de CLDL inferiores a 70 mg/dl, foi de 3,1 e de 2,4/100 pessoas-ano (p<0,001)¹⁴⁴³. Para os autores do estudo foi mais importante atingir os objectivos a nível do CLDL e da PCR do que a estatina utilizada.

Em mais de 1 500 residentes nos Estados Unidos, com doença coronária e sujeitos a intervenção coronária percutânea, verificou-se que os que estavam medicados com estatinas, antes da intervenção, tinham níveis de PCR significativamente inferiores (4,0 versus 5,0 mg/L, p=0,012), independentemente dos níveis do colesterol, e menor incidência de EAM no período peri-intervenção (5,7% versus 8,1%, p=0,038). Ao fim do primeiro ano e nos doentes com maiores níveis de PCR ($\geq 11,1$ mg/L) a pré-terapêutica com estatinas foi preditiva de uma menor mortalidade (5,7% versus 14,8% com e sem terapêutica, respectivamente; p=0,009)¹⁴⁴⁴.

Como vimos no capítulo sobre inflamação e aterosclerose, para além da PCR, outras moléculas inflamatórias apresentam importantes relações com a aterogénese e a doença vascular e será importante avaliar as possíveis acções dos inibidores da HMG-CoA reductase nessas moléculas.

O Flt-1 que, como vimos, é um receptor do VEGF e do factor de crescimento placentário (PlGF), encontra-se no endotélio e nos monócitos e macrófagos, promovendo a activação e a migração destas últimas células inflamatórias. O Flt-1 existe igualmente numa forma solúvel, sFlt-1, capaz de

capturar o VEGF e o P1GF e reduzir a sua ligação aos monócitos e macrófagos. Em 50 doentes com EAM, a atorvastatina, nas doses de 10 mg/dia, induziu ao fim de seis meses de terapêutica, um aumento nas concentrações da sFlt-1 ($p < 0,05$) e uma diminuição recíproca nas concentrações do VEGF e do P1GF ($p < 0,05$). Estas alterações acompanharam-se de uma melhoria da fracção de ejeção ventricular esquerda ($p < 0,05$)¹⁴⁴⁵. Neste mesmo trabalho, as variações percentuais da IL-8, entre as duas semanas e os seis meses de terapêutica, estiveram positivamente correlacionadas com as variações das concentrações do VEGF e do P1GF e inversamente com as concentrações do sFlt-1 ($r = 0,31$, $0,35$ e $-0,29$, respectivamente, $p < 0,05$).

A sinvastatina reduziu significativamente os níveis da PCR, do TNF- α e da IL6 em indivíduos hipercolesterolémicos ($>6,5$ mmol/L), não tendo sido este efeito influenciado pela adição da aspirina¹⁴⁴⁶.

Avaliaram-se os efeitos da sinvastatina e do fenofibrato a nível da PCR e da produção dos factores quimiotácticos (MCP-1 e RANTES), em células endoteliais da veia umbilical humana. Verificou-se que a PCR induziu significativamente a produção do MCP-1 ($p = 0,001$), sendo este efeito anulado pela sinvastatina e pelo fenofibrato ($p < 0,05$)¹⁴⁴⁷.

Como vimos, a IL8 é uma quimiocina CXC, responsiva à PCR e presente no ateroma coronário humano, responsável, entre outras acções, pela adesão dos monócitos ao endotélio.

A pitavastatina, em células endoteliais aórticas humanas, reduziu significativamente a produção da IL8 induzida pela PCR, aparentemente por inibição da fosforilação das MAPK (ERK, p38 MAPK e JNK)¹⁴⁴⁸.

Outros trabalhos, demonstraram a capacidade das estatinas de inibir a produção de factores quimiotácticos, o recrutamento das células inflamatórias e a sua adesão ao endotélio, admitindo na sua maioria que estes efeitos se devem à redução da síntese das moléculas isoprenóides e à consequente inibição da isoprenilação de moléculas tão importantes como as integrinas e a proteína Rho (necessária para a adesão dos leucócitos dependente das integrinas)¹⁴⁴⁹.

Os inibidores da HMG-CoA reductase possuem capacidade de interferir com a acção das Integrinas, reduzindo a adesão das células inflamatórias à superfície endotelial.

Esta acção foi demonstrada *in vitro* em células endoteliais humanas e estará na dependência da redução da expressão e/ou actividade das integrinas na superfície celular ($p < 0,005$)^{1450 1451}.

Os inibidores da HMG-CoA reductase ligar-se-ão ao domínio extracelular da integrina impedindo o reconhecimento do ligante¹⁴⁵².

Através do ácido delta-hidroxi, fruto da hidrólise do anel lactona da lovastatina, este fármaco ligou-se ao domínio-I do LFA-1, a nível do MIDAS (metal ion dependent adhesion site), inibindo a ligação desta molécula aos ICAM(s)¹⁴⁵³. Este mecanismo parece ser o único efeito de uma, ou de várias estatinas, independente da cadeia do mevalonato.

A Lovastatina e a Sinvastatina inibiram significativamente *in vitro* a ligação da MAC-1 às moléculas de adesão e a fixação dos monócitos, não estimulados ou estimulados pelo MCP-1, às células endoteliais ($p < 0,01$)¹⁴⁵⁴. Para os autores, as estatinas, ao impedirem a prenilação das proteínas G, interferiram com a sua ligação à membrana celular e com a activação e a expressão das integrinas.

O *Atorvastatin for Reduction of Myocardial Damage during Angioplasty* (ARMYDA), incluiu 153 doentes com angina estável e com indicação para angioplastia coronária percutânea programada. Sete dias antes da intervenção, cerca de metade iniciou terapêutica com atorvastatina (40 mg/dia) e os restantes receberam placebo. Determinaram-se as concentrações séricas da ICAM-1, da selectina-E e da VCAM-1 basais, que se mostraram idênticas nos dois grupos. Ao fim das primeiras 24 H pós-intervenção, o aumento da ICAM-1 foi significativamente inferior no grupo da estatina (282 ± 56 versus 325 ± 70 ng/ml; $p = 0,007$) e relativamente à selectina-E, esta diferença verificou-se logo às 8 H (50 ± 8 versus 59 ± 13 ng/ml; $p = 0,002$), atingindo uma maior expressão às 24H (57 ± 9 versus 73 ± 18 ng/ml; $p = 0,0008$). Estes resultados poderão explicar, em parte, a menor incidência das lesões miocárdicas associadas à intervenção (aumento $> 2X$ da CK-MB), nos doentes medicados com a atorvastatina (5% versus 21%; $p = 0,08$)¹⁴⁵⁵.

Em ratos nefróticos avaliaram-se os efeitos da lovastatina (4mg/Kg) sobre a expressão do MCP-1 e a infiltração de macrófagos a nível glomerular. Este fármaco reduziu a expressão do factor quimiotáctico, a infiltração macrofágica glomerular e a proteinúria, admitindo os autores que estes efeitos estarão na dependência da redução das moléculas isoprenóides¹⁴⁵⁶.

Estes resultados estão em contradição com os de outros estudos.

As estatinas aumentaram a expressão de várias sub-unidades de integrinas nas células progenitoras endoteliais do rato e a expressão das ICAM-1, VCAM-1 e selectina-E, na superfície das células endoteliais humanas^{1457 1458}. Este aumento da expressão das moléculas de adesão acompanhou-se, inesperadamente, de uma reduzida adesão dos monócitos ao endotélio e foi também inibido pela adição do mevalonato e/ou do geranylgeranylpirofosfato. Uma possível explicação, para este aparente paradoxo, é a de que as estatinas poderão alterar a organização espacial das moléculas de adesão, dificultando o reconhecimento pelos ligantes dos monócitos¹⁴⁵⁹. A proteína Rho regula a organização espacial das moléculas de adesão endoteliais, permitindo o correcto reconhecimento pelos respectivos ligantes dos monócitos. A inibição pelas estatinas, da sua isoprenilação, poderá alterar a organização das moléculas de adesão e dificultar a ligação dos monócitos. Uma outra explicação, é a possível existência de um tónus inibitório basal, dependente de uma proteína G, relativamente à expressão das moléculas de adesão. Esta proteína G, para ser activa, necessita de ser prenilada, pelo que as estatinas, ao inibirem a sua prenilação, poderão reduzir o tonus inibitório e aumentar a expressão das moléculas de adesão¹⁴⁶⁰.

Para além da inibição do recrutamento dos monócitos, as estatinas também poderão interferir com o próprio funcionamento celular.

In vitro, a cerivastatina reduziu significativamente a produção de MCP-1 e de IL8, em células macrofágicas alveolares e endoteliais umbilicais humanas, incubadas com *C. pneumoniae* ($p < 0,05$)¹⁴⁶¹.

Os inibidores da HMG-CoA reductase suprimiram significativamente a secreção de IL6 em monócitos estimulados pelo LPS¹⁴⁶².

A expressão de receptores de superfície celular para as LDL modificadas, acetiladas e oxidadas, tais como os SR-A e os CD36, tem particular significado na transformação dos monócitos/macrófagos em células espumosas.

A lovastatina (10 $\mu\text{m/L}$) reduziu os níveis do mRNA e a expressão dos receptores nas fases iniciais de evolução dos mononucleares (monócitos) e inibiu significativamente a captação e degradação das LDL modificadas ($81 \pm 4\%$; $p < 0,05$ e $51 \pm 3\%$; $p < 0,001$; LDL acetiladas e oxidadas, respectivamente)¹⁴⁶³.

Em seis indivíduos hipercolesterolémicos (3,39 a 6,22 mmol/L), dois do sexo masculino e quatro do sexo feminino e sem doença vascular conhecida, determinaram-se os efeitos de 40 mg/dia de pravastatina nas concentrações plasmáticas de várias citocinas, após estimulação pelo LPS. A estatina provocou uma redução da IL-6 em 26% ($p=0,046$) e do TNF- α em 31% ($p=0,028$)¹⁴⁶⁴.

Em 155 doentes submetidos a CABG (coronary artery bypass grafting), e seguidos prospectivamente, avaliou-se o significado prognóstico da administração prévia de estatinas. Relativamente aos participantes que não tinham previamente tomado qualquer fármaco desta classe, os 69% que estavam medicados com sinvastatina, ou atorvastatina, ou pravastatina, ou cerivastatina, ou fluvastatina, apresentaram menores níveis de IL6 no pré-operatório e na pós-cirurgia, um menor aumento desta citocina (211 ± 156 vs 269 ± 141 pg/ml; $p<0,01$)¹⁴⁶⁵.

Resultados semelhantes foram obtidos num outro estudo realizado em 40 doentes submetidos a *by-pass* cirúrgico coronário. Às 4 H do pós-operatório, os níveis séricos da IL6, da IL8 e a expressão do CD11b nos neutrófilos, assim como a sua adesão ao endotélio, aumentaram menos nos 20 indivíduos previamente medicados com atorvastatina ($p=0,02$; $=0,02$ e $=0,004$ respectivamente)¹⁴⁶⁶.

Em 623 doentes com EAM ou com angina instável, submetidos a angiografia coronária, verificou-se que os 240 medicados regularmente com estatinas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina e sinvastatina), comparativamente aos 383 que não tomavam qualquer destes fármacos, apresentaram menores níveis séricos da PCR ($p=0,033$). No mesmo estudo, os níveis séricos da IL-6 não foram significativamente diferentes nos dois grupos de doentes¹⁴⁶⁷.

Em indivíduos hipercolesterolémicos, a utilização da sinvastatina (40 a 80 mg/dia) e da atorvastatina (40 a 80 mg/dia), durante 36 semanas, não provocou alteração significativa dos níveis séricos da IL6 nem da ICAM-1, apesar da redução significativa dos níveis da PCR ($p<0,05$) e da SAA ($p<0,05$) pela atorvastatina e da SPLA₂ pelas duas estatinas ($p<0,05$)¹⁴⁶⁸. Os autores explicaram este efeito diferencial das estatinas, a nível dos marcadores inflamatórios locais e sistémicos, pelo facto da acção destes fármacos se exercer essencialmente a nível da síntese hepática das proteínas de fase aguda,

podendo não haver uma acção directa a nível da inflamação vascular, aonde são essencialmente produzidas a IL6 e as moléculas de adesão.

Uma outra molécula aparentemente sensível às estatinas é o CD40 e o seu ligante CD154.

Em 80 doentes hipercolesterolémicos, a administração da pravastatina ou da cerivastatina, reduziu significativamente os níveis circulantes do sCD154 ($p<0,02$ e $p<0,05$, respectivamente) e a activação da coagulação ($p<0,02$ e $p<0,05$, respectivamente), aparentemente em relação com a redução dos níveis do colesterol (CT $r=0,389$, $p<0,05$; CLDL $r=0,41$, $p<0,05$)¹⁴⁶⁹.

Como vimos no capítulo sobre a peroxidação lipídica, as placas ateroscleróticas instáveis são ricas em macrófagos e metaloproteinases. Também a este nível, os inibidores da HMG-CoA reductase poderão exercer alguma acção protectora.

Em placas de coelhos *Watanabe* com hipercolesterolemia endógena, a cerivastatina (0,6 mg/Kg/dia) suprimiu a proliferação macrófágica ($p<0,01$) e a expressão das metaloproteinases ($p<0,01$) e promoveu a estabilização da placa. De notar que estes efeitos foram conseguidos com concentrações passíveis de ser obtidas no homem (0,01 a 0,05 $\mu\text{mol/L}$)¹⁴⁷⁰.

Em lesões de ateroma de coelhos *Watanabe*, avaliou-se a acção das estatinas a nível da expressão do gene do colagénio, do número de células musculares lisas e das metaloproteinases. Administrando doses hipocolesterolemiantes equivalentes de uma estatina hidrofílica (pravastatina) e outra lipofílica (fluvastatina), verificou-se uma redução na expressão das metaloproteinases 1, 3 e 9 pelos macrófagos da íntima ($p<0,01$). O número das células musculares lisas e a expressão do mRNA do procolagénio tipo I foram significativamente superiores no grupo da pravastatina ($p<0,05$), apontando para possíveis diferenças entre os dois fármacos¹⁴⁷¹. Os autores chamam a atenção para o facto de estes resultados não poderem ser extrapolados directamente para o homem, pois as concentrações obtidas com a fluvastatina foram muito superiores às preconizadas no ser humano.

Utilizando soro de indivíduos medicados com fluvastatina, induziu-se uma redução significativa na proliferação das células musculares lisas humanas em cultura ($p<0,01$) e estimulou-se a respectiva apoptose^{1472 1473}.

Compararam-se os efeitos de uma dieta hipolipemiante da *American Heart Association* (AHA), isolada ou associada à sinvastatina (20 mg/dia), em indivíduos com doença da artéria coronária. Comparativamente aos doentes apenas sob medidas dietéticas, os medicados com a sinvastatina, para além de uma melhor resposta vasomotora à hiperémia ($3,37 \pm 2,28\%$ para $5,89 \pm 2,35\%$; $p < 0,001$), apresentaram menores níveis plasmáticos da PCR (0,48 para 0,10 mg/dl; $p < 0,001$), do TNF α (3,38 para 2,79 pg/ml; $p < 0,001$), da MMP-9 (36 para 28 ng/ml; $p = 0,006$), do inibidor da metaloproteínase-1 (TIMP-1) (80 ± 30 para 74 ± 23 ng/ml; $p = 0,041$) e da relação MMP-9 / TIMP ($p = 0,018$), aumentando a estabilidade da placa¹⁴⁷⁴.

Em doentes com estenose carotídea sintomática e submetidos a endarterectomia, verificou-se que os que foram medicados com 40 mg de pravastatina (n=11), nos três meses prévios à intervenção, apresentaram a nível da placa menor concentração das OxLDL ($13,3 \pm 3,6\%$ versus $22,0 \pm 6,5\%$; $p < 0,001$), dos macrófagos ($15,0 \pm 10,2\%$ versus $25,3 \pm 12,5\%$; $p < 0,05$), das células T ($11,2 \pm 9,3\%$ versus $24,3 \pm 13,4\%$; $p < 0,05$), da MMP-2 ($3,6 \pm 3,9\%$ versus $8,4 \pm 5,3\%$; $p < 0,05$), maior concentração do TIMP-1 ($9,0 \pm 6,2\%$ versus $3,1 \pm 3,9\%$; $p < 0,05$) maior conteúdo em colagénio ($12,4 \pm 3,1\%$ versus $7,5 \pm 3,5\%$; $p < 0,005$) e redução da morte das células musculares lisas ($17,7 \pm 7,8\%$ versus $32,0 \pm 12,6\%$; $p < 0,05$), comparativamente aos que não efectuaram qualquer terapêutica hipolipemiante (n=13)¹⁴⁷⁵.

O aumento da expressão da COX-2 e da sintetase da prostaglandina E (mPGES) está subjacente ao aumento das metaloproteínases e à instabilidade da placa. Em cerca de 70 indivíduos com doença carotídea sintomática, avaliou-se a acção da dieta hipolipídica da AHA ou da sinvastatina (40 mg/dia) associada à dieta, a nível da concentração da COX-2, da mPGES e das metaloproteínases vasculares. As placas dos indivíduos medicados com a estatina, apresentaram redução significativa dos macrófagos ($p < 0,0001$), dos linfócitos T ($p < 0,0001$), da COX-2 ($p < 0,0001$), da mPGES ($p < 0,0001$), das metaloproteínases ($p < 0,0001$) e das OxLDL ($p < 0,0001$), enquanto que os indivíduos que receberam apenas a dieta demonstraram maiores níveis das metaloproteínases, da COX2 e da PGES; os efeitos da simvastatina foram inibidos pelo mevalonato¹⁴⁷⁶.

No LIPID, a pravastatina na dose de 40 mg/dia, reduziu significativamente o risco de AVC não hemorrágico ($p=0,05$)¹⁴⁷⁷.

Neste estudo, os níveis do colesterol não se correlacionaram com a incidência de AVC, pelo que os autores atribuíram a redução do risco aos possíveis efeitos extra-lipídicos da pravastatina.

Uma metanálise de três estudos randomizados e controlados, dois deles de prevenção secundária, o CARE e o LIPID, e um de prevenção primária, o WOSCOPS, incluiu 19 768 participantes. Nos dois primeiros, verificaram-se reduções significativas no número total dos AVC(s) e dos AVC(s) não fatais ($p=0,01$), enquanto no WOSCOPS não se obtiveram reduções com significado estatístico¹⁴⁷⁸.

As estatinas reduziram os níveis da PCR após AVC isquêmico, o déficit neurológico inicial, a ocorrência de novos acidentes vasculares e a morte¹⁴⁷⁹¹⁴⁸⁰. Aparentemente estes efeitos foram independentes das alterações lipídicas e o melhor prognóstico foi obtido nos indivíduos que apresentavam inicialmente níveis mais altos de PCR.

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica e desmielinizante, de etiologia autoimune, do sistema nervoso central. Um modelo experimental da EM, a *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), tem sido utilizado para testar as possíveis ações das estatinas; nesta entidade, as células CD4 T_H1 reconhecem um dos antígenos da mielina, provocando a desmielinização do SNC e uma paralisia recidivante e progressiva.

A atorvastatina inibiu ou reverteu a EAE e mesmo após interrupção da terapêutica, menos animais desenvolveram a doença. Nos casos em que esta ocorreu manifestou-se de uma forma atenuada, o que sugeriu um efeito mantido da estatina¹⁴⁸¹.

As estatinas podem reduzir a migração dos leucócitos do sangue para o SNC, por inibição da produção de factores quimiotáticos pelas células endoteliais, pela micróglia, pelos oligodendrócitos e astrócitos e também pela inibição do LFA-1 e da sua ligação ao ICAM -1 endotelial¹⁴⁸²¹⁴⁸³¹⁴⁸⁴. A inibição das metaloproteinases pelas estatinas poderá interferir com a migração das células inflamatórias através dos tecidos e das membranas biológicas.

Uma outra via pela qual as estatinas podem interferir nos mecanismos inflamatórios da EAE é através da produção das citocinas. As células CD4 T_H1

produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL1, a IL12, o INF-gama e o TNF- α , enquanto que as CD4 T_H2 produzem citocinas com propriedades essencialmente inibitórias, de que são exemplo a IL-4, a IL-5, a IL-10 e a IL-13.

A atorvastatina induziu a produção das citocinas T_H2 e a diferenciação das células T_H0 em T_H2¹⁴⁸⁵.

A lovastatina inibiu a expressão de NO induzível, do TNF- α e do INF-gama no SNC de animais com EAE, melhorando simultaneamente as manifestações clínicas da doença^{1486 1487}.

Uma palavra para o complexo de histocompatibilidade major (MHC) que, como se sabe, tem um papel primordial na apresentação do antigénio às células efectoras pelas células apresentadoras (monócitos/macrófagos, células dendríticas).

As estatinas inibiram a expressão do complexo de histocompatibilidade, induzido pelo INF-gama, a nível de várias células apresentadoras de Ag, tendo este efeito sido anulado pelo mevalonato^{1488 1489}.

O coactivador transcripcional CIITA é o regulador da expressão constitutiva e induzida das moléculas da classe II do MHC, sendo activado pelo INF-gama.

Utilizando células endoteliais e monócitos/macrófagos humanos activadas pelo INF-gama, demonstrou-se que a sinvastatina reduziu a expressão das moléculas de classe II do MHC e a activação das células T, através da repressão do CIITA^{1490 1491}.

Embora todos estes estudos experimentais apresentem resultados bastante encorajadores, permanece a questão da possível utilização dos inibidores da HMG-CoA reductase na terapêutica da EM.

Estudos epidemiológicos avaliaram se os indivíduos com EM e medicados com estatinas, devido a dislipidemia, apresentaram evolução mais favorável. O facto de as primeiras manifestações da EM aparecerem por volta dos 30 anos e o início da terapêutica com estatinas ser em média mais tardio, pode ter dificultado estas avaliações, dado que os inibidores da HMG-CoA reductase podem ser particularmente eficazes nos estádios iniciais da doença^{1492 1493}.

11.1.9 - Efeitos antioxidantes

Como vimos no capítulo da peroxidação lipídica, as estatinas, através de diferentes mecanismos, possuem importantes acções antioxidantes. As principais são a inibição da oxidação dependente da mieloperoxidase e do óxido nítrico, aparentemente por mecanismos independentes da sua acção hipolipemiante e em relação com a inibição da isoprenilação de proteínas de sinalização como a Rac e a Rho¹⁴⁹⁴.

Em células musculares lisas do rato, demonstrou-se o efeito antioxidante da atorvastatina, dependente da inibição da NAD(P)H oxidase (por inibição da prenilação da Rac e conseqüente redução da translocação desta proteína do citoplasma para a membrana celular) e do aumento da actividade da catalase ($p < 0,05$)¹⁴⁹⁵.

Em células endoteliais de artérias coronárias humanas, a pravastatina e a sinvastatina, reduziram a expressão de diversas moléculas de adesão, tais como as selectinas-E e P, a VCAM-1 e a ICAM-1 ($p < 0,05$). As estatinas obtiveram este efeito por inibição da activação do NF- κ B pelas OxLDL e da posterior expressão da LOX-1¹⁴⁹⁶.

12 - Activadores dos PPAR(s) – Fibratos e Glitazonas

O BECAIT foi o primeiro estudo angiográfico controlado a demonstrar que o tratamento com um fibrato, o bezafibrato, teve efeitos benéficos na progressão da aterosclerose coronária focal¹⁴⁹⁷. Para além dos efeitos lipídicos, os autores apontaram outras acções deste fibrato, dependentes igualmente da sua capacidade de activação dos *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR), para justificar o benefício observado.

Também o estudo LOCAT, com o genfibrozil, demonstrou a capacidade deste fármaco em retardar a progressão da aterosclerose coronária, em homens com baixos valores de colesterol HDL; mais uma vez, as alterações a nível dos lípidos não terão explicado na totalidade o benefício obtido¹⁴⁹⁸.

Para abordarmos os potenciais efeitos imunomoduladores dos fibratos impõe-se que façamos algumas considerações sobre os *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPAR) e sobre as suas múltiplas acções.

Os PPARs são factores de transcrição, pertencentes à superfamília dos genes de receptores nucleares, são activados pelos ácidos gordos e seus derivados e encontram-se presentes em muitos tecidos tais como o fígado, o músculo, o rim, o coração, o tecido adiposo e os micro e macro-vasos^{1499 1500 1501 1502}.

Existem essencialmente três classes de PPARs - os PPAR α , os PPAR γ e os PPAR δ . Quando activados, estimulam a degradação dos ácidos gordos por β -oxidação, promovem a diferenciação dos adipócitos e controlam a adipogénese, respectivamente.

Segundo estudos realizados no rato, os PPAR α são os receptores predominantes nos linfócitos, enquanto que os PPAR γ são os mais representados em toda a linha celular mielóide¹⁵⁰³.

Os ácidos gordos são ligantes naturais dos PPAR α , dos PPAR γ e dos PPAR δ . Os leucotrienos, formados a partir do ácido araquidónico pela acção da lipoxigenase, activam os PPAR α , enquanto que as prostaglandinas, formadas a partir do ácido araquidónico pela acção da cicloxigenase, são ligantes dos PPAR γ ^{1504 1505}.

Dispomos de agonistas sintéticos dos PPARs, usados no tratamento das doenças metabólicas, particularmente das dislipidemias e da diabetes tipo 2. Os fibratos activam os PPAR α e são hipolipemiantes e as glitazonas são ligantes de alta afinidade dos PPAR γ com acção antidiabética^{1506 1507}.

Após activação pelos ligantes, os PPARs regulam a transcrição nas regiões reguladoras dos genes alvo, através da dimerização com o receptor retinóide X e a ligação aos *PPAR response elements* (PPREs)¹⁵⁰⁸.

Os PPARs podem, igualmente, reprimir a transcrição de determinados genes ao interferir com o NF- κ B e o AP-1, com os transdutores de sinal e com os activadores da transcrição, podendo esta repressão explicar as acções anti-inflamatórias dos PPARs^{1509 1510 1511 1512 1513 1514}.

Os activadores dos PPAR γ inibiram a transcrição de múltiplos genes inflamatórios, particularmente quando a activação transcripcional era induzida pelo LPS, pela IL-1 e pelo IFN- γ ¹⁵¹⁵.

Os genes estimulados pelo LPS e que foram inibidos pelos activadores dos PPAR γ , incluíram alguns responsáveis pela imunidade inata e pela imunidade adquirida (IL-12 e IP-10). Esta constatação, sugere um papel

controlador na activação dos macrófagos por parte dos PPARs, após exposição ao antigénio¹⁵¹⁶.

Os níveis de expressão dos PPARs dependem de diferentes estímulos, como o ritmo circadiano, o jejum, o stresse e o frio^{1517 1518 1519}. Também os corticóides, a insulina e algumas citocinas têm capacidade de alterar a expressão dos PPARs^{1520 1521 1522}.

Os diferentes polimorfismos dos PPAR(s) poderão também condicionar a sua actividade metabólica e/ou antiinflamatória.

A homozigotia para o polimorfismo L162V do gene do PPAR α , esteve associada com a aterosclerose coronária e com os níveis da IL-6 ($p < 0,01$)¹⁵²³.

Não nos vamos debruçar sobre as acções dos PPARs a nível dos metabolismos das gorduras e dos hidratos de carbono, por não constituírem o objectivo primordial do nosso estudo. Recordar-se apenas que, no metabolismo lipídico, os PPAR α , após estimulação pelos fibratos, aumentam a captação e o catabolismo dos ácidos gordos e reduzem a produção dos triglicédeos e das VLDL pelo fígado e estimulam o metabolismo intravascular dos triglicédeos¹⁵²⁴. Esta última propriedade dos PPAR α depende da estimulação da lipoproteína lipase (LPL) a nível hepático e da inibição da apoC-III^{1525 1526}.

As glitazonas também interferem com os níveis plasmáticos dos ácidos gordos livres, do colesterol e dos triglicédeos, aparentemente por indução da lipólise (aumento da expressão da LPL nos adipócitos) e da clearance das lipoproteínas ricas em triglicédeos^{1527 1528}.

12.1 - PPARs e a resposta inflamatória

Os PPARs exercem as suas acções antiinflamatórias em diferentes tipos de células vasculares e imunológicas, como os monócitos / macrófagos, as células endoteliais, as células musculares lisas, as células dendríticas e os linfócitos T.

Os seus activadores, ao interferir negativamente com a activação dos factores de transcrição NF-kB e AP-1, inibiram a resposta inflamatória, com redução da transcrição dos genes das citocinas, das metaloproteinases e de outros reagentes de fase aguda, particularmente a nível da parede vascular¹⁵²⁹

¹⁵³⁰.

Os PPARs regulam a atracção e a adesão celular às células endoteliais.

O fenofibrato (100 µmol/L) inibiu quase por completo a produção de MCP-1, induzida pela PCR (100 µg/ml), nas células endoteliais da veia umbilical humana (2,1±0,6 ng/ml; aumento de 0,9±0,2 vezes; 15% da resposta máxima; $p<0,05$)¹⁵³¹.

Os activadores dos PPAR γ (10 µM de 15d-PGJ₂, 10 µM de troglitazona e 10 µM de BRL49653) bloquearam a expressão endotelial de várias proteínas quimiotácticas CXC, IP10 e a α -quimoquina para as células T (1-TAC), induzidas pelo INF-gama (100 U/ml) e responsáveis pelo recrutamento das células mononucleares para os locais de inflamação ($p<0,05$)¹⁵³².

Nos monócitos, as glitazonas reduziram a expressão do CCR2, um receptor transmembranar para o MCP-1¹⁵³³.

Os activadores dos PPAR α , fenofibrato (100 µmol/l) e WY 14643 (250 µmol/L), reduziram a expressão da VCAM-1 em células endoteliais humanas (respectivamente, 33±9% e 52±2%; $p<0,01$) e os PPAR γ , ciglitazona, troglitazona e outros, também em células endoteliais humanas, reduziram a expressão da VCAM-1 induzida por citocinas e a adesão dos monócitos ($p<0,001$)^{1534 1535}.

Em células endoteliais da aorta humana, a troglitazona (100 µmol/L) inibiu significativamente a expressão da VCAM-1 e da ICAM-1, induzidas pelo TNF. A confirmar o significado biológico deste facto, a mesma glitazona, na dose de 400 e 3200 mg/Kg, reduziu significativamente o número de macrófagos, nas placas de aterosclerose de ratos deficientes em Apo E (respectivamente, 236±77 versus 177±43; $P=0,03$ e 344±76 versus 172±83; $P=0,005$).¹⁵³⁶

Em células endoteliais da aorta humana, os ligantes sintéticos dos PPAR γ , inibiram significativamente a expressão da VCAM-1 e a adesão dos monócitos ($p<0,001$), principais responsáveis pela inflamação crónica, sem afectarem a expressão da selectina-E e a ligação dos neutrófilos, responsáveis pela inflamação aguda¹⁵³⁵. Este efeito selectivo manteve practicamente intactas as defesas contra as infecções agudas.

Os PPARs demonstraram actividade moduladora dos linfócitos T^{1537 1538}.

A troglitazona inibiu a produção de IL-2 e a proliferação, estimulada pela fitohemaglutinina, dos linfócitos T humanos, através da formação de um complexo molecular entre o PPAR γ e o factor de transcrição NFAT,

regulador do gene da IL-2¹⁵³⁹. Esta acção verificou-se apenas nas células que expressavam os PPAR γ e não nos linfócitos T destituídos destes receptores.

Em células endoteliais humanas, os activadores dos PPAR α e γ , inibiram a produção da endotelina-1 estimulada pela trombina ($p < 0,05$), ao interferirem com a transcrição do seu gene pelo AP-1¹⁵⁰².

A incubação de monócitos humanos com prostaglandinas e ligantes sintéticos dos PPAR γ , inibiu a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF α , a IL1 β , a IL6, a IL8 e a IL10^{1540 1541}.

Os activadores dos PPAR α inibiram a expressão da COX-2 e da IL6 nas células musculares lisas da aorta humana¹⁵⁴², assim como a expressão induzida do factor tecidual ($p < 0,05$) em monócitos humanos^{1543 1544}.

Indivíduos com hiperlipoproteinemia tipo IIb, foram medicados com 200 mg/dia de fenofibrato durante um mês, tendo-se verificado uma redução significativa nos níveis séricos do TNF- α e do INF γ . Para os autores, esta redução correlacionou-se com as alterações dos valores lipídicos^{1545 1546}.

Os activadores dos PPAR α inibiram, *in vitro* e *in vivo*, a transcrição da PCR ($p < 0,05$) através do aumento da expressão do I κ B- α ($p < 0,05$), impedindo a translocação do factor de transcrição p50-NF κ B para o núcleo e reduzindo os níveis hepáticos da *coactivator of the CCAAT box/enhancer-binding protein- β* (C/EBP- β) e do p50-NF κ B, através dos quais a IL-1 aumenta a expressão da PCR^{1547 1548}.

Determinaram-se os níveis séricos da PCR, da IL6, da MMP-9 e o número de leucócitos em 357 diabéticos tipo 2, antes e depois da terapêutica com a rosiglitazona (2 e 4 mg/dia). Este fármaco reduziu significativamente os níveis da PCR, da MMP-9 e o número de leucócitos ($p < 0,01$), tendo os níveis da IL-6 sido igualmente reduzidos mas de uma forma não significativa¹⁵⁴⁹.

Efeito semelhante a nível da PCR e no número de leucócitos foi obtido com a pioglitazona, independentemente das alterações da glicose¹⁵⁵⁰.

Em doentes coronários, não diabéticos, muitos deles medicados com estatinas, a rosiglitazona (4 a 8 mg / dia) reduziu a expressão da selectina-E ($p = 0,03$), do factor Von Willebrand ($p = 0,007$), do fibrinogénio ($p = 0,003$) e da PCR circulantes ($p < 0,001$), podendo estas acções ser explicadas pelo aumento da sensibilidade à insulina e pela inibição da activação do NF- κ B¹⁵⁵¹.

Um trabalho realizado em diabéticos tipo 1 e 2, demonstrou que o CD40L se encontrava elevado nestes doentes, relativamente aos não diabéticos ($p < 0,001$) e que a utilização da troglitazona (600 mg/dia) nos diabéticos tipo 2, diminuiu esta citocina pró-inflamatória em 29% ($p < 0,001$)¹⁵⁵². Para os autores, a activação dos PPAR γ traduziu-se numa acção antiinflamatória, limitando a progressão da doença arterial nos diabéticos.

Esta acção foi também demonstrada em diabéticos tipo 2 com doença da artéria coronária e medicados com rosiglitazona nas doses de 4 a 8 mg/dia ($p < 0,05$)¹⁵⁵³.

Nas células musculares lisas da aorta do rato, a PGJ2 e o 9-HODE induziram a expressão da fosfolipase A2 secretada tipo II (s-PLA₂), uma enzima que hidrolisa os fosfolípidos e induz a produção de mediadores inflamatórios lipídicos, tais como os ácidos araquidónico e lisofosfatídico¹⁵⁵⁴.

A sPLA₂ induziu a produção do 9-HODE, agonista dos PPAR(s), por estimulação da lipoxigenase a partir das LDL¹⁵⁵⁵. Esta enzima, pode assim inicialmente conduzir a uma actividade proinflamatória, independente dos PPARs e posteriormente, a uma inibição da resposta inflamatória dependente dos PPARs^{1556 1557}.

Outros estudos utilizando ligantes naturais dos PPAR γ , nomeadamente o leucotrieno B₄, demonstraram que estes podem inibir a sintetase do óxido nítrico induzível, muito provavelmente através da indução da proteína de stresse heme oxigenase 1¹⁵⁵⁸. A produção de metabolitos dos eicosanóides durante a inflamação poderá, assim, contribuir para a sua resolução através da via dos PPARs.

Os PPAR α e os PPAR γ encontram-se presentes nos macrófagos humanos diferenciados, enquanto que nos monócitos apenas estão presentes os primeiros.

Os activadores dos PPAR α e dos PPAR γ induziram a apoptose dos macrófagos diferenciados, particularmente quando activados pelo INF γ e pelo TNF α . O TNF α afectou a sobrevivência dos macrófagos por dois mecanismos diferentes, um pró-apoptótico independente do NF κ B e outro anti-apoptótico dependente deste factor de transcrição. Os PPARs inibiram a actividade transcripcional do p65 / RelA, um componente chave da via de sinalização anti-apoptótica do NF κ B¹⁵⁵⁹.

A aparente capacidade das glitazonas para prevenir o desenvolvimento da diabetes tipo 1, autoimune, levou alguns autores a investigar, no rato, se a troglitazona actua através da interferência com a via do ICAM/LFA-1 e / ou do equilíbrio entre as citocinas Th₁ / Th₂. As células dos ilhéus pancreáticos dos animais tratados com a glitazona, mostraram uma redução da expressão da ICAM-1 induzida pela IL-1, levando os autores a concluir que a supressão da ICAM torna as células dos ilhéus menos vulneráveis à agressão autoimune¹⁵⁶⁰.

Estes estudos estão de acordo com uma acção reguladora dos processos inflamatórios por parte dos *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*.

12.2 - PPARs e a estabilidade da placa

Como vimos, a instabilidade da placa deve-se em parte à degradação da sua matriz extracelular.

Em lesões de aterosclerose carotídea humana, a troglitazona inibiu a expressão da metaloproteinase-9 e preveniu a ruptura da placa e a posterior trombose ($p < 0.01$)¹⁵⁶¹.

Em células musculares lisas, as glitazonas inibiram significativamente ($p < 0,05$) a expressão da Est-1, um factor de transcrição do gene da metaloproteinase¹⁵⁶².

Os PPARs α e gama controlaram a apoptose dos macrófagos a nível do NF- κ B. A rosiglitazona, também em macrófagos humanos, estimulou a expressão do PTEN ($p < 0,05$), um factor de supressão tumoral que modula a resposta inflamatória, a migração, a sobrevivência e a proliferação celulares, e reduziu a expressão macrófágica da MMP-9 ($p < 0,05$)^{1563 1564}.

A restenose por proliferação das células musculares lisas, é a principal causa da falência da revascularização e toda a terapêutica capaz de inibir ou atrasar a ocorrência deste fenómeno será da maior utilidade. Em células musculares lisas da veia safena humana, demonstrou-se *in vitro* que o fenofibrato, aparentemente por inibição do PDGF e de uma forma independente das alterações do colesterol, inibiu significativamente a sua proliferação¹⁵⁶⁵.

Em células musculares lisas da aorta humana, os activadores dos PPARgama inibiram a produção do factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), induzida pelo TGB- β , aparentemente por repressão da transcrição do

gene responsável. Através deste mecanismo, conseguiram reduzir a formação da matriz extracelular das lesões de aterosclerose, contrariando o crescimento da lesão e a restenose¹⁵⁶⁶.

Em células endoteliais da aorta bovina, os activadores dos PPAR α e dos PPAR γ , inibiram a expressão da endotelina-1 induzida pela trombina e reduziram a proliferação das células musculares lisas ($p < 0,05$)^{1567 1502}.

12.3 - PPARs e trombose

Os activadores dos PPAR γ inibiram a expressão da sintetase e da proteína do tromboxano A2 (TXA2).

O NRF2 é um factor de transcrição da família *Cap "n" Collar* (p45, NRF1, NRF3, BACH1 e BACH2) e está envolvido na indução dos genes da hemoxigenase 1 e do TXA2.

A activação dos PPAR γ , com a PGJ2 (1 e 5 μmol) ou a troglitazona (10 e 20 μmol), suprimiu a expressão do gene do TXA2 a nível da proteína transcricional, através da interacção directa entre os PPAR γ e o NRF2 ($p < 0,01$)¹⁵⁶⁸.

Em células musculares lisas vasculares do rato, compararam-se as acções de diversas tiazolidinedionas, rosiglitazona, P1455 e troglitazona, a nível da transcrição dos genes do TXA2 e do receptor AT1 da Ag II. Apenas a troglitazona, que possui um anel fenol, estruturalmente semelhante ao α -tocoferol, inibiu significativamente ($p < 0,01$) a transcrição dos dois genes; esta acção terá estado na dependência da activação dos PPAR γ , comum às outras tiazolidinedionas e da sua potencial acção antioxidante¹⁵⁶⁹.

Em monócitos e macrófagos humanos os activadores dos PPAR α , fenofibrato (100 $\mu\text{mol/L}$), WY14643 (10 $\mu\text{mol/L}$) e GW2331 (1 $\mu\text{mol/L}$), inibiram a expressão do TF, induzida por 0,4 ng/ml de LPS ($p < 0,05$), através da inibição da activação dos factores de transcrição AP-1 e NF κ B¹⁵⁷⁰.

Em macrófagos humanos, as OxLDL activaram os PPAR α e reduziram a expressão do receptor do PAF, sugerindo que a oxidação de um ou de vários componentes das LDL poderá resultar na formação de activadores naturais destes factores de transcrição¹⁵⁷¹.

As glitazonas e os fibratos modularam a secreção do PAI-1, embora os seus efeitos a este nível, não estejam ainda completamente esclarecidos. Enquanto um estudo demonstrou uma melhoria da fibrinólise com a troglitazona¹⁵⁷², noutro, os activadores dos PPAR γ aumentaram os níveis do PAI-1, produzidos pelas células endoteliais humanas ($p=0,03$), não se tendo verificado qualquer efeito com os PPAR α ¹⁵⁷³.

O fibrinogénio é simultaneamente um factor de coagulação e um reagente de fase aguda e vê a sua produção estimulada por citocinas, como a IL-6. A síntese do fibrinogénio efectua-se nos hepatócitos, sendo secretado como uma molécula dimérica. Cada uma dessas moléculas é composta por três polipeptídeos ligados entre si, denominados A α , B β e γ . No homem, a síntese da cadeia B β é a principal etapa reguladora da síntese do fibrinogénio.

O *transcriptional intermediary factor glucocorticoid receptor-interacting protein 1/transcriptional intermediary factor 2* (GRIP1/TIF2) é um regulador positivo da transcrição da cadeia B β e a inibição do GRIP1/TIF2, pelos PPAR α , poderá constituir o mecanismo molecular pelo qual os fibratos reduzem a síntese do fibrinogénio e a tendência pró-trombótica¹⁵⁷⁴.

Em doentes coronários, não diabéticos, a rosiglitazona, na dose de 4 mg/dia, reduziu a concentração sérica do factor VonWillebrand ($p=0,007$) e do fibrinogénio ($p=0,003$). Para os autores, estas acções poderão ser explicadas pela sensibilização à insulina, induzida pela rosiglitazona, e pela possível acção inibitória a nível do NF- κ B¹⁵⁷⁵.

12.4 - PPAR(s) e Angiotensina II

Através da estimulação do crescimento e da apoptose celulares, da migração, da inflamação e da deposição das proteínas da matriz extracelular, a Ag II contribui definitivamente para o “remodeling vascular” que acompanha a HTA¹⁵⁷⁶.

As tiazolidinedionas têm demonstrado reduzir a tensão arterial, mas os mecanismos envolvidos nessa acção não estão ainda completamente esclarecidos¹⁵⁷⁷.

Em ratos infundidos com Ag II (TAS - 176 ± 5 mmHg) foi possível prevenir a HTA com a administração da pioglitazona, ($134\pm$ mmHg; $p<0,05$) e da

rosiglitazona (123 ± 2 mmHg; $p < 0,05$), respectivamente nas doses de 10 e 5 mg/Kg. Através da inibição da activação do NF- κ B e da redução dos receptores vasculares AT₁ ($p < 0,05$) e do aumento dos AT₂ ($p < 0,05$), estes activadores dos PPAR γ inibiram a inflamação e o crescimento celular ($p < 0,05$)¹⁵⁷⁸.

Proliferação celular - Em macrófagos humanos e em células neoplásicas do cólon e da mama, a activação dos PPAR γ pela rosiglitazona, aumentou a expressão do PTEN ($p < 0,05$), um factor de supressão tumoral que modula a resposta inflamatória, a migração, a sobrevivência e a proliferação celulares. O aumento da expressão deste supressor, teve como consequência, a indução da apoptose dos macrófagos e a redução da proliferação das células malignas ($p < 0,01$)¹⁵⁶³.

A troglitazona demonstrou, igualmente, capacidades diferenciadoras das células neoplásicas da próstata e do lipossarcoma^{1579 1580}.

Os agonistas dos PPAR γ poderão vir assim a revelar-se, no futuro, como fármacos eficazes na terapêutica anti-neoplásica.

13 - Probucol

O probucol é um fármaco anti-aterogénico único, exercendo esta acção mais pelo seu efeito antioxidante do que pelo efeito hipolipemiante. O seu mecanismo não está ainda perfeitamente esclarecido mas, tal como em relação aos fibratos e às estatinas, são-lhe reconhecidas propriedades imunomoduladoras.

A proliferação mesangial e a sua infiltração pelas células inflamatórias, são comuns a várias lesões glomerulares precoces.

Num artigo publicado no *Kidney International*, avaliou-se a acção do probucol a nível das células mesangiais do glomérulo do rato. Os autores chamaram a atenção para as principais acções da IL-1, nos estádios iniciais da glomerunefrite. Através do aumento da expressão da ICAM-1, potenciou a acção do PDGF na proliferação das células mesangiais e provocou a infiltração leucocitária. Incubaram-se células mesangiais com LPS, na presença e na ausência do probucol. O LPS aumentou em 5 vezes a expressão da ICAM-1, tendo sido este efeito significativamente reduzido pelo fármaco¹⁵⁸¹.

Os mesmos autores, afirmaram num outro trabalho, que o probucol inibiu a expressão do mRNA e da própria ICAM-1 nas células mesangiais do rato, por supressão da actividade da IL-1¹⁵⁸².

Através da inibição desta citocina pelos macrófagos da parede arterial, o probucol poderá interferir favoravelmente nas lesões de aterosclerose.

O pré-tratamento de células endoteliais da veia umbilical humana, com 50 microM de probucol, reduziu a expressão do mRNA da VCAM-1 e a adesão dos leucócitos após estimulação com TNF α ¹⁵⁸³.

Em células endoteliais do porco, estimuladas pelas OxLDL, a adesão dos monócitos foi também inibida pelo probucol¹⁵⁸⁴.

Em aortas de coelhos, deficientes em receptores LDL, verificou-se uma associação entre a expressão do VCAM-1 e a infiltração dos macrófagos na íntima ($p < 0,001$). O tratamento com probucol reduziu significativamente a expressão da VCAM-1 (0.605 ± 0.080 versus 0.840 ± 0.095 ; $P = 0.047$), a infiltração macrofágica e a presença de lesões de aterosclerose¹⁵⁸⁵.

Ao inibir a oxidação das LDL que, quando oxidadas, induzem a libertação da IL-1 pelos macrófagos, o probucol poderá exercer a sua acção imunomoduladora.

14 - CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

A doença aterosclerótica é a principal causa de morte nos países desenvolvidos. Na sua etiopatogénese parece estar uma reacção do vaso a uma qualquer agressão física, química, infecciosa ou imunológica. Seja qual for o factor responsável pela agressão, os mecanismos inflamatórios e imunológicos exercem um papel primordial na ampliação e manutenção do processo aterogénico. As OxLDL comportam-se como um dos principais desencadeantes dessa reacção inflamatória.

A peroxidação lipídica e o seu papel na alteração das LDL e das membranas biológicas, particularmente do endotélio, tem sido objecto de grande investigação. A maioria dos trabalhos tem sido realizada no animal de experiência e *in vitro*. No homem, alguns estudos também demonstraram uma relação entre a peroxidação, as LDL oxidadas e a patologia vascular periférica, carotídea e coronária ^{1586 1587 1588 1589 1590}.

No *Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial* (PREVENT), realizado em homens e mulheres dos 30 aos 80 anos, com evidência angiográfica de doença coronária, as concentrações séricas de TBARS comportaram-se como factores preditivos fortemente positivos de futura doença cardiovascular. Os indivíduos com TBARS no quartil mais elevado apresentaram um RR de 2,94 (IC a 95% de 1,75 a 4,94; $p < 0,0001$) de EAM fatal / não fatal, um RR de 2,32 (IC a 95% de 1,43 a 3,77; $p < 0,0007$) de cirurgia de *bypass* coronário e um RR de 2,21 (IC a 95% de 1,59 a 3,06; $p < 0,0001$) de angioplastia coronária transluminal percutânea¹⁵⁹¹.

Em relação à população portuguesa, existe um número considerável de trabalhos neste campo, tais como estudos da peroxidação lipídica associada à toxicidade etanólica, ao exercício físico, ao enfarte agudo do miocárdio e à lesão de reperfusão, assim como da avaliação das propriedades antioxidantes de certos fármacos e oligoelementos ^{1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598}.

Não temos conhecimento de estudos que tenham avaliado os fenómenos oxidativos e a sua correlação com as dislipidemias e as lesões de aterosclerose, em homens e mulheres portugueses saudáveis. A dieta mediterrânica tradicional, rica em flavonóides antioxidantes e em ácidos gordos monoinsaturados, mais resistentes à oxidação, poderá ser responsável por um

perfil de peroxidação lipídica / inflamação típica dos portugueses e de outros povos mediterrânicos.

Pareceu-nos, assim, justificado avaliar em homens e mulheres portugueses saudáveis, através da determinação de alguns marcadores bioquímicos séricos, se a inflamação e a peroxidação lipídica estão associadas às dislipidemias mais comuns e à lesão vascular sub-clínica.

Os fármacos hipolipemiantes têm um papel central na prevenção e no tratamento da doença cardiovascular, como atestam diversos ensaios de prevenção primária e secundária. Para além da sua acção hipolipemiante, parecem ter igualmente, um efeito não negligenciável a nível dos mecanismos inflamatórios, imunológicos e oxidativos, com potencial interesse terapêutico.

As vitaminas antioxidantes, como a Vit E e a Vit C, poderão influenciar favoravelmente a lesão vascular ao reduzir a produção de radicais livres, a oxidação das lipoproteínas, a inflamação e a agressão do endotélio.

Os resultados dos estudos com este tipo de vitaminas estão, no entanto, longe de ser concordantes e encorajadores.

14.1 - Objectivos

No nosso estudo, procurámos avaliar a acção antiinflamatória, imunomoduladora e/ou antioxidativa das estatinas, dos fibratos e das vitaminas E e C e uma eventual interferência na evolução das lesões vasculares sub-clínicas.

Este trabalho pretendeu avaliar novos indicadores de risco da doença cardiovascular e a sua importância na população portuguesa, tentando definir possíveis estratégias para a sua modulação.

Assim, propusemo-nos:

1 - Avaliar a peroxidação lipídica em indivíduos normolipidémicos (grupo controlo) e dislipidémicos com doença carotídea sub-clínica.

2 – Determinar nos mesmos indivíduos, diversos factores séricos relacionados com a inflamação e procurar uma possível associação entre um estado inflamatório sub-clínico, as diversas dislipidemias e as lesões de aterosclerose.

3 - Procurar uma eventual relação entre a peroxidação lipídica, a inflamação e as diferentes dislipidemias.

4 - Avaliar uma possível acção antioxidante e antiinflamatória de alguns dos fármacos hipolipemiantes e das vitaminas antioxidantes.

5 – Confirmar uma possível relação entre o consumo de álcool e os mecanismos inflamatórios e peroxidativos.

14.2 - Material e Métodos

14.2.1 – Caracterização das populações estudadas

Grupo controlo (C), constituído por 12 indivíduos saudáveis de ambos os sexos, normolipidémicos, com idades compreendidas entre os 30 e os 70 anos. Este grupo foi sujeito apenas à avaliação inicial.

Grupo de dislipidémicos (D), constituído por 40 indivíduos recrutados da nossa Consulta de Dislipidemias, comparáveis em termos de sexo e idade aos do grupo C, mas apresentando valores elevados de colesterol total (>200 mg / dl) ou CLDL (>130 mg / dl) e / ou triglicérides (>200 mg / dl) e com lesões sub-clínicas de aterosclerose carotídea. Dois destes participantes não foram incluídos na nossa análise, por incumprimento das terapêuticas prescritas, pelo que o grupo D ficou reduzido a 38 indivíduos.

Todos os participantes deram o seu consentimento informado, tendo sido o presente estudo aprovado pela Comissão de Ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

A prescrição das vitaminas antioxidantes, E e C, foi realizada com o consentimento dos participantes, após explicação da sua acção, possíveis benefícios e esclarecimento sobre o aparecimento de eventuais efeitos iatrogénicos.

A prescrição dos hipolipemiantes foi sempre guiada por critérios estritamente clínicos.

Outras terapêuticas cumpridas pelos participantes antes da entrada no estudo, nomeadamente o ácido acetilsalicílico em doses anti-agregantes, foram mantidas, sempre que existisse indicação para tal.

14.2.2 - Protocolo do Estudo

14.2.2.1 - Avaliação clínica e laboratorial

Todos os indivíduos foram submetidos a um exame físico que incluiu a determinação do peso, da altura, do índice de massa corporal, da relação perímetro abdominal / perímetro da anca, da pressão arterial, tendo sido igualmente pesquisadas as manifestações de aterosclerose (sopros vasculares, pulsos periféricos) e as de dislipidemia (arco corneano, xantelasmas / xantomias, hepatoesplenomegalia).

Avaliaram-se as histórias familiares, os hábitos dietéticos, tabágicos e alcoólicos, o uso de fármacos e outras características do estilo de vida.

Analicamente, dosearam-se a ficha lipídica (o colesterol total, o colesterol HDL, o colesterol LDL e os triglicerídeos), a Apo A1, a Apo B100, a Apo(a) e a genotipagem da Apo E, a glucose, o ácido úrico, a CK, a fosfatase alcalina, as transaminases, a gama-GT, as bilirrubinas, o azoto ureico, a creatinina, as hormonas tiroideias e a urina tipo II. Determinaram-se, igualmente, os níveis séricos da ceruloplasmina e da transferrina. Todas as determinações analíticas foram realizadas depois de um jejum de 12 a 14h.

Realizou-se um electrocardiograma e uma avaliação de eventuais lesões de aterosclerose, com determinação da espessura da média-íntima da artéria carotídea, através do estudo com ecodoppler.

Determinou-se igualmente o Índice Perna-Braço (IPB) e quando justificado, realizou-se um doppler arterial dos membros inferiores.

Os indivíduos do grupo D, sem qualquer terapêutica com hipolipemiantes ou antioxidantes, ou, se estivessem medicados com algum destes fármacos, após 1 mês de suspensão dos mesmos, iniciaram uma terapêutica com antioxidantes (Vitaminas E e C), durante três meses, nas doses abaixo indicadas.

No fim deste período, realizou-se uma nova avaliação da ficha lipídica, dos parâmetros inflamatórios e imunológicos e da peroxidação lipídica.

Posteriormente, os indivíduos dislipidémicos foram divididos em dois subgrupos:

O grupo E (N = 28), em que os participantes apresentavam uma hipercolesterolemia e foram, aleatoriamente, medicados com sinvastatina ou com atorvastatina.

O grupo F (N = 10), em que os indivíduos apresentavam uma hipertrigliceridemia ou uma dislipidemia mista e foram submetidos a uma terapêutica com o fenofibrato.

Em metade dos participantes dos grupos E e F, manteve-se igualmente a terapêutica antioxidante, com a associação Vit E e Vit C.

Os participantes foram regularmente observados em consulta, com uma periodicidade de 6 meses, em que, para além do exame físico, eram interrogados sobre a ocorrência de eventuais efeitos secundários e realizavam-se as determinações das fichas lipídicas e de outros parâmetros laboratoriais, incluindo os indicadores da existência de potencial iatrogenia.

Anualmente determinou-se o IPB e foi requisitado um ecodoppler carotídeo.

Após 36 meses de terapêutica, todos os participantes foram avaliados em termos do estado inflamatório e oxidativo e em termos da evolução das lesões vasculares.

14.2.2.2 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o cálculo de intervalos de confiança a 95%, e a análise de variância (ANOVA) para comparação de médias, seja entre grupos seja no mesmo grupo em momentos sucessivos. O nível de significância adoptado foi o de 95% ($p < 0.05$).

Foi utilizado o software estatístico SPSS v.15.

Os resultados estão expressos como números absolutos, relativos e médias (e desvio padrão).

14.2.2.3 - Apresentação dos resultados

Dada a sua extensão, optámos por dividir a Contribuição Pessoal em quatro grandes capítulos:

- 1 – Caracterização e comparação das Populações Estudadas
- 2 – Comparação Grupo Dislipidémicos (D) / Grupo Controlo (C), sob terapêutica
- 3 – Comparação Grupo Estatinas (E) / Grupo Controlo (C), sob terapêutica
- 4 – Comparação Grupo Fibratos (F) / Grupo Controlo (C), sob terapêutica

Cada um destes capítulos foi igualmente dividido em três ou quatro sub-capítulos, que analisaram sucessivamente o comportamento das variáveis lipídicas, da oxidação e da inflamação. Cada um destes sub-capítulos foi constituído por uma primeira parte, em que se apresentaram os resultados e uma segunda parte, constituída pelos comentários.

Em relação ao material e métodos, eles foram comuns a todos e já explicitados na secção – Protocolo do Estudo.

No final do trabalho são apresentadas as conclusões e reflexões finais.

Embora fugindo um pouco ao modelo mais comum de elaboração de uma tese, pensamos que a nossa opção permitirá ao leitor uma análise mais fácil do nosso trabalho, dos seus resultados e das nossas reflexões. Se, com esta estratégia, não conseguimos esses objectivos, aqui fica desde já o nosso pedido de desculpas.

14.2.2.4 - Fármacos utilizados

Estatinas

Simvastatina (Zocor), 20 a 40 mg/dia
Atorvastatina (Zarator), 10 a 40 mg/dia

Fibratos

Fenofibrato (Catalip 267), 267 mg/dia

Antioxidantes

Ever-Fit Cardio

(Vit C – 200 mg; Vit E – 268 mg/400 UI; Ácido fólico 400 µg; Vit B6 – 20 mg; Betacaroteno – 25 mg; Mg – 300 mg; Zn – 15 mg; Se – 200 µg; Luteína – 3 mg)

Foram mantidos todos os outros fármacos considerados necessários, incluindo os antiagregantes como o ácido acetilsalicílico

14.2.2.5 - Objectivos da terapêutica hipolipemiante

Colesterol Total < 200 mg / dl

C-LDL < 130 mg / dl

Triglicerídeos < 150 mg / dl

14.2.2.6 – Exames complementares realizados

Análises realizadas no laboratório de Patologia Clínica

Directora: Dra Helena Ribeiro

Colesterol total – Enzimático (CHOD-PAP)	V.R. < 200 mg/dl
Colesterol HDL – Enzimático Colorimétrico Homogéneo	V.R. ≥ 60 mg/dl
Colesterol LDL – Enzimático Homogéneo	V.R. < 130 mg/dl
Triglicerídeos – Enzimático (GPO-PAP)	V.R. < 150 mg/dl
Apo A1, apo B100 e apo (a) – Nefelometria (BNII – DADE BEHRING)	
Genotipagem da apo E – INNO-LiPA apo E typing test (hibridização reversa)	
Glucose – Hexokinase	V.R. 60 – 109 mg/dl
Ácido úrico – Uricase	V.R. – H 3,5 – 7,2 e M 2,6 – 6,0 mg/dl
Creatina Kinase – CKNAC (IFCC)	V.R. H ≤ 171 e M ≤ 145 U/L
Fosfatase alcalina – 4-NPP (IFCC)	V.R. (adulto) – 30 – 120 mg/dl
Aspartato Aminotransferase – IFCC (sem Fosfato de Piridoxal)	
	V.R. – H < 35 e M < 31 U/L
Alanina Aminotransferase – IFCC (sem Fosfato de Piridoxal)	
	V.R. – H < 45 e M < 34 mg/dl

Gama-Glutamiltransferase – SZASZ (IFCC)	V.R. – H < 38 e M < 55 U/L
Bilirrubina total – DPD (3,5 Dichlorophenyl Diazonim Tetrafluoborato)	V.R. – 0,3 – 1,2 mg/dl
Bilirrubina directa – DPD	V.R. - < 0,2 mg/dl
Azoto ureico – Urease	V.R. – 7,9 – 20 mg/dl
Creatinina – Jaffé Kinetic	V.R. – H < 50 A 0,81–1,3 e > 50 A 0,81 – 1,44; M 0,7 – 1,1 mg/dl

Todas estas análises foram efectuadas num Equipamento OLYMPUS

Análises na Urina – Glucose, bilirrubina, acetona, densidade, sangue, PH, proteínas, urobilinogéneo, nitritos e leucócitos – Tiras Teste

Sedimento Urinário – Citometria de Fluxo (Equipamento SismeX).

Ceruloplasmina	V.R. – 0,2 – 0,6 g/L
Transferrina	V.R. – 2,00 – 3,6 g/L
Alfa 1 – Antitripsina	V.R. – 0,90 – 2,0 g/L
Proteína C reactiva (ultra-sensível)	V.R - < 0,8mg/dl
Serologia do CMV	IgG e IgM
Serologia da Clamídea	IgG e IgA

Análises realizadas no laboratório de Medicina Nuclear

Director: Prof Dr Pedroso de Lima

TSH T3 e T4 livres

Exames realizados no Serviço de Cardiologia

Director: Prof Dr Luís Providência

Electrocardiograma

Exames realizados no Serviço de Imagiologia

Director: Prof Dr Filipe Caseiro Alves

1- Avaliação por Doppler da espessura da Média-Íntima Carotídea

A avaliação da espessura da média-íntima da parede carotídea (EMI), por eco-doppler, foi realizada no serviço de imagiologia dos HUC. A descrição das imagens obtidas utilizou a classificação já adoptada por José Manuel Silva na sua tese de doutoramento¹⁸, baseada no trabalho de Sutton-Tyrrell¹⁵⁹⁹: grau 0, sem alterações; grau 1, espessamento da parede ≥ 1 mm; grau 2, placa única, sem compromisso hemodinâmico; grau 3, duas ou mais placas, sem compromisso hemodinâmico; grau 4, compromisso hemodinâmico. O estudo doppler incidiu sobre a carótida comum, a carótida interna e o bolbo carotídeo.

2 - Doppler arterial dos membros inferiores (quando justificado).

Exames realizados no Serviço de Med 2

Director: Prof Dr José Júlio Alves de Moura

Determinação do Índice Perna-Braço

Para a determinação do Índice Perna-Braço (IPB), utilizou-se um aparelho doppler bidireccional, marca *Hokanson*, modelo MD6.

Resumidamente, a técnica empregue consistia na insuflação de uma braçadeira pneumática até atingir uma pressão suprassistólica. Posteriormente, desinsuflava-se e registava-se a TA a que o fluxo sanguíneo era detectado pela sonda do doppler (tensão arterial sistólica - TAS). Este processo era repetido sucessivamente em cada braço e em cada perna, avaliando, bilateralmente, a TAS nas artérias umerais e tibiais posteriores. O IPB era obtido dividindo a menor TAS, medida nos membros inferiores, pela maior TAS obtida nos membros superiores. Considerou-se um IPB normal, quando superior ou igual a 1,0 e anormal quando a relação encontrada foi inferior ou igual a 0,9.

Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UC

Directora: Profa Dra Leonor Almeida

1 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante

Para obtenção de alguma informação sobre o estado oxidante/antioxidante da população estudada recorreu-se à determinação da concentração da vitamina E (Vit E) e das OxLDL no plasma e à avaliação da capacidade antioxidante total do plasma através da determinação do parâmetro TRAP – *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*.

1.1 - Determinação da Vitamina E

A determinação da Vit E no plasma foi feita por análise de HPLC (Cromatografia Líquida de Elevada Precisão), após uma prévia extracção com solventes orgânicos, de acordo com Vieira e colaboradores¹⁶⁰⁰. A separação foi feita numa coluna de fase reversa Lichrosphor 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 12,5 cm x 4 mm DI, Merck, adaptada a um cromatógrafo Beckman Gold, UV detector model 166), e a detecção realizou-se a 290 nm. A quantificação foi feita com base numa curva de calibração de alfa-tocoferol e recorreu-se ao uso de um padrão interno (acetato de alfa-tocoferol).

Os valores numéricos apresentados são o resultado de, pelo menos, 3 experiências independentes e estão expressos como o valor médio \pm erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi efectuada com um programa adequado (GraphPad Prism), através da análise de variância (ANOVA) com um factor e usando o teste de Tukey como teste de comparação múltipla de médias. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As unidades utilizadas foram µmol/L.

Os valores da Vit E nas diferentes amostras de plasmas foram também apresentados em termos dos quocientes mMolar *Vit E/Triglicerídeos* e *Vit E/(Triglicerídeos+Col-LDL)*. De facto, nas amostras de plasma hiperlipidémicas, quer hipertrigliceridémicas quer hipercolesterolémicas, os aumentos das

lipoproteínas, em particular VLDL e LDL, poderão implicar um aumento de vitamina E, já que esta é nelas transportada. Assim, fez-se uma correcção através do cálculo dos quocientes entre as concentrações mMolar de Vit E e as concentrações mMolar dos triglicerídeos ou o somatório das concentrações mMolar de triglicerídeos e de Col-LDL. Nestes cálculos assumiu-se uma massa molecular de 882 para os triglicerídeos plasmáticos e de 386.6 para o colesterol plasmático.

1.2 - Determinação do *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*

O plasma possui uma bateria de compostos com actividade antioxidante que lhe conferem capacidade para captar radicais livres e inibir a acção de outros oxidantes. A avaliação da capacidade antioxidante total do plasma fez-se com recurso à determinação do parâmetro TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*) através de uma metodologia fluorescente, baseada no uso da sonda fluorescente R- Ficoeritrina. Neste ensaio, a sonda foi adicionada ao plasma e sujeita a uma reacção de peroxidação controlada, iniciada pela adição do 2,2'-Azobis (2-Amidinopropano) (AAPH), um azocomposto que a 37°C gera radicais peroxilo a uma velocidade constante, de acordo com a metodologia já descrita¹⁶⁰¹. Os radicais libertados provocam a oxidação da R-Ficoeritrina que perde fluorescência. O decréscimo da intensidade de fluorescência desta sonda foi monitorizado durante 1 hora, num espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50B, com um suporte de células termostalizadas a 37 °C. O λ de emissão foi de 575 nm, mantendo o λ de excitação a 540 nm e a largura de fendas de 5 nm. A capacidade antioxidante das diferentes amostras de plasma foi avaliada através da sua capacidade de protecção contra a oxidação de uma dada quantidade de sonda fluorescente, com base no período inicial de inibição do decréscimo de fluorescência. A extensão deste período de inibição relaciona-se directamente com a capacidade antioxidante total do plasma.

Os resultados foram padronizados usando o Trolox, um antioxidante de referência, análogo hidrossolúvel do alfa-tocoferol, que foi adicionado em cada ensaio (2 μ M), aos 60 minutos de registo da intensidade de fluorescência. Assim, para a quantificação do TRAP relativo a cada amostra de plasma, mediu-se o

intervalo de tempo de protecção, em que não ocorreu a oxidação da sonda fluorescente, conferida por um dado volume de plasma (T_{Plasma}) e o período de tempo de protecção conferida por uma concentração conhecida de Trolox (T_{Trolox}). Tendo em conta estes dois períodos de tempo e a concentração do Trolox usada (C), o valor do TRAP de uma amostra de plasma foi obtido, tal como descrito por Ghiselli e colaboradores (Ref. XXXV), pela seguinte proporção:

$$C_{\text{Trolox}} : T_{\text{Trolox}} = \text{TRAP} : T_{\text{Plasma}}$$

Considerando que o Trolox capta 2 radicais peroxilo por molécula (i.e. o factor estequiométrico do Trolox é igual a 2), o valor TRAP resultante foi então multiplicado por 2,0 e pelo factor de diluição do plasma (250). Os valores foram assim expressos em micromoles de radicais peroxilo captados por litro de plasma ($\mu\text{mol/L}$). Os valores apresentados correspondem à média de duas determinações independentes.

1.3 - Determinação das LDL oxidadas

As LDL plasmáticas oxidadas (OxLDL) parecem reflectir o teor de LDL oxidadas na lesão aterosclerótica. A determinação da sua concentração plasmática realizou-se através de um Kit comercializado pela *Mercodia* (Sweden), designado "*Mercodia Oxidized LDL Competitive ELISA*". Trata-se de um ensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), competitivo, baseado no uso de um anticorpo monoclonal anti-LDL oxidadas (Apo B100 oxidada). A reacção de visualização, colorimétrica, foi lida espectrofotometricamente, a 450 nm, num leitor de placas (Well Plate Reader). Os valores apresentados, em UI/L, correspondem aos valores médios de duas determinações independentes, feitas em duplicado. De referir que os coeficientes de variação, quer dentro do mesmo ensaio quer entre ensaios diferentes, foram bastante baixos, de acordo com os valores apontados pela *Mercodia*.

1 - Avaliação da Inflamação

1.1 - Determinação das interleucinas e quimiocinas

Recorrendo a uma técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) determinaram-se a IL-6, a IL-8, a IL-18, o INF- γ e o VEGF.

1.2 - Determinação dos marcadores de membrana

Os anticorpos monoclonais usados foram:

CD8 FITC, CD19 FITC, CD3 PE, CD56 PE e CD4 PECy5_Lymphogram
“Cytognos”

CCR5 PE - RD Systems

CD8 PE, CD3 Cy5 , CD4Cy5 – Dako

CD95 FITC, CD26 PE, CD62L, HLA DR FITC - Immunotech

CD4 FITC, CD25 FITC, CD69 PE - CLB

CD95 FITC, CD26 PE –

CD95L PE – Caltag

-A aquisição das amostras foi efectuada no citómetro de fluxo (“FacsCalibur”-*Becton Dickinson*) a três fluorescências:

FL1 – FITC (fluoresceína)

FL2 – PE (ficoeritrina)

FL3 – PE Cy5 (ficoeritrina-cianina 5)

-Os dados adquiridos foram guardados e analisados posteriormente usando o programa de análise “*Paint-a-gate*”, que permite identificar as várias populações celulares.

15 - Resultados

15.1 - Caracterização das populações estudadas

No quadro 1 apresentam-se as características das populações estudadas.

	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%		
Idade	D	38	55,76	8,001	53,13	58,39
	C	12	51,33	12,213	43,57	59,09
Peso	D	38	77,700	16,1072	72,406	82,994
	C	12	74,917	7,3665	70,236	79,597
Altura	D	38	1,6437	0,08387	1,6161	1,6713
	C	12	1,6667	0,07981	1,6160	1,7174
IMC	D	38	28,55	4,209	27,17	29,94
	C	12	26,75	3,769	24,36	29,14
P. Anca	D	38	101,25	7,368	98,83	103,67
	C	9	102,22	5,357	98,10	106,34
P. Cint	D	38	97,29	11,793	93,41	101,17
	C	9	95,33	8,411	88,87	101,80
F. Car	D	38	70,82	9,481	67,70	73,93
	C	11	72,82	3,371	70,55	75,08

Quadro 1
(Caracterização das Populações)

A população dislipidémica, identificada como D, é constituída por 38 indivíduos dos dois sexos, 22 (57,89%) do sexo masculino e 16 (42,1%) do sexo feminino, com uma idade média de 55,76 A. O grupo controlo, designado por C, é formado por 12 indivíduos com uma idade média de 51,33 A e é constituído por igual número de homens e mulheres.

Neste quadro podem ver-se também os valores médios do peso e da altura, do Índice de Massa Corporal (IMC), do perímetro da anca e da cintura e a frequência cardíaca das duas populações.

No quadro 2 podem ver-se os valores mínimos e máximos das variáveis acima referidas.

Idade	D	40	69
	C	32	70
Peso	D	52,0	117,0
	C	65,0	90,0
Altura	D	1,50	1,80
	C	1,55	1,78
IMC	D	22	38
	C	21	33
P. Anca	D	89	116
	C	96	110
P. Cint	D	76	125
	C	82	110
F. Car	D	51	92
	C	70	80

Quadro 2
(Caracterização das Populações)

Os parâmetros avaliados não apresentam quaisquer diferenças significativas entre os dois grupos (“p” variando entre 0,150 e 0,712) pelo que as duas populações são perfeitamente comparáveis.

16 - Comparação entre as populações estudadas

16.1 - Determinações lipídicas

Relativamente aos valores da ficha lipídica as duas populações apresentam, como seria de esperar, diferenças significativas na concentração do colesterol total (CT) e do colesterol LDL (CLDL), e também dos triglicerídeos (TG), embora nestes últimos sem atingir significado estatístico. Relativamente aos valores do colesterol HDL (CHDL), foram sobreponíveis nas duas populações.

A relação CT / CHDL, de grande significado prognóstico e idealmente inferior a cinco, mostrou-se significativamente diferente nas duas populações, com os dislipidémicos apresentando valores que os colocam num risco cardiovascular superior aos controlos.

Os quadros 3 e 4 descrevem em pormenor as fichas lipídicas das duas populações (mg/dl)

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		p
CT D	38	307,74	60,142	9,756	287,97	327,50	0,000
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CLDL D	38	172,18	44,105	7,155	157,69	186,68	0,000
C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	
CHDL D	38	49,79	12,739	2,067	45,60	53,98	0,720
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
CT/CHDL D	39	6,5497	2,34644	0,38064	5,7784	7,3209	0,001
C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	
TG D	38	285,47	295,102	47,872	188,48	382,47	0,104
C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	

Quadro 3
(Variáveis Lipídicas)

	Mínimo	Máximo
CT D	166	432
C	144	226
CLDL D	76	247
C	65	146
CHDL D	21	80
C	35	64
CT/CHDL D	3,46	17,95
C	2,63	5,44

TG	D	68	1335
	C	69	234

Quadro 4
(Variáveis Lipídicas)

Relativamente às concentrações séricas das apoproteínas, A1, B100 e Lp(a) (Quadro 5), justificam-se os seguintes comentários: Os valores da apoA1 são sobreponíveis nas duas populações, ligeira e não significativamente superiores no grupo dos dislipidémicos ($p=0,561$); este dado está de acordo com os valores do CHDL, também discretamente superiores neste grupo D. A apoB100 ($p=0,000$), tal como o CLDL, está significativamente aumentada no grupo D, o mesmo acontecendo com a Lp(a) ($p=0,050$). Estas diferenças estão obviamente na dependência dos critérios de selecção dos dois grupos de participantes.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		p
ApoA1 D	38	163,42	26,817	4,350	154,61	172,24	,561
C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoB100 D	38	164,82	33,254	5,395	153,89	175,75	,000
C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
Lp(a) D	37	41,919	47,7606	7,8518	25,995	57,943	,050
C	12	13,577	14,0976	4,0696	4,619	22,534	

Quadro 5 (Apoproteínas)

16.2 - Determinações séricas da Glicose e do Ácido Úrico

No Quadro 6 estão descritos os valores séricos da glicose (mg/dl) e do ácido úrico (mg/dl). Este último parâmetro, constituindo uma das defesas antioxidantes do nosso organismo, não apresentou qualquer diferença significativa entre as duas populações - discretamente mais elevado no grupo dos dislipidémicos (5,4 versus 5,017 mg/dl; $p=0,542$). Por sua vez, a glicose encontrava-se significativamente mais elevada nos indivíduos D (101,95 versus 89,75 mg/dl; $p=0,032$).

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança		p
Glicose D	38	101,95	18,543	3,008	95,85	108,04	0,032
C	12	89,75	7,841	2,263	84,77	94,73	
Á. Úrico D	38	5,400	2,0090	0,3259	4,740	6,060	0,542
C	12	5,017	1,3979	0,4036	4,128	5,905	

Quadro 6
(Glicose e ácido úrico)

16.3 - Resumo e comentários

Como dissemos, as diferenças verificadas entre os grupos D e C relativamente às fracções lipídicas, reflectiram os critérios de selecção, pelo que não se justificam quaisquer comentários.

No que se refere aos maiores níveis séricos da glucose, no grupo D, gostaríamos de tecer algumas considerações. Embora do ponto de vista antropométrico as diferenças entre as populações não tenham atingido significado estatístico, existe uma tendência para um maior peso (77,7 versus 74,917 Kg; $p=0,567$) e um maior IMC (28,55 versus 26,75; $p=0,192$) no grupo D. No mesmo grupo e relativamente à ficha lipídica verificaram-se, como vimos já, valores significativamente superiores do colesterol total, da relação CT/CHDL e dos triglicéridos (estes sem atingirem significado estatístico). Atendendo à frequente associação da glicemia elevada, a um peso e a um IMC mais elevados, a uma hipertrigliceridemia e a uma maior relação CT/CHDL, não foi inesperado o maior nível de glucose nos indivíduos do grupo D.

16.4 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante

Vamos agora apresentar os resultados das determinações de alguns parâmetros relacionados com os fenómenos oxidativos. Procurámos avaliar eventuais diferenças entre os participantes dislipidémicos e os controlos, no que

diz respeito à peroxidação lipídica, e a possível acção de determinados fármacos, como as estatinas, os fibratos e a associação das vitaminas E e C nos fenómenos oxidativos / antioxidativos.

16.4.1 - Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina

Começámos por analisar os valores da transferrina (Transf) e da ceruloplasmina (Cerul). Como dissemos no capítulo da peroxidação, os metais de transição, nomeadamente o Fe e o Cu, são extremamente importantes na formação dos radicais livres de oxigénio, através da reacção de Fenton, em que as suas formas reduzidas reagem com o peróxido de hidrogénio, dando origem ao radical OH \cdot . A Transf e a Cerul, como proteínas fixadoras e transportadoras do Fe e do Cu, impedem-nos de reagir com outras moléculas, podendo comportar-se como defesas antioxidantes e conhecendo-se a associação entre a oxidação lipídica e as dislipidemias, esperávamos encontrar diferenças significativas entre as nossas populações.

O quadro 7 mostra os resultados basais destas duas proteínas (g/L).

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
Transf D	38	2,8829	0,42895	0,06959	2,7419	3,0239	
C	6	3,3783	1,51070	0,61674	1,7930	4,9637	0,094
Cerul D	38	0,3497	0,0723	0,01174	0,3260	0,3735	
C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	0,000

Quadro 7
(Transferrina e Ceruloplasmina)

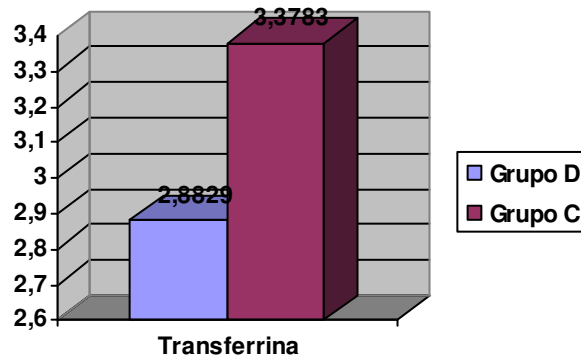


Gráfico 1

Como se vê no quadro 7 e no gráfico 1, os valores séricos da transferrina foram mais elevados nos indivíduos C do que nos D, embora sem significado estatístico ($p=0,094$).

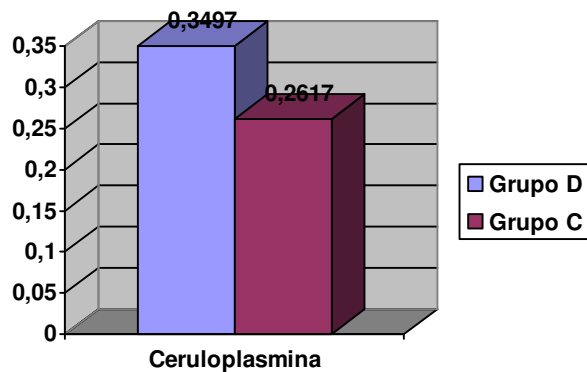


Gráfico 2

A ceruloplasmina (Quadro 7 e Gráfico 2) apresentou valores significativamente aumentados nos dislipidémicos ($p=0,000$).

16.4.2 - Vitamina E, "Total Radical-trapping Antioxidant Parameter" e LDL oxidadas no Plasma

Como se pode ver no quadro 8 e no gráfico 3 os teores médios da Vit E no plasma estavam significativamente aumentados na nossa população dislipidémica (56,841 versus 28,479 $\mu\text{mol/L}$, $p=0,000$).

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
Vit E 1	D	37	56,841	24,4107	4,0131	48,702	64,979	0,000
	C	12	28,479	3,3984	0,9810	26,320	30,638	
VitETG1	D	37	24,918	10,8540	1,7844	21,299	28,536	0,101
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitETGLDL1	D	36	7,317	1,4318	0,2386	6,832	7,801	0,106
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
OxLDL 1	D	37	123,2070	23,18650	3,81184	115,4763	130,9378	0,000
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
TRAP 1	D	37	1275,932	184,1305	30,2709	1214,540	1337,324	0,276
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	

Quadro 8
(Antioxidantes e Oxidação)

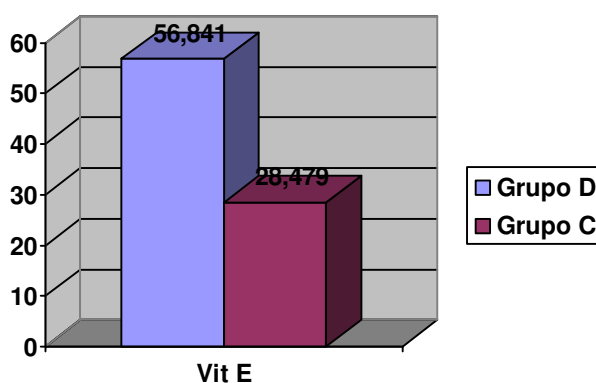


Gráfico 3

Como esta vitamina é fortemente lipossolúvel, encontrando-se associada às lipoproteínas, nomeadamente às VLDL e às LDL, fizemos a correcção dos valores da Vit E tendo em conta as concentrações das referidas fracções lipoproteicas (com base nas concentrações, respectivamente dos triglicerídeos e do CLDL) e apresentamos na mesma tabela os valores da referida vitamina em termos de quociente mMolar Vit E/TG e Vit E/TG+CLDL. Os gráficos 4 e 5 mostram os valores médios destes quocientes.

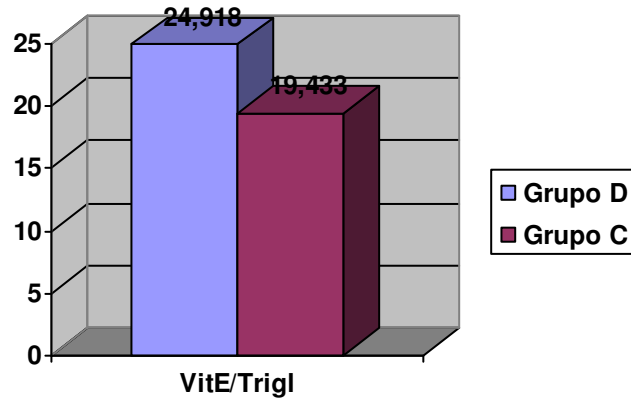


Gráfico 4

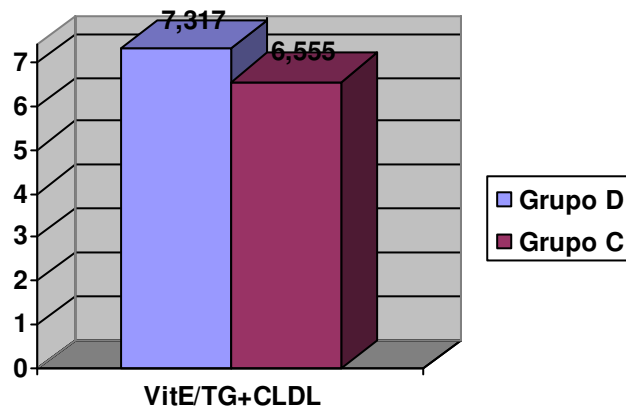


Gráfico 5

Embora os seus valores tenham continuado superiores na população D, a sua diferença perdeu significado estatístico com esta correcção (respectivamente, $p=0,101$ e $0,106$), pelo que julgamos poder concluir que o aumento dos níveis da Vit E nos dislipidémicos, se deveu essencialmente à sua associação às lipoproteínas e às maiores concentrações destas nos indivíduos do grupo D.

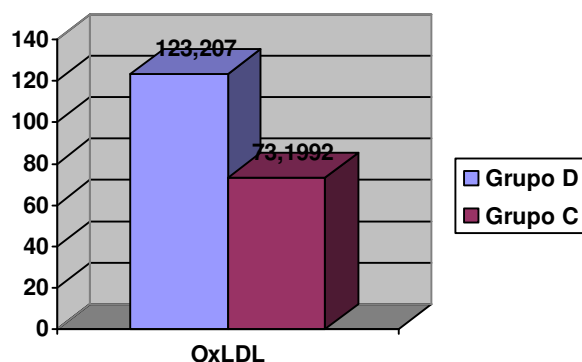


Gráfico 6

Relativamente às concentrações plasmáticas das OxLDL, gráfico 6, estiveram também significativamente aumentadas nos indivíduos do grupo D ($p=0,000$).

16.4.3 - Resumo e comentários

Em resumo, relembramos que o nosso grupo C apresentou valores da transferrina não significativamente superiores aos do grupo D. Uma explicação para esta diferença não significativa da transferrina, entre duas populações em que, previsivelmente, os fenómenos oxidativos ocorrerão com diferente magnitude, poderá ser o reduzido número de indivíduos do grupo C (6) em que foi possível determinar a transferrinemia. Um outro facto a ter em conta é que a transferrina tem um duplo significado na fisiopatologia da aterosclerose. Por um lado tem um papel controlador do Fe, impedindo que ele forme OH^{\cdot} , sendo de esperar que apresente valores mais elevados, por menor consumo, nos indivíduos sem dislipidemias ou outros factores de risco associados à peroxidação. Por outro, não podemos esquecer que a transferrina tem igualmente funções de “proteína de fase aguda”, podendo por isso estar aumentada nos indivíduos em que, devido à maior expressão de factores de risco, terão provavelmente lesões vasculares mais activas, com maior ambiente inflamatório. A própria relação entre as concentrações séricas do ferro e a doença aterosclerótica continua fruto de alguma controvérsia. Os estudos que procuraram identificar uma possível associação entre o Fe e a doença vascular analisaram, uns, os valores da ferritina, outros a saturação da transferrina, outros

ainda a concentração do ferro sérico, o que terá justificado a falta de concordância nalguns dos seus resultados.

Alguns estudos epidemiológicos admitiram que as altas reservas de ferro (ferritina elevada) poderiam ser consideradas factores de risco para a doença vascular e noutros, as altas saturações da transferrina, estiveram negativa e significativamente associadas às mortalidades total e cardiovascular^{1602 1603}. Dois estudos procuraram avaliar se, em indivíduos portadores da mutação do gene da hemocromatose, em que se verifica uma elevada saturação da transferrina e previsivelmente um excesso de ferro livre, haveria um excesso de morbi e/ou mortalidade por doença cardiovascular. Em nenhum dos estudos a hemocromatose hereditária, C282Y/C282Y e C282Y/H63D, esteve associada a uma maior prevalência da doença cardíaca isquémica^{1604 1605}. Outros trabalhos identificaram a presença do ferro nas lesões de aterosclerose¹⁶⁰⁶. Um estudo, realizado em coelhos NZW, alimentados com uma dieta enriquecida em colesterol, alguns deles sujeitos a flebotomias e outros a injeções de ferro dextrano, demonstrou que nestes últimos, houve uma redução de 36% na formação de lesões de aterosclerose aórtica ($p < 0,05$). Nos animais suplementados com ferro verificou-se igualmente um aumento da saturação da transferrina e uma redução do colesterol total ($p < 0,05$), não se verificando em nenhum dos grupos qualquer alteração na susceptibilidade das LDL à oxidação *in vitro*, nem nos níveis plasmáticos e tecidulares de antioxidantes e/ou de produtos da peroxidação lipídica¹⁶⁰⁷. A administração de ferro a ratos hipercolesterolémicos, reduziu significativamente a concentração plasmática do colesterol total, comparativamente aos ratos não suplementados ($3,17 \pm 0,31$ versus $5,31 \pm 0,83$ mmol/L; $p < 0,01$), para além de induzir um aumento do CHDL e uma redução do CLDL (ambos com $p < 0,01$)¹⁶⁰⁸.

Resultados diferentes, foram obtidos num estudo em que se encontrou uma relação positiva entre os níveis séricos da ferritina e a prevalência de placas carotídeas, com significado estatístico apenas nos homens - OR 1,33 (IC 95% 1,08 a 1,44). Verificou-se também uma relação positiva entre a ferritina e o CLDL ($p = 0,039$), estando a maior prevalência de placas, associada à simultaneidade dos níveis elevados da ferritina e do CLDL¹⁶⁰⁹. Um curioso trabalho demonstrou que, a adição de ferro não ligado à transferrina a um meio de cultura celular, aumentou a adesão dos monócitos às células endoteliais da veia umbilical

humana ($p < 0,05$), admitindo os autores que este facto esteve relacionado com a produção de radicais livres¹⁶¹⁰.

De todas estas considerações é evidente que a relação entre o metabolismo do ferro, os factores de risco e/ou a doença aterosclerótica, necessita de mais esclarecimentos. Julgamos que os diferentes parâmetros avaliados nos diversos estudos assim como a presença ou não de outros factores, como as defesas antioxidantes e os factores de risco vascular (tabaco, dislipidemia, HTA...), a natureza dos próprios estudos, feitos no animal ou no homem, incluindo ou não a mulher pós-menopausica, poderão explicar algumas das contradições encontradas.

Relativamente ao nosso trabalho e admitindo que o ferro está positivamente associado à formação de radicais livres, julgamos que a maior concentração da transferrina, associando-se muito provavelmente a menores níveis de ferro livre, conferirá uma maior protecção antioxidativa aos nossos indivíduos C.

No nosso estudo a ceruloplasmina esteve significativamente mais elevada no grupo D. Trata-se de uma proteína fixadora do Cu e por isso capaz de inibir a reacção de Fenton, o que lhe conferirá um papel protector contra a aterosclerose. No entanto, em diversos estudos, tem estado associada a um maior risco cardiovascular, traduzindo provavelmente um estado inflamatório subjacente. Para além da sua função fixadora do Cu, impedindo-o de induzir a produção de radicais livres, ela é também uma proteína de fase aguda, encontrando-se aumentada nas reacções inflamatórias. Os seus valores estiveram elevados em populações de diabéticos tipo 2, em indivíduos com insulino resistência, em insuficientes renais crónicos sob-terapêutica dialítica e em fumadores, populações com alta prevalência de dislipidemias e doença vascular^{1611 1612 1613 1614}. Em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol, verificou-se um aumento dos níveis séricos dos peróxidos lipídicos, do cobre e da ceruloplasmina ($p < 0,01$), assim como uma correlação significativamente positiva entre a ceruloplasmina e os peróxidos ($p < 0,05$) e uma actividade antioxidativa duas vezes superior à do grupo controlo¹⁶¹⁵. Resultados um pouco diferentes foram obtidos em coelhos NZW, alimentados com uma dieta hipercolesterolemiantes, sendo alguns deles suplementados com acetato de cobre. Os animais suplementados com o Cu apresentaram concentrações

plasmáticas deste elemento não significativamente superiores e tecidulares significativamente mais elevadas ($p < 0,05$), para além de concentrações da ceruloplasmina semelhantes às dos animais não suplementados. As lesões da íntima a nível da aorta foram significativamente inferiores nos animais suplementados ($p < 0,05$), sugerindo um papel protector do cobre na aterogénese¹⁶¹⁶! Em 26 doentes coronários turcos, com doença angiograficamente comprovada, não diabéticos, quando comparados com o grupo controlo, ficou demonstrada uma menor concentração do CHDL, da Vit C e de uma menor actividade da PON1, assim como uma maior concentração da ceruloplasmina e dos TBARS (todos com $p < 0,05$). Num modelo de regressão múltipla, os factores de risco independentes associados com a doença coronária incluíram uma ceruloplasmina elevada¹⁶¹⁷.

Julgamos poder afirmar que a maior concentração sérica da ceruloplasmina nos nossos dislipidémicos, estará associada a um exagerado ambiente inflamatório subjacente à doença vascular mais avançada, a um possível aumento das defesas antioxidantes, visando contrariar uma provável maior intensidade oxidativa do grupo D, ou, mais provavelmente, a um somatório de todos estes factores.

A Vit E, significativamente mais elevada no grupo dos dislipidémicos, parecendo conferir a este grupo uma maior protecção antioxidativa, quando relacionada com as lipoproteínas, embora continuando mais elevada no grupo D, a sua diferença tornou-se mínima, relativamente ao grupo C. Este dado levou-nos a concluir que os maiores níveis da Vit E, nos dislipidémicos, foram devidos à sua associação com as lipoproteínas.

Apoiando esta hipótese, verificou-se uma concentração das OxLDL significativamente mais elevada no grupo D, o que contraria qualquer ideia de uma maior defesa antioxidativa, dada pelos maiores níveis da Vit E neste mesmo grupo.

Pensamos que este achado se ficou a dever às maiores concentrações do CLDL nestes participantes dislipidémicos e ao facto das defesas antioxidantes plasmáticas, traduzidas pelo TRAP, não apresentarem qualquer diferença significativa entre os dois grupos. É de admitir que, sem um aumento compensador dos mecanismos antioxidantes, uma maior concentração basal de CLDL se tenha traduzido numa maior concentração destas partículas oxidadas.

De referir que, no grupo controlo, a concentração média da Vit E (28,479 $\mu\text{Mol/L}$) mostrou-se sobreponível à encontrada noutros estudos. Numa população semelhante à nossa, constituída por 79 indivíduos saudáveis, 60 do sexo masculino, não fumadores, sem qualquer terapêutica vitamínica nem hipolipemiante, os valores da Vit E foram na ordem dos $23,0 \pm 4,7 \mu\text{Mol/L}$ ¹⁶¹⁸. Num estudo prospectivo já referido, o ASAP, em que se avaliou a progressão da aterosclerose carotídea em indivíduos hipercolesterolémicos dos dois sexos, os valores basais da Vit E foram de $31,7 \mu\text{Mol/L}$ ⁵³⁸.

Tivemos alguma dificuldade, por escassez de estudos, em comparar as concentrações das OxLDL da nossa população C com os níveis considerados normais, referentes a indivíduos sem factores de risco nem doença cardio-cerebro-vascular. Em 94 indivíduos sujeitos a cateterismo cardíaco para esclarecimento de toracalgia, as OxLDL apresentaram concentrações plasmáticas médias de $13,8 \pm 0,9 \text{ UI/ml}$ (2,4 a 52,5) - ELISA, Kit Kyowa Medex Co. ToKyo¹⁶¹⁹. Num outro estudo realizado em 687 doentes coronários o teor plasmático médio das OxLDL foi de $67,7 \text{ UI/L}$ ¹⁶²⁰. Num grupo de indivíduos sem doença vascular conhecida, a concentração média das OxLDL, determinada através de um método ELISA, foi de $112,4 \pm 3,3 \text{ UI/dl}$ ¹⁶²¹. A Mercodia, o laboratório que, como dissemos, foi o responsável pelo “Kit” utilizado na determinação das OxLDL no nosso estudo, aponta para valores normais médios de 61 (26 a 117) UI/L, tendo esta determinação sido realizada numa população sueca (Mercodia Oxidized LDL ELISA – Product Information). Verifica-se assim uma grande variabilidade nas concentrações plasmáticas obtidas pelos diferentes estudos, tanto em doentes como em indivíduos saudáveis. Comparativamente aos valores indicados pelo laboratório responsável pela técnica utilizada no nosso estudo, o grupo C apresentou uma concentração média superior das OxLDL - 73,19 (61,10 a 85,29) UI/L, embora numa gama mais estreita.

A maior concentração das OxLDL nos dislipidémicos, confirma a nossa convicção de que os elevados valores absolutos da Vit E nestes indivíduos, estiveram essencialmente dependentes dos maiores níveis lipídicos, não tendo sido acompanhados de uma maior protecção antioxidativa. A apoiar esta nossa convicção, o valor médio do *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter* (TRAP), que nos dá uma ideia relativa da capacidade antioxidante total do

plasma, pela sua capacidade de captação dos radicais livres, mostrou-se discreta e não significativamente mais elevado no grupo C ($p=0,276$). Este dado permite-nos igualmente concluir que a Vit E não será a única, nem eventualmente a mais importante, defesa antioxidativa do nosso plasma. Outros constituintes terão compensado os níveis mais baixos de Vit E dos nossos controlos, mesmo depois de corrigidos para os lípidos, permitindo-lhes apresentar uma tendência para uma maior capacidade antioxidativa.

A determinação do TRAP que, embora sem significado, esteve discretamente mais elevado no grupo C, confirmou a ideia de que os maiores níveis absolutos do α -tocoferol não se associam forçosamente a maiores defesas antioxidantes e que outros constituintes do plasma participam na neutralização dos radicais livres.

Julgamos que a relação entre a Vit E e os lípidos ou a determinação desta vitamina associada às lipoproteínas, traduzirá de uma forma mais fiel os seus níveis protectores, do que a simples determinação da sua concentração plasmática.

16.5 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios

Como dissemos no início do trabalho, um dos principais objectivos foi caracterizar o perfil inflamatório dos participantes do nosso estudo, dislipidémicos e controlos, socorrendo-nos para o efeito da determinação de moléculas como a proteína C reactiva, pelo método de alta sensibilidade (hsPCR), a alfa 1-antitripsina (AAT), diversas citocinas e os marcadores de membrana celular.

Vamos apresentar os resultados dessa análise, realizada antes de qualquer terapêutica hipolipemiante ou antioxidativa - avaliação basal.

16.5.1 - hsPCR e AAT

No quadro 9 estão descritos os valores da hsPCR (mg/dl) e da AAT (g/l).

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P	
hsPCR	D	38	0,3524	0,31156	0,05054	0,2500	0,4548	0,763
	C	12	0,3208	0,32191	0,09293	0,1163	0,5254	
AAT	D	38	1,269	0,2800	0,0454	1,177	1,362	0,980
	C	12	1,272	0,1970	0,0569	1,147	1,397	

Quadro 9
(hsPCR e AAT)

Nesta nossa avaliação basal não houve qualquer diferença significativa nos valores da PCR, entre os indivíduos das duas populações, observando-se um valor médio elevado desta proteína, nos grupos D e C.

O pequeno tamanho da amostra e a existência de alguns indivíduos com valores de hsPCR superiores a 10 mg/L poderá ter contribuído para um aumento espúrio desta proteína nos dois grupos. Assim, realizámos uma nova análise das nossas populações, excluindo os indivíduos que, em qualquer das avaliações, tivessem apresentado valores de hsPCR superiores a 10 mg/L. São estes dados que o quadro 10 e o gráfico 7 demonstram.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P	
PCR	D	32	0,2806	0,19427	0,3434	0,2106	0,3507	0,597
	C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	

Quadro 10
(hsPCR)

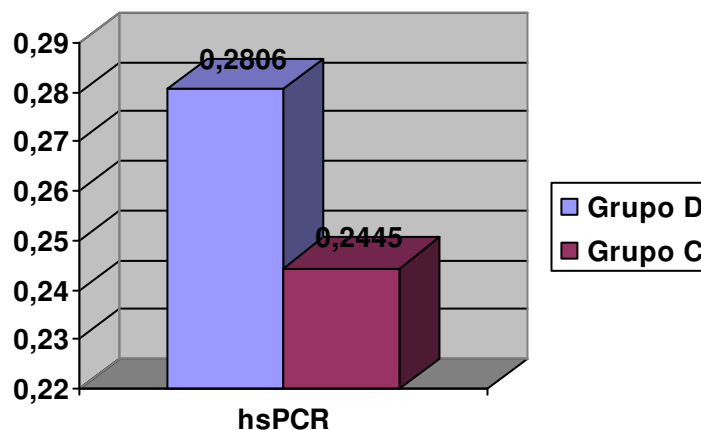


Gráfico 7

Verificou-se uma ligeira diminuição dos valores da hsPCR nos dois grupos, mantendo-se não significativamente mais elevados nos dislipidémicos. Os valores de hsPCR apresentados, quer pelos indivíduos dislipidémicos (2,806 mg/L), quer pelos controlos (2,445 mg/L), colocaram-nos numa categoria de médio risco de doença vascular.

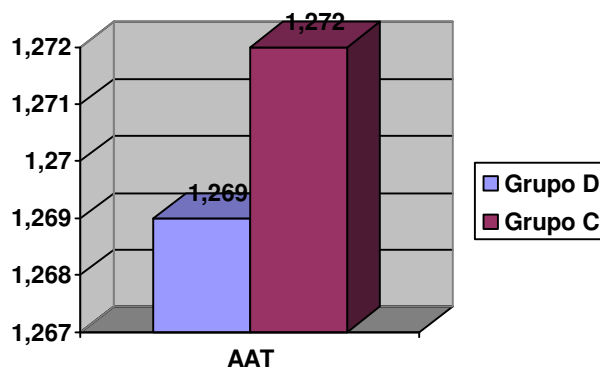


Gráfico 8

A AAT é uma proteína de fase aguda, sendo o inibidor de protease mais abundante no plasma e os valores plasmáticos médios dos nossos participantes estão indicados no gráfico 8. Da sua consulta verifica-se que os dois grupos apresentaram valores semelhantes desta proteína ($p=0,980$).

16.5.2 – Interleucinas

No quadro 11 apresentam-se os valores, em pg/ml, das concentrações das interleucinas avaliadas.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
IL6	D	37	2,17332	1,500875	0,246742	1,67291 2,67374	0,029
	C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589 1,69777	
IL8	D	37	41,99143	116,673731	19,181043	3,09047 80,89239	0,109
	C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816 171,24634	
IL18	D	37	352,56800	483,038920	79,411109	191,51481 513,62119	0,005
	C	12	854,42767	577,429103	166,68942	487,54672 1221,30862	
INFGamaD	D	37	27,86722	8,775837	1,442739	24,94121 30,79323	0,500
	C	12	25,79667	10,359777	2,990610	19,21438 32,37895	
VEGF	D	37	208,78089	180,131351	29,613412	148,72211 268,83967	0,552
	C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384 253,15683	

Quadro 11
(Interleucinas)

Como dissemos em capítulo anterior, a IL6 é uma citocina produzida por diversas células, linfócitos B e T, macrófagos, células endoteliais e outras, tem actividade reguladora das células B e T e induz a síntese hepática de diversas proteínas de fase aguda, entre elas, a PCR. Contrariamente a esta última, a semi-vida plasmática da IL6 é extremamente curta.

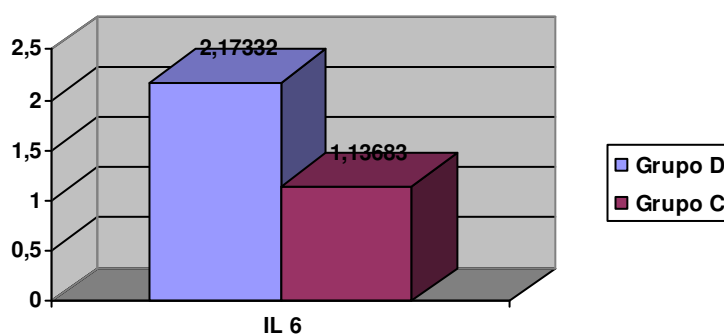


Gráfico 9

Os nossos resultados (gráfico 9) mostraram uma diferença significativa nas concentrações plasmáticas da IL6, entre os indivíduos do grupo D e C, com os primeiros apresentando valores mais elevados (2,17332 versus 1,13683 pg/ml; $p=0,029$).

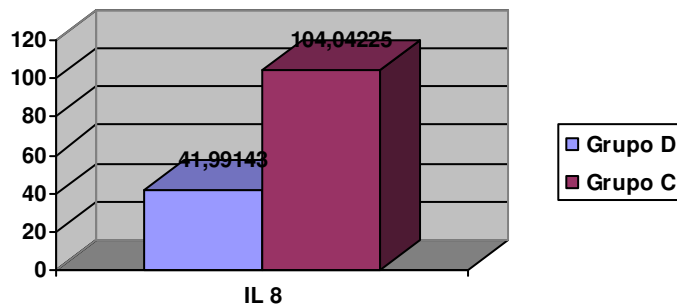


Gráfico 10

O gráfico 10 representa os valores médios da IL8.

Relativamente a esta interleucina, uma conclusão que se pode tirar da análise do quadro, são os elevados valores séricos desta citocina nos dois grupos de participantes⁹⁵². Um outro dado que se salienta é a maior concentração desta quimiocina, embora não significativa, nos controlos (104,04 versus 41,99 pg/ml; $p=0,109$).

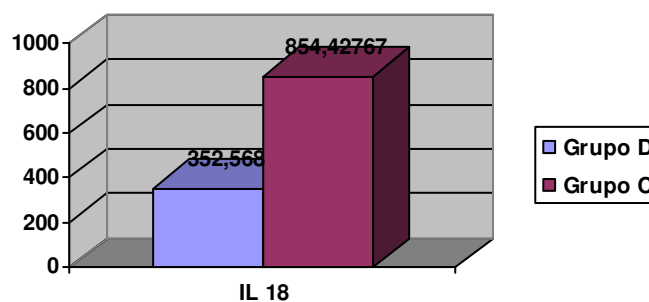


Gráfico 11

Os níveis séricos da IL18 (gráfico 11) mostraram-se significativamente mais elevados na população C do que na D (854,427 versus 352,568; $p=0,005$).

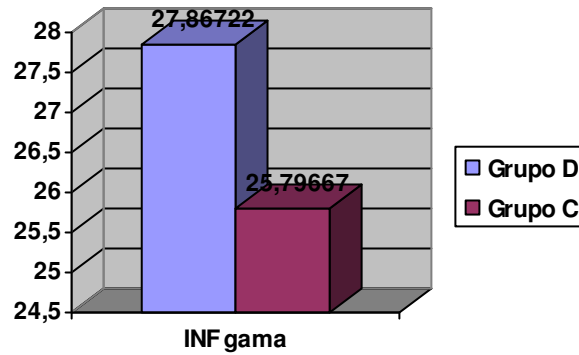


Gráfico 12

Os indivíduos do grupo D (gráfico 12) apresentaram níveis não significativamente superiores de INF-gama ($p=0,5$).

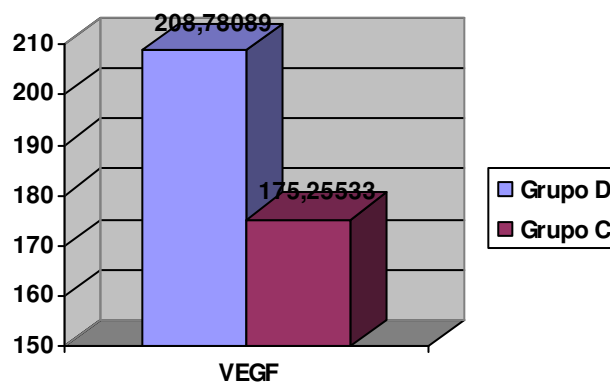


Gráfico 13

O VEGF (gráfico 13) esteve não significativamente mais elevado nos indivíduos do grupo D (208,78 versus 175,255 pg/ml; $p=0,553$).

16.5.3 – Populações Linfocitárias

O quadro 12 apresenta, em percentagem, as determinações das populações linfocitárias através da utilização de anticorpos monoclonais específicos dos diferentes *clusters de diferenciação* – CD(s).

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Interv Confiança 95%		P
CD3	D	37	73,508	7,5188	1,2361	71,001	76,015	0,240
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329	80,438	
CD4	D	37	40,300	7,6530	1,2582	37,748	42,852	0,026
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056	51,411	
CD8	D	37	23,900	6,2737	1,0314	21,808	25,992	0,783
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876	29,124	
CD19	D	37	12,62	4,177	0,687	11,23	14,01	0,945
	C	12	12,72	3,879	1,120	10,25	15,18	
CD56	D	37	13,589	6,6275	1,0896	11,379	15,799	0,196
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	
CD56CD8	D	37	6,035	3,2411	0,5328	4,955	7,116	0,244
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	
DN	D	37	3,089	2,1216	0,3488	2,382	3,797	0,275
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	
CD25	D	37	11,076	3,0142	0,4955	10,071	12,081	0,108
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	
CD26	D	37	39,41	11,317	1,861	35,64	43,18	0,050
	C	12	46,99	11,392	3,289	39,75	54,23	
CD25CD3	D	37	8,408	2,0973	0,3448	7,709	9,107	0,016
	C	12	10,200	2,3460	0,6772	8,709	11,691	
CD26CD3	D	37	36,922	11,2472	1,8490	33,172	40,672	0,038
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	
CD25CD26CD3	D	37	5,157	1,7321	0,2848	4,579	5,734	0,000
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	
CCR5	D	35	2,234	1,2943	0,2188	1,790	2,679	0,199
	C	12	2,942	2,3666	0,6832	1,438	4,445	
CCR5CD3	D	35	1,603	1,0537	0,1781	1,241	1,965	0,279
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	
CCR5CD4	D	35	1,069	0,7688	0,1299	0,804	1,333	0,867
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	
HLADR	D	37	26,489	7,7643	1,2764	23,900	29,078	0,014
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	
HLADRC4	D	37	7,722	3,8419	0,6316	6,441	9,003	0,015
	C	12	4,508	3,7833	1,0922	2,105	6,912	

HLADRC8h	D	37	4,486	1,9518	0,3209	3,836	5,137	0,001
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	
HLADRC8low	D	37	1,557	0,9648	0,1586	1,235	1,878	0,027
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	
HLADRC8	D	37	6,068	2,5047	0,4118	5,232	6,903	0,001
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	
CD95	D	37	21,076	11,2630	1,8516	17,320	24,831	0,487
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	
CD95CD95L	D	37	0,470	0,4169	0,0685	0,331	0,609	0,064
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	
CD3CD95	D	37	17,511	10,3625	1,7036	14,056	20,966	0,966
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	
CD3CD95L	D	37	1,219	1,2778	0,2101	0,793	1,645	0,400
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	
CD62L	D	37	60,046	14,3597	2,3607	55,258	64,834	0,087
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	
CD3CD62L	D	37	43,792	12,8940	2,1198	39,493	48,091	0,066
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	
CD69	D	37	11,705	7,0168	1,1536	9,366	14,045	0,024
	C	12	16,750	4,5900	1,3250	13,834	19,666	
CD69CD3	D	37	5,468	4,2780	0,7033	4,041	6,894	0,003
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	
CD69CD4	D	37	3,511	2,8682	0,4715	2,555	4,467	0,008
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	

Quadro 12

(Populações Celulares)

Os resultados obtidos merecem-nos alguns comentários:

Sabemos que as determinações das populações celulares séricas, poderão não traduzir o que acontece a nível da parede vascular e da lesão de aterosclerose. Por exemplo, as células CD4 reactivas à HSP humana, foram detectadas na placa de aterosclerose mas não no sangue periférico¹⁶²². O ideal seria termos amostras tecidulares, mas essa metodologia estava para além das possibilidades do nosso trabalho.

Se bem que na sua grande maioria não se tenham observado diferenças significativas nas populações celulares estudadas, entre os indivíduos D e C, obtivemos em algumas, resultados que justificam alguma reflexão.

O gráfico seguinte apresenta as percentagens das células CD4+.

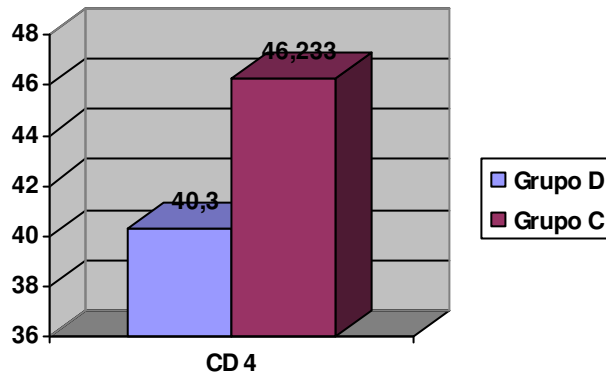


Gráfico 14

O antigénio CD4 encontra-se nas células T e comporta-se como co-receptor das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade major (MHC classe II) para activação destas células. É um marcador da diferenciação tímica. Existe também em alguns timócitos, monócitos/macrófagos e granulócitos.

As células CD4+ apresentaram-se em percentagem significativamente superior nos controlos, relativamente aos dislipidémicos (46,233 versus 40,300; $p=0,026$).

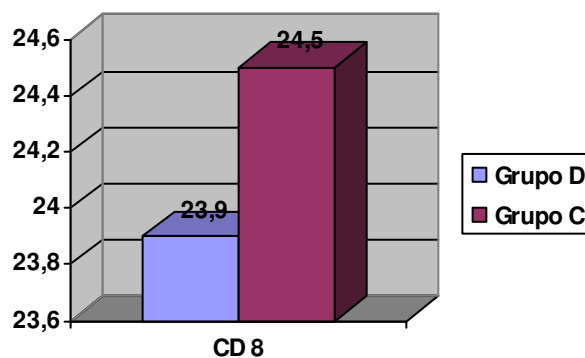


Gráfico 15

As células CD8+ (Gráfico 15) apresentaram-se em percentagens semelhantes nos dois grupos de participantes ($p=0,783$).

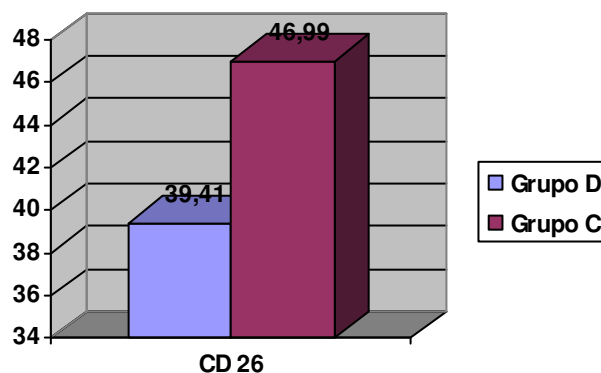


Gráfico 16

Um outro antígeno que mostrou diferentes percentagens entre os indivíduos D e C foi o CD26 (gráfico 16).

A percentagem de células CD26+ foi marginalmente superior nos nossos controlos, relativamente aos dislipidémicos (46,99 versus 39,41; $p=0,050$).

As células CD25CD3+, CD26CD3+ e CD25CD26CD3+ (Quadro 12) apresentaram também percentagens significativamente mais elevadas no grupo C (10,200 versus 8,408; $p=0,016$ / 44,908 versus 36,922; $p=0,038$ / 7,642 versus 5,157; $p=0,000$).

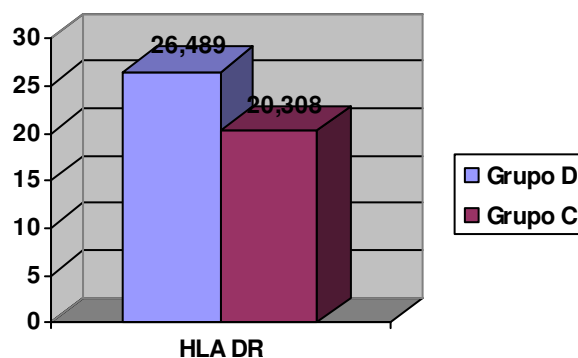


Gráfico 17

O HLA DR (gráfico 17) é um receptor de superfície pertencente à classe II do MHC. No nosso trabalho e na avaliação basal, este marcador de activação esteve significativamente aumentado nos indivíduos D (26,489 versus 20,308; $p=0,014$).

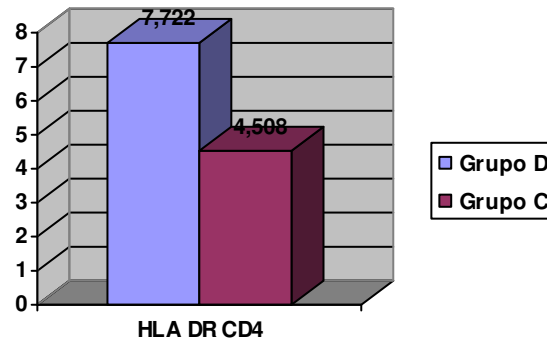


Gráfico 18

A população celular duplamente positiva para o HLA DR e o CD4, células HLADRCD4+ (gráfico 18), apresentou uma concentração significativamente superior nos indivíduos dislipidémicos (7,722 versus 4,508; $p=0,015$).

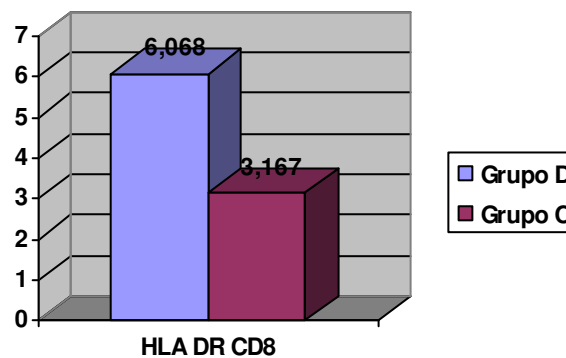


Gráfico 19

As células HLADRCD8+ (gráfico 19) estavam também significativamente aumentadas na população D (6,068 versus 3,167; $p=0,001$) sendo igualmente células apresentadoras de antígeno, mas do tipo célula dendrítica.

Outras células apresentadoras de antígeno, como as HLADRCD8h e as HLADRCD8low estiveram também percentualmente aumentadas nos indivíduos dislipidémicos (4,486 versus 2,325; $p=0,001$ / 1,557 versus 0,843; $p=0,027$).

O gráfico seguinte apresenta as percentagens médias das células CD95+.

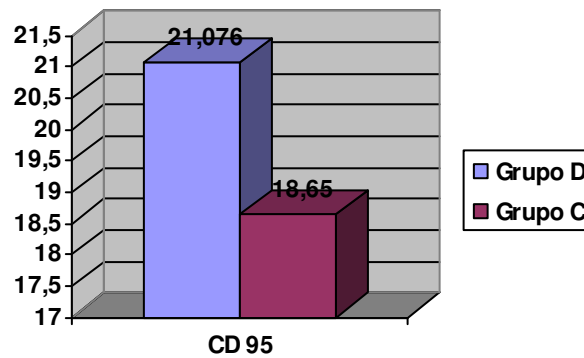


Gráfico 20

O antígeno CD95, também conhecido por antígeno Fas, pertence à superfamília dos receptores TNF e encontra-se nos linfócitos T e B activados, nos monócitos, nos fibroblastos e nos neutrófilos. A sua principal função é a indução da apoptose. Nesta avaliação basal, os níveis séricos do CD95 estiveram não significativamente mais elevados nos indivíduos dislipidémicos ($p=0,487$).

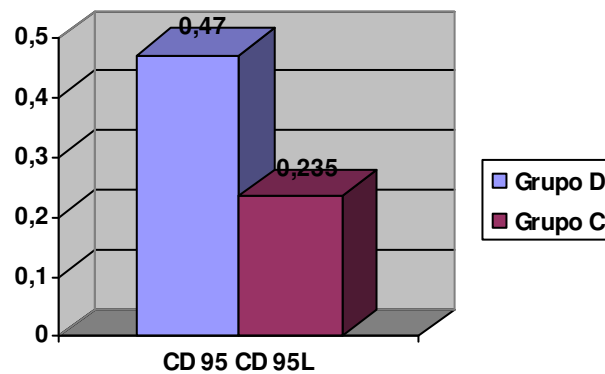


Gráfico 21

As células duplamente positivas para o CD95 e para o seu ligante, CD95CD95L+ (gráfico 21), apresentaram-se em concentrações mais elevadas

nos nossos participantes dislipidémicos, embora não atingindo significado estatístico, (0,470 versus 0,235; $p=0,064$).

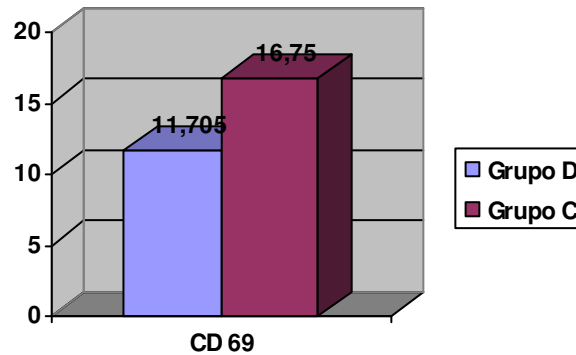


Gráfico 22

As células CD69+ (gráfico 22) estavam percentualmente mais representadas nos nossos controlos (16,750 versus 11,705; $p=0,024$).

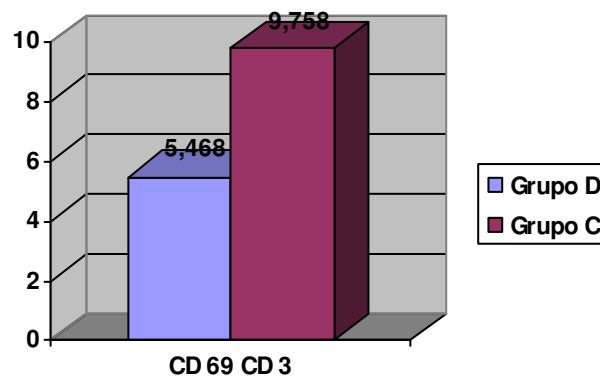


Gráfico 23

As células duplamente positivas para o CD69 e o CD3, CD69CD3+ (gráfico 23), constituem linfócitos T activados e tal como as anteriores estavam significativamente mais representadas nos indivíduos C (9,758 versus 5,468; $p=0,003$). O mesmo se verificou com as células CD69CD4+ (Quadro 12), linfócitos CD4 e monócitos activados, também significativamente aumentadas na população C (6,125 versus 3,511; $p=0,008$).

16.5.4 - Resumo e comentários

A análise destes resultados basais, obtidos em indivíduos dislipidémicos e normolipidémicos, sem qualquer terapêutica hipolipemiante nem anti-oxidativa (recorde-se que os participantes do grupo D interromperam qualquer hipolipemiante que fizessem durante pelo menos 30 dias), merecem os seguintes comentários:

A determinação das diferentes moléculas envolvidas nos mecanismos inflamatórios e oxidativos, assim como a identificação dos diversos marcadores celulares, foi realizada no sangue periférico. Este facto constitui uma limitação do nosso estudo, pois não sabemos em que medida estes resultados traduzem o ambiente inflamatório/antiinflamatório e/ou oxidativo/antioxidativo existente nos vasos e nas lesões de aterosclerose.

Por outro lado, não sabemos se o intervalo de 30 dias, em que não foi administrado qualquer fármaco hipolipemiante aos nossos dislipidémicos, terá sido suficiente para que se não fizessem sentir os seus potenciais efeitos pleiotrópicos.

Foi permitido aos indivíduos do grupo D medicados com ácido acetilsalicílico (AAS), em doses antiagregantes, que mantivessem a sua administração. Não sabemos se nestas doses, o AAS poderá ter influenciado as determinações realizadas.

A análise por doppler, feita apenas nos indivíduos D, não permitiu avaliar da existência ou não de doença vascular nos controlos. No entanto a existência de factores de risco importantes, como o colesterol total, o colesterol LDL e o índice aterogénico, assim como os valores da glicemia, significativamente superiores nos primeiros, faz supor um atingimento vascular substancialmente diferente nas duas populações.

A técnica utilizada não nos deu também qualquer informação sobre o grau de estabilidade / instabilidade das lesões.

Tendo estas limitações subjacentes, tecemos alguns comentários a estes primeiros resultados:

hsPCR - Os dois grupos de participantes apresentaram elevadas concentrações plasmáticas de hsPCR, para o que não terá sido indiferente o

facto de, quer nos dislipidémicos, quer nos normolipidémicos, se verificar um IMC > 25 Kg/m².

O pequeno tamanho da amostra e a existência de alguns indivíduos com valores de hsPCR superiores a 10 mg/L poderá ter contribuído para um aumento espúrio desta proteína nos dois grupos. Embora tenha sido nossa preocupação a exclusão de qualquer doença infecciosa e/ou inflamatória, aguda ou crónica, em todos os participantes, não podemos garantir com toda a certeza que, pelo menos nestes indivíduos com valores muito elevados da hsPCR, não tenha existido qualquer patologia sub-clínica que justificasse esta elevação. Assim e de acordo com *Smith S, Circulation, 2004;110*⁹²⁸ fizemos nova análise da nossa população, excluindo os indivíduos que, em qualquer das avaliações, tivessem apresentado valores de hsPCR superiores a 10 mg/L. Esta estratégia traduziu-se numa discreta redução dos valores séricos da hsPCR, nos dois grupos, mantendo-se no entanto em concentrações elevadas e indiciadoras de um risco cardiovascular intermédio.

Também o facto de ter sido utilizada apenas uma determinação da hsPCR e não a média de duas determinações, poderá ter contribuído para estes nossos resultados¹⁶²³.

Uma outra possível explicação para a ausência de diferença significativa nos valores da hsPCR entre os dois grupos, foi a toma regular de ácido acetilsalicílico (AAS), nas doses de 100 a 150 mg/dia, por parte de 16 indivíduos do grupo D, enquanto nenhum do grupo C esteve medicado com qualquer fármaco com propriedades antiinflamatórias. No entanto, nestas doses antiagregantes, a actividade antiinflamatória do AAS será mínima ou nula.

Embora desconheçamos valores na população portuguesa, um estudo realizado em norteamericanos saudáveis, encontrou concentrações da hsPCR significativamente inferiores aos dos participantes do nosso estudo, na ordem dos 0,64 mg/L (IC 95% de 0,08 a 3,11 mg/L)⁸⁵⁷. Se admitirmos como certa a distribuição da hsPCR aceite pela maioria dos autores, em que valores <1, ≥1 e ≤3 e >3 mg/L correspondem, respectivamente, a indivíduos com baixo, moderado e elevado risco de doença cardiovascular^{921 1624}, tanto os dislipidémicos como os controlos, encontravam-se na categoria de alto (3,52 e 3,20 mg/L) ou moderado risco (2,8 e 2,4 mg/L), respectivamente antes e depois da exclusão dos participantes com valores de hsPCR superiores a 10 mg/L.

Os elevados valores da hsPCR no grupo D, podem estar dependentes de determinadas características destes indivíduos. Todos eles apresentam alterações carotídeas no estudo doppler, nomeadamente espessamento e a presença de placas. Conhecendo-se a associação positiva entre estas alterações vasculares e os valores da hsPCR^{875 889}, a sua presença poderá ser uma das explicações para os altos valores desta proteína de fase aguda. A diabetes e a insulinoresistência associam-se também a alterações dos valores da hsPCR. Como vimos, os indivíduos do grupo D apresentaram valores da glicemia significativamente mais elevados do que os do grupo C, para além de uma maior concentração dos triglicéridos, não atingindo significado estatístico, e da relação CT/CHDL. Perante esta associação de distúrbios metabólicos e de um IMC de 28,55, julgamos poder afirmar com alguma segurança que a insulinoresistência terá estado mais frequentemente subjacente nos nossos dislipidémicos do que nos controlos, podendo este facto ter contribuído igualmente para os elevados valores da hsPCR⁹¹³.

Relativamente aos indivíduos do grupo C, em que os valores médios do colesterol total e da fracção LDL, dos triglicéridos e da glicose se encontravam dentro dos parâmetros da normalidade e apesar de um IMC superior a 25 Kg/m², o achado de uma hsPCR elevada, embora não tanto como no grupo D, foi um tanto inesperado. A ausência destes distúrbios metabólicos nos nossos controlos, faz admitir uma doença vascular sub-clínica muito menos exuberante, logo com um ambiente inflamatório menos intenso. No entanto, como não foi realizado nestes indivíduos o estudo doppler carotídeo, não sabemos se a convicção de uma menor doença vascular neste grupo, corresponderá à realidade.

Como dissemos em capítulo anterior, parece haver uma associação particularmente forte entre a doença vascular cerebral isquémica e os mecanismos inflamatórios, nomeadamente com os níveis da PCR^{905 906}. Relativamente à relação entre o colesterol e a incidência do AVC isquémico, motivo de alguma polémica, diversos autores defendem que ela só terá significado se a hipercolesterolemia for acompanhada de elevados valores de marcadores inflamatórios⁹⁰⁴. Atendendo à elevada morbi-mortalidade por AVC isquémico existente no nosso país, será interessante especular que estes níveis elevados da PCR poderão estar envolvidos nesta incidência elevada. Não podemos no entanto deixar de referir um artigo recente em que é negada uma

possível relação de causalidade entre os elevados níveis da PCR e a doença vascular, embora sem se pôr em causa o seu valor como marcador de risco desta doença¹⁶²⁵.

AAT - É a principal componente da alfa-1-globulina, aumentando de forma rápida, mas inespecífica, em processos inflamatórios. Encontra-se elevada nas infecções, artrites, vasculites, gravidez, terapia com estrógenos ou corticóides, neoplasias e no pós-operatório. A deficiência genética de AAT pode estar associada ao enfisema pulmonar, à cirrose hepática e ao carcinoma hepatocelular.

Diversos trabalhos demonstraram a associação da AAT com factores de risco cardiovascular clássicos, nomeadamente com a obesidade / excesso de peso, a diabetes e a dislipidemia e com a própria doença vascular^{1626 1627 1628}.

Seria assim de esperar que os indivíduos do grupo D, com hiperlipidemia, glicemia mais elevada e eventualmente lesões de aterosclerose mais avançadas, apresentassem, relativamente aos indivíduos C, valores igualmente mais elevados deste inibidor, o que não se verificou. Por outro lado a AAT, como inibidor da serina-protease, terá um papel relevante na protecção do tecido elástico vascular, particularmente da lâmina interna. Como a degradação das fibras elásticas dos vasos constitui um importante factor da perda do tónus vascular e do desenvolvimento da aterosclerose, a AAT poderá ter um papel protector da doença vascular aterosclerótica¹⁶²⁹.

Por estes, ou outros motivos que desconhecemos, ou por um tamanho insuficiente da amostra, os indivíduos dos dois grupos do nosso estudo não apresentaram qualquer diferença significativa na AAT.

IL6 - A IL6 apresentou concentrações significativamente superiores nos indivíduos do grupo D. A concentração mais alta nos dislipidémicos, poderá traduzir um estado inflamatório subjacente, nomeadamente em relação com a patologia vascular sub-clínica. Todos estes participantes tinham alterações carotídeas, embora falte o mesmo estudo nos controlos, o que permitiria reforçar, ou não, esta nossa explicação. No entanto, os factores de risco apresentados pela população D, aumento do CT, do CLDL, dos triglicédeos e da glicose, fazem suspeitar que estes indivíduos tenham lesões vasculares mais desenvolvidas e/ou mais activas do que os controlos. Admitimos, de acordo com alguns estudos, que os diversos factores clássicos do risco cardiovascular, como

a hiperlipidemia, a diabetes, a HTA, o tabagismo, a idade e o IMC, se correlacionam com os valores séricos da IL6. Enquanto que na maioria destes factores a correlação é positiva, relativamente ao colesterol total, essa relação foi positiva nuns e negativa noutros estudos^{1004 1007}. No PHS verificou-se uma correlação positiva entre os valores da IL6 e o número de factores de risco clássicos simultaneamente presentes (0, 1, 2, 3 ou mais; $p=0,0001$)¹⁰⁰⁴. A diferença apresentada pelos grupos D e C, relativamente aos valores do CT, CLDL, triglicédeos e glicemia, poderá ser uma das explicações para o diferencial nos valores da IL6.

A relação existente entre a IL6 e a PCR faria esperar um comportamento semelhante entre as duas moléculas; no entanto, o aumento significativo da primeira, no grupo D, não foi acompanhado por igual tendência da PCR (com aumento discreto, sem significado estatístico). A semi-vida significativamente diferente das duas moléculas poderá ser uma das explicações para este achado, assim como, mais uma vez, o tamanho reduzido da amostra.

IL8 - A IL8, indicadora da activação dos macrófagos, apresentou-se inesperadamente mais elevada nos nossos controlos. Atendendo à relação que parece existir entre a IL8 e a fisiopatologia da aterosclerose, seria de esperar valores séricos superiores no grupo dos dislipidémicos. No entanto, da revisão dos trabalhos em que se procurou uma relação entre a IL8, os factores de risco e/ou a doença aterosclerótica, a maioria analisou a sua concentração nas placas de aterosclerose e nas células mononucleares e não os seus valores séricos^{950 1630 1631}. Nestes trabalhos ficou demonstrada uma relação positiva da IL8 com o colesterol e a doença vascular. Num estudo em que se verificou uma associação entre a concentração sérica da IL8 e o risco de doença coronária, não houve qualquer relação entre os valores desta citocina, a PCR e os factores de risco clássicos, como o CLDL, o CHDL, os triglicédeos e a diabetes⁹⁵². No nosso trabalho determinou-se a concentração sérica da IL8 e o facto de não se ter verificado um aumento na população dislipidémica, está parcialmente de acordo com os resultados deste último estudo.

IL18 - Também a IL18 esteve mais elevada no grupo C, contrariando as nossas expectativas, baseadas na literatura consultada. As concentrações apresentadas por qualquer dos grupos, segundo alguns autores, colocam estes indivíduos num maior risco de doença vascular¹⁶³². Tendo em conta as maiores

concentrações de triglicérides e de glicose nos indivíduos D e as associações positivas entre os níveis desta interleucina e estes dismetabolismos^{1031 1633}, seria de esperar que este grupo apresentasse valores médios da IL18 superiores aos do grupo C. Diversos trabalhos demonstraram uma associação positiva entre os níveis da IL18 e os de outros marcadores inflamatórios, como a IL6 e a PCR^{1029 1031 1634}. Como vimos, a hsPCR e a IL6 apresentaram concentrações séricas mais elevadas nos participantes dislipidémicos, a primeira sem e a segunda com significado estatístico (respectivamente 0,2806 versus 0,2445 mg/dl; $p=0,597$ e 2,17332 versus 1,13683 pg/ml; $p=0,029$), pelo que seria de esperar níveis da IL18 igualmente mais elevados no grupo D. Também a presença da doença carotídea em todos os indivíduos dislipidémicos do nosso estudo, faria antever a presença de maiores níveis de IL18^{1028 1330}, embora esta relação positiva não se tenha verificado em todos os estudos¹⁰³¹. Julgamos que a grande dispersão dos níveis desta interleucina apresentada pelos indivíduos do grupo D (0,001 a 2232,668 pg/ml), quando comparada com a verificada no grupo C (210,021 a 2364,008 pg/ml), poderá ser uma das explicações para os resultados obtidos. O valor de 0,001 pg/ml, apresentado apenas por um dos participantes, afasta-se nitidamente dos valores médios verificados nos restantes o que, atendendo ao pequeno número da amostra, poderá ter também contribuído para estes resultados. Uma outra possível explicação para a menor concentração da IL18 nos participantes do grupo D foi a toma regular de ácido acetilsalicílico por 16 desses indivíduos. Para terminar gostaríamos de referir um trabalho realizado em 16 centenários saudáveis. Quando comparados com dois grupos de indivíduos saudáveis, cada um com 18 elementos e com idades de $55,9\pm 1,43$ e $74,3\pm 1,35$ anos e ainda com 23 doentes coronários crónicos, de idades comparáveis às dos controlos, os centenários e os doentes apresentaram níveis séricos de IL18 significativamente superiores aos dos controlos saudáveis. Comparativamente aos controlos e aos doentes, os centenários apresentaram níveis da *IL18 binding-protein* (IL18BP) também significativamente mais elevados (respectivamente $p=0,0014$ e $p=0,043$). Os autores concluíram que a ligação da IL18 pela IL18BP, poderia explicar os inesperados níveis elevados desta citocina apresentados por indivíduos saudáveis e de grande longevidade¹⁶³⁵. Embora constituindo pura especulação e baseados neste último trabalho, poderíamos pensar que os nossos normolipidémicos possuiriam

maiores níveis de IL18BP, comparativamente aos participantes do grupo D, o que se traduziria em menores níveis de IL18 livre. Como não foram determinados os níveis da IL18BP, esta nossa explicação, tal como dissemos, não poderá passar de pura especulação.

INFGama - O INFGama é produzido pelos linfócitos T (CD4 Th₁) após contacto com um antígeno, constituindo-se um factor de activação macrofágica. Ao estimular também os linfócitos citotóxicos e as células NK, é simultaneamente um indutor e um marcador da imunidade celular. Como vimos em capítulo anterior, detectou-se a presença desta citocina nas placas de aterosclerose, no homem e no animal e demonstrou-se uma relação entre os níveis intracelulares do INFGama e a gravidade da doença carotídea^{982 983984}. Também na doença coronária isquémica parece haver um aumento dos níveis séricos do INFGama¹⁶³⁶.

Embora no nosso trabalho se tenham determinado as concentrações séricas do INFGama, a presença de níveis discretamente mais elevados na população D poderá estar associada às alterações vasculares evidenciadas por estes indivíduos. Atendendo à relação existente entre a IL18 e o INFGama, a primeira a estimular a síntese do segundo pelas células T, seria de esperar que as duas citocinas apresentassem um paralelismo das suas concentrações nos dois grupos de participantes o que, como se viu, não aconteceu.

Estudos no animal mostraram uma correlação positiva entre os valores do colesterol e a concentração do INFGama, o que poderá estar parcialmente de acordo com os nossos resultados^{1637 1638}.

VEGF – Este factor angiogénico apresentou-se em concentrações não significativamente superiores no grupo D.

Parece haver uma relação positiva entre os valores séricos do VEGF e os do colesterol¹⁰⁸⁵.

Como vimos em capítulo anterior, esta interleucina poderá ter importante papel na fisiopatologia da aterosclerose, estimulando por uma lado, o desenvolvimento de vasos colaterais e por outro aumentando a angiogénese da placa, tornando-a mais friável e com maior propensão para romper e trombosar. Diversos trabalhos demonstraram uma correlação positiva entre os níveis tecidulares do VEGF e a gravidade das lesões vasculares^{1086 1087}. Em 40 dislipidémicos, metade dos quais com lesões confirmadas de aterosclerose,

verificaram-se maiores níveis séricos de VEGF do que em 40 indivíduos saudáveis ($p < 0,01$)¹⁶³⁹.

Embora tenhamos determinado a concentração sérica e não a tecidual, e não saibamos se os níveis séricos traduzem a concentração a nível da parede dos vasos, a presença de lesões carotídeas neste nosso grupo D, poderá também justificar a tendência para os valores mais elevados do VEGF.

Populações celulares - As células CD4+ apresentaram percentagens significativamente inferiores no grupo D. A relação entre as células CD4+, os factores de risco e a doença vascular clínica e/ou sub-clínica tem sido alvo de diversos estudos. Num deles, realizado em homens japoneses com síndrome metabólica, as células CD4+ e CD3+ e as células de memória (CD4+CD45RO+) correlacionaram-se positivamente com o IMC, com as concentrações plasmáticas da glicose e dos triglicéridos e inversamente com a concentração do CHDL¹⁶⁴⁰. Num outro estudo verificou-se, mais uma vez, uma relação positiva entre as células CD4+, CD3+, CD8+ e CD8+CD28+ com a diabetes¹⁶⁴¹. Ainda noutro trabalho, a relação CD4+Th₁/CD4+CD25+ esteve positivamente associada com a ocorrência de síndromes coronárias agudas¹⁶⁴². Uma correlação positiva foi também encontrada entre os linfócitos CD4+CD28- e o risco de AVC isquémico¹⁶⁴³. Resultados diferentes foram obtidos num estudo realizado em transplantados renais, em que se verificou uma relação inversa entre os níveis de CD4+ e a ocorrência de eventos cardiovasculares. A uma concentração de CD4+ no maior quartil, correspondeu um risco dez vezes menor ao do associado a uma concentração no menor quartil¹⁶⁴⁴. Um estudo em doentes HIV+ em que, tal como no nosso, se avaliou a doença carotídea por doppler, uma maior concentração de células CD4+ associou-se a uma menor progressão da doença carotídea ($p = 0,01$)¹⁶⁴⁵. Por outro lado, em indivíduos saudáveis, entre os 60 e os 70 anos, as células T de memória CD4+CD45RO+ e as B activadas CD19+CD80+ correlacionaram-se positiva e significativamente, com a espessura da média-íntima carotídea¹⁶⁴⁶.

O CD8 encontra-se nas células T, sendo um co-receptor para a activação destas células que reconhecem os antígenos ligados às moléculas da classe I do MHC. Está também presente em alguns timócitos e em algumas células dendríticas.

As células CD8+ comportam-se como células citotóxicas, eliminando as células infectadas com vírus, as células tumorais e as células de enxerto e não apresentaram diferenças percentuais significativas entre os indivíduos dos grupos D e C.

São em menor quantidade os trabalhos que avaliaram uma possível relação entre as células CD8+ do sangue periférico e a doença vascular. Um deles foi já referido¹⁶⁴¹. Noutro, realizado em doentes com apneia do sono, em que a doença vascular tem uma prevalência superior ao da população geral, verificou-se que os linfócitos CD8+ periféricos apresentavam um grau de citotoxicidade, traduzida pela presença de CD56 e CD16, significativamente superior aos dos controlos¹⁶⁴⁷. Resultados semelhantes foram obtidos num outro estudo¹⁶⁴⁸.

A percentagem significativamente maior das células CD4+ (0,026) nos controlos e a semelhança das CD8+ nos dois grupos de indivíduos ($p=0,783$), poderá fazer antever um maior peso da imunidade humoral (CD4 TH₂) e /ou da hipersensibilidade celular (CD4 TH₁) nos normolipidémicos, assim como um predomínio da imunidade celular (CD8+) nos dislipidémicos do nosso estudo.

Com a ressalva de não ter sido estudada a artéria carotídea nos nossos controlos, admitimos como provável que os indivíduos dislipidémicos apresentem lesões mais avançadas e/ou mais instáveis. Sendo assim, somos tentados a concordar com alguns autores que referem ser a imunidade celular a principal responsável pela doença aterosclerótica, atribuindo à imunidade humoral, particularmente aos anticorpos anti-OxLDL, um papel protector. Este conceito está longe de ser consensual, com alguns trabalhos a demonstrarem resultados contraditórios^{146 147 148 150}.

As células CD26+ encontravam-se, como vimos, em percentagem marginalmente superiores no grupo dos controlos.

O CD26 encontra-se nas células T activadas, nas células B, nas células *Natural Killer* (NK), nos macrófagos, nas células do epitélio tubular proximal, do epitélio intestinal e dos canalículos biliares. Encontra-se também nos timócitos maduros da medula óssea e nas células T de memória pós-activação. Funciona como protease membranar, como molécula co-estimuladora das células T, induzindo uma resposta essencialmente CD4 TH₁ (com produção de IL2) e como molécula de adesão. Através da sua actividade *dipeptidyl peptidase 4* (DPP-4),

ao degradar as incretinas, tem um importante papel na patogénese da diabetes

1649 1650

Em doentes sujeitos a aterectomia coronária, divididos em grupos de indivíduos com angina estável, AI estabilizada, AI refractária e EAM, procurou-se uma possível relação entre a presença de linfócitos activados na placa e a gravidade da doença. As percentagens das células CD25+, CD26+, CD40L+ e CD69+CD3+, aumentaram com a gravidade da doença coronária. Nos indivíduos com EAM e AI refractária as percentagens foram significativamente superiores às dos doentes com angina estável e AI estabilizada¹⁶⁵¹.

Atendendo à provável doença vascular mais desenvolvida dos indivíduos do grupo D, esperaríamos maiores níveis de CD26 neste grupo, o que não aconteceu. Também não se verificou um paralelismo entre os níveis desta protease membranar e os valores da glucose plasmática, significativamente mais elevados nos indivíduos do grupo D.

As células CD25CD3+, CD26CD3+ e CD25CD26CD3+ apresentaram-se em percentagens significativamente mais elevadas no grupo C.

A molécula CD3 encontra-se nos timócitos, nas células T e nas Células T NK. Nas células T associa-se ao *T-cell receptor* (TCR), formando o complexo membranar TCR-CD3, que participa na transdução de sinal após interacção com o antígeno. Em ratinhos deficientes em receptor LDL, a administração do anticorpo anti—CD3, antes da introdução de uma dieta hipercolesterolemia, reduziu significativamente o desenvolvimento das placas de aterosclerose. Quando o mesmo anticorpo foi administrado já depois da dieta e do desenvolvimento de aterosclerose, verificou-se uma redução significativa na progressão das lesões vasculares¹⁶⁵².

O CD25 está presente nos linfócitos T e B activados, nos monócitos, nos oligodendrócitos e em alguns macrófagos, nos linfócitos NK, nas células mielóides e em algumas células dendríticas. A activação das células T e a resposta celular é modulada pela IL2. O principal receptor desta interleucina é constituído por três cadeias, uma das quais é a cadeia α ou CD25. Este marcador de superfície, também conhecido por Tac (T cell activation) e que apresenta baixa afinidade para a IL2, é um marcador precoce da activação celular¹⁶⁵³. Induz a activação e a proliferação dos linfócitos T, B e NK, dos

timócitos e dos macrófagos e participa nas respostas imunológicas mediadas pelos linfócitos T.

Em peças de aterectomia, a percentagem de células T activadas, CD25+CD3+, foi significativamente superior nos doentes com AI refractária (7,8%) e EAM (18,5%), relativamente aos indivíduos com angina estável (2,2%) ou AI estabilizada (3,3%). Os autores concluíram que estes resultados estão de acordo com a activação e amplificação das respostas imunológicas “intra-placa”¹⁶⁵⁴.

Gostaríamos de chamar a atenção para um facto que julgamos importante. Não tendo sido analisada a percentagem de células duplamente positivas para o CD4 e o CD25, células CD4CD25+, com funções reguladoras, verificou-se, tal como acabamos de referir, que a percentagem dos marcadores CD4 e CD25 estava reduzida nos nossos dislipidémicos. Dada a importância atribuída às células CD4CD25+ na fisiopatologia da aterosclerose, inibindo o seu desenvolvimento, poderíamos especular que a simultaneidade de valores mais baixos de CD4 e de CD25 nos participantes do nosso grupo D, poderiam traduzir uma reduzida percentagem das células T reguladoras CD4CD25+^{1655 1656 1657}!

O antigénio CD26 foi já referido.

A presença das células positivas para o CD25, o CD26 e/ou o CD3, traduz a activação celular e seria de esperar que estivessem em maior número nos nossos dislipidémicos, todos eles com doença vascular documentada. O facto de uma grande percentagem destes indivíduos ter estado medicada com fármacos hipolipemiantes, estatinas e/ou fibratos, até 30 dias antes da entrada no estudo e da realização deste primeiro balanço laboratorial, poderá ter contribuído para estes resultados. Com efeito, admitimos que os potenciais efeitos antiinflamatórios dos hipolipemiantes, possam de alguma forma interferir com os procesos de activação e diferenciação das células envolvidas nos processos imunológicos. Como a vida média de algumas destas células é de semanas, a menor percentagem destas células nos dislipidémicos poderá reflectir ainda a acção dos hipolipemiantes. Veremos nas avaliações subsequentes se se confirmam estas acções. Por outro lado desconhecemos o grau de actividade/instabilidade das lesões vasculares detectadas por doppler. Assim, se a maioria das lesões estiverem estabilizadas pelas terapêuticas utilizadas até ao

mês anterior à inclusão do estudo, poderá haver menor activação celular a nível vascular, relativamente aos controlos que não faziam qualquer terapêutica.

A HLADR encontra-se nos monócitos/macrófagos, nas células B e T e nas células dendríticas, frequentemente associado a uma proteína com 9 aminoácidos, formando um complexo que se comporta como “ligante” para o TCR. A sua função principal é apresentar os antígenos aos linfócitos CD4+, activando-os, sendo por isso considerado um marcador tardio da activação imunológica.

As células HLADR+ estiveram percentualmente mais representadas no grupo D. Este resultado, sendo de alguma forma esperado, atendendo aos factores de risco desta população e à presença da doença vascular, não está de acordo com as concentrações das populações celulares já referidas, também elas marcadores de activação, mas aumentadas nos indivíduos C. A estreita relação funcional entre as células HLA DR+ e as CD4+, faria supor um paralelismo das suas concentrações, o que não se verificou nos indivíduos do nosso estudo. Diferenças entre as vidas médias das diferentes células, nomeadamente dos macrófagos, das células B, das células dendríticas e das células T, assim como a possível acção já referida dos hipolipemiantes, poderão explicar estas diferenças.

Indivíduos hipertensos com linfócitos B e T periféricos positivos para o HLA DR (DR13 e DR17), apresentaram maior espessura da média e íntima carotídea, comparativamente aos hipertensos sem este marcador nas células periféricas ($0,096 \pm 0,018$ versus $0,085 \pm 0,021$ cm, $p=0,012$)¹⁶⁵⁸.

Num outro estudo, realizado em 65 indivíduos, avaliou-se a inflamação do miocárdio através da realização de biópsia e a função endotelial a nível da artéria radial. A expressão a nível do miocárdio do HLA DR, HLA-1 e ICAM-1 correlacionou-se positivamente com a disfunção endotelial¹⁶⁵⁹.

A população celular duplamente positiva para o HLA DR e o CD4, células HLADRCD4+, apresentou-se numa concentração significativamente superior nos indivíduos dislipidémicos. São células apresentadoras de antígeno, do tipo monócito/macrófago.

As células HLADRCD8+, sendo igualmente células apresentadoras de antígeno mas do tipo célula dendrítica estavam também significativamente aumentadas na população D.

Outras células apresentadoras de antígeno, como as HLADRCD8h e as HLADRCD8low estiveram também percentual e significativamente aumentadas nos indivíduos dislipidémicos.

Desta análise basal parece poder concluir-se que nos nossos dislipidémicos, as células especializadas na apresentação do antígeno aos linfócitos T estiveram todas significativamente aumentadas. Não nos é possível esclarecer se o aumento destas células HLADR+, na população D, se deveu à doença vascular subjacente, à sua instabilidade, aos factores de risco presentes ou a outras condicionantes.

Nesta avaliação basal, as percentagens do marcador CD95 estiveram não significativamente mais elevados nos indivíduos dislipidémicos.

O antígeno CD95, também conhecido por antígeno Fas, pertence à superfamília dos receptores TNF e a sua principal função é a indução da apoptose. Na aterosclerose os mecanismos indutores da morte celular programada poderão ter efeitos importantes, nomeadamente na transformação das placas estáveis em instáveis¹⁶⁶⁰. O NFkB é um dos intervenientes na transcrição da proteína pró-apoptótica FasL. Estudaram-se os níveis da activação do NFkB e da expressão do FasL em 32 placas de aterosclerose e nas células mononucleares do sangue periférico de doentes com estenose carotídea, assim como nas células sanguíneas periféricas de indivíduos saudáveis. As regiões inflamatórias quando comparadas com as zonas fibrosadas das placas, apresentaram um aumento da activação do NFkB (3393 ± 281 versus 1029 ± 100 nucleos positivos por mm, $p < 0.001$), da expressão da FasL ($16 \pm 1,4\%$ versus $13 \pm 1,8\%$, $p < 0.05$) e das caspases activas ($3.3 \pm 0,6$ versus $1,5 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$). A nível das células mononucleares periféricas a activação do NFkB e a expressão da FasL foram significativamente superiores nos doentes ($p < 0,001$), comparativamente aos indivíduos saudáveis¹⁶⁶¹.

Alguns trabalhos procuraram avaliar possíveis relações entre a apoptose, o CD95, a aterosclerose, a doença e/ou os factores de risco cardiovascular. O tabaco, um dos principais factores de risco cardiovascular, induziu a apoptose dos macrófagos alveolares através de um aumento do stresse oxidativo, sendo este efeito inibido pelos antioxidantes glutathiona, Vit C e Vit E. O aumento da apoptose pelo fumo do tabaco terá sido independente do antígeno Fas¹⁶⁶². Noutro estudo que utilizou hepatócitos, a depleção prolongada de um dos

principais antioxidantes, a glutathiona, induziu a disfunção e a ruptura da membrana mitocondrial e a apoptose, dependente do CD95 e da activação das caspases¹⁶⁶³.

As células CD95CD95L+ apresentaram-se em concentrações discretamente mais elevadas nos nossos participantes dislipidémicos ($p=0,064$). Podemos assim admitir que nestes indivíduos, com factores de risco e doença vascular confirmados, os mecanismos pró-apoptóticos se encontram exacerbados, conferindo-lhes eventualmente um maior risco de doença clínica aguda. Nas células B e T, a presença destes marcadores da apoptose, traduz activação celular. Alguns estudos demonstraram que o aumento da expressão da CD95/CD95L, associada à redução dos CD25 e CD28, está relacionada com o envelhecimento celular e um aumento da susceptibilidade à apoptose^{1664 1665}.

Atendendo à relação entre os mecanismos oxidativos e os da apoptose, parece-nos que o aumento das células CD95+ e CD95CD95L+ nos nossos dislipidémicos está muito provavelmente na dependência, pelo menos parcialmente, da maior concentração das OxLDL (123,207 versus 73,1992; $p=0,000$) e do menor TRAP (1275,932 versus 1340,058; $p=0,276$) nos indivíduos do grupo D. Veremos se a terapêutica antioxidante, ao reduzir as OxLDL, irá também reduzir os mecanismos pró-apoptóticos, com uma redução das células CD95+ e CD95CD95L+.

O CD69 está presente nos leucócitos activados, incluindo os linfócitos T, B e NK. Encontra-se igualmente presente nos neutrófilos, nos eosinófilos e nas células de Langerhans. Está envolvido na activação precoce dos linfócitos, dos monócitos e das plaquetas; promove a entrada de Ca para a célula, a síntese de citocinas e dos seus receptores e a expressão de proto-oncogenes como o c-myc e o c-fos. Promove ainda a lise celular pelas células NK.

As células CD69+ estavam percentualmente mais representadas nos nossos controlos ($p=0,024$).

Mais uma vez, as moléculas associadas à activação celular estiveram menos elevadas nos indivíduos dislipidémicos e com doença vascular, tal como já se verificou relativamente a outras moléculas de activação (CD25, CD26). Os mesmos argumentos apresentados para essas moléculas poderão igualmente justificar a menor concentração das CD69+ nos indivíduos do grupo D. De salientar a maior dispersão de valores apresentada pelo grupo D (1,0 a 27,3 %)

comparativamente ao grupo C (11,0 a 25,0 %), o que poderá ter contribuído para estes resultados.

Relativamente a este marcador celular são poucos os trabalhos que procuraram avaliar a sua relação com a doença e/ou os factores de risco para a doença cardiovascular e/ou a aterosclerose. Recordamos o trabalho já referido em que, em peças de aterectomia coronária, a percentagem das células CD69CD3+ se correlacionou positivamente com a gravidade da doença¹⁶⁵¹.

Relativamente às populações celulares, poderemos dizer que as HLADR+, HLADRC4+, HLADRC8+, HLADRC8h+ e as HLADRC8low+, envolvidas essencialmente na apresentação do antigénio e na activação celular tardia, apresentaram-se significativamente elevadas nos dislipidémicos. Outras, como as CD26+, CD25CD3+, CD25CD26+, CD25CD26CD3+ e as CD69+, traduzindo activação celular precoce, estiveram significativamente mais elevadas nos controlos. As células CD95+ e as CD95CD95L+, relacionadas com a indução da apoptose, apresentaram-se em concentrações discretamente superiores nos dislipidémicos.

Relativamente à menor concentração das células CD4+ na nossa população de dislipidémicos, seria necessário caracterizar melhor o tipo de células CD4+. Com efeito e como já referimos, a simultaneidade de menores percentagens de CD4 e de CD25 na nossa população D, permite-nos especular que poderão ser essencialmente as células CD4CD25+, reguladoras e com funções supressoras da aterosclerose, que poderão estar reduzidas nestes indivíduos. Também o conhecimento do fenótipo apresentado pelas células CD4, essencialmente Th1, com produção de Interferão gama, ou Th2, com produção de citocinas antiinflamatórias, como a IL10, poderá explicar a relação entre esta células, os factores de risco e o desenvolvimento da aterosclerose¹⁶⁵⁶.

17 – Comparação Grupo Dislipidémicos (D) / Grupo Controlo (C) (Sob terapêutica)

Neste capítulo vamos comparar com a única avaliação realizada no grupo controlo, grupo C, as três avaliações do grupo constituído por todos os dislipidémicos, grupo D, medicados quer com estatinas, quer com o fenofibrato.

Apresentamos a evolução das diferentes variáveis estudadas, clínicas e laboratoriais, analisando mais pormenorizadamente as que pela sua importância, ou pelas alterações sofridas, justificam uma maior atenção. Como comparação utilizámos, como dissemos, a primeira e única avaliação realizada no grupo controlo. Os algarismos 1, 2 e 3, presentes nas tabelas e gráficos seguintes, à direita das diversas variáveis, referem-se respectivamente à primeira, segunda e terceira avaliação

17.1 - Determinações antropométricas

No quadro 1 estão representadas as determinações antropométricas efectuadas e a sua evolução ao longo do estudo.

	N	Média	Desvio padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P	
Peso1	D	38	77,7	16,1072	2,6129	72,406	82,994	0,567
	C	12	74,917	7,3665	2,1265	70,236	79,597	
Peso2	D	38	77,71	16,434	2,666	72,31	83,11	0,573
	C	12	74,92	7,366	2,127	70,24	79,60	
Peso1	D	38	77,91	16,611	2,695	72,45	83,37	0,550
	C	12	74,92	7,366	2,127	70,24	79,60	
IMC1	D	38	28,55	4,209	0,683	27,17	29,94	0,192
	C	12	26,75	3,769	1,088	24,36	29,14	
IMC2	D	38	28,47	4,196	0,681	27,09	29,85	0,211
	C	12	26,75	3,769	1,088	24,36	29,14	
IMC3	D	38	28,66	4,370	0,709	27,22	30,09	0,181
	C	12	26,75	3,769	1,088	24,36	29,14	
Cintura1	D	38	97,29	11,793	1,913	93,41	101,17	0,642
	C	9	95,33	8,411	2,804	88,87	101,80	

Cintura2 D	38	97,09	12,079	1,960	93,12	101,06	
C	9	95,33	8,411	2,804	88,87	101,80	0,683
Cintura2 D	38	95,61	11,691	1,897	91,76	99,45	
C	9	95,33	8,411	2,804	88,87	101,80	0,948

Quadro 1
(Variáveis Antropométricas)

Como podemos verificar não houve diferenças ao longo do estudo relativamente às determinações realizadas. Assim qualquer alteração ocorrida noutros parâmetros avaliados, nomeadamente os relacionados com a inflamação e a peroxidação lipídica não terá sido devida a alterações do peso, nem do IMC nem do perímetro da cintura.

17.2 – Consumo de álcool

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
Álcool1 D	38	25,39	34,897	5,661	13,92	36,87	
C	12	2,50	4,523	1,306	-0,37	5,37	0,029
Álcool2 D	38	24,24	34,919	5,665	12,76	35,71	
C	12	2,50	4,523	1,306	-0,37	5,37	0,038
Álcool3 D	38	18,96	24,249	3,934	10,99	26,93	
C	12	2,50	4,523	1,306	-0,37	5,37	0,024

Quadro 2
(Consumo Álcool G/dia)

O quadro 2 indica o consumo de álcool, em gramas/dia, pelos dois grupos de participantes, assim como a sua evolução ao longo do estudo.

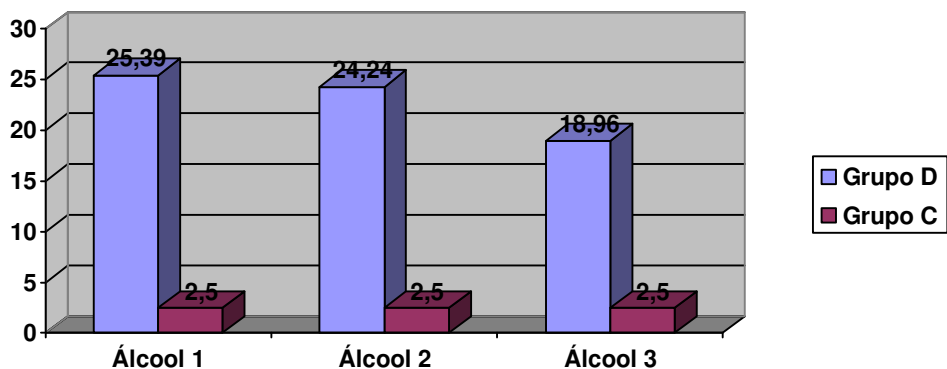


Gráfico 1

O gráfico 1 mostra ter havido um consumo diário de álcool significativamente superior no grupo D. Na última avaliação houve uma discreta redução, não significativa, neste consumo ($p=0,143$).

17.3 - Determinações Lipídicas

De seguida, vamos analisar essencialmente as alterações lipídicas associadas à terapêutica antioxidante, reservando para os próximos capítulos os comentários sobre a acção dos hipolipemiantes.

O quadro 3 apresenta a evolução das variáveis lipídicas sob-terapêutica, inicialmente antioxidante e posteriormente hipolipemiante.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
CT 1 D	38	307,74	60,142	9,756	287,97	327,50	0,000
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CT 2 D	37	299,78	65,599	10,784	277,91	321,66	0,000
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CT 3 D	38	217,76	39,686	6,438	204,72	230,81	0,026
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CHDL1 D	38	49,79	12,739	2,067	45,60	53,98	0,720
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
CHDL2 D	38	50,92	12,102	1,963	46,94	54,90	0,507
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	

CHDL3	D	38	55,89	15,399	2,498	50,83	60,96	0,118
	C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
CT/HDL1	D	38	6,5497	2,34644	0,38064	5,7784	7,3209	0,001
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	
CT/HDL2	D	38	5,8716	1,66948	0,27083	5,3229	6,4204	0,001
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	
CT/HDL3	D	38	4,1248	1,10826	0,17978	3,7605	4,4891	0,841
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	
CLDL1	D	38	172,18	44,105	7,155	157,69	186,68	0,000
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	
CLDL2	D	38	174,45	44,757	7,261	159,74	189,16	0,000
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	
CLDL3	D	38	145,84	32,743	5,312	135,08	156,60	0,003
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	
TG1	D	38	285,47	295,102	47,872	188,48	382,47	0,104
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	
TG2	D	38	224,16	172,414	27,969	167,49	280,83	0,114
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	
TG3	D	38	179,71	114,438	18,564	142,10	217,33	0,283
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	

Quadro 3
(Variáveis Lipídicas)

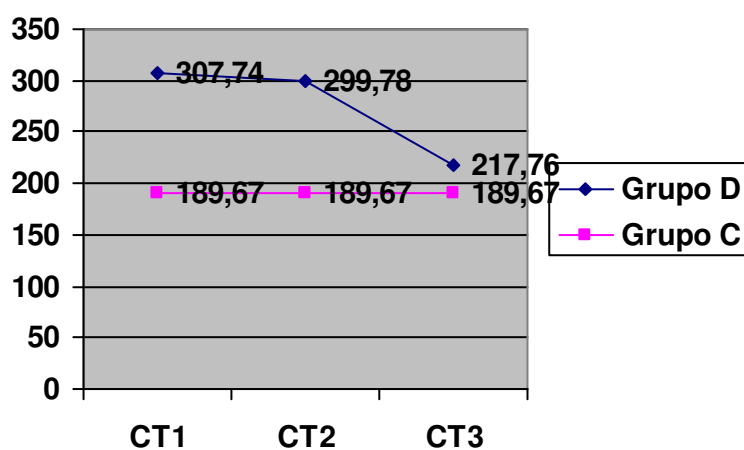


Gráfico 2

Como se verifica no quadro 3 e no gráfico 2, a concentração do colesterol total apresentou uma redução não significativa de 2,58% ($p=0,122$) após terapêutica com as Vit(s) E e C.

Quanto à terapêutica hipolipemiante, com estatinas ou fibratos, esta induziu uma redução previsível de 26,65 % ($p=0,000$) na concentração do colesterol total (Quadro 3 e Gráfico 2) .

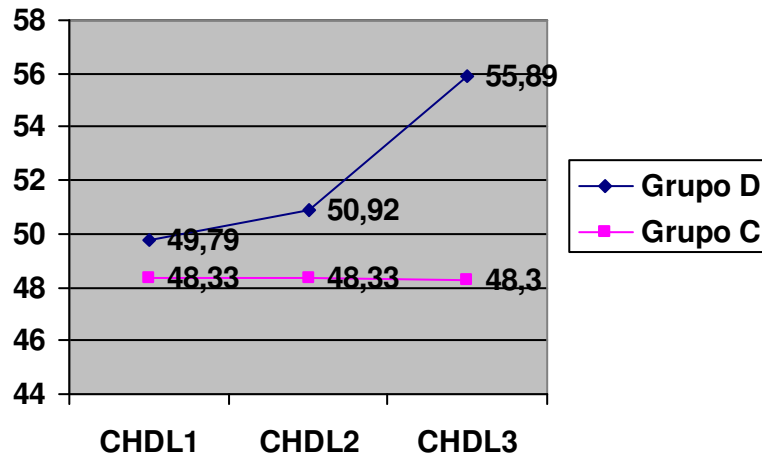


Gráfico 3

A concentração basal do CHDL, ligeira e não significativamente mais elevada no grupo D, manteve-se inalterada com a terapêutica vitamínica ($p=0,275$), apresentando uma elevação de 9,76% ($p=0,001$) com os hipolipemiantes (Quadro 3 e Gráfico 3).

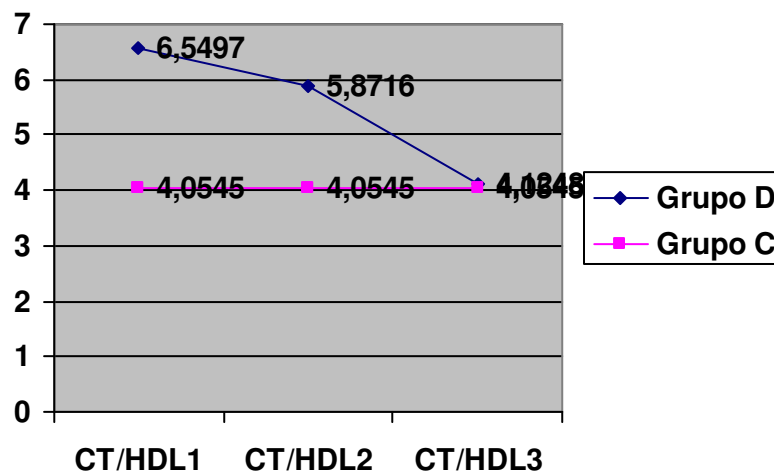


Gráfico 4

Relativamente à relação CT/CHDL verificou-se uma evolução favorável, com uma redução de 10,35% ($p=0,046$) com a terapêutica antioxidante e de 29,74 % ($p=0,000$) com os hipolipemiantes (Quadro 3 e Gráfico 4). De notar que este índice passou de valores superiores a 6, na avaliação basal, para cerca de 4 na ultima avaliação.

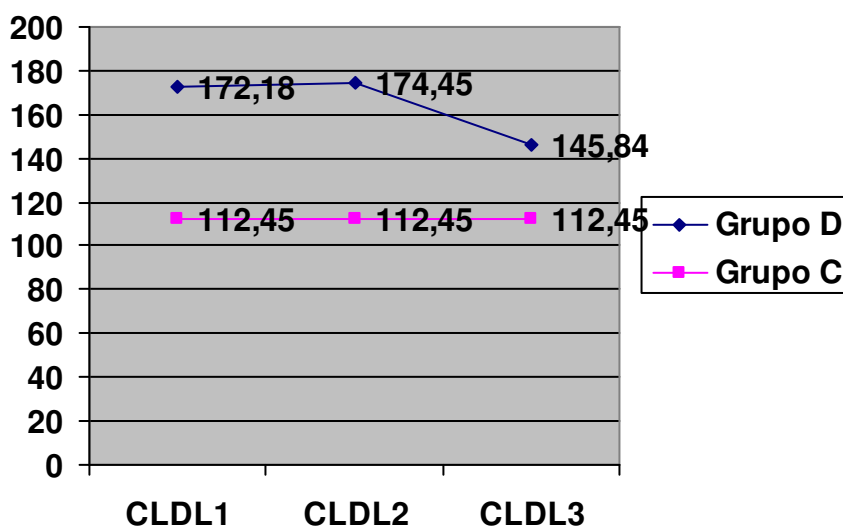


Gráfico 5

O LDL apresentou uma evolução paralela ao CT, mantendo-se praticamente inalterado após terapêutica com as vitaminas E e C ($p=0,677$) e apresentando uma redução de 16,4% ($p=0,001$) com as estatinas ou o fibrato (Quadro 3 e Gráfico 5).

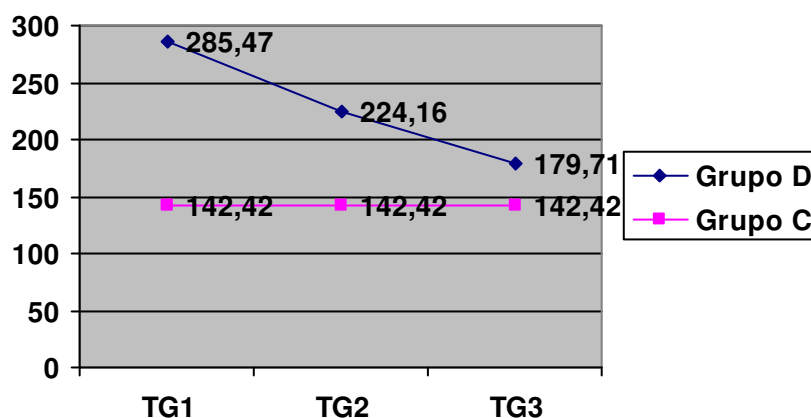


Gráfico 6

Os triglicerídeos apresentaram uma redução praticamente constante desde a primeira à última avaliação, com uma redução de 21,47% ($p=0,030$) e de 19,82% ($p=0,019$), respectivamente com os antioxidantes e os hipolipemiantes (Quadro 3 e Gráfico 6).

O quadro 4 apresenta os dados obtidos relativamente às determinações das apoproteínas.

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
ApoA1	D	38	163,42	26,817	4,350	154,24	172,24	0,561
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoA2	D	38	167,24	28,104	4,559	158,00	176,47	0,323
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoA3	D	38	165,63	28,877	4,684	156,14	175,12	0,430
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoB100 1	D	38	164,82	33,254	5,395	153,89	175,75	0,000
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
ApoB100 2	D	38	164,50	32,977	5,350	153,66	175,34	0,000
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
ApoB100 3	D	38	117,74	22,272	3,613	110,42	125,06	0,010
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
Lp(a)1	D	37	41,919	47,7606	7,8518	25,995	57,843	0,050
	C	12	13,577	14,0976	4,0696	4,619	22,534	
Lp(a)2	D	38	42,95	47,498	7,705	27,34	58,57	0,041
	C	12	13,58	14,098	4,070	4,62	22,53	
Lp(a)3	D	38	42,810	45,6026	7,3977	27,821	57,799	0,035
	C	12	13,577	14,0976	4,0696	4,619	22,534	

Quadro 4
(Apoproteínas)

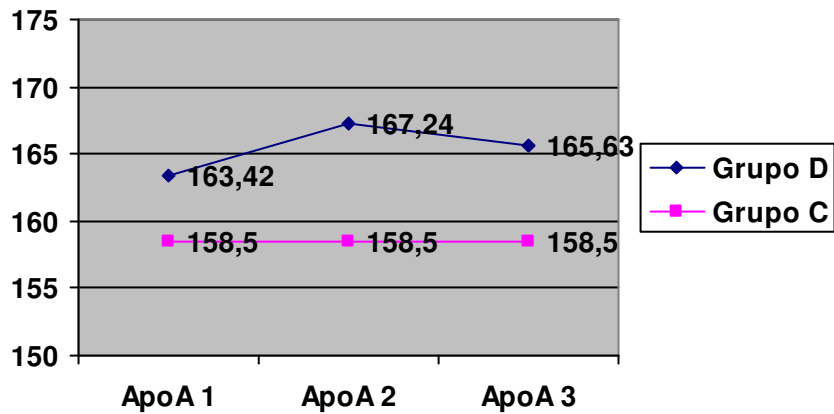


Gráfico 7

A ApoA1 (Quadro 4 e Gráfico 7) não apresentou alterações significativas ao longo do nosso estudo, quer com os antioxidantes, quer posteriormente com a terapêutica hipolipemiante. Verificou-se um aumento não significativo de 2,33% ($p=0,648$) com as vitaminas E e C. Relativamente ao terceiro e último controlo, os valores desta apoproteína mantiveram-se praticamente inalterados ($p=0,244$), reflectindo essencialmente a acção das estatinas utilizadas na maioria dos nossos dislipidémicos e que, como é sabido, não possuem grande capacidade de alterar os valores da ApoA1.

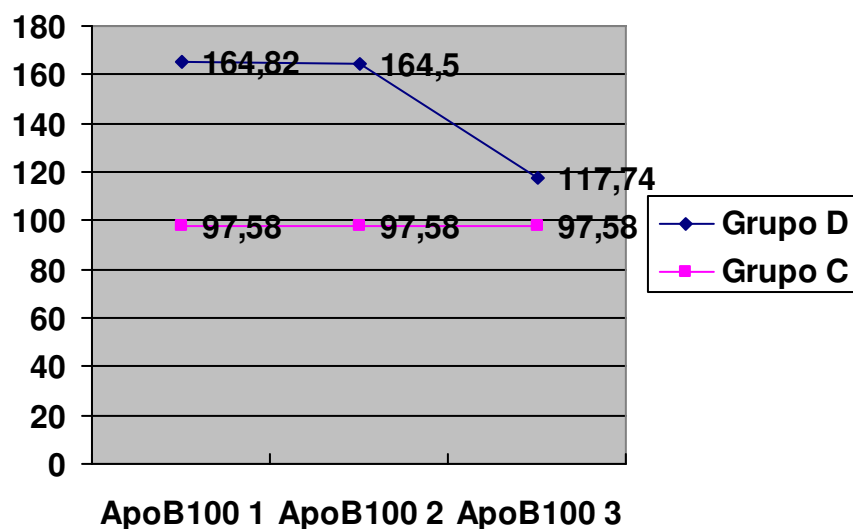


Gráfico 8

Da análise do comportamento da ApoB100 (Quadro 4 e Gráfico 8) ressalta essencialmente a descida, significativa e previsível, após a utilização dos hipolipemiantes (28,425%, $p=0,000$).

O outro dado que ressalta desta análise foi o efeito neutro das vitaminas antioxidantes, nesta apoproteína ($p=0,901$) (Quadro 4 e Gráfico 8).

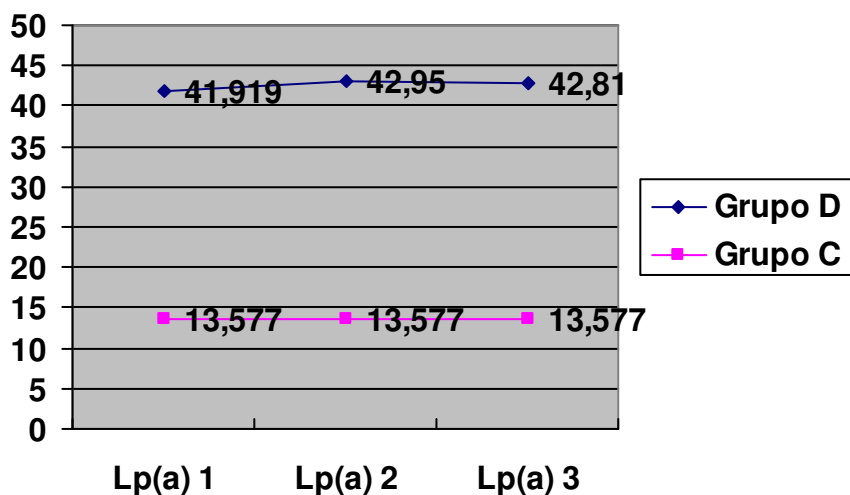


Gráfico 9

Quanto às concentrações da Lp(a), estas mantiveram-se inalteradas nas três avaliações realizadas (Quadro 4 e Gráfico 9).

17.4 - Determinações séricas da Glicose e do Ácido úrico

O quadro 5 apresenta os resultados obtidos com as determinações da glicose e do ácido úrico (mg/dl).

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
Glicose1 D	38	101,95	18,543	3,008	95,85	108,04	0,032
C	12	89,75	7,841	2,263	84,77	94,73	
Glicose2 D	38	105,82	22,381	3,631	98,46	113,17	0,019
C	12	89,75	7,841	2,263	84,77	94,73	

Glicose3 D	38	108,11	23,148	3,755	100,50	115,71	
C	12	89,75	7,841	2,263	84,77	94,73	0,010
Ac. Urico1 D	38	5,400	2,0090	0,3259	4,740	6,060	
C	12	5,017	1,3979	0,4036	4,128	5,905	0,542
Ac. Urico2 D	38	5,137	1,8192	0,2951	4,539	5,735	
C	12	5,017	1,3979	0,4036	4,128	5,905	0,835
Ac. Urico3 D	38	5,06	1,559	0,253	4,55	5,57	
C	12	5,02	1,398	0,404	4,13	5,90	0,935

Quadro 5
(Glicose e ácido úrico)

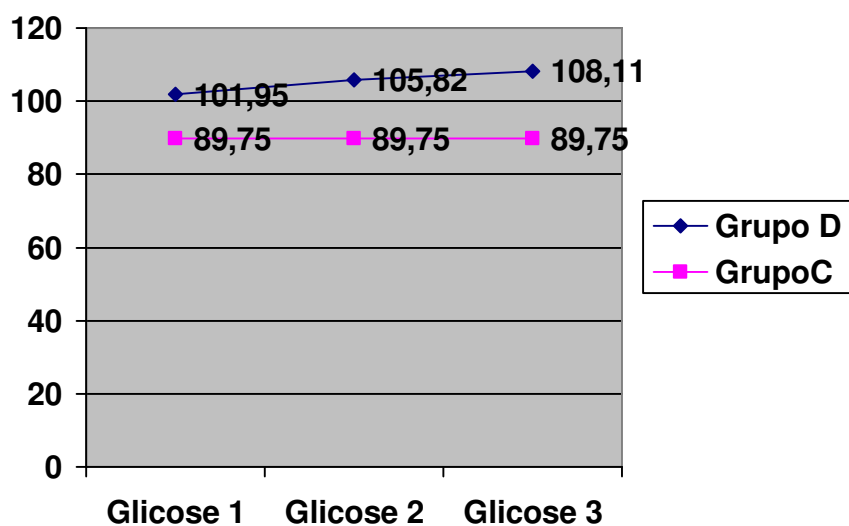


Gráfico 10

A glicose, inicialmente em concentração mais elevada no grupo D, apresentou um aumento não significativo da sua concentração sérica, primeiro com as vitaminas E e C ($p=0,102$) e posteriormente com os hipolipemiantes ($p=0,426$).

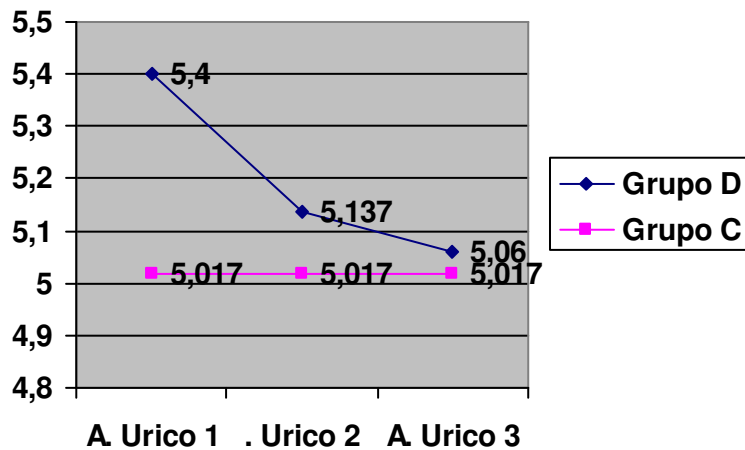


Gráfico 11

Verificou-se uma discreta e não significativa redução na concentração sérica do ácido úrico, inicialmente com a terapêutica antioxidante (4,87%; $p=0,065$) e depois com a hipolipemiante (1,5%; $p=0,743$).

17.5 - Resumo e comentários

Relativamente ao consumo de álcool, que julgámos útil avaliar dadas as suas relações com alguns factores de risco cardiovascular, nomeadamente com as diferentes lipoproteínas, com a glicemia, com a HTA, com a hemostase e para o nosso estudo mais importante, com os fenómenos oxidativos, verificou-se ao longo do estudo ser significativamente mais elevado no grupo D. Este grupo de indivíduos apresentou um consumo diário médio habitualmente aceite como não tóxico e eventualmente como protector da doença cardiovascular. Os níveis de consumo mantiveram-se praticamente inalterados, da primeira para a segunda avaliação e mostraram no último controlo uma tendência não significativa para uma redução ($p=0,143$).

Da análise destes dados ressalta uma quase total ausência de efeitos das vitaminas antioxidantes nos parâmetros lipídicos avaliados. Apenas os triglicerídeos apresentaram uma redução significativa de 21,47% ($p=0,030$) com a terapêutica vitamínica, verificando-se também uma redução em cerca de 10% ($p=0,046$) da relação CT/CHDL.

Diversos trabalhos têm procurado avaliar uma possível acção da Vit E e/ou de outras vitaminas antioxidantes a nível do colesterol total, apontando muitos deles, tal como o nosso, para uma ausência de efeitos significativos¹⁶⁶⁶
¹⁶⁶⁷ ¹⁶⁶⁸ ¹⁶⁶⁹. Num estudo realizado em 120 homens e mulheres sem doença vascular conhecida, a suplementação com Vit C, Vit E ou a associação das duas, reduziu significativamente os níveis séricos do CT, do LDL e dos triglicéridos ($p < 0,001$)¹⁶⁷⁰.

Em coelhos NZW, doses de Vit E muito superiores às utilizadas no homem, provocaram uma redução significativa do CT ($0,017$)⁴⁶⁹.

Relativamente à possível acção da Vit E e/ou de outras vitaminas antioxidantes nos níveis do HDL, a literatura por nós consultada não é consensual. A maioria dos trabalhos aponta para um efeito redutor do alfa-tocoferol nos níveis das lipoproteínas de alta densidade, anulando mesmo os efeitos das estatinas e do ácido nicotínico sobre estas lipoproteínas⁵⁴¹ ⁵⁴² ⁵⁴³ ⁵⁴⁴
¹⁶⁷¹. Esta acção dos antioxidantes exerce-se essencialmente a nível das partículas HDL₂ e poderá ser devida à interferência com diversas proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, como a LCAT, a apo A1 e a proteína de transferência dos fosfolípidos. Alguns trabalhos encontraram resultados diferentes, como foi o caso de um estudo publicado em 1987 e realizado em indivíduos hipercolesterolémicos. Nestes indivíduos, a suplementação com 500 UI/dia de Vit E aumentou significativamente a concentração do HDL (13,6%, $p < 0,05$) e reduziu simultaneamente a relação CT/ HDL em 23%¹⁶⁷². Em doentes IRC em hemodiálise, a suplementação com 200 mg de Vit E/dia conseguiu um aumento do HDL e uma redução significativa da relação LDL/HDL ($p < 0,05$); no mesmo trabalho, outros doentes suplementados com 200 mg de Vit C apresentaram reduções significativas do CT, do LDL, das relações LDL/HDL e CT/HDL ($p < 0,05$)¹⁶⁷³. Num outro estudo realizado em doentes coronários, a suplementação com Vit E (1200 UI/dia) durante 2 anos não provocou alterações significativas nos níveis do CT, do LDL, do HDL nem dos triglicéridos. O mesmo trabalho não mostrou qualquer efeito significativo do alfa-tocoferol nos níveis da apo A1 nem das sub-fracções das lipoproteínas HDL¹⁶⁷⁴.

Também a nível do LDL não se verificou qualquer efeito significativo por parte das Vit(s) E e C. Diversos trabalhos avaliaram as acções das vitaminas

antioxidantes a nível do LDL. Num deles, realizado em 40 indivíduos dos dois sexos, com hipercolesterolemia familiar heterozigótica e com idades compreendidas entre os 2 e os 18 anos, a associação das vitaminas E e C nas doses de, respectivamente, 400 UI e 500 mg / dia, não teve qualquer efeito significativo no LDL nem no restante perfil lipídico ¹⁶⁶⁷. Em 297 professores reformados, a suplementação com 400 UI de Vit E, 500 mg de Vit C e 6 mg de beta-caroteno/dia, durante 2 a 4 meses, não induziu qualquer alteração significativa nos níveis do LDL, do CT, nem do HDL ¹⁶⁷⁵. Resultados semelhantes foram obtidos em indivíduos saudáveis dislipidémicos e em doentes coronários ^{1666 1674}. Num outro estudo realizado em hemodializados e já comentado, a Vit C, nas doses de 200 mg/dia, induziu uma redução significativa nos níveis do LDL e da relação LDL/HDL ($p < 0,05$) ¹⁶⁷³. Em 120 homens e mulheres saudáveis, a Vit C, a Vit E e a associação das duas, conseguiram reduções significativas ($p < 0,001$) nos níveis do LDL e do CT ¹⁶⁷⁰.

O efeito obtido pelas vitaminas antioxidantes na concentração dos triglicéridos, uma redução significativa, não sendo como vimos inédito, foi de alguma forma inesperado particularmente no que se refere à sua magnitude, sobreponível à conseguida com os hipolipemiantes. Sendo a concentração destas lipoproteínas muito mais influenciável pelos cuidados higieno-dietéticos de “curto prazo”, não podemos excluir que esta resposta reflecta também o efeito de potenciais correcções do estilo de vida pelos participantes do grupo D.

São em menor número os trabalhos sobre a acção das vitaminas antioxidantes nos níveis dos triglicéridos. Num deles, realizado há muitos anos em dislipidémicos medicados com o clofibrato, a Vit E nas doses de 400 mg/dia, não obteve qualquer efeito significativo nos níveis dos triglicéridos ¹⁶⁷⁶. Em doentes coronários, a Vit E nas doses de 1200 mg/dia, não induziu qualquer alteração nos níveis dos triglicéridos ¹⁶⁷⁴. Resultado diferente foi obtido por um outro estudo realizado em 120 indivíduos saudáveis, com idade superior a 50 anos, em que a Vit E, isoladamente ou associada à Vit C, conseguiu uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis dos triglicéridos séricos ¹⁶⁷⁰.

A terapêutica vitamínica não obteve qualquer efeito significativo a nível da Apo A1 (discreto aumento).

No que diz respeito à acção dos antioxidantes sobre a ApoA1, os resultados da literatura nem sempre são concordantes. Como vimos quando

analisámos o comportamento do CHDL, alguns estudos apontam para um papel negativo da Vit E sobre a concentração desta lipoproteína e das apoproteínas a ela associadas. No *HDL-Atherosclerosis Treatment Study* (HATS), que incluiu 160 doentes coronários dos dois sexos, a terapêutica simultânea com a sinvastatina e a niacina provocou um aumento dos níveis das HDL₂ e da ApoA1, respectivamente de 65 e 81%. A associação da Vit E contrariou esta tendência, conduzindo a aumentos de apenas 28% tanto para as HDL₂ como para a ApoA1⁵⁴¹. Estes efeitos obtidos com a associação da Vit E foram significativamente diferentes dos obtidos apenas com os hipolipemiantes ($p < 0,02$ e $0,01$, respectivamente)⁵⁴¹. Num outro estudo, também em doentes coronários e com baixos níveis de CHDL, a associação da sinvastatina com a niacina induziu um aumento selectivo da ApoA1 (64%) nas HDL e do volume destas lipoproteínas. Quando se associou a VitE aos hipolipemiantes, estas acções foram anuladas⁵⁴². Resultados diferentes foram obtidos noutros estudos. Em 127 doentes coronários, sob terapêutica com estatinas, a suplementação diária com 1200 UI de Vit E durante 2 anos, não teve qualquer efeito nas concentrações do CT, do CLDL, do CHDL, dos triglicéridos, nem da ApoA1¹⁶⁷⁴. Em 32 indivíduos saudáveis dos dois sexos, o alfa-tocoferol nas doses de 268 mg/dia, durante 28 dias, induziu um significativo aumento da ApoA1 ($p < 0,01$)¹⁶⁷⁷. Ainda num outro trabalho realizado em 69 diabéticos tipo 2, a associação de Mg, Zn, Vit C e Vit E, durante 3 meses, aumentou significativamente os níveis do CHDL e da ApoA1 (24%; $50,4 \pm 19,3$ mg/dl versus $40,6 \pm 10,8$ mg/dl e 8.8%; $169,8 \pm 33,8$ mg/dl versus $156,1 \pm 23,9$ mg/dl, respectivamente, $P < 0,01$)¹⁶⁷⁸. Uma referência a um trabalho em babuínos, em que a Vit E para além de aumentar o TAS e reduzir as OxLDL, aumentou a concentração da ApoA1 mas reduziu o volume das HDL. Os autores explicaram este resultado, aparentemente contraditório, com o facto da concentração das HDL₂, contrariamente à da ApoA1, ser influenciada essencialmente por mecanismos genéticos¹⁶⁷⁹.

Também a Apo B100 não mostrou qualquer alteração com as Vit(s) E e C. A literatura consultada foi pobre na referência a trabalhos que avaliassem especificamente a acção da Vit E e/ou Vit C sobre a ApoB100. Num trabalho já citado e realizado em 69 hipercolesterolémicos, a Vit E na dose de 500 UI/dia, durante 3 meses, reduziu significativamente os níveis da Apo B100 e aumentou em 17,9% a relação Apo A1/ Apo B100¹⁶⁷². Num outro estudo realizado em

diabéticos tipo 2, a utilização de Mg e Zn, das Vit(s) C e E ou da associação destas com os minerais referidos, não obtiveram qualquer alteração nos níveis da Apo B100¹⁶⁷⁸. Em doentes hemodializados, a utilização durante 6 meses de um concentrado de sumo de uva preta, rico em polifenóis, para além de aumentar a capacidade antioxidativa total do plasma e as concentrações do CHDL e da Apo A1, reduziu as do CLDL e da Apo B100 ($p < 0,05$)¹⁶⁸⁰. Num estudo chinês realizado em 68 indivíduos com AVC isquémico, a utilização de um composto antioxidante, o *Composite Salvia Injection* (CSI), provocou, para além do aumento da SOD e da ApoA1, uma redução significativa da ApoB100 ($p < 0,05$)¹⁶⁸¹.

A Lp(a), manteve-se também inalterada após utilização das vitaminas antioxidantes. Relativamente à acção das Vit(s) E e C, encontrámos poucos trabalhos na revisão que fizemos. Num estudo realizado em 101 homens e mulheres, com idades compreendidas entre os 20 e os 69 anos, o ácido ascórbico, na dose de 1G/dia e durante 8 meses, não provocou qualquer alteração nos valores da Lp(a)¹⁶⁸². Num outro trabalho realizado em 44 doentes coronários dos dois sexos, com menos de 60 anos, a utilização do ácido ascórbico em altas doses (4,5G/dia), durante 12 semanas, também não conduziu a qualquer alteração nos níveis da Lp(a)¹⁶⁸³. Resultados parcialmente diferentes foram obtidos num outro estudo realizado em 124 homens e mulheres saudáveis, entre os 17 e os 74 anos de idade, no qual a Vit C, nas doses de 1 e 2 G/dia, durante um mês, anulou a diferença significativa na concentração da Lp(a) basal, superior nos homens que consumiam mais de 50 G álcool /dia¹⁶⁸⁴.

17.6 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante

17.6.1 - Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina

No Quadro 6 está indicada a evolução manifestada ao longo do estudo, pela transferrina e pela ceruloplasmina

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P	
Transf1	D	38	2,8829	0,42895	0,06959	2,7419	3,0238	0,094
	C	6	3,3783	1,51070	0,61674	1,7930	4,9637	
Transf2	D	38	2,9453	0,45008	0,07301	2,7973	3,0932	0,149
	C	6	3,3783	1,51070	0,61674	1,7930	4,9637	
Transf3	D	38	2,627	0,3908	0,0634	2,498	2,755	0,010
	C	6	3,378	1,5107	0,6167	1,793	4,964	
Cerulop1	D	38	0,3497	0,07235	0,01174	0,3260	0,3735	0,000
	C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	
Cerulop2	D	38	0,3761	0,11054	0,01793	0,3397	0,4124	0,001
	C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	
Cerulop3	D	38	0,2684	0,05233	0,00849	0,2512	0,2856	0,717
	C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	

Quadro 6
(Transferrina e Ceruloplasmina)

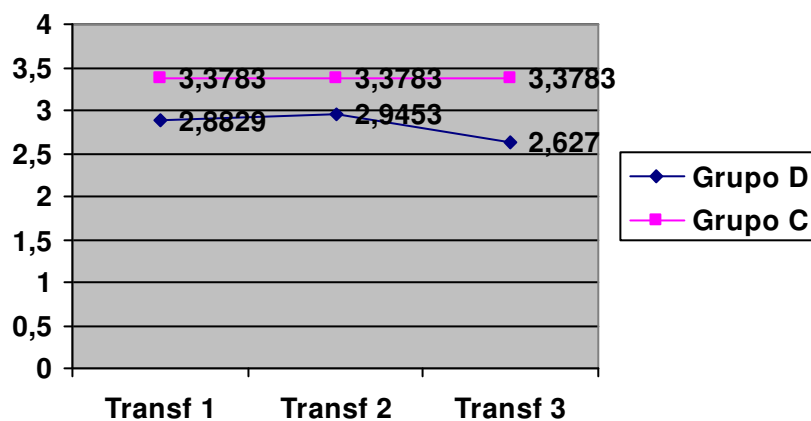


Gráfico 12

A transferrina (Quadro 6 e Gráfico 12) apresentou uma concentração sérica basal inferior, embora não significativamente, no grupo dos dislipidémicos ($p=0,094$). Manteve-se inalterada com a terapêutica vitamínica ($p=0,369$) e apresentou uma redução de 10,8% ($p=0,000$) com os hipolipemiantes. Relativamente aos controlos, os níveis do grupo D foram significativamente inferiores na última avaliação ($p=0,010$).

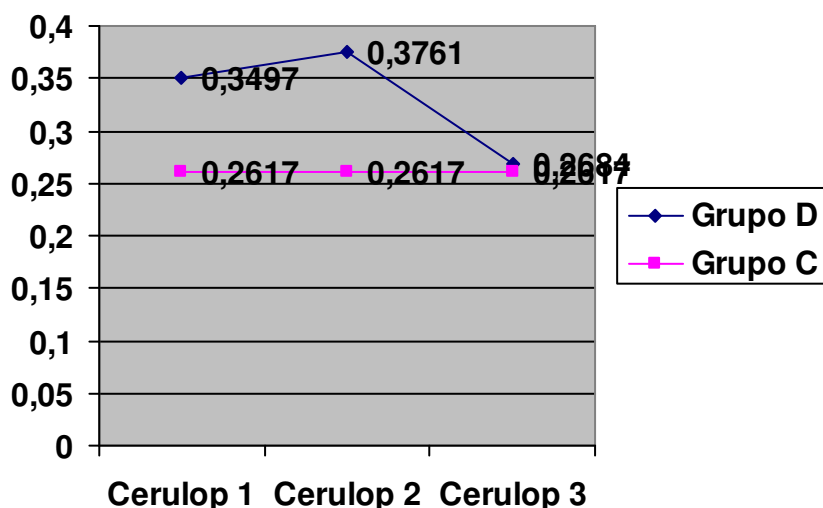


Gráfico 13

Em relação à ceruloplasmina (Quadro 6 e Gráfico 13) e tal como vimos no capítulo anterior, o grupo D apresentou uma concentração basal significativamente superior à do grupo C ($p=0,000$). A terapêutica com as vitaminas E e C induziu um aumento de 7,54% ($p=0,019$) nos seus níveis e os hipolipemiantes reduziram a sua concentração em 28,63% ($p=0,000$), tornando-a praticamente sobreponível à dos controlos.

17.6.2 - Vitamina E, "Total Radical-trapping Antioxidant Parameter" e LDL oxidadas no Plasma

Quanto aos resultados obtidos para a Vit E estes estão indicados no quadro 7 e nos gráficos 14, 15 e 16.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%	P	
Vit E 1	D	37	56,841	24,4107	4,0131	48,702 64,979	0,000
	C	12	28,479	3,3984	0,9810	26,320 30,638	
Vit E 2	D	37	70,291	29,1731	4,7960	60,565 80,018	0,000
	C	12	28,479	3,3984	0,9810	26,320 30,638	
Vit E 3	D	37	45,3084	14,50729	2,38498	40,4714 50,1453	0,000
	C	12	28,4792	3,39837	0,98102	26,3199 30,6384	

VitETG1	D	37	24,918	10,8540	1,7844	21,299	28,536	0,101
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitETG2	D	35	36,849	19,1639	3,2393	30,266	43,432	0,003
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitETG3	D	37	26,608	11,5494	1,8987	22,757	30,459	0,044
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitE/TG+LDL 1	D	36	7,317	1,4318	0,2386	6,832	7,801	0,106
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
VitE/TG+LDL 2	D	28	9,961	2,9152	0,5509	8,831	11,092	0,001
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
VitE/TG+LDL 3	D	37	7,962	2,0293	0,3336	7,286	8,639	0,032
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	

Quadro 7
(Vitamina E)

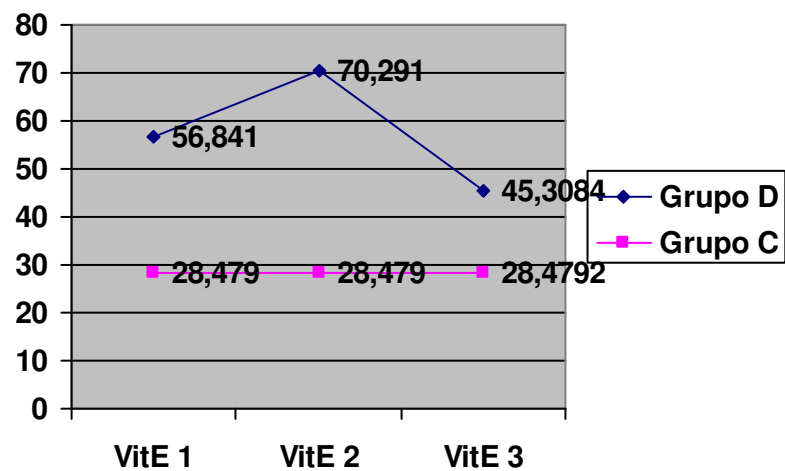


Gráfico 14

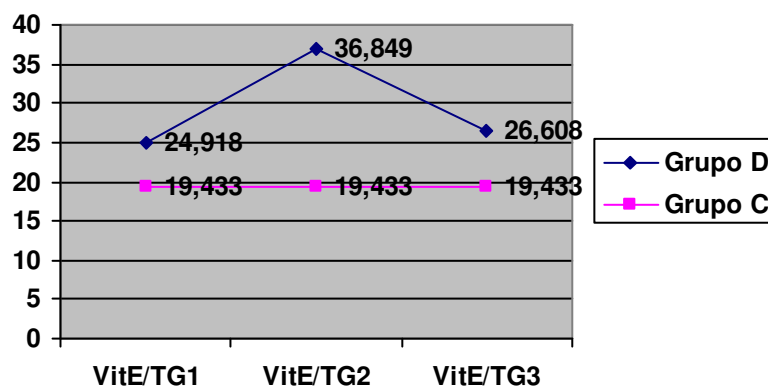


Gráfico 15

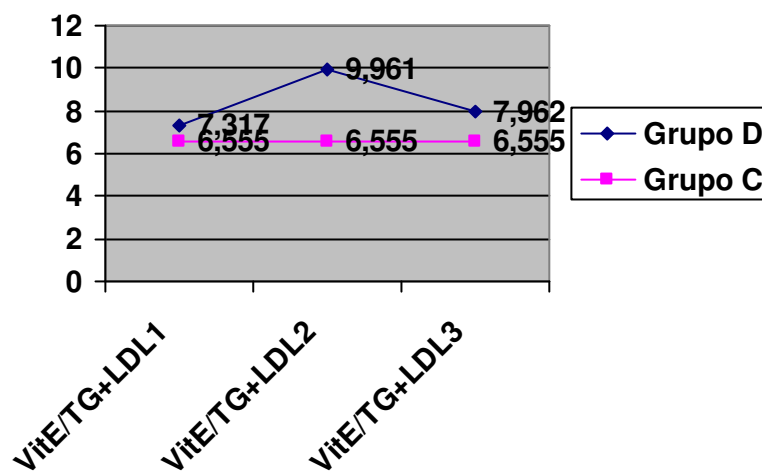


Gráfico 16

Como se pode ver no quadro 7 e no gráfico 14, no grupo D verificou-se um aumento esperado nos níveis da Vit E plasmáticos após suplementação com esta vitamina, mantendo-se ao longo do estudo significativamente mais elevados do que os do grupo C ($p=0,000$). As vitaminas antioxidantes induziram um aumento de 23,66% ($p=0,000$) e os hipolipemiantes uma redução de 35,54% ($p=0,000$) (Gráfico 14).

Como vimos no capítulo anterior a capacidade antioxidativa associada à Vit E será mais fielmente traduzida pela relação entre esta vitamina e as diferentes lipoproteínas. Tal como para a concentração sérica da Vit E, verificou-se na segunda avaliação um aumento das relações do α -tocoferol com os triglicérideos (47,88%; $p=0,000$) (Gráfico 15), que se mantiveram superiores no grupo dos dislipidémicos relativamente aos controlos ($p=0,101$ e $0,003$,

respectivamente na primeira e segunda avaliação) e da relação Vit E/TG+CLDL (36,13%; $p=0,000$), também mais elevados no grupo D ($p=0,106$ e $0,001$, respectivamente na primeira e segunda avaliação) (Gráfico 16). No terceiro e último controlo, em que apenas cerca de metade dos participantes utilizaram suplementos destas vitaminas houve, como vimos já, uma redução dos níveis plasmáticos da VitE para valores inferiores aos basais, mantendo-se no entanto superiores aos controlos ($p=0,000$).

Relativamente aos parâmetros plasmáticos OxLDL e TRAP, os valores obtidos estão apresentados no quadro 8 e nos gráficos 17 e 18.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P	
OxLDL 1	D	37	123,2070	23,18650	3,81184	115,4763	130,9378	0,000
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
OxLDL 2	D	37	116,8027	22,31069	3,66785	108,3639	123,2415	0,000
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
OxLDL 3	D	37	93,7243	14,18053	2,33126	88,9963	98,4523	0,000
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
TRAP 1	D	37	1275,932	184,1305	30,2709	1214,540	1337,324	0,276
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	
TRAP 2	D	37	1323,123	166,5380	27,3787	1267,596	1378,649	0,753
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	
	T	49	1327,270	159,6776	22,8111	1281,405	1373,135	
TRAP 3	D	37	1299,924	162,6517	26,7398	1245,694	1354,155	0,449
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	

Quadro 8
(Oxidação)

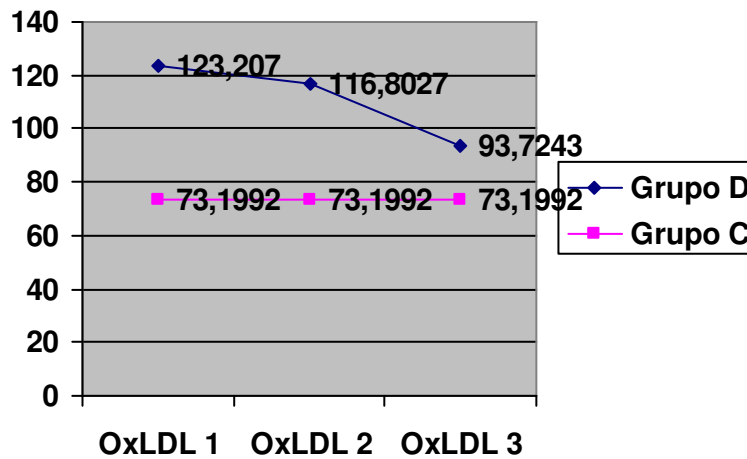


Gráfico 17

Os indivíduos do grupo D mantiveram-se ao longo do estudo com concentrações plasmáticas das OxLDL significativamente superiores às do grupo C ($p=0,000$).

A suplementação com a associação Vit E /C provocou uma redução destas LDL oxidadas (5,19%; $p=0,041$), efeito que se acentuou com a administração dos hipolipemiantes (19,75%; $p=0,000$).

Relativamente à terceira avaliação, em que se verificou uma nova redução das OxLDL, preferimos abordar estes resultados quando analisarmos a acção separada das estatinas e do fibrato.

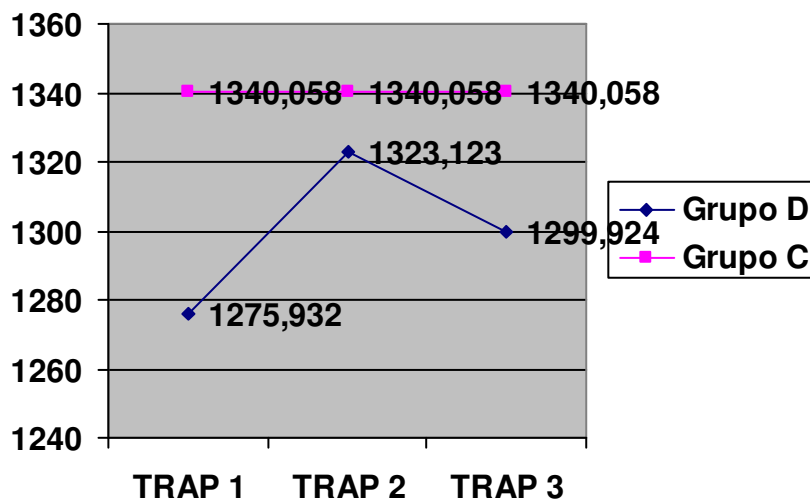


Gráfico 18

Como foi dito em capítulo anterior, o TRAP – *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter* - mede a capacidade do plasma de proceder à captação dos radicais e neutralizar outros oxidantes, traduzindo de uma forma indirecta a resistência à acção peroxidativa. Este marcador que ao longo de todo o estudo, se mostrou sempre inferior nos indivíduos do grupo D, embora sem significado estatístico ($p=0,276$, $0,753$ e $0,449$, respectivamente da primeira para a última avaliação), aumentou com a administração das vitaminas antioxidantes (3,69%; $p=0,044$), tendo sido reduzido em 1,75% ($p=0,396$) após terapêutica hipolipemiante.

Referimos em capítulo anterior que o ácido úrico é um dos principais responsáveis pela capacidade antioxidativa plasmática⁷⁴⁹. Como se vê no gráfico 19, os níveis de urato apresentaram uma redução progressiva ao longo das três determinações - 4,87% ($p=0,065$) com a terapêutica antioxidante e 1,49% ($p=0,743$) com os hipolipemiantes.

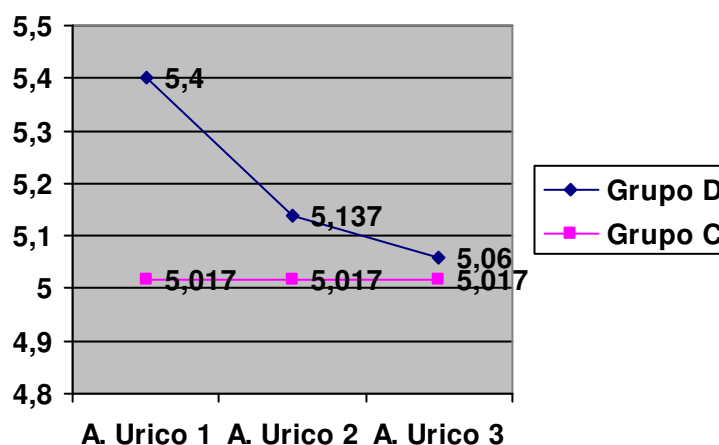


Gráfico 19

17.6.3 - Resumo e comentários

Não se verificou qualquer alteração nos teores séricos de transferrina após terapêutica com as Vit(s) E e C. Em mulheres com ferropenia, a administração de um suplemento vitamínico, que incluiu a Vit E e a Vit C, induziu um aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis da ferritina. Relativamente à transferrina, não encontramos qualquer referência¹⁶⁸⁵.

Os níveis séricos da ceruloplasmina aumentaram significativamente com a terapêutica vitamínica. Não encontramos na literatura trabalhos que se tenham debruçado sobre a possível relação entre a terapêutica com as Vit(s) E, C e/ou outros antioxidantes e os níveis da ceruloplasmina. Apenas num artigo, já de 1998, terá sido demonstrado um efeito “estabilizador” da ceruloplasmina com a utilização da Vit E. Como o artigo está escrito em russo, não conseguimos especificar o significado do termo “estabilizar”¹⁶⁸⁶!

A administração do α -tocoferol e do ácido ascórbico induziu aumentos significativos dos níveis séricos da vitamina E e talvez mais importante, da sua relação com as lipoproteínas. Como já defendemos, a capacidade antioxidativa do α -tocoferol será melhor traduzida pela relação entre esta vitamina e as fracções lipídicas do que pelos seus níveis séricos, muito influenciados pela concentração das lipoproteínas. A redução da concentração da Vit E após terapêutica hipolipemiante resultou muito provavelmente, para além do menor número de participantes suplementados, da redução da concentração dos triglicéridos e do CLDL induzida pelos hipolipemiantes. De acordo com esta nossa explicação esteve o facto da relação entre as concentrações do α -tocoferol com os triglicéridos e com os triglicéridos+CLDL, apesar da redução verificada, relativamente à segunda avaliação, respectivamente de 27,79% ($p=0,001$) e 20,06% ($p=0,008$), se terem mantido em níveis superiores aos basais.

Os nossos resultados estiveram de acordo com os de um estudo realizado em 96 doentes com AVC isquémico nas últimas 12 horas, em que a administração, durante 14 dias, de 800 UI/dia de Vit E e 500 mg/dia de Vit C, associadas ou não a vitaminas do grupo B, originou um aumento significativo nas concentrações plasmáticas das vitaminas E e C¹⁶⁸⁷.

De acordo com esta evolução estiveram os níveis séricos das OxLDL, inicialmente mais elevadas no grupo D, apesar da concentração sérica significativamente superior da Vit E nestes indivíduos e que viram a sua concentração reduzida, primeiro com a terapêutica antioxidante e depois com a hipolipemiante. A acção dos antioxidantes sobre a oxidabilidade das LDL era esperada e esteve de acordo com os resultados de diversos estudos, em que a oxidação das LDL foi significativamente reduzida com o α -tocoferol em doses iguais ou superiores a 400 UI/dia^{481 482 1688}. No entanto estes resultados não são

corroborados por toda a literatura. Enquanto alguns trabalhos questionam a determinação das OxLDL como avaliador da acção antioxidante, preferindo a utilização de outros marcadores da oxidação, como os isoprostanos^{373 378 379}, outros, apesar do aumento significativo dos seus níveis plasmáticos, não encontraram qualquer acção da Vit E em indivíduos saudáveis nem da Vit C em hipercolesterolémicos^{1689 1690}.

Relativamente ao TRAP, com valores basais mais baixos nos dislipidémicos, apresentou uma significativa elevação dos seus níveis com a terapêutica vitamínica. Estes dados estão de acordo com uma maior protecção antioxidativa do plasma veiculada pela administração das vitaminas E e C.

Relativamente ao terceiro e último controlo do estudo, verificou-se uma discreta redução deste parâmetro, devendo-se muito provavelmente à redução concomitante nos níveis da Vit E e eventualmente à variação de outros componentes do plasma. Referimos em capítulo anterior que o ácido úrico é um dos principais responsáveis pela capacidade antioxidativa plasmática⁷⁴⁹. Os níveis de urato apresentaram uma redução progressiva ao longo das três determinações, embora não significativa, primeiro com as vitaminas antioxidantes e depois com os hipolipemiantes, podendo ter contribuído para a redução não significativa do TRAP no último controlo. Apesar desta evolução, a concentração das OxLDL manteve a tendência descendente, que poderá dever-se à acção dos hipolipemiantes a nível do CLDL e a uma actividade antioxidante intrínseca destes fármacos. De recordar também que apenas cerca de metade dos indivíduos foram medicados com as vitaminas E e C, associadamente às estatinas ou ao fibrato, o que poderá justificar os valores da última determinação.

O aumento do TRAP com as vitaminas antioxidantes acompanhou-se de uma redução paralela das OxLDL.

17.7 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios

17.7.1 - hsPCR e AAT

No quadro 9 estão descritos os valores da hsPCR (mg/dl) e da AAT (g/l).

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
PCR1	D	38	0,3524	0,31156	0,05054	0,2500 0,4548	0,763
	C	12	0,3208	0,32191	0,09293	0,1163 0,5254	
PCR2	D	38	0,4153	0,46209	0,07496	0,2634 0,5671	0,514
	C	12	0,3208	0,32191	0,09293	0,1163 0,5254	
PCR3	D	37	0,64	1,455	0,239	0,15 1,12	0,462
	C	12	0,32	0,322	0,093	0,12 0,53	
AAT1	D	38	1,269	0,2800	0,0454	1,177 1,362	0,980
	C	12	1,272	0,1970	0,0569	1,147 1,397	
AAT2	D	38	1,305	0,2760	0,0448	1,215 1,396	0,698
	C	12	1,272	0,1970	0,0569	1,147 1,397	
AAT3	D	38	1,1695	0,26148	0,04242	1,0835 1,2554	0,220
	C	12	1,2717	0,19697	0,05686	1,1465 1,3968	

Quadro 9
(hsPCR e AAT)

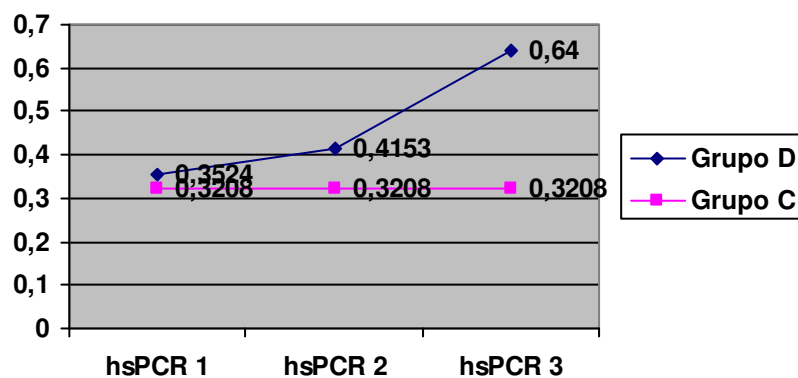


Gráfico 20

Da observação do quadro 9 e do gráfico 20, verifica-se que, para além dos valores de hsPCR basais aumentados em todos os participantes, atribuindo-lhes um elevado risco cardiovascular e discretamente mais elevados nos indivíduos D, existiu um aumento inesperado desta proteína após terapêutica com as vitaminas antioxidantes e particularmente com os hipolipemiantes. Da análise individual dos nossos dislipidémicos, verificámos haver seis deles que, no início ou após terapêutica, apresentavam valores da hsPCR muito superiores

a 10 mg/L. Como já referido, a maior parte da literatura consultada considera que valores desta ordem de grandeza não podem ser aceites como marcadores/factores de risco da doença vascular, devendo ser atribuídos a outras causas, nomeadamente infecciosas, doenças do tecido conjuntivo ou neoplásicas. Optámos assim por fazer uma nova análise do comportamento da hsPCR, retirando os participantes com valores desta proteína superiores a 10 mg/L. O quadro 10 e o gráfico 21 representam os resultados desta nova avaliação .

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
PCR D	32	0,2806	0,19427	0,3434	0,2106	0,3507	0,597
C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	
PCR D	32	0,2981	0,22034	0,03895	0,2187	0,3776	0,478
C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	
PCR D	31	0,1958	0,16421	0,02949	0,1356	0,2560	0,424
C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	

Quadro 10
(hsPCR)

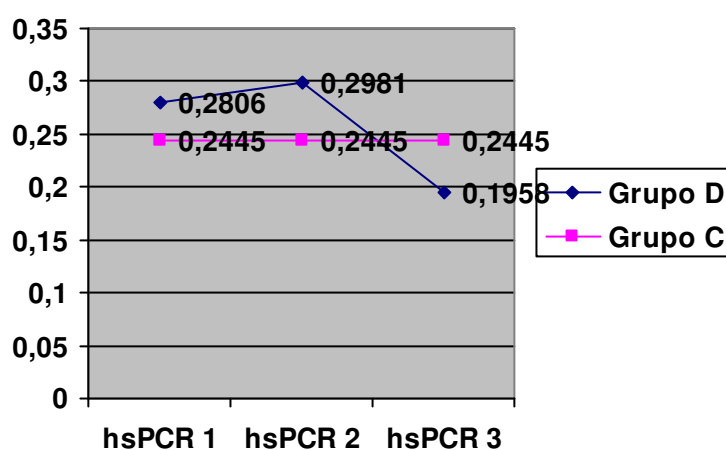


Gráfico 21

Verificou-se em todos os participantes uma redução dos valores médios da hsPCR (Quadro 10 e Gráfico 21), que se mantiveram nas duas primeiras avaliações não significativamente superiores nos indivíduos do grupo D ($p=0,597$

e 0,478). Houve uma resposta nula aos antioxidantes ($p=0,479$), mas a terapêutica hipolipemiante originou uma redução de 34,31% ($p=0,000$) na concentração desta proteína de fase aguda, que apresentou na última determinação concentrações inferiores, embora não significativamente, às do grupo C ($p=0,424$).

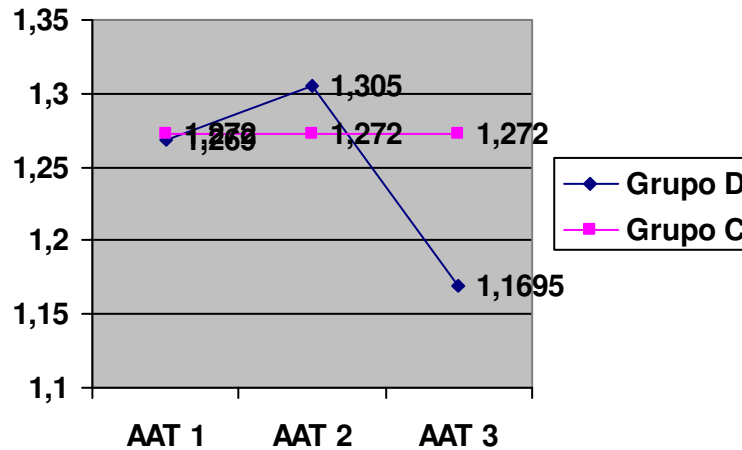


Gráfico 22

A AAT1 (Quadro 9 e Gráfico 22), com valores basais perfeitamente sobreponíveis nos dois grupos de participantes ($p=0,980$), apresentou uma discreta elevação com as vitaminas antioxidantes ($p=0,121$) e uma significativa redução de 10,83% ($p=0,002$) após terapêutica hipolipemiante, apresentando no fim do estudo uma concentração não significativamente inferior à do grupo C ($p=0,220$).

17.7.2 – Interleucinas

No Quadro 11 apresentam-se os valores, em pg/ml, das concentrações das interleucinas avaliadas.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%	P
IL61 D	37	2,17332	1,500875	0,246742	1,67291 2,67374	0,029
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589 1,69777	

IL6 2 D	37	2,18462	1,715629	0,282048	1,61260	2,75664	
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589	1,69777	0,049
IL6 3 D	36	2,92739	1,323012	0,220502	2,47975	3,37503	
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589	1,69777	0,000
IL8 1 D	37	41,99143	116,673731	19,181043	3,09047	80,89239	
C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,109
IL8 2 D	37	19,14289	27,415868	4,507141	10,00199	28,28380	
C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,000
IL8 3 D	36	36,89681	36,686561	6,114427	24,48386	49,30975	
C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,002
IL18 1 D	37	352,56800	483,038920	79,411109	191,51481	513,62119	
C	12	854,42767	577,429103	166,68942	487,54672	1221,3086	0,005
IL18 2 D	37	332,54373	378,655294	62,250547	206,29377	458,79369	
C	12	854,42767	577,429103	166,68942	487,54672	1221,3086	0,001
IL18 3 D	36	488,52697	507,485707	84,580951	316,81851	660,23543	
C	12	854,42767	577,429103	166,68942	487,54672	1221,3086	0,042
INFga1D	37	27,86722	8,775837	1,442739	24,94121	30,79323	
C	12	25,79667	10,359777	2,990610	19,21438	32,37895	0,500
INFga2D	37	27,24768	7,943949	1,305977	24,59903	29,89632	
C	12	25,79667	10,359777	2,990610	19,21438	32,37895	0,613
INFga3D	36	28,9693	8,22996	1,37166	26,1847	31,7540	
C	12	25,7967	10,35978	2,99061	19,2144	32,3790	0,284
VEGF1D	37	208,78089	180,131351	29,613412	148,72211	268,83967	
C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,552
VEGF2D	37	221,43570	136,202124	22,391491	176,02365	266,84775	
C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,302
VEGF3D	36	239,65000	168,260144	28,043357	182,71896	296,58104	
C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,229

Quadro 11
(Interleucinas)

Iremos analisar de seguida o comportamento das diferentes interleucinas relativamente à acção das vitaminas E e C, preferindo mais uma vez deixar os comentários sobre a resposta aos hipolipemiantes para quando procedermos à análise de cada uma das classes em particular.

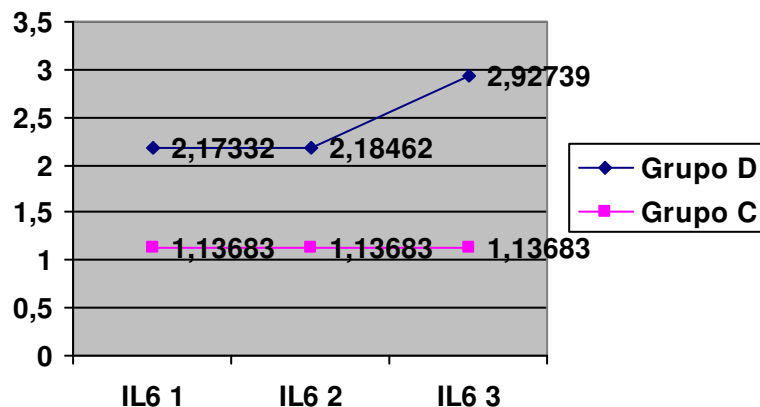


Gráfico 23

A IL6 (Quadro 11 e Gráfico 23), manteve-se inalterada com as vitaminas antioxidantes ($p=0,966$). Relativamente aos valores do grupo controlo, os indivíduos do grupo D apresentaram valores significativamente superiores nas duas primeiras avaliações ($p=0,029$ e $0,049$), atingindo maior significado na última ($p=0,000$), depois de um significativo aumento ($p=0,028$) com os hipolipemiantes.

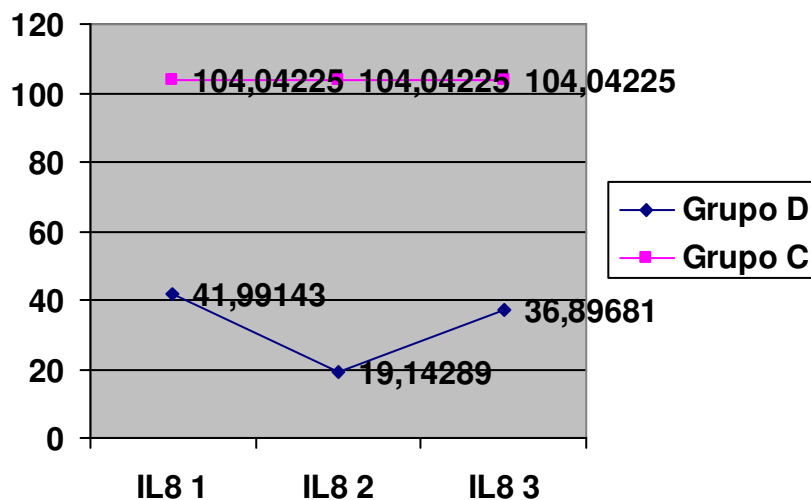


Gráfico 24

A IL8 nos indivíduos do grupo D (Quadro 11 e Gráfico 24), manteve-se com valores plasmáticos inferiores aos do grupo controlo, na primeira avaliação sem significado estatístico ($p=0,109$), tendo este sido atingido nas duas últimas

($p=0,000$ e $0,002$). Esta citocina viu reduzida a sua concentração com a terapêutica antioxidante em 54,41% ($p=0,250$), redução parcialmente anulada na terceira e última avaliação devido a um aumento de 92,74% ($p=0,022$) com a terapêutica hipolipemiante.

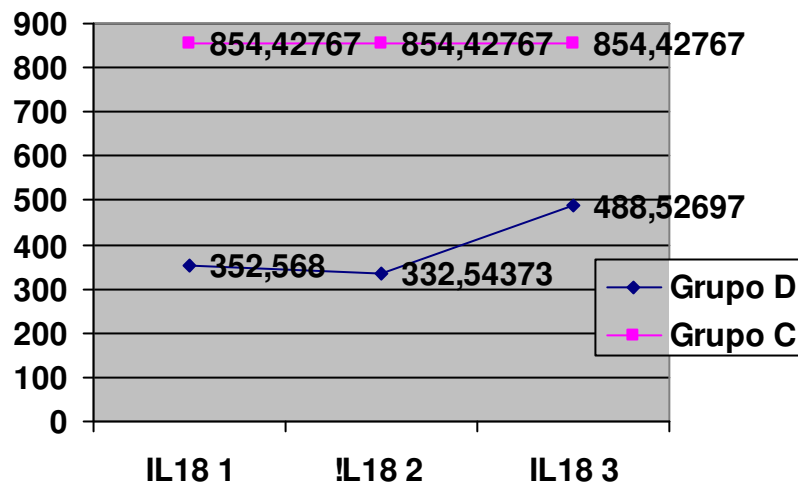


Gráfico 25

A IL18 (Quadro 11 e Gráfico 25) apresentou concentrações plasmáticas significativamente inferiores nos indivíduos D, sendo essa diferença mais acentuada nas duas primeiras avaliações ($p=0,005$ e $0,001$), atenuando-se após terapêutica hipolipemiante ($p=0,042$).

As vitaminas E e C induziram uma discreta e não significativa redução desta citocina ($p=0,783$), enquanto que as estatinas e o fibrato provocaram uma elevação, igualmente não significativa ($p=0,168$), da sua concentração.

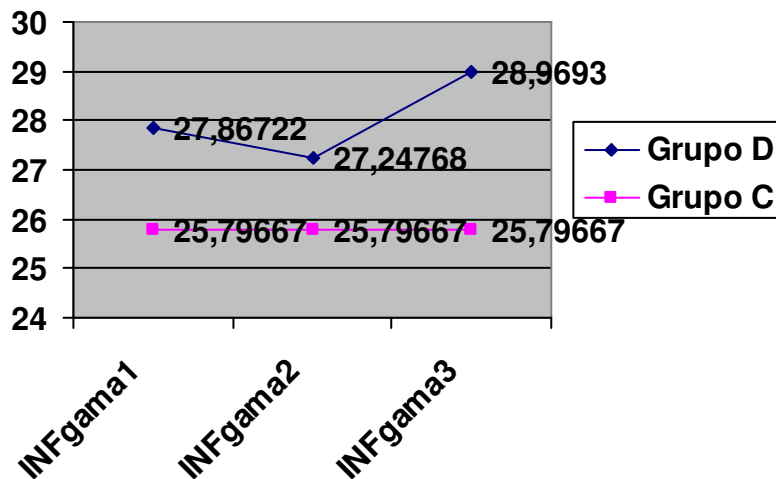


Gráfico 26

As concentrações do INFgama (Quadro 11 e Gráfico 26) foram sistemática e não significativamente superiores nos nossos dislipidémicos, relativamente ao grupo C ($p=0,500$, $0,613$ e $0,284$, da primeira para a última avaliação). Verificou-se uma redução muito discreta com a terapêutica vitamínica ($p=0,690$) e um igualmente discreto aumento com os hipolipemiantes ($p=0,239$).

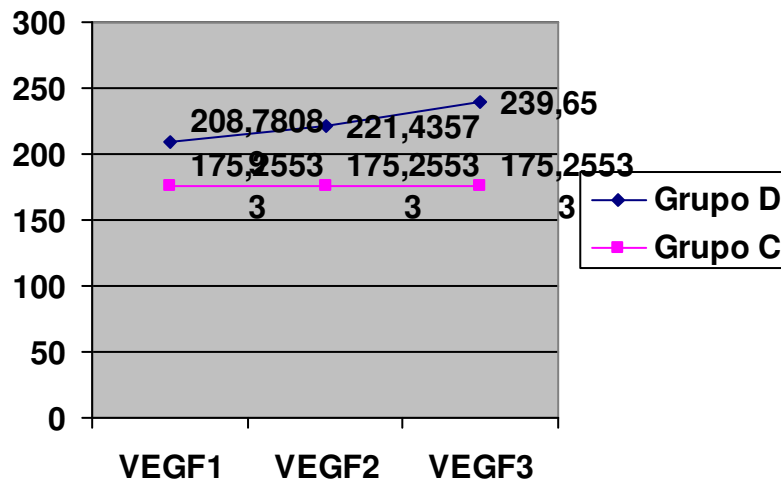


Gráfico 27

O VEGF (Quadro 11 e Gráfico 27) apresentou-se ao longo de todo o estudo, não significativamente mais elevado nos indivíduos D ($p=0,552$, $0,302$ e $0,229$, respectivamente na primeira, segunda e terceira avaliação). Os seus

valores sofreram um discreto aumento com a terapêutica antioxidante ($p=0,545$) e hipolipemiante (0,578).

17.7.3 – Populações Linfocitárias

O quadro 12 apresenta, em percentagem, as determinações das populações linfocitárias através da utilização de anticorpos monoclonais específicos dos diferentes *clusters de diferenciação* – CD(s).

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Interv Confiança 95%		P
CD3 1	D	37	73,508	7,5188	1,2361	71,001	76,015	0,240
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329	80,438	
CD3 2	D	37	74,297	7,7317	1,2711	71,719	76,875	0,403
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329	80,438	
CD3 3	D	36	74,519	7,7538	1,2923	71,896	77,143	0,457
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329	80,438	
CD4 1	D	37	40,300	7,6530	1,2582	37,748	42,852	0,026
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056	51,411	
CD4 2	D	37	41,276	7,4602	1,2264	38,788	43,763	0,056
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056	51,411	
CD4 3	D	36	43,817	8,4607	1,4101	40,954	46,679	0,392
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056	51,411	
CD8 1	D	37	23,900	6,2737	1,0314	21,808	25,992	0,783
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876	29,124	
CD8 2	D	37	24,249	6,8547	1,1269	21,963	26,534	0,914
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876	29,124	
CD8 3	D	36	23,517	7,8577	1,3096	20,858	26,175	0,704
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876	29,124	
CD19 1	D	37	12,62	4,177	0,687	11,23	14,01	0,945
	C	12	12,72	3,879	1,120	10,25	15,18	
CD19 2	D	37	12,624	4,5969	0,7557	11,092	14,157	0,950
	C	12	12,717	3,8788	1,1197	10,252	15,181	
CD19 3	D	36	11,086	4,0032	0,6672	9,732	12,441	0,225
	C	12	12,717	3,8788	1,1197	10,252	15,181	

CD56 1	D	37	13,589	6,6275	1,0896	11,379	15,799	0,196
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	
CD56 2	D	37	12,992	7,3470	1,2078	10,542	15,441	0,352
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	
CD56 3	D	36	14,353	7,2406	1,2068	11,903	16,803	0,128
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	
CD56CD8 1	D	37	6,035	3,2411	0,5328	4,955	7,116	0,244
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	
CD56CD8 2	D	37	5,368	3,3978	0,5586	4,235	6,500	0,617
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	
CD56CD8 3	D	36	5,236	3,6803	0,6134	3,991	6,481	0,725
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	
DN 1	D	37	3,089	2,1216	0,3488	2,382	3,797	0,275
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	
DN 2	D	37	3,386	2,3299	0,3830	2,610	4,163	0,522
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	
DN 3	D	36	4,319	2,5807	0,4301	3,446	5,193	0,605
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	
CD25 1	D	37	11,076	3,0142	0,4955	10,071	12,081	0,108
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	
CD25 2	D	37	11,024	3,0849	0,5072	9,996	12,053	0,104
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	
CD25 3	D	36	9,575	2,6728	0,4455	8,671	10,479	0,001
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	
CD26 1	D	37	39,41	11,317	1,861	35,64	43,18	0,050
	C	12	46,99	11,392	3,289	39,75	54,23	
CD26 2	D	37	41,792	8,7709	1,4419	38,868	44,716	0,104
	C	12	46,992	11,3920	3,2886	39,754	54,230	
CD26 3	D	36	44,928	9,0992	1,5165	41,849	48,007	0,526
	C	12	46,992	11,3920	3,2886	39,754	54,230	
CD25CD3 1	D	37	8,408	2,0973	0,3448	7,709	9,107	0,016
	C	12	10,200	2,3460	0,6772	8,709	11,691	
CD25CD3 2	D	37	8,72	2,467	0,406	7,90	9,54	0,074
	C	12	10,200	2,346	0,677	8,71	11,69	
CD25CD3 3	D	36	7,308	2,2430	0,3738	6,549	8,067	0,000
	C	12	10,200	2,3460	0,6772	8,709	11,691	
CD26CD3 1	D	37	36,922	11,2472	1,8490	33,172	40,672	

	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	0,038
CD26CD3 2	D	37	39,276	8,8056	1,4476	36,340	42,212	
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	0,080
CD26CD3 3	D	36	42,272	8,9863	1,4977	39,232	45,313	
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	0,415
CD25CD26CD3 1	D	37	5,157	1,7321	0,2848	4,579	5,734	
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	0,000
CD25CD26CD3 2	D	37	5,754	2,3009	0,3783	4,987	6,521	
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	0,013
CD25CD26CD3 3	D	36	4,853	1,7569	0,2928	4,258	5,447	
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	0,000
CCR5 1	D	35	2,234	1,2943	0,2188	1,790	2,679	
	C	12	2,942	2,3666	0,6832	1,438	4,445	0,199
CCR5 2	D	37	3,09	2,090	0,344	2,39	3,78	
	C	12	2,94	2,367	0,683	1,44	4,45	0,841
CCR5 3	D	36	5,02	5,090	0,848	3,30	6,74	
	C	12	2,94	2,367	0,683	1,44	4,45	0,181
CCR5CD3 1	D	35	1,603	1,0537	0,1781	1,241	1,965	
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	0,279
CCR5CD3 2	D	37	1,989	1,2076	0,1985	1,587	2,392	
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	0,947
CCR5CD3 3	D	36	3,533	3,7704	0,6284	2,258	4,809	
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	0,181
CCR5CD4 1	D	35	1,069	0,7688	0,1299	0,804	1,333	
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	0,867
CCR5CD4 2	D	37	1,146	0,7186	0,1181	0,906	1,386	
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	0,624
CCR5CD4 3	D	36	2,344	3,1657	0,5276	1,273	3,416	
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	0,162
HLADR 1	D	37	26,489	7,7643	1,2764	23,900	29,078	
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	0,014
HLADR 2	D	37	24,749	7,3576	1,2096	22,295	27,202	
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	0,059
HLADR 3	D	36	23,517	4,5950	0,7658	21,962	25,071	
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	0,049
HLADRCD4 1	D	37	7,722	3,8419	0,6316	6,441	9,003	
	C	12	4,508	3,7833	1,0922	2,105	6,912	0,015

HLADRC4 2	D	37	7,31	2,943	0,484	6,33	8,29	
	C	12	4,51	3,783	1,092	2,10	6,91	0,010
HLADRC4 3	D	36	6,89	2,273	0,379	6,13	7,66	
	C	12	4,51	3,783	1,092	2,10	6,91	0,011
HLADRC8h 1	D	37	4,486	1,9518	0,3209	3,836	5,137	
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	0,001
HLADRC8h 2	D	37	3,995	1,9865	0,3266	3,332	4,657	
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	0,012
HLADRC8h 3	D	36	3,092	1,3048	0,2175	2,650	3,533	
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	0,106
HLADRC8low 1	D	37	1,557	0,9648	0,1586	1,235	1,878	
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	0,027
HLADRC8low 2	D	37	1,305	0,7608	0,1251	1,052	1,559	
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	0,084
HLADRC8low 3	D	36	1,225	0,9060	0,1510	0,918	1,532	
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	0,208
HLADRC8 1	D	37	6,068	2,5047	0,4118	5,232	6,903	
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	0,001
HLADRC8 2	D	37	5,330	2,5177	0,4139	4,490	6,169	
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	0,012
HLADRC8 3	D	36	4,325	1,6657	0,2776	3,761	4,889	
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	0,068
CD95 1	D	37	21,076	11,2630	1,8516	17,320	24,831	
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	0,487
CD95 2	D	37	20,086	10,8877	1,7899	16,456	23,717	
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	0,671
CD95 3	D	36	19,067	11,3641	1,8940	15,222	22,912	
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	0,906
CD95L 1	D	37	2,68	1,690	0,278	2,12	3,24	
	C	12	2,00	1,004	0,290	1,36	2,64	0,194
CD95L 2	D	37	2,649	2,6798	0,4406	1,755	3,542	
	C	12	2,000	1,0036	0,2897	1,362	2,638	0,419
CD95L 3	D	36	2,194	2,0887	0,3481	1,488	2,901	
	C	12	2,000	1,0036	0,2897	1,362	2,638	0,759
CD95CD95L 1	D	37	0,470	0,4169	0,0685	0,331	0,609	
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	0,064
CD95CD95L 2	D	37	0,663	1,0458	0,1719	0,315	1,012	

	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	0,167
CD95CD95L 3	D	36	0,390	0,4596	0,0766	0,234	0,545	
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	0,263
CD3CD95 1	D	37	17,511	10,3625	1,7036	14,056	20,966	
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	0,966
CD3CD95 2	D	37	17,130	9,6671	1,5893	13,907	20,353	
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	0,936
CD3CD95 3	D	36	16,375	9,9882	1,6647	12,995	19,755	
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	0,749
CD3CD95L 1	D	37	1,219	1,2778	0,2101	0,793	1,645	
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	0,400
CD3CD95L 2	D	37	1,187	1,8037	0,2965	0,585	1,788	
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	0,583
CD3CD95L 3	D	36	1,625	1,8653	0,3109	0,994	2,256	
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	0,190
CD62L 1	D	37	60,046	14,3597	2,3607	55,258	64,834	
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	0,087
CD62L 2	D	37	65,114	11,2199	1,8445	61,373	68,854	
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	0,447
CD62L 3	D	36	55,392	8,8647	1,4774	52,392	58,391	
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	0,000
CD3CD62L 1	D	37	43,792	12,8940	2,1198	39,493	48,091	
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	0,066
CD3CD62L 2	D	37	47,916	9,9020	1,6279	44,615	51,218	
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	0,279
CD3CD62L 3	D	36	38,419	7,6911	1,2818	35,817	41,022	
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	0,000
CD4CD62L 1	D	35	31,683	11,1936	1,8921	27,838	35,528	
	C	12	37,583	9,8715	2,8497	31,311	43,855	0,112
CD4CD62L 2	D	37	34,457	8,3911	1,3795	31,659	37,254	
	C	12	37,583	9,8715	2,8497	31,311	43,855	0,288
CD4CD62L 3	D	36	27,08	7,195	1,199	24,64	29,51	
	C	12	37,583	9,872	2,850	31,31	43,86	0,000
CD69 1	D	37	11,705	7,0168	1,1536	9,366	14,045	
	C	12	16,750	4,5900	1,3250	13,834	19,666	0,024
CD69 2	D	37	14,586	5,3833	0,8850	12,792	16,381	
	C	12	16,750	4,5900	1,3250	13,834	19,666	0,217

CD69 3	D	36	13,51	5,782	0,964	11,55	15,47	0,085
	C	12	16,75	4,590	1,325	13,83	19,67	
CD69CD3 1	D	37	5,468	4,2780	0,7033	4,041	6,894	0,003
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	
CD69CD3 2	D	37	7,238	3,4551	0,5680	6,086	8,390	0,037
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	
CD69CD3 3	D	36	7,103	3,5424	0,5904	5,904	8,301	0,032
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	
CD69CD4 1	D	37	3,511	2,8682	0,4715	2,555	4,467	0,008
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	
CD69CD4 2	D	37	4,130	1,8815	0,3093	3,502	4,757	0,006
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	
CD69CD4 3	D	36	4,361	2,8543	0,4757	3,395	5,327	0,066
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	

Quadro 12
(Populações Celulares)

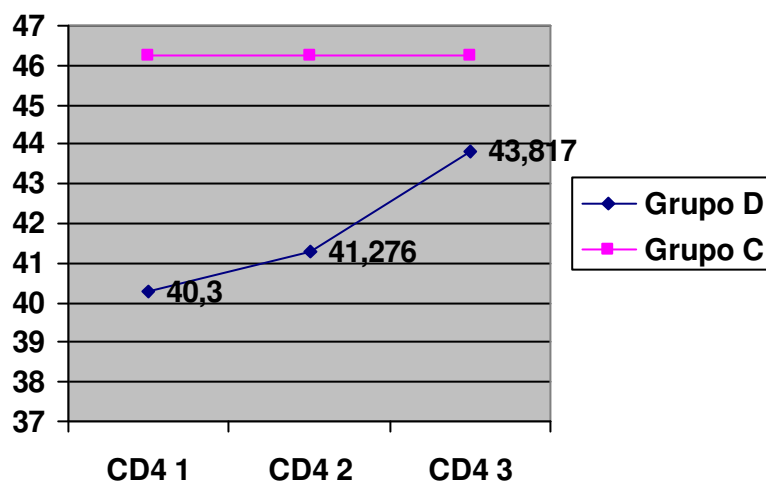


Gráfico 28

Na primeira avaliação as células CD4+ (Quadro 12 e Gráfico 28) encontravam-se, tal como vimos em capítulo anterior, numa percentagem significativamente inferior no grupo D (40,3 versus 46,233; $p=0,026$). Os seus valores percentuais apresentaram uma discreta subida com as vitaminas E e C ($p=0,275$), ficando com uma diferença “borderline” relativamente à avaliação basal do grupo controlo ($p=0,056$) e uma elevação mais pronunciada com os

hipolipemiantes ($p=0,004$), atingindo um valor de 43,817, aproximando-se dos valores do grupo controlo ($p=0,392$).

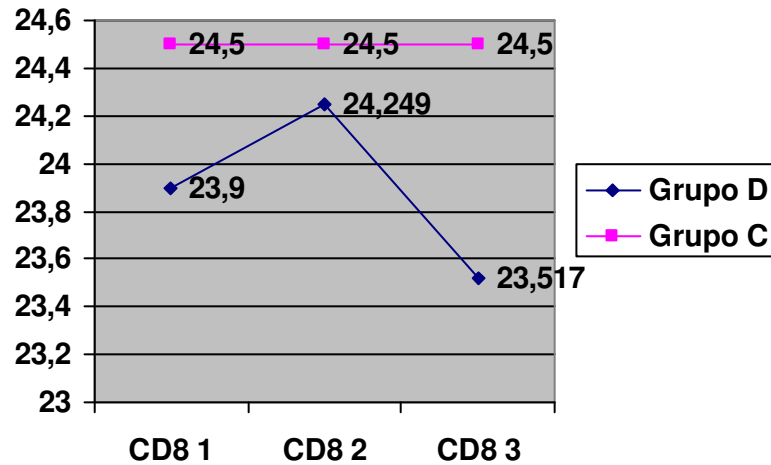


Gráfico 29

As células CD8+ (Quadro 12 e Gráfico 29) encontravam-se no início do estudo em concentrações inferiores nos participantes D mas, ao contrário do verificado com as células CD4+, a diferença não atingiu significado estatístico (23,9 versus 24,5; $p=0,783$). A sua concentração sofreu um ligeiro aumento com as vit(s) E e C ($p=0,525$) e uma posterior redução, igualmente discreta, com os hipolipemiantes ($p=0,320$).

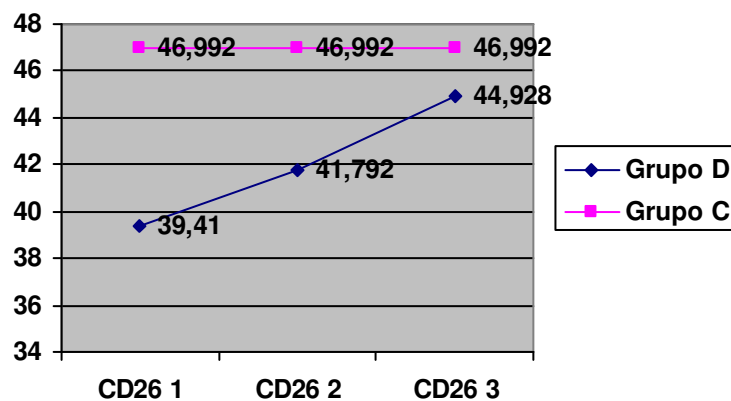


Gráfico 30

A percentagem de células CD26+ (Quadro 12 e Gráfico 30), inicialmente inferior no grupo D ($p=0,05$), apresentou uma discreta elevação com as vitaminas antioxidantes ($p=0,190$) e um aumento de 7,5% ($p=0,023$) com a terapêutica hipolipemiante. Com os aumentos apresentados, a diferença na concentração do CD26 relativamente ao grupo C perdeu significado, com $p=0,104$ e $p=0,526$, respectivamente na segunda e na terceira avaliações.

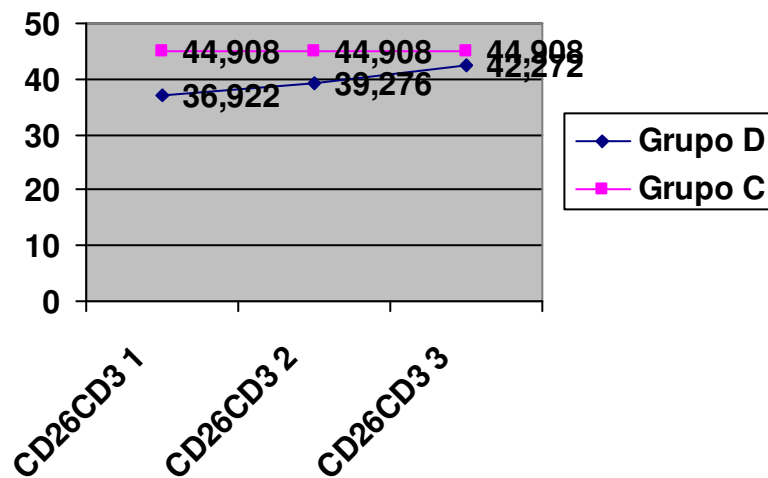


Gráfico 31

As células CD26CD3+ (Quadro 12 e Gráfico 31) apresentaram-se na primeira avaliação em concentrações significativamente inferiores no grupo D ($p=0,038$), com posterior elevação dos seus níveis na segunda (6,37%; $p=0,190$) e terceira avaliações (7,62%; $p=0,020$), aproximando-se dos do grupo C ($p=0,080$ e $p=0,415$, respectivamente no segundo e terceiro controlo).

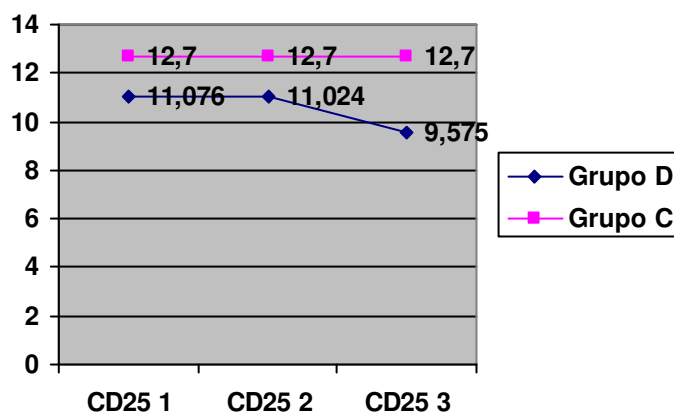


Gráfico 32

Como vimos já, o CD25 (Quadro 12 e Gráfico 32) constitui uma das moléculas do receptor para a IL2 e é um marcador precoce da activação celular. Aparentemente nos nossos dislipidémicos a activação celular estará não significativamente reduzida ($p=0,108$), relativamente aos controlos e não sofreu qualquer alteração com a terapêutica vitamínica.

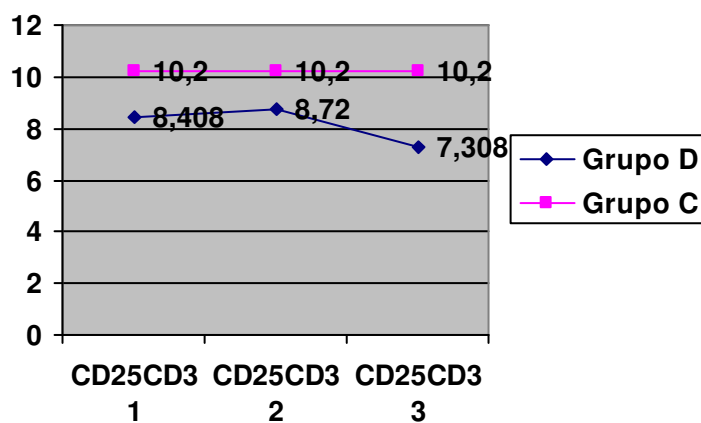


Gráfico 33

Como se pode ver no quadro 12 e no gráfico 33 a percentagem de células CD25CD3+ na primeira avaliação, foi igualmente não significativamente inferior no grupo D ($p=0,16$) tendo apresentado na segunda avaliação um aumento sem significado ($p=0,509$). Posteriormente os seus níveis foram reduzidos com os

hipolipemiantes em 16,19% ($p=0,014$) tornando-se a diferença para o grupo C, novamente significativa ($p=0,000$).

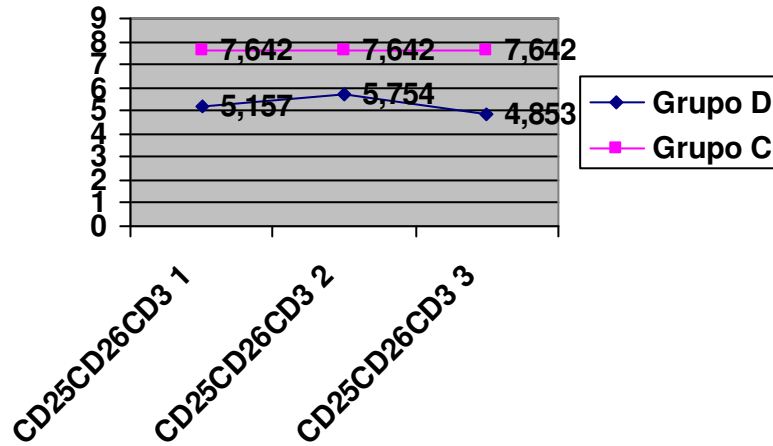


Gráfico 34

A percentagem das células CD25CD26CD3+ (Quadro 12 e Gráfico 34) foi significativamente inferior nos dislipidémicos ao longo de todo o estudo (valor de “p” da primeira para a terceira avaliação, respectivamente de 0,000, 0,013 e 0,000), com uma discreta elevação após terapêutica vitamínica ($p=0,170$) e uma igualmente discreta redução com os hipolipemiantes ($p=0,056$).

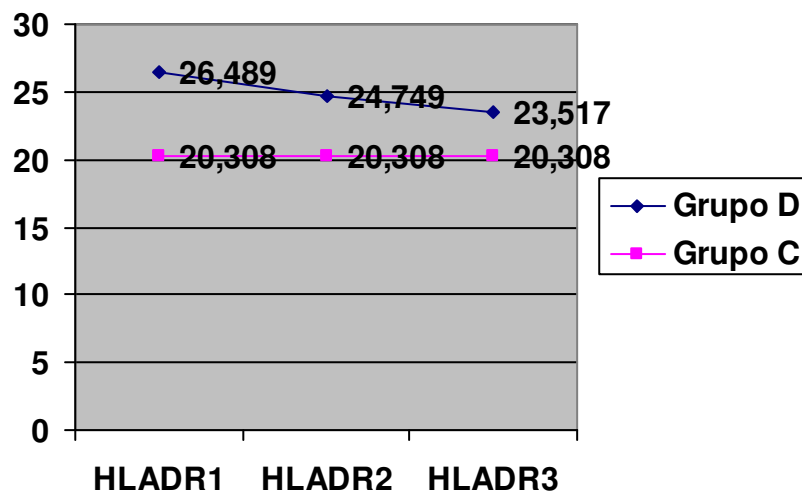


Gráfico 35

Como vimos em capítulo anterior, antes de qualquer terapêutica, a concentração das células HLADR+ (Quadro 12 e Gráfico 35) foi significativamente superior no grupo D ($p=0,014$), apresentando uma progressiva e não significativa redução com a utilização das vitaminas antioxidantes ($p=0,240$) e dos hipolipemiantes ($p=0,324$), aproximando-se dos valores apresentados pelo grupo C (0,049).

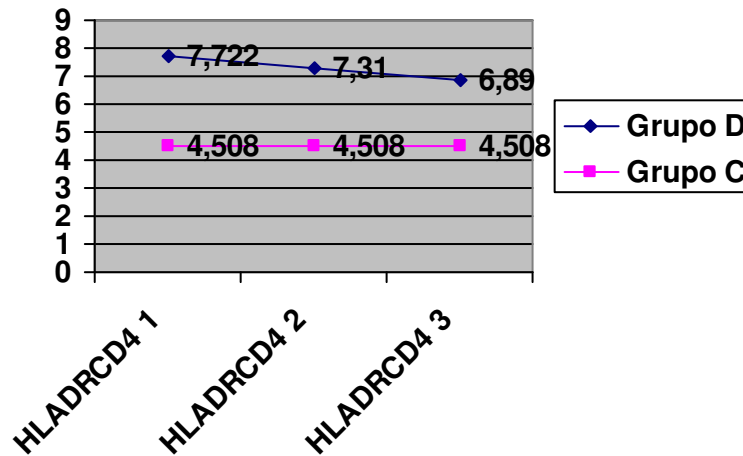


Gráfico 36

Comportamento paralelo apresentaram as células HLADRCDA+ (Quadro 12 e Gráfico 36), com percentagem igualmente superior nos dislipidémicos, na primeira avaliação ($p=0,015$), sofrendo posteriormente uma progressiva e não significativa redução com as terapêuticas vitamínica ($p=0,574$) e hipolipemiante ($p=0,429$), mantendo-se no final do estudo superior à do grupo controlo ($p=0,011$).

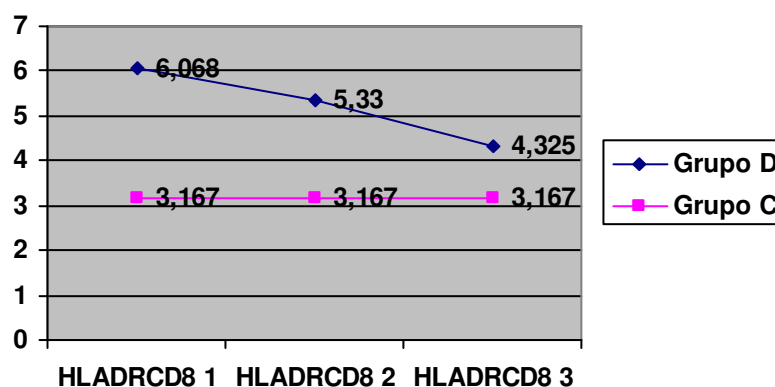


Gráfico 37

Como se pode ver no quadro 12 e no gráfico 37, a concentração das células HLADRC8+ foi também, na primeira avaliação, superior no grupo D ($p=0,001$), apresentando uma posterior e não significativa redução pós-terapêutica antioxidante ($p=0,140$) e mais pronunciadamente com a hipolipemiante ($p=0,041$). Na última avaliação, a diferença relativamente ao grupo C, perdeu significado ($p=0,068$).

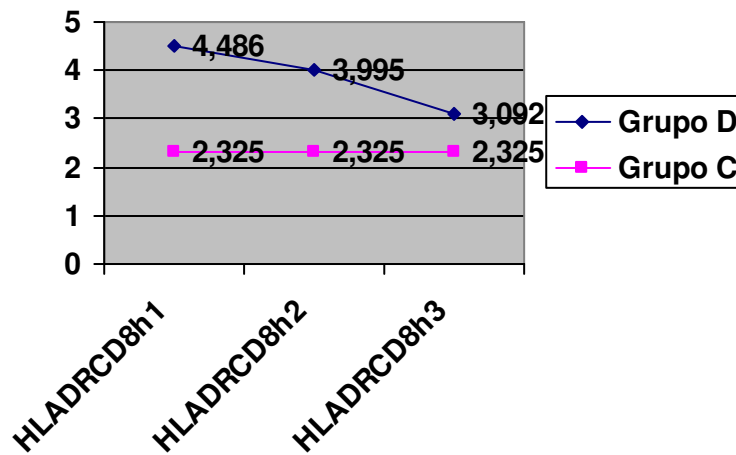


Gráfico 38

Na primeira avaliação, a percentagem das células HLADRC8h (Quadro 12 e Gráfico 38) foi igualmente superior nos indivíduos do grupo D ($p=0,001$). Verificou-se mais uma vez uma tendência para a redução dos seus níveis com as vitaminas E e C ($p=0,205$) e as estatinas e o fibrato ($p=0,018$), com aproximação aos níveis apresentados pelos controlos ($p=0,012$ e $0,106$, respectivamente na segunda e terceira avaliação).

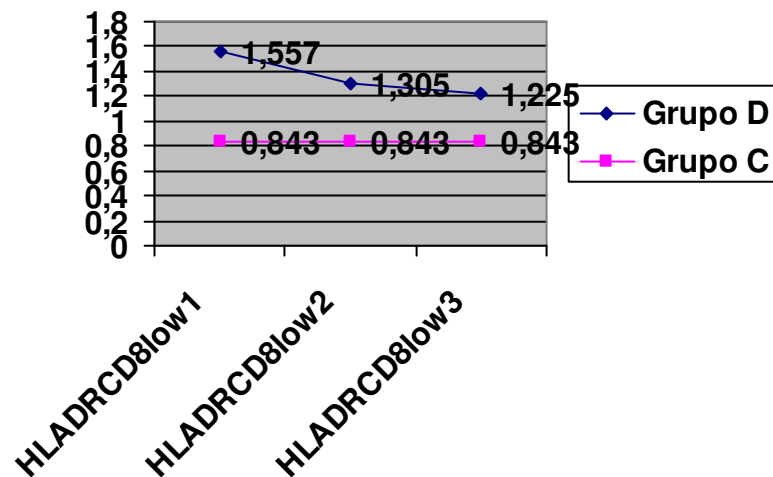


Gráfico 39

Como se pode ver no quadro 12 e gráfico 39, o comportamento apresentado pelas células HLADRC D8low foi perfeitamente sobreponível ao das anteriores, com uma concentração inicial e significativamente mais elevada no grupo D ($p=0,027$), reduzindo-se posteriormente e sem significado com as terapêuticas vitamínica ($p=0,135$) e hipolipemiante ($p=0,734$) e aproximando-se da do grupo C no final do estudo ($p=0,208$).

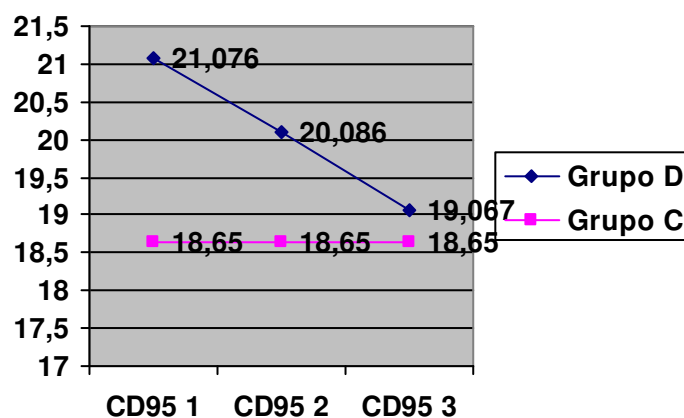


Gráfico 40

A concentração inicial das células CD95+ (Quadro 12 e Gráfico 40) foi superior no grupo D, embora não significativamente ($p=0,487$), apresentando uma posterior e não significativa redução, quer com as vitaminas antioxidantes

($p=0,728$) quer com os hipolipemiantes ($p=0,648$). Na última avaliação os seus níveis aproximaram-se dos do grupo C ($p=0,906$).

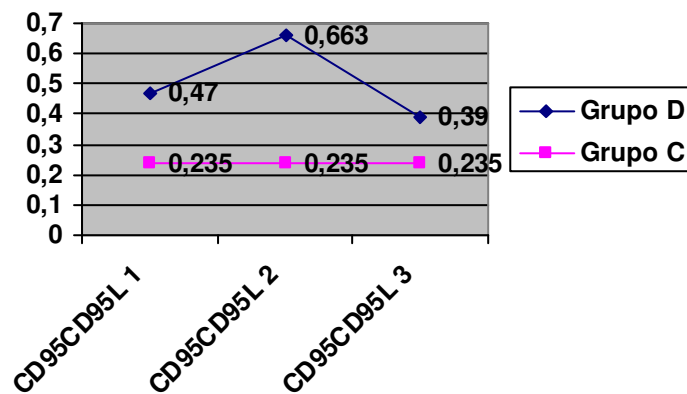


Gráfico 41

As células CD95CD95L+ (Quadro 12 e Gráfico 41) encontravam-se na primeira avaliação numa concentração não significativamente superior no grupo D ($p=0,064$), apresentando um ligeiro aumento com as vitaminas E e C ($p=0,151$) e uma redução, igualmente discreta, com os hipolipemiantes ($p=0,146$). Na segunda e terceira avaliação os seus níveis mantiveram-se superiores aos do grupo C (respectivamente, $p=0,167$ e $0,263$).

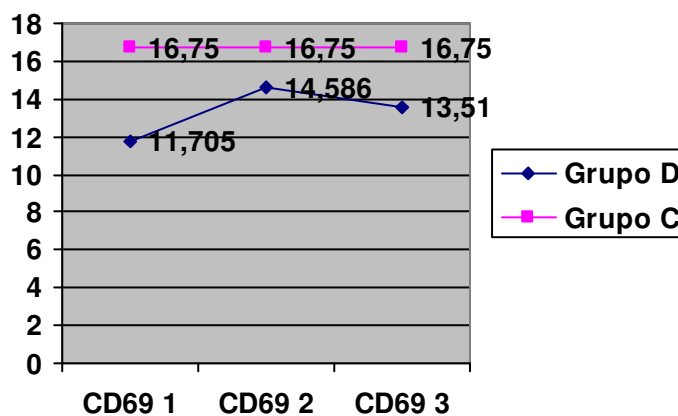


Gráfico 42

As células CD69+ encontravam-se inicialmente numa concentração significativamente inferior no grupo D ($p=0,024$) e apresentaram um aumento de 24,61% ($p=0,027$) com as vitaminas antioxidantes, aproximando-se da concentração do grupo C ($p=0,217$). No último controlo a sua concentração

sofreu uma redução não significativa ($p=0,440$) afastando-se novamente da do grupo C ($p=0,085$).

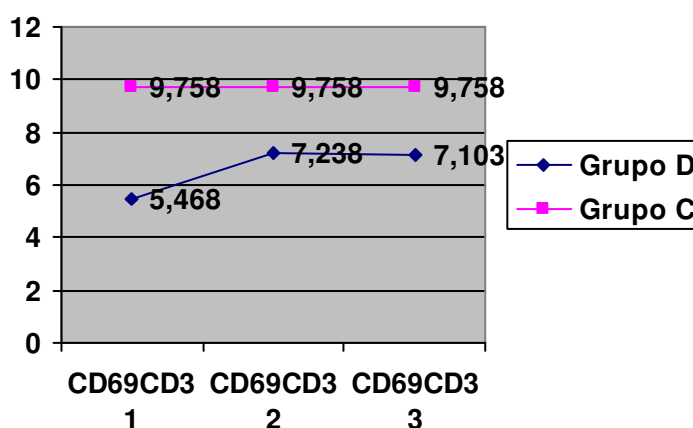


Gráfico 43

Como se pode ver no quadro 12 e gráfico 43, no grupo D o comportamento das células CD69CD3⁺ foi sobreponível aos das anteriores, com um aumento de 32,37% ($p=0,031$) após terapêutica vitamínica e uma redução não significativa ($p=0,849$) com os hipolipemiantes, mantendo uma diferença sempre significativa relativamente ao grupo C ($p=0,003$, $0,037$ e $0,032$, da primeira para a última avaliação).

17.7.4 - Resumo e Comentários

Relativamente ao comportamento das diversas moléculas inflamatórias, nomeadamente na sua resposta à terapêutica com as vitaminas antioxidantes, verificaram-se algumas diferenças entre elas.

hsPCR - A ausência de resposta da hsPCR às vitaminas antioxidantes está de acordo com alguma da literatura consultada. Em 38 insuficientes cardíacos determinaram-se as respostas de diversos marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- α e sVCAM-1), às terapêuticas com atorvastatina (10 mg/dia) isolada ou associada à vit E (400 UI/dia). Os níveis destes marcadores foram significativamente reduzidos com a estatina ($p<0,05$), mas a associação da Vit E anulou esta resposta¹⁶⁹¹. Em atletas de maratona, a administração única das vitaminas C e E (1000 mg e 300 mg), não anulou o aumento da PCR, da IL6 e

do TNF- α induzido pelo esforço¹⁶⁹². Resultados semelhantes foram obtidos com uma associação de antioxidantes (10000 UI de beta-caroteno, 200 UI α -tocoferol, 250 mg de ácido ascórbico, 50 μ g de selénio e 15 mg de zinco), em atletas, ao nível do mar e em grande altitude, sem diferenças na PCR, na IL6 e no TNF α comparativamente ao grupo placebo¹⁶⁹³. Resultados diferentes foram obtidos em indivíduos com síndrome metabólica, em que a suplementação simultânea com gama-tocoferol e α -tocoferol (800 + 800 mg/dia) provocou uma redução significativa dos valores da hsPCR¹⁶⁹⁴. Não sabemos se esta acção resultou da associação do gama e do α -tocoferol, ou das altas doses utilizadas.

Relativamente à redução associada aos hipolipemiantes, esteve de acordo com a esmagadora maioria dos trabalhos consultados, como foi já referido em capítulo próprio. Em trabalhos como o CARE, o AFCAPS/TexCAPS, o PRINCE, o PROVE IT-TIMI 22 e o JUPITER Trial, as estatinas reduziram significativamente os valores da hsPCR 1437^{1438 1440 1443 927}. Também com os fibratos, embora em menor número, existem trabalhos que demonstram uma potencial acção antiinflamatória, com redução da concentração de determinadas moléculas entre as quais a PCR^{1545 1546 1547 1548}. Comentaremos mais pormenorizadamente estas acções quando analisarmos, separadamente, os efeitos das estatinas e do fibrato.

AAT – As Vit(s) E e C provocaram um aumento não significativo dos níveis da AAT. Num estudo realizado em 39 doentes dos dois sexos, com hemorragia sub-aracnoideia por ruptura aneurismática, verificou-se que apesar dos níveis plasmáticos da AAT não diferirem dos controlos, a sua actividade esteve significativamente reduzida nos doentes ($p=0,019$). Os níveis plasmáticos das vitaminas A e E encontravam-se também significativamente reduzidos nestes indivíduos (respectivamente $p=0,038$ e $0,0158$). Os autores concluíram dizendo que um reduzido estado antioxidante, traduzido por baixos níveis das vitaminas A e E, pode condicionar uma maior sensibilidade da AAT às reacções oxidativas e que a actividade desta enzima estará dependente da capacidade antioxidante das referidas vitaminas lipossolúveis¹⁶⁹⁵.

No nosso estudo, embora não tenhamos determinado a actividade da AAT, verificou-se um discreto aumento dos seus níveis séricos com a terapêutica vitamínica, estando assim parcialmente de acordo com os resultados do trabalho citado.

Antes de comentar o comportamento de cada interleucina em particular, relativamente às diferentes terapêuticas, gostaríamos de tecer algumas considerações.

Tal como para a PCR, alguns indivíduos apresentaram concentrações bastante elevadas destas interleucinas, afastando-se nitidamente da média, o que julgamos poder inviabilizar, ou dificultar seriamente, qualquer conclusão sobre o seu comportamento. Contrariamente à PCR, em que existe algum consenso relativamente aos seus valores médios e às concentrações que podem ser utilizadas para avaliação do risco vascular, o que nos permitiu excluir os indivíduos com valores superiores a 10 mg/L, relativamente a estas interleucinas não conhecemos trabalhos que apontem para os valores médios da população com doença vascular, clínica e/ou subclínica, ou com factores de risco clássicos, nem os valores a partir dos quais estas interleucinas não poderão servir para este efeito.

Uma outra constatação foi a dispersão de valores manifestada por alguns dos indivíduos. Apenas como exemplo, em alguns dos nossos participantes os valores da IL6 variaram entre os 0,9 e os 9,04, os da IL8 entre 0,001 e 72,537 e os da IL18 entre 0,001 e 750,905, o que nos parece um comportamento pouco usual em variáveis biológicas.

Atendendo ao pequeno número de participantes, estes achados poderão influenciar negativamente os resultados globais.

Uma outra dificuldade encontrada foi a quase ausência de literatura que faça referência a uma possível acção das vitaminas E, C e/ou outros antioxidantes, sobre a concentração das interleucinas por nós estudadas, com excepção da IL6.

IL6 - Os níveis séricos da IL6 estavam, no início do estudo, significativamente mais elevados no grupo D e não sofreram qualquer alteração com a terapêutica antioxidante. Em dois estudos já citados, um em atletas de maratona e o outro em atletas que realizaram as suas corridas ao nível do mar e a uma altitude superior a 4000 metros, a suplementação com as vitaminas C e E nos primeiros e com uma associação de vários antioxidantes, entre os quais a VitE, nos segundos, não conseguiu inibir o aumento da IL6 desencadeado pelo esforço e pela grande altitude^{1692 1693}. Um outro estudo encontrou resultados diferentes ao suplementar 57 doentes IRC, em hemodiálise, com uma

associação de ácido docosahexanoico (308 mg) e VitE (800 mg), verificando-se uma redução significativa da IL6 ($21,4 \pm 3,5$ para $16,8 \pm 3,7$ pg/mL; $p < 0,05$)¹⁶⁹⁶. Um outro estudo avaliou a capacidade das vitaminas antioxidantes em contrariar o aumento da IL6 muscular induzido pelo esforço. Uma associação de vitaminas C e E (500 mg e 400 UI por dia), durante 28 dias, inibiu significativamente o aumento da concentração plasmática da IL6 ($p < 0,05$), ao reduzir a libertação desta citocina pelo musculo em contracção¹⁶⁹⁷.

IL8 - Relativamente à concentração da IL8, inicialmente mais baixa no grupo dos dislipidémicos, apresentou uma discreta redução com a terapêutica antioxidante, ficando os seus níveis significativamente inferiores aos do grupo C. Como já dissemos, não temos conhecimento de estudos que tenham analisado o comportamento da IL8 plasmática relativamente à terapêutica com as vitaminas E e/ou C, não podendo assim comparar os nossos resultados.

Julgamos poder explicar a redução da concentração desta molécula inflamatória por nós verificada, pela relação existente entre os fenómenos oxidativos e os inflamatórios. Como vimos em capítulo anterior, as OxLDL têm propriedades pró-inflamatórias, induzindo as células endoteliais a produzir factores quimiotácticos e activadores dos monócitos (MCP-1 e o M-CSF) e moléculas de adesão, traduzindo-se na quimiotaxia destas células, na sua adesão ao endotélio e na sua migração sub-endotelial. Como já foi igualmente referido, este será um dos primeiros e principais mecanismos responsáveis pela formação das *foam-cells*, também estas com grande capacidade de produzir moléculas inflamatórias^{45 46}. Por outro lado as OxLDL são fortemente imunogénicas activando as células T circulantes e tecidulares. Os linfócitos T presentes na placa de aterosclerose, após exposição às OxLDL, apresentaram uma proliferação do DNA e a produção de diversas citocinas (IL1, IL6 e TNF- α)^{1223 1224 1229}. Para além de estimularem a imunidade celular, as OxLDL têm também a capacidade para produzir anticorpos anti-OxLDL¹²²⁵ e de induzir a expressão das HSP¹²³³. Como dissemos em capítulo anterior, parece haver uma reactividade cruzada entre as OxLDL e os anticorpos anti-cardiolipina, em parte dependente da oxidação desta última, podendo os anticorpos anti-OxLDL ser considerados anticorpos anti-fosfolípidos e estar envolvidos na fisiopatologia da SAF^{1202 1203 1204 1205}.

Por todas estas relações entre as OxLDL e os mecanismos inflamatórios, dos quais as interleucinas pró-inflamatórias em geral e a IL8 em particular possuem um papel relevante, pode-se esperar um comportamento paralelo entre as LDL oxidadas e esta citocina. Como vimos anteriormente a concentração das OxLDL apresentou uma redução ao longo do nosso estudo, traduzindo muito provavelmente uma inibição dos fenómenos oxidativos. Julgamos que este facto, à luz do que acabámos de referir, poderá constituir uma explicação para a redução não significativa verificada na concentração da IL8, após terapêutica com as vitaminas antioxidantes.

IL18 - A IL18, com concentração inicialmente inferior no grupo D, não manifestou qualquer alteração com a terapêutica vitamínica (uma muito discreta redução). Também para esta interleucina não encontramos estudos sobre uma eventual relação com as vitaminas antioxidantes. Julgamos que as considerações tecidas relativamente à acção das vitaminas antioxidantes sobre a IL8, poderão ser aplicadas em relação à IL18.

INFgama - O INFgama basal, não significativamente mais elevado nos dislipidémicos, apresentou uma discreta redução com as vitaminas E e C. Saliemos o paralelismo no comportamento do INFgama com o da IL18. Muito embora esta última apresentasse concentrações mais baixas nos dislipidémicos e o INFgama valores mais elevados nos mesmos indivíduos, ambas as moléculas apresentaram discretas reduções com as Vit(s) E e C e um posterior aumento com os hipolipemiantes. Dada a relação existente entre a IL18 e o INFgama, com a primeira a induzir a secreção da segunda pelos linfócitos, este comportamento verificado no nosso estudo, pareceu-nos curioso.

Em 161 indivíduos saudáveis com mais de 65 anos, a Vit E nas doses de 50 a 100 mg/dia induziu uma redução nos níveis do INFgama¹⁶⁹⁸. Em 12 doentes com carcinoma do cólon, a administração de 750 mg/dia de VitE, aumentou a relação das células CD4/CD8 e a capacidade das células T para produzir INFgama e IL2¹⁶⁹⁹.

VEGF – Esta interleucina, também não significativamente mais elevada no grupo D, apresentou uma discreta elevação com os antioxidantes. Também relativamente ao VEGF não encontramos na literatura referência a estudos que tenham avaliado o seu comportamento sob terapêutica com as vitaminas E e/ou C e embora julgando não ser de valorizar o discreto aumento desta citocina

verificado com a terapêutica antioxidante, existem, relativamente a outras citocinas, trabalhos com resultados semelhantes. Em 10 indivíduos saudáveis a suplementação com 1 G de ácido ascórbico e 400 mg de α -tocoferol por dia, provocou um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção da IL-1 e do TNF- α pelas células mononucleares do sangue periférico. Este aumento coincidiu com a maior concentração sérica das vitaminas¹⁷⁰⁰. Resultado semelhante foi obtido também em indivíduos saudáveis, em que a suplementação diária com Vit E (800 mg), induziu um aumento significativo da concentração plasmática da IL2 ($p < 0,05$)¹⁷⁰¹.

Tal como dissemos, seria de esperar que todas estas moléculas apresentassem um comportamento paralelo ao das OxLDL. Com efeito, estas lipoproteínas oxidadas constituem-se como um potente estímulo inflamatório, induzindo a produção de diversas moléculas pelas células envolvidas nos fenómenos imunológicos, admitindo-se que o faça pela activação da transcrição do NFkB. Como vimos, verificou-se uma tendência para a redução da concentração sérica das OxLDL e para um aumento do TRAP com a terapêutica vitamínica, não se tendo verificado uma evolução paralela em todas as moléculas inflamatórias. Assim, a PCR, a IL6, o INFgama o VEGF, com concentrações basais mais elevadas no grupo D, mantiveram-se inalteradas (PCR e IL6) ou apresentaram uma redução (INFgama) ou um aumento não significativos (VEGF) com as vitaminas antioxidantes. Por outro lado, as IL(s) 8 e 18 encontravam-se inicialmente mais baixas nos dislipidémicos e após terapêutica vitamínica apresentaram uma discreta redução sem significado. Julgamos que as considerações tecidas no início desta análise das interleucinas, assim como as múltiplas acções associadas a cada uma das moléculas estudadas, poderão justificar este comportamento nem sempre previsível.

Populações linfocitárias – As células CD4+ e CD8+ apresentaram uma discreta elevação na sua percentagem com as vitaminas E e C. O comportamento destas células após terapêutica vitamínica, esteve parcialmente de acordo com alguns trabalhos no animal e no homem. Em perus suplementados com diferentes concentrações de Vit E (0, 100 e 200 UI /dia) e inoculados oralmente com *L. monocytogenes* verificou-se que, nos animais suplementados com 200 UI/dia, para além de uma menor taxa de infecção visceral, a citometria de fluxo demonstrou elevações entre 6 e 8 vezes dos

linfócitos CD4+ e CD8+¹⁷⁰². Um outro trabalho realizado em galinhas demonstrou que a Vit E, em doses \geq a 80 mg/dia, aumentou significativamente as percentagens das células CD4+ e CD8+¹⁷⁰³. Um estudo no rato concluiu que a administração de 500 UI /dia de Vit E estimulou a proliferação e a diferenciação tímica dos linfócitos e aumentou significativamente a percentagem das células CD4+CD8- e CD4-CD8+ periféricas¹⁷⁰⁴. Em ratos verificou-se que a reduzida capacidade de formação de sinapses entre as células T e os antigénios, associada ao envelhecimento, era revertida pela suplementação com Vit E¹⁷⁰⁵. Em 32 cães com idades entre os 7 e os 10 anos, a suplementação com alfa-tocoferol (all rac) e ácidos gordos ómega 6 e 3, estimulou a população de células T CD8+, independentemente da relação ómega 6 / ómega 3¹⁷⁰⁶. Em 12 doentes com cancro colo-rectal, com prévia quimio ou radioterapia, a suplementação com 750 mg/dia de Vit E durante 2 semanas, induziu um aumento da relação CD4/CD8 e um aumento da capacidade das células T para produzir as citocinas Th₁, IL2 e INFgama ($p=0,02$)¹⁶⁹⁹. Resultados semelhantes foram obtidos noutros estudos^{1707 1708}. Em 18 doentes HIV+, metade suplementados com 800 mg/dia de Vit E, verificou-se nestes últimos e comparativamente aos não suplementados, uma redução da carga viral ($p<0,05$) e um aumento da relação CD4/CD8¹⁷⁰⁹. Em 88 indivíduos saudáveis com idades \geq 65 anos avaliaram-se os efeitos da administração da Vit E durante 235 dias, nas doses de 60, 200 ou 800 mg/dia, em determinados parâmetros da imunidade celular. Na dose de 200 mg/dia a vitamina E melhorou a resposta cutânea de hipersensibilidade e os títulos de Ac(s) anti-hepatite B (respectivamente 65% e 6 vezes), comparativamente ao grupo do placebo (17% e 3 vezes), ao grupo da dose de 60 mg (41% e 3 vezes) e ao grupo da dose de 800 mg (49% e 2,5 vezes)¹⁷¹⁰.

As células CD26+ viram a sua percentagem aumentar de uma forma não significativa com as Vit(s) E e C. Não encontramos na literatura estudos que tenham avaliado especificamente a acção das vitaminas E e/ou C sobre as células CD26+. Como dissemos em capítulo anterior, o CD26 para além de outras funções, nomeadamente como molécula co-estimuladora das células T, comporta-se igualmente como molécula de adesão. Num estudo realizado em doentes coronários, alguns deles medicados com 800 mg/dia de Vit E, durante o mês que antecedeu a realização da angioplastia coronária transluminal per-

cutânea e contrariamente ao grupo placebo, as concentrações séricas da selectina-P e do ICAM-1 do grupo suplementado não aumentaram com a realização da angioplastia¹⁷¹¹. Resultados semelhantes foram obtidos em 100 doentes com estenose aórtica, em que a associação de 400 UI/dia de Vit E com 1000 mg/dia de Vit C, durante 6 meses, reduziu significativamente os níveis séricos do ICAM-1 (298±12 para 272±12 ng/ml; p=0,0015)¹⁷¹². Em 39 homens saudáveis com idade média de 41,6±5,9 anos, os níveis séricos basais da ICAM-1, para além de estarem inversamente correlacionados com os níveis do α -tocoferol (r=-0,525; p<0,0001), apresentaram uma redução significativa após 20 semanas de suplementação com 50 UI /dia de VitE (149,2±18,4 versus 131,5±17,2, p<0,004)¹⁷¹³. Resultados diferentes foram obtidos em doentes diabéticos, em quem a Vit E não induziu qualquer alteração significativa nos níveis séricos da ICAM-1 nem da selectina-P¹⁷¹⁴.

No nosso estudo as células CD26+ apresentaram um comportamento diferente do da maioria dos trabalhos consultados, nos quais se verificou uma redução das moléculas envolvidas na adesão celular. A origem celular diferente – a ICAM-1 e a selectina-P encontram-se essencialmente nas plaquetas e nas células endoteliais - as múltiplas funções relacionadas com o CD26, o reduzido número da nossa população e a duração da terapêutica vitamínica do nosso estudo, poderão ser algumas das explicações para os resultados que obtivemos. Recordamos no entanto que alguns dos estudos, tal como o nosso, não encontraram qualquer efeito significativo da Vit E nos níveis das moléculas de adesão celular¹⁷¹⁴.

As células CD25+ apresentaram-se numa percentagem não significativamente inferior nos dislipidémicos e não sofreram qualquer alteração com a terapêutica vitamínica. Não encontramos na literatura nenhum trabalho que tenha procurado relacionar a terapêutica com as vitaminas E e/ou C, ou qualquer outro antioxidante, com os níveis das células CD25+.

Como foi dito em capítulo anterior, o HLADR é um receptor de superfície pertencente à classe II do MHC e encontra-se nos monócitos/macrófagos, nas células B e T e nas células dendríticas. A sua função principal é a de apresentar os antígenos aos linfócitos CD4+, activando-os, sendo por isso considerado um marcador tardio da activação imunológica.

Não encontramos na literatura referências a trabalhos que relacionassem a terapêutica com as vitaminas E e C e/ou outros antioxidantes, com a expressão celular das moléculas HLA DR e/ou da classe II MHC. Alguns estudos demonstraram uma capacidade dos mecanismos e/ou dos produtos de oxidação de estimularem a apresentação dos antígenos e a activação das células mononucleares. As OxLDL estimularam a expressão das moléculas da classe II MHC em monócitos humanos e em células U937, um sistema que segundo os autores, é utilizado no estudo da diferenciação monocítica. O mesmo trabalho demonstrou haver um aumento da expressão do antígeno LeuM3 e uma redução do CD4, compatível com um fenótipo celular mais diferenciado¹⁷¹⁵. Resultados semelhantes foram obtidos num outro estudo mais recente¹⁷¹⁶. Em 27 indivíduos saudáveis, a administração de 5µg/ml de OxLDL induziu um aumento das células produtoras de INF-gama ($p < 0,001$), estando a activação das células T pelas OxLDL dependente das moléculas da classe II MHC¹⁷¹⁷.

Considerando que a principal função de todas as células HLADR testadas é a apresentação antigénica às células T, parece que os resultados obtidos no nosso trabalho, reduções de todas elas, embora não significativas, após terapêutica com a associação das vitaminas antioxidantes, estarão de acordo com os estudos publicados. Com efeito, admitindo que os mecanismos oxidativos e os produtos da peroxidação, como as OxLDL, estimulam a expressão das células HLADR+, as vitaminas E e C ao reduzirem a concentração das OxLDL e ao aumentarem o TRAP, como se demonstrou em capítulo próprio, inibirão com toda a probabilidade alguns dos principais estímulos para a expressão das células positivas para este tipo de moléculas.

O comportamento das células positivas para o CD95 e o CD95CD95L foi diferente, com uma ligeira redução das primeiras e um igualmente discreto aumento das segundas após terapêutica antioxidante. Atendendo à relação existente entre os mecanismos oxidativos e a apoptose, seria de esperar uma redução destas células com as vitaminas E e C, o que só aconteceu e de uma forma pouco pronunciada com as primeiras. Não sabemos se estes resultados se ficaram a dever à pequena dimensão da amostra, à duração do estudo, às terapêuticas concomitantes (por exemplo o A.A.S.), ou a outros factores.

Num estudo realizado com linfócitos de ratos jovens (3 meses) e velhos (24 meses), os autores demonstraram existir um maior número de células

apoptóticas nestes últimos, quer em condições basais quer após estimulação com 2-desoxi-D-ribose, que esgotou as reservas celulares da glutathione. A administração do antioxidante ginkgo biloba ao meio de cultura celular e ao animal vivo (100 mg/Kg), reduziu significativamente a apoptose¹⁷¹⁸. Suplementaram-se 20 indivíduos saudáveis com um composto de antioxidantes – α -tocoferol, ácido α -lipóico, coenzima Q10, carnitinas e selenometionina – tendo-se avaliado posteriormente o estado antioxidante plasmático (TAS), os níveis dos peróxidos e a apoptose linfocitária. Os participantes do grupo controlo receberam apenas carnitina ou um composto constituído por α -tocoferol, ácido α -lipóico, coenzima Q10 e selenometionina. No grupo que recebeu o composto antioxidante completo, para além de um significativo aumento do TAS e de uma redução nos níveis dos peróxidos, verificou-se uma redução significativa da apoptose dos linfócitos CD4+ e CD8+. Nos grupos medicados apenas com a carnitina ou com a fórmula incompleta os resultados foram menos consistentes¹⁷¹⁹.

No nosso trabalho o comportamento das células CD95+, que se associam positivamente à apoptose, foi compatível com os destes estudos e como dissemos, previsível, atendendo à redução do stresse oxidativo com a terapêutica antioxidante.

Outros trabalhos utilizando um análogo do α -tocoferol, o succinato de α -tocoferol, demonstraram uma capacidade pró-apoptótica desta molécula nas células neoplásicas. Este efeito do succinato da Vit E foi documentado em células humanas do cancro da mama, em que este análogo da Vit E induziu a apoptose de uma forma tempo e dose dependente, através das vias de sinalização do TGF-beta e do CD95¹⁷²⁰. Efeitos sobreponíveis foram também obtidos em células neoplásicas da próstata e nas do carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço^{1721 1722}. Nestas células o succinato da Vit E induziu a apoptose através do metabolismo da ceramida. Um outro análogo da Vit E, o *RRR-alpha-tocopherol ether linked acetic acid* (α -TEA), demonstrou também grande potencial anti-tumoral no cancro do ovário. Nestas células neoplásicas o α -TEA induziu a apoptose através do aumento dos níveis do CD95+ e do CD95L¹⁷²³. Julgamos que o comportamento oposto demonstrado pela Vit E e pelos seus análogos, em termos de modificação da apoptose, poderá ser devida em primeiro lugar às diferenças químicas e consequentes

acções, existentes entre a Vit E e as outras moléculas e eventualmente, a um diferente nível basal da actividade apoptótica das células neoplásicas.

Como vimos, o CD69 é um marcador precoce da activação celular. Tal como para outros marcadores da activação celular (CD25), não encontramos na literatura estudos que tivessem avaliado especificamente as possíveis relações existentes entre os mecanismos oxidativos e este tipo de células. Curiosamente, o comportamento das células CD69 e CD69CD3 foi semelhante ao das outras, igualmente positivas para marcadores da activação celular. Com efeito, estes dois últimos tipos de células, tal como as células CD25CD3 e as CD25CD26CD3, encontravam-se inicialmente em concentrações inferiores no grupo D e apresentaram um aumento mais ou menos pronunciado com as vit(s) E e C.

Resumindo, verificou-se que as populações celulares associadas à activação celular, como as CD25CD3+, CD25CD26CD3+ e as CD69+, apresentaram-se inicialmente mais baixas nos indivíduos dislipidémicos, esboçando uma tendência para um aumento dos seus níveis com a terapêutica antioxidante. As células CD26+ e CD26CD3+, envolvidas nos fenómenos da adesão celular, encontravam-se em níveis basais mais baixos no grupo D, tendo aumentado discretamente com a terapêutica antioxidante. Os marcadores celulares indicadores da apresentação antigénica às células efectoras, como os diversos HLADR (CD4, CD8, CD8h e CD8low), estavam inicialmente mais elevados no grupo D e mostraram uma tendência para a redução dos seus níveis com as vitaminas E e C. Quanto às células positivas para o marcador da apoptose CD95+ e para o seu ligante CD95CD95L+, encontravam-se inicialmente mais elevadas no grupo D mas apresentaram um comportamento diferente à terapêutica antioxidante. As primeiras mostraram uma redução não significativa nos seus níveis, enquanto as segundas viram a sua concentração aumentada, igualmente sem significado, com a terapêutica vitamínica. As células CD4+ e CD8+, apresentaram ambas um aumento não significativo com as vitaminas antioxidantes. Atendendo à redução, embora não significativa, da concentração do INFgama igualmente obtida com a terapêutica vitamínica, atrevemo-nos a especular que poderá ter havido uma redução da relação CD4+ Th₁/Th₂.

18 - Avaliação arterial não-invasiva

18.1 - Índice Perna-Braço

O IPB é a relação entre a Tensão Arterial Sistólica (TAS), determinada a nível da artéria tibial posterior e da artéria umeral. Admite-se que este índice se comporta não só como um marcador da doença arterial dos membros inferiores, mas também de outros territórios vasculares.

Para a maioria dos autores um IPB está reduzido quando é igual ou inferior a 0,9.

Ao longo do estudo, realizaram-se em média três determinações do Índice Perna-Braço (IPB), pela técnica já descrita.

No Gráfico seguinte estão indicados os resultados obtidos na primeira e na terceira avaliação. Os indivíduos com $IPB \leq 0,9$ encontram-se referenciados pelo algarismo “1” e os que apresentavam valores $\geq 1,0$ pelo algarismo “2”.

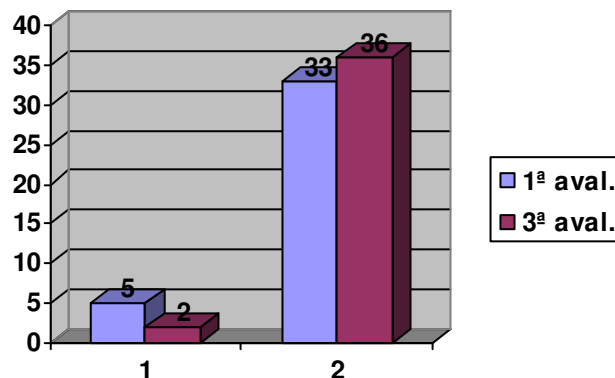


Gráfico 44

Da observação do Gráfico 44, verifica-se não ter havido evolução significativa deste parâmetro. Quer no início quer no fim do nosso estudo, predominavam os indivíduos com $IPB \geq 1,0$, compatível com uma saúde vascular ainda conservada.

Os nossos resultados, muito provavelmente pelo reduzido número de participantes e pelo nítido predomínio de valores normais, não permitiram qualquer conclusão relativamente à acção das terapêuticas utilizadas. Julgamos,

no entanto, baseando-nos na revisão bibliográfica, ser o IPB um meio de avaliação arterial clinicamente útil, não invasivo, de fácil realização e não dispendioso.

Numa análise do *Atherosclerosis Risk In Communities* (ARIC), o IPB correlacionou-se inversamente com a incidência da doença coronária, com a do AVC e com a aterosclerose sub-clínica das artérias carótida e poplítea¹⁷²⁴.

Numa análise mais recente do mesmo estudo, avaliou-se o valor preditivo de um baixo IPB (<0,8) na incidência do AVC, numa população de brancos e negros dos dois sexos. Demonstrou-se uma associação inversa entre o IPB e a incidência de AVC - RR 5,68 (IC 95% 2,77 a 11,66; p<0,0001), embora esta relação tenha sido reduzida após ajustamento para outros factores de risco - RR1,93 (IC95% 0,78 a 4,78)¹⁷²⁵.

Num estudo coorte, o *Edinburgh Artery Study*, que incluiu 809 homens e 783 mulheres, com idades compreendidas entre os 55 e os 74 anos, um IPB inferior a 0,9 mostrou ser um factor de risco significativo para a mortalidade por DCV - RR 1,53 (IC 95%; 1,13 a 2,07; p=0,006). Esta associação foi independente da existência de síndrome metabólica e dos factores de risco de DCV convencionais¹⁷²⁶.

Outros estudos têm demonstrado resultados semelhantes no idoso, em indivíduos com alto risco de DCV e em indivíduos com doença coronária^{1727 1728 1729}.

Numa recente revisão de estudos que utilizaram o IPB para a avaliação de futura doença vascular (22 estudos identificados - 13 excluídos e 9 sujeitos a metanálise), a sensibilidade e a especificidade deste método foram, respectivamente, para a doença cardíaca coronária de 16,5% e 92,7%, para o AVC de 16% e 92% e para a mortalidade cardiovascular de 41% e 87,9%. Os RR respectivos foram de 2,53 (IC 95%, 1,45 a 4,40), 2,45 (IC 95%, 1,76 a 3,41) e de 5,61 (IC 95%, 3,45 a 9,13)¹⁷³⁰. Os autores concluíram que, a especificidade do IPB para prever a ocorrência de doença cardiovascular é alta e a sensibilidade baixa, recomendando a sua utilização na avaliação do risco em doentes seleccionados.

Um estudo realizado em índios norteamericanos encontrou uma curva em U, na relação entre o IPB e a as mortalidades cardiovascular e total. Relativamente aos indivíduos com IPB normal, o RR para a mortalidade por

todas as causas foi, respectivamente, de 1,69 (IC 95% 1,34 a 2,14) e de 1,77 (IC 95% 1,48 a 2,13) para os que apresentavam IPB <0,9 e >1,40. Relativamente à mortalidade cardiovascular os RR foram, respectivamente, de 2,52 (IC 95% 1,74 a 3,64) e de 2,09 (IC 95% 1,49 a 2,94). Neste estudo a prevalência de diabetes, de albuminúria e de HTA, foi sobreponível nos indivíduos com baixo e alto IPB

1731

18.2 - Espessura Média-Íntima Carotídea

Como já foi referido, ao longo do estudo realizaram-se três avaliações, por ecodoppler, da espessura da média-íntima carotídea (EMI). A classificação por grau 0, 1, 2, 3 e 4 foi já explicada em capítulo anterior.

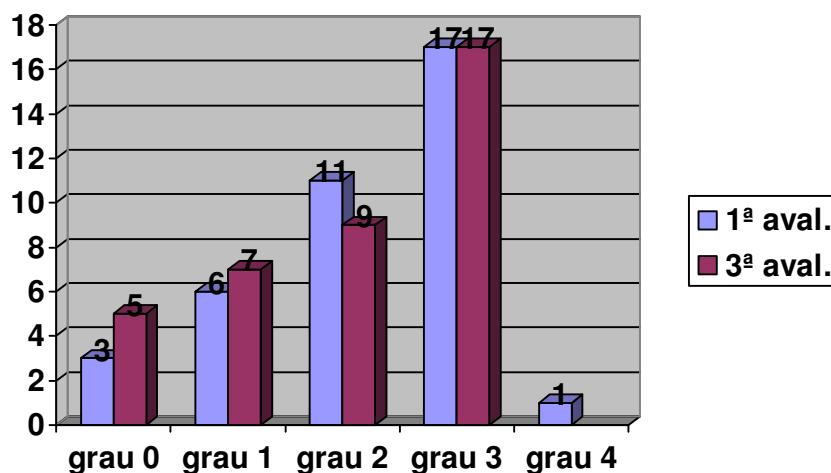


Gráfico 45

Como se pode ver no Gráfico 45, quer no início quer no fim do estudo, predominaram as lesões grau 3, ou seja, artérias carotídeas em que o estudo doppler mostrou a existência de duas ou mais placas, sem condicionar qualquer compromisso hemodinâmico.

A avaliação da evolução das placas que, como veremos, é talvez mais importante do que a simples identificação da sua existência, não foi realizada.

Relativamente a esta avaliação do nosso estudo e tal como para o IPB, o reduzido número de participantes e um eventual período de seguimento

demasiado curto, não permitiu objectivar qualquer resposta significativa à terapêutica.

A ultrassonografia modo B (eco-doppler) permite a visualização não invasiva da parede arterial e a determinação da espessura da média e da íntima (EMI).

A capacidade desta técnica para avaliar a doença aterosclerótica tem sido confirmada por diversos estudos clínicos, apontando a maioria deles para uma relação directa entre a EMI e a incidência da doença coronária e cerebral isquémica^{1732 1733 1734}.

A determinação da EMI permite ainda a avaliação da progressão e da regressão das lesões arteriais, particularmente na resposta à dieta e/ou à terapêutica farmacológica^{1735 1736}.

Estudos em peças de endarterectomia coronária e carotídea, confirmaram a natureza dinâmica da placa, nomeadamente a ruptura, a trombose, a cicatrização e o “remodeling”.

A ecolucência da placa parece correlacionar-se positivamente com um alto teor em gordura, com uma tendência aumentada para a ruptura e com a trombose e a ocorrência de AVC isquémico (RR 4,6; IC 95% 1,1 a 18,9; $p=0,015$). As placas ecogénicas têm um maior conteúdo em tecido fibroso e cálcio, um comportamento mais estável e um menor risco cardiocerebrovascular¹⁷³⁷.

Esta avaliação morfológica da placa está sujeita a uma grande variação e dependência inter-observador, assim como ao segmento arterial avaliado, o que poderá limitar, para alguns autores, a sua aplicabilidade na prática clínica^{1738 1739}. As determinações realizadas no segmento distal da carótida comum e no bolbo serão menos sujeitas à influência de artefactos e reflectem de uma forma mais acurada a EMI arterial^{1740 1741}.

Para ultrapassar estas limitações, estão disponíveis duas principais abordagens: a avaliação manual de vários locais da artéria carótida, proximais e distais e a medição computadorizada e automática do segmento distal. Na determinação manual, a mais utilizada na prática clínica, o segmento que melhor se correlaciona com a presença de doença vascular é a extremidade distal da artéria carótida comum, a 1 cm do bolbo¹⁷⁴².

Também a idade influencia significativamente a EMI carotídea média, defendendo alguns autores, diferentes valores para a EMI dos jovens (0,5 mm) e dos idosos (0,9 mm)¹⁷⁴².

Utilizando-se frequentemente em ensaios clínicos a determinação ecográfica da EMI, é necessária uma uniformização dos critérios de avaliação, de forma a ser possível uma reprodutibilidade e uma comparação dos estudos. Assim, segundo alguns autores, define-se como placa uma estrutura focal que faz proclência de pelo menos 0,5 mm no lúmen da artéria, ou com uma espessura igual ou superior a 1,5 mm, medida desde a interface média-adventícia até à interface íntima-lumen¹⁷⁴³.

19 - Comparação Grupo Estatinas / Grupo Controlo (Sob terapêutica)

Neste capítulo iremos comparar o grupo dos hipercolesterolémicos, medicados com a sinvastatina ou a atorvastatina, grupo E, tendo como parâmetro de comparação a primeira e única avaliação realizada nos indivíduos controlos, grupo C.

19.1 - Determinações Lipídicas

Não era um objectivo principal do nosso trabalho avaliar a acção hipolipemiante das estatinas usadas, sinvastatina e atorvastatina, dado ser um efeito esperado, previsível e largamente demonstrado em inúmeros estudos de grande escala. As concentrações das diferentes lipo e apoproteínas dos indivíduos do grupo D, apresentaram uma evolução compatível com os efeitos conhecidos dos fármacos. Sendo assim a nossa análise a estes resultados, apresentados no Quadro 1 será, justificadamente, breve.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
CT1 E	28	314,86	47,818	9,037	296,32	333,40	0,000
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CT2 E	27	311,85	56,981	10,966	289,31	334,39	0,000
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CT3 E	28	222,75	41,308	7,806	206,73	238,77	0,014
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
HDL1 E	28	54,68	10,342	1,955	50,67	58,69	0,082
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
HDL2 E	28	55,07	10,691	2,020	50,93	59,22	0,071
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
HDL3 E	28	60,46	13,669	2,583	55,16	65,76	0,009
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
CT/HDL1 E	28	5,9079	1,15377	0,21804	5,4605	6,3552	0,000
C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	

CT/HDL2	E	28	5,5680	1,73442	0,32778	4,8955	6,2406	
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	0,007
CT/HDL3	E	28	3,8083	0,87850	0,16602	3,4677	4,1490	
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	0,419
CLDL1	E	28	187,86	32,624	6,165	175,21	200,51	
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	0,000
CLDL2	E	28	185,86	39,264	7,420	170,63	201,08	
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	0,000
CLDL3	E	28	150,07	36,036	6,810	136,10	164,04	
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	0,003
TRIG1	E	28	158,71	69,000	13,040	131,96	185,47	
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	0,472
TRIG2	E	28	147,43	87,388	16,515	113,54	181,31	
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	0,855
TRIG3	E	28	133,43	56,641	10,704	111,47	155,39	
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	0,643

Quadro 1
(Variáveis Lipídicas)

Relativamente à ficha lipídica, os efeitos das vitaminas E e C foram já comentados em capítulo anterior.

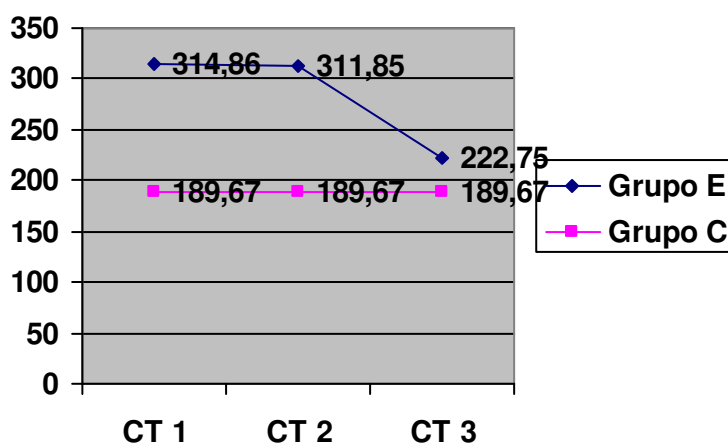


Gráfico 1

A concentração basal do CT nos indivíduos do grupo E (Quadro 1 e Gráfico 1) foi ligeiramente superior à do grupo D (314,86 versus 307,74 mg/dl).

Esta diferença é explicada pelos próprios critérios de selecção, dado que os indivíduos destinados à terapêutica com as estatinas eram os que apresentavam maiores concentrações de CT. Tal como no grupo de todos os dislipidémicos, o grupo D, o colesterol plasmático manteve-se no grupo E significativamente superior ao longo do estudo relativamente aos valores basais dos participantes C.

Da primeira para a segunda avaliação, período correspondente à terapêutica antioxidante, verificou-se uma redução não significativa na concentração do CT ($p=0,583$), seguido por uma redução de 28,57% ($p=0,000$) após terapêutica com as estatinas. Os seus valores, embora mantendo-se superiores aos do grupo C, perderam algum significado na última avaliação ($p=0,000$, $0,000$ e $0,014$, da primeira para a última determinação).

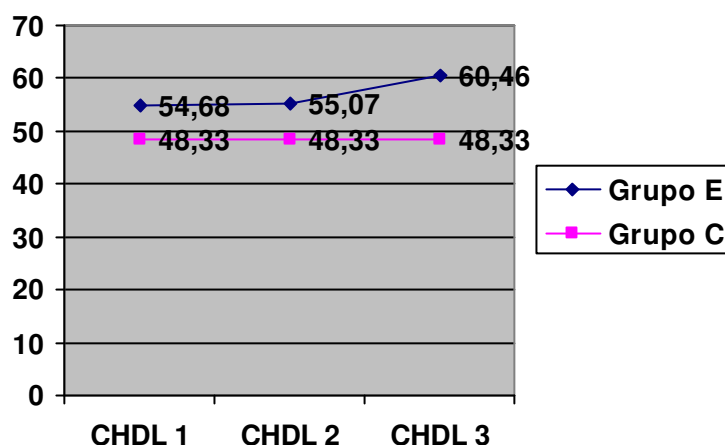


Gráfico 2

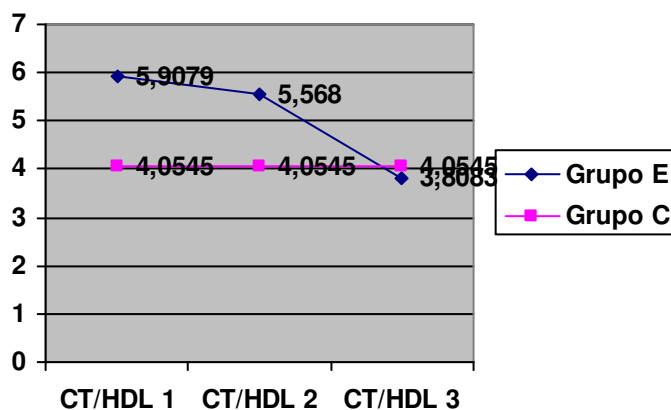


Gráfico 3

Neste grupo E o CHDL (Quadro 1 e Gráfico 2) apresentou uma concentração plasmática basal superior à do grupo D (54,68 versus 49,79 mg/dl), com uma evolução ao longo do estudo sobreponível à verificada no grupo de todos os dislipidémicos; manteve-se inalterada com as vitaminas E e C ($p=0,734$) e mostrou um aumento significativo ($p=0,003$) com as estatinas. Comparativamente ao grupo C e contrariamente aos indivíduos D, este grupo apresentou na última avaliação, uma concentração do CHDL significativamente superior ($p=0,009$).

O comportamento da relação CT/CHDL nos indivíduos E (Quadro 1 e Gráfico 3) foi igualmente sobreponível ao do grupo D. Os seus valores basais, ligeiramente inferiores neste grupo (5,9079 versus 6,5497), apresentaram uma redução inicialmente discreta com as vitaminas antioxidantes ($p=0,253$) e mais pronunciada ($p=0,000$) com as estatinas. Na última avaliação e comparativamente ao grupo C, o efeito obtido com os hipolipemiantes traduziu-se na perda de significado da diferença nesta relação ($p=0,000$, 0,007 e 0,419, respectivamente da primeira para a terceira), tornando-se mesmo ligeiramente inferior no grupo E.

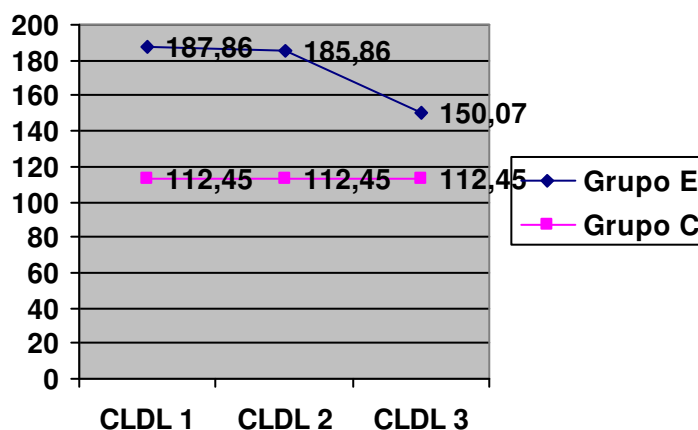


Gráfico 4

Como seria de esperar, atendendo aos critérios de selecção, o grupo E apresentou valores basais de LDL (Quadro 1 e Gráfico 4) superiores aos do grupo D (187,86 versus 172,18).

Os efeitos das vitaminas antioxidantes, tal como no grupo D, foram insignificantes ($p=0,760$) e já discutidos no capítulo anterior.

Relativamente à terceira e última avaliação, obteve-se uma redução significativa do CLDL (19,25%; $p=0,001$), superior à verificada no grupo de todos os dislipidémicos (16,400%). Apesar da redução conseguida com as estatinas, a concentração do CLDL manteve-se, na última avaliação, significativamente superior à do grupo C (150,07 versus 112,45 mg/dl; $p=0,003$).

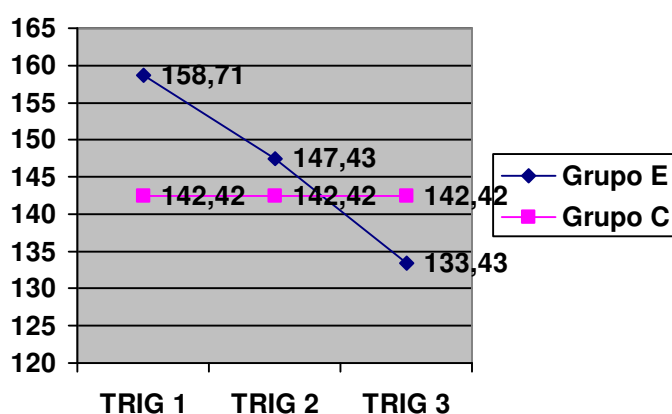


Gráfico 5

Neste grupo E, a concentração inicial dos triglicerídeos (Quadro 1 e Gráfico 5) foi inferior à do grupo D (158,71 versus 285,47 mg/dl), em que estavam incluídos os hipercolesterolémicos e os hipertrigliceridémicos, enquanto que este incluiu apenas os primeiros.

Verificou-se uma redução de 7,1% ($p=0,155$) na segunda avaliação e de 9,49% ($p=0,307$) na terceira, inferiores às obtidas no grupo D (respectivamente de 21,47 e 19,82%). Relativamente aos valores basais do grupo C, o grupo E apresentou concentrações de triglicerídeos não significativamente superiores nas duas primeiras avaliações, tornando-se ligeiramente inferiores no final do estudo ($p=0,472$).

O quadro 2 representa as concentrações séricas das diversas apoproteínas.

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
ApoA 1	E	28	170,11	173,39	28,210	162,45	184,33	0,171
	C	12	158,50	158,50	19,838	145,90	171,10	
ApoA 2	E	28	173,39	28,210	5,331	162,45	184,33	0,106
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoA 3	E	28	169,18	23,413	4,425	160,10	178,26	0,176
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoB100 1	E	28	170,89	30,185	5,704	159,19	182,60	0,000
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
ApoB100 2	E	28	170,82	31,384	5,931	158,65	182,99	0,000
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
ApoB100 3	E	28	119,86	24,417	4,614	110,39	129,33	0,011
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
Lp(a) 1	E	27	46,897	48,4085	9,3162	27,747	66,047	0,026
	C	12	13,577	14,0976	4,0696	4,619	22,534	
Lp(a) 2	E	28	49,16	48,994	9,259	30,17	68,16	0,019
	C	12	13,58	14,098	4,070	4,62	22,53	
Lp(a) 3	E	28	49,055	46,9931	8,8809	30,833	67,277	0,015
	C	12	13,577	14,0976	4,0696	4,619	22,534	

Quadro 2
(Apoproteínas)

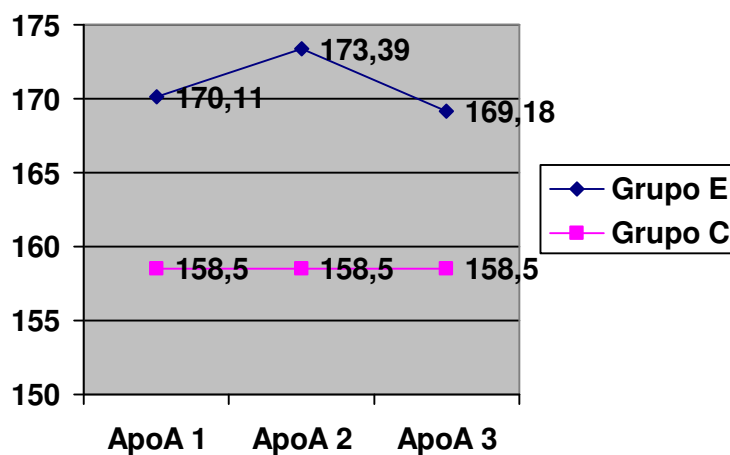


Gráfico 6

A ApoA1 apresentou, no grupo E, (Quadro 2 e Gráfico 6) um comportamento perfeitamente paralelo ao verificado no grupo D. Os valores séricos ligeiramente superiores aos dos controlos ($p=0,171$), na avaliação basal, mostraram um discreto aumento com as vitaminas E e C ($p=0,455$) e posteriormente uma também discreta redução com as estatinas ($p=0,225$). Embora sempre superiores às do grupo C, as concentrações da ApoA1 nunca atingiram diferenças estatisticamente significativas.

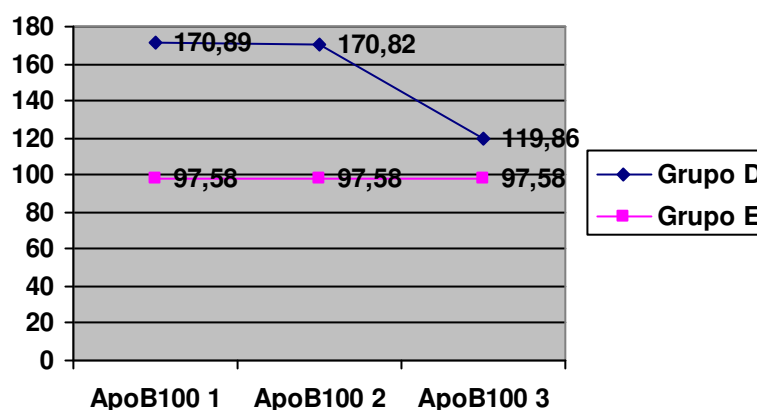


Gráfico 7

A concentração da ApoB100 neste grupo E (Quadro 2 e Gráfico 7) apresentou mais uma vez, uma evolução perfeitamente sobreponível à do grupo D. Assim, a um efeito neutro das vitaminas E e C, seguiu-se uma redução de 29,83% ($p=0,000$) com as estatinas. Se compararmos a redução do CLDL com a redução das ApoB100 (19,25 versus 29,83%), verificamos que as estatinas reduziram essencialmente a concentração das pequenas LDL, mais oxidáveis e aterogénicas.

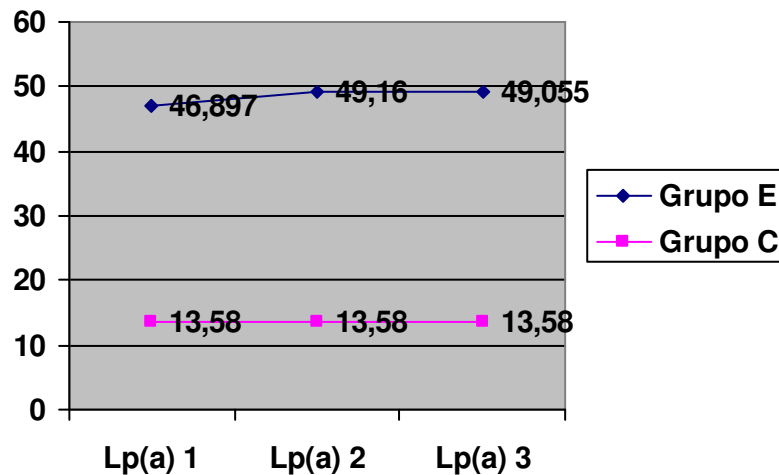


Gráfico 8

A Lp(a) (Quadro 2 e Gráfico 8) manteve-se sem grandes variações ao longo do nosso estudo, sempre em concentrações significativamente superiores no grupo E, relativamente ao grupo C e com um pequeno aumento não significativo nas duas últimas avaliações ($p=0,077$ e $0,959$, respectivamente na segunda e terceira).

19.2 - Resumo e Comentários

Em resumo, tal como dissemos, não foi nosso objectivo principal a análise do comportamento das diversas lipó e apoproteínas com a terapêutica hipolipemiante, neste caso com as estatinas, por se tratar de um tema exaustivamente abordado. Sendo assim salientaremos apenas os aspectos mais relevantes.

Verificaram-se reduções significativas na concentração do CT, do CLDL e da relação CT/CHDL. A redução do CLDL (19,25%; $p=0,001$) foi superior à verificada no grupo de todos os dislipidémicos (16,400%), em provável relação com os maiores níveis iniciais neste grupo E e com o facto de, neste grupo, os resultados traduzirem unicamente a acção das estatinas.

Relativamente aos triglicérideos houve uma redução não significativa dos seus níveis, inferior à verificada no grupo D. Julgamos que, por um lado, os maiores valores basais explicam a maior redução obtida no grupo D e por outro,

o fenofibrato, um redutor dos triglicerídeos mais potente do que as estatinas, não foi utilizado nos indivíduos E.

O CHDL apresentou um aumento significativo da sua concentração.

Relativamente às apoproteínas, a única alteração relevante foi uma redução dos níveis da ApoB100. Ao reduzir mais intensamente a concentração desta apoproteína do que a do CLDL, as estatinas terão muito provavelmente reduzido essencialmente as pequenas e mais oxidáveis partículas LDL.

O comportamento da Lp(a) neste grupo E foi semelhante ao verificado no grupo D e era previsível, dada a ausência de efeitos, comprovadamente significativos, a nível desta lipoproteína, quer por parte das vitaminas E e C, quer por parte das estatinas. Como se sabe, presentemente, apenas o ácido nicotínico possui alguma capacidade para reduzir a concentração da Lp(a).

19.3 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante

19.3.1 - Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina

A transferrina, tal como dissemos, é uma molécula com duplo significado, comportando-se por um lado como proteína de fase aguda e por outro, ao fixar o Fe, constituindo-se como possível defesa antioxidante.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
Transf 1 E	28	2,9107	0,40989	0,07746	2,7518	3,0697	0,151
C	6	3,3783	1,51070	0,61674	1,7930	4,9637	
Transf 2 E	28	2,9579	0,46293	0,08749	2,7784	3,1374	0,211
C	6	3,3783	1,51070	0,61674	1,7930	4,9637	
Transf 3 E	28	2,518	0,3402	0,0643	2,386	2,650	0,008
C	6	3,378	1,5107	0,6167	1,793	4,964	
Cerul 1 E	28	0,3568	0,07770	0,01468	0,3267	0,3869	0,001
C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	
Cerul 2 E	28	0,3929	0,11885	0,02246	0,3468	0,4389	0,001
C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	

Cerul 3 E	28	0,2743	0,04917	0,00929	0,2552	0,2934	
C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	0,508

Quadro 3
(Transferrina e Ceruloplasmina)

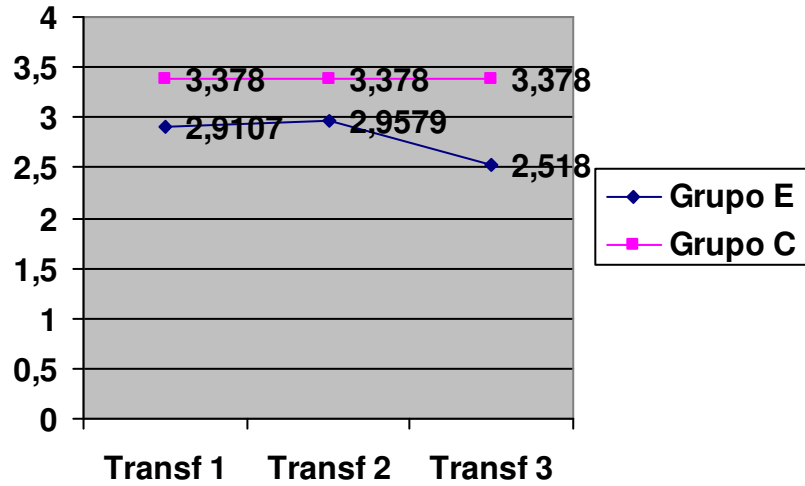


Gráfico 9

Como se pode observar no quadro 3 e gráfico 9, os valores mantiveram-se no grupo E, ao longo do estudo, sempre inferiores, comparativamente aos indivíduos C. Esta diferença apenas atingiu significado estatístico após terapêutica com as estatinas ($p=0,008$), ao ser significativamente reduzida em 14,87% ($p=0,000$).

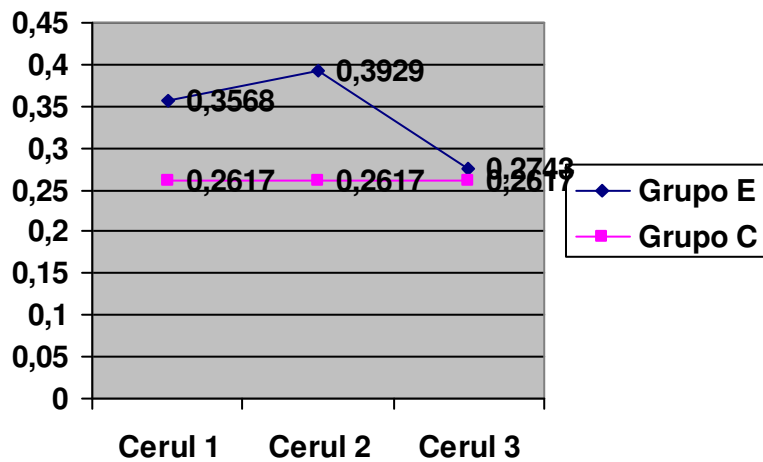


Gráfico 10

A concentração da ceruloplasmina (Quadro 3 e Gráfico 10) manteve-se significativamente superior no grupo E, na primeira e na segunda avaliação ($p=0,001$), tendo ficado praticamente sobreponível à do grupo C no último controlo do nosso estudo ($p=0,508$), após redução significativa com as estatinas (30,18%; $p=0,000$). A acção das vitaminas E e C foi já abordada (aumento de 10,1%; $p=0,016$).

19.3.2 - Vitamina E, "Total Radical-trapping Antioxidant Parameter" e LDL oxidadas no Plasma

As avaliações dos parâmetros plasmáticos Vit E, OxLDL e TRAP estão indicadas no quadro 4.

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
VitE 1	E	27	47,409	11,5470	2,2222	42,841	51,976	0,000
	C	12	28,479	3,3984	0,9810	26,320	30,638	
VitE 2	E	27	60,861	19,5775	3,7677	53,117	68,606	0,000
	C	12	28,479	3,3984	0,9810	26,320	30,638	
VitE 3	E	27	41,2437	13,31707	2,56287	35,9756	46,5118	0,002
	C	12	28,4792	3,39837	0,98102	26,3199	30,6384	
VitE/TG 1	E	27	29,270	9,0526	1,7422	25,689	32,851	0,001
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitE/TG 2	E	25	43,736	18,4687	3,6937	36,112	51,360	0,000
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitE/TG 3	E	27	29,700	11,5030	2,2137	25,150	34,250	0,006
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitE/TG+CLDL1E	E	26	7,054	1,4265	0,2798	6,478	7,630	0,297
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
VitE/TG+CLDL2E	E	18	9,309	3,0987	0,7304	7,768	10,850	0,008
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
VitE/TG+CLDL3E	E	27	7,878	2,2239	0,4280	6,998	8,758	0,067
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
OxLDL1	E	27	127,4900	20,91444	4,02499	119,2165	135,7635	0,000
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	

OxLDL2	E	27	115,0656	20,16514	3,88079	107,0885	123,0426	0,000
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
OxLDL3	E	27	93,7693	15,10363	2,90669	87,7945	99,7441	0,001
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
TRAP 1	E	27	1243,487	148,4098	28,5615	1184,778	1302,196	0,065
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	
TRAP 2	E	27	1299,768	148,2125	28,5235	1241,137	1358,399	0,433
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	
TRAP 3	E	27	1281,681	129,8019	24,9804	1230,334	1333,029	0,216
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	

Quadro 4
(Vitamina E e Oxidação)

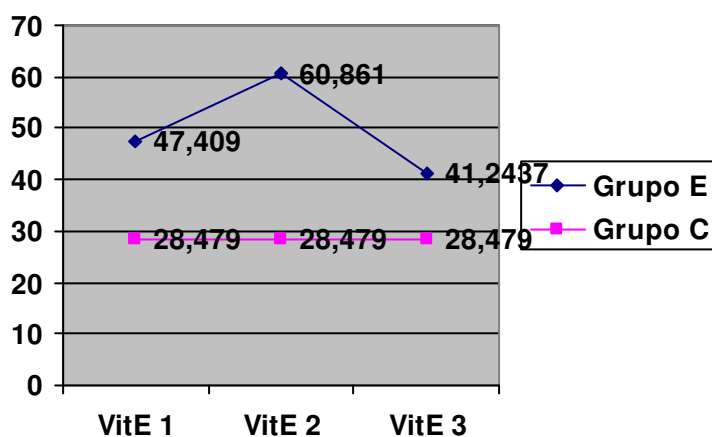


Gráfico 11

Relativamente aos níveis séricos da Vit E (Quadro 4 e Gráfico 11), significativamente superiores no grupo dos dislipidémicos ao longo do estudo, apresentaram um aumento de 28,37% ($p=0,001$) com a administração das Vit(s) E e C e uma posterior redução com as estatinas (32,23%; $p=0,000$), ficando na última avaliação inferiores aos níveis basais.

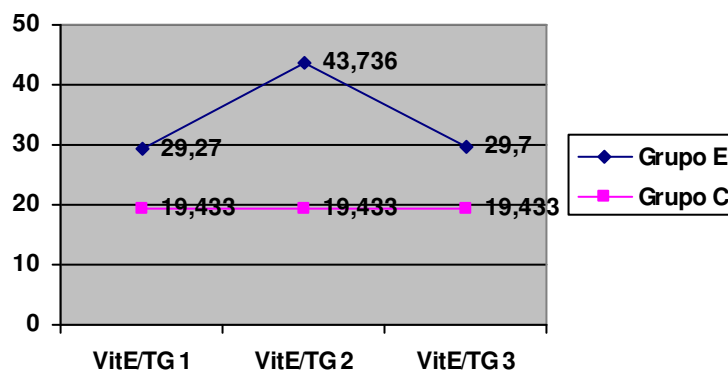


Gráfico 12

Comportamento semelhante foi verificado quando se avaliou a evolução da relação molar entre a Vit E e os triglicerídeos (Quadro 4 e Gráfico 12), aumentando com as vitaminas antioxidantes (49,42%; $p=0,000$) e regressando aos níveis iniciais com as estatinas, na sequência de uma redução de 32,09% ($p=0,001$). Os valores desta relação mantiveram-se ao longo do estudo significativamente superiores no grupo E.

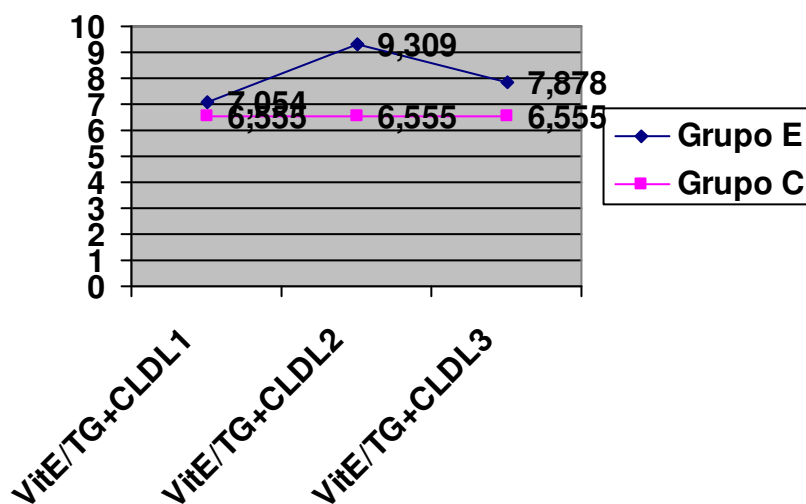


Gráfico 13

Também a relação molar entre a Vit E e o somatório dos triglicerídeos com o LDL (Quadro 4 e Gráfico 13) apresentou um aumento de 31,96% ($p=0,007$) após terapêutica com o α -tocoferol e a vitamina C e uma posterior

redução, não significativa, de 15,37% ($p=0,163$) com a atorvastatina/sinvastatina. No entanto, em relação ao parâmetro VitE/(TG+CLDL), a diferença entre os grupos E e C não foi inicialmente significativa ($p=0,297$) e depois de ter atingido, como vimos, significado estatístico com a terapêutica vitamínica ($p=0,008$), apresentou na última avaliação uma diferença que embora não significativa, foi superior à da avaliação basal ($p=0,067$).

Em relação à determinação das OxLDL, os valores obtidos na população tratada com estatinas, em relação ao controlo, estão indicados no quadro 4 e no gráfico 14.

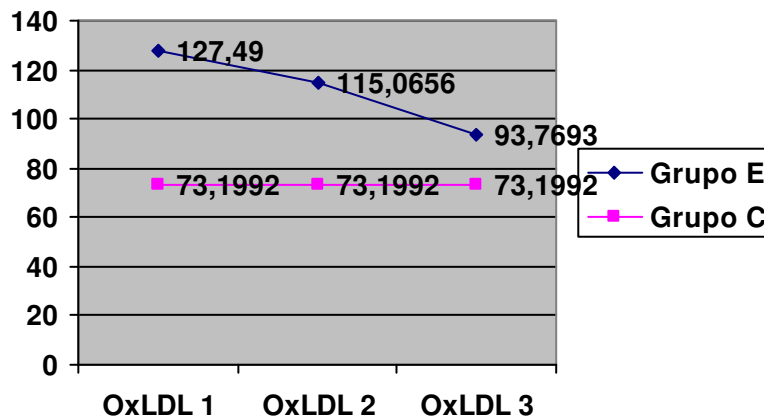


Gráfico 14

Os valores das OxLDL mantiveram-se sempre significativamente superiores nos dislipidémicos E, relativamente aos indivíduos do grupo C. Verificou-se no entanto uma redução dos seus níveis, quer com as vitaminas E e C (9,74%; $p=0,006$), quer com as estatinas (18,5%; $p=0,000$).

O gráfico 15 mostra a variação dos valores médios de TRAP ao longo do estudo na população tratada com estatinas em relação à população controlo.

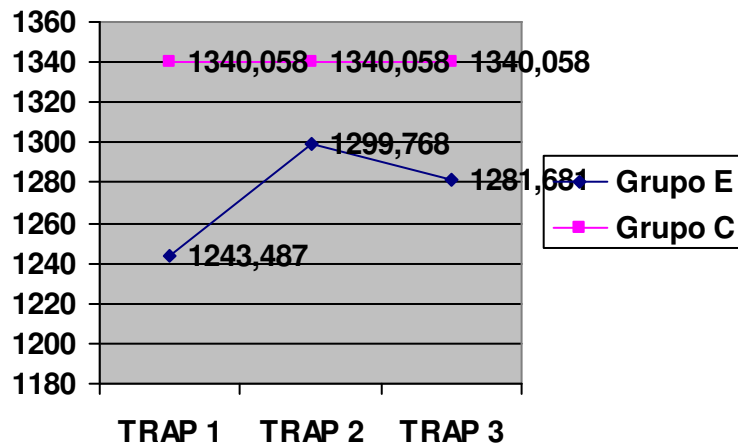


Gráfico 15

Como já referimos atrás, apesar da maior concentração sérica basal do α -tocoferol no nosso grupo E, o TRAP, na primeira avaliação, foi superior no grupo C, não atingindo no entanto significado estatístico ($p=0,065$). Com a administração das vitaminas antioxidantes, verificou-se no grupo E um aumento de 4,52% ($p=0,042$) neste parâmetro, reduzindo-se a diferença relativamente ao grupo controlo ($p=0,433$). Com as estatinas, houve uma ligeira redução do TRAP (1,39%; $p=0,531$), que se manteve, apesar desta redução, superior aos níveis pré-terapêuticos e com uma menor diferença relativamente ao grupo C ($p=0,216$).

19.3.3 - Resumo e comentários

Em resumo, gostaríamos de tecer algumas considerações relativamente aos resultados acima discutidos.

As duas proteínas relacionadas com os mecanismos oxidativos e inflamatórios, a transferrina e a ceruloplasmina, mostraram comportamentos parcialmente semelhantes. A primeira, inicialmente em níveis mais baixos nos indivíduos do grupo E, viu a sua concentração reduzir-se após terapêutica com as estatinas ($p=0,000$), ficando significativamente inferior à do grupo C. A concentração basal da ceruloplasmina, mais elevada no grupo E, foi igualmente reduzida de uma forma significativa pela terapêutica com os referidos

hipolipemiantes ($p=0,000$), ficando praticamente sobreponível à dos indivíduos normolipidémicos.

A redução da ceruloplasmina verificada no nosso estudo, com as estatinas, está de acordo com a literatura consultada. Vinte dislipidémicos, com idade média de $49,15 \pm 3,28$ anos, foram tratados durante quatro meses com 10 mg/dia de sinvastatina ou de atorvastatina. Entre outras alterações verificadas, ocorreu uma redução significativa do Cu (9%, $p < 0,01$) e da ceruloplasmina (24%, $p < 0,05$) séricos¹⁷⁴⁴. Resultados semelhantes foram obtidos noutra estudo realizado em 32 doentes de Alzheimer, em que o tratamento com estatinas durante um ano, provocou uma redução significativa nos níveis séricos da ceruloplasmina ($p < 0,05$). Os autores concluíram também que o colesterol e a ceruloplasmina poderão estar associados à deterioração cognitiva¹⁷⁴⁵.

Julgamos que os efeitos das estatinas sobre estas duas proteínas poderão ter dois significados. Por um lado, ao reduzir a sua concentração, estarão eventualmente a reduzir as defesas antioxidantes, permitindo que mais Fe e Cu livres possam participar na formação de radicais através da reacção de Fenton. Por outro lado, estas duas proteínas são também marcadores inflamatórios de fase aguda e particularmente a ceruloplasmina, tem estado positivamente associada à patologia vascular. Sendo assim, a redução dos seus níveis poderá traduzir uma redução do ambiente inflamatório sistémico e do risco cardio-cerebrovascular.

Relativamente à concentração sérica da Vit E, manteve-se ao longo do estudo, sempre superior no grupo dos dislipidémicos medicados com as estatinas, tendo sido aumentada com a terapêutica vitamínica e reduzida com os hipolipemiantes. Comportamento sobreponível ocorreu com a relação VitE/TG. A relação VitE/TG+CLDL, também inicialmente mais elevada no grupo E, embora sem significado estatístico, aumentou igualmente com as Vit (s) E e C e foi reduzida de uma forma não significativa após terapêutica com as estatinas, mantendo-se ligeiramente superior à do grupo C. Julgamos que o efeito hipolipemiante das estatinas, ao reduzir significativamente o CLDL, particularmente as pequenas LDL e o número de moles destas lipoproteínas, terá alterado, a favor do número de moles do α -tocoferol, a relação mMolar Vit E/TG+CLDL, pelo que esta razão não foi significativamente reduzida. Pelo contrário, ao não reduzir de uma forma significativa os triglicéridos, a

terapêutica com estatinas, reduziu mais significativamente a razão mMolar Vit E/TG.

O aumento da relação entre a Vit E e as lipoproteínas, que admitimos espelhar da maneira mais fiel os níveis da referida vitamina, conseguido de uma forma significativa pela suplementação com as Vit(s) E e C, terá conferido ao plasma dos nossos dislipidémicos uma maior capacidade antioxidativa.

Num estudo realizado em 205 sicilianos hipercolesterolémicos em que se avaliaram, entre outros parâmetros, a oxidabilidade das LDL e o conteúdo destas lipoproteínas em Vit E, verificou-se que a terapêutica com 10 mg/dia de atorvastatina, conferiu uma resistência à oxidação por parte das LDL e um aumento do seu conteúdo em α -tocoferol¹⁷⁴⁶. Em 47 dislipidémicos, dos quais 25 com hipercolesterolemia familiar (HF), a administração durante 14 semanas de sinvastatina, nas doses de 10 a 20 mg/dia, conduziu por um lado a uma redução significativa nos níveis do α -tocoferol plasmático ($p < 0,05$) e por outro, a um aumento da relação entre esta vitamina e o colesterol total (9,1 nos indivíduos com HF e 12,1% nos restantes, $P < 0,01$)¹⁷⁴⁷. Num outro estudo realizado também em hipercolesterolémicos, a sinvastatina nas doses de 20 a 40 mg/dia aumentou significativamente os níveis plasmáticos, corrigidos para os lípidos, do α -tocoferol e do gama-tocoferol ($p < 0,001$ e $0,005$)¹⁷⁴⁸.

Embora no nosso estudo não tenhamos determinado o conteúdo das LDL em Vit E, o aumento da relação entre esta e as lipoproteínas, particularmente as LDL, após terapêutica antioxidante, reflectirá muito provavelmente um aumento do α -tocoferol ligado às lipoproteínas. As estatinas reduziram a Vit E total em 32,23% ($p = 0,000$) e a relação entre esta vitamina e os triglicerídeos em 32,09% ($p = 0,001$). Quando a concentração do α -tocoferol foi simultaneamente ajustada para os níveis dos triglicerídeos e do CLDL, verificou-se que as estatinas induziram uma redução muito mais discreta desta relação (15,37%; $p = 0,163$). Como as estatinas reduziram significativamente o CLDL, alterou-se a favor da Vit E a relação existente entre esta vitamina e os lípidos.

A evolução dos níveis da Vit E e particularmente quando corrigidos para os lípidos, foi acompanhada por uma evolução favorável da concentração das OxLDL, progressiva e significativamente reduzida ao longo do estudo. A marcada redução das OxLDL com as estatinas, apesar da evolução manifestada pela Vit E sérica, traduz por um lado a redução significativa do CLDL e por outro

uma possível actividade antioxidante destes fármacos. Este efeito das estatinas foi já documentado em diversos estudos, que incluíram dislipidémicos, transplantados renais, IRC sob terapêutica dialítica, parecendo ficar a dever-se, entre outros mecanismos, à inibição da actividade da NADPH oxidase e à estimulação de enzimas antioxidantes como a PON1 e a glutathione peroxidase^{1749 1750 1751 1752 1753 1754}. Como exemplo, citamos um trabalho realizado em 55 adultos com hipercolesterolemia moderada (CLDL 3,4 a 4,9 mmol/L), em que a terapêutica com 40 mg/dia de pravastatina ou 20 a 80 mg/dia de sinvastatina, aumentou significativamente o *lag time* da oxidação das LDL (74,3±39,8 versus 98,3±57,8 min; p=0,003)¹⁷⁵⁵. Esta acção antioxidante das estatinas não estará, segundo alguns autores, na dependência das alterações lipídicas induzidas por estes fármacos¹⁷⁵⁶. Nem todos os estudos estão no entanto de acordo com estes efeitos antioxidantes das estatinas. É o caso de um trabalho realizado em diabéticos tipo 1, com uma relação CT/CHDL > 4, em que a atorvastatina, na dose de 40 mg/dia, para além dos efeitos lipídicos previsíveis, reduziu os níveis do α -tocoferol (46,4 ±16,3 para 32,2±11,8; p<0,001) e aumentou significativamente a peroxidação das LDL+VLDL induzida pelo Cu (p=0,004)¹⁷⁵⁷.

O TRAP depois de um aumento com a terapêutica antioxidante teve uma redução, sem significado, com as estatinas. Num estudo já citado, a sinvastatina, nas doses de 20 e 40 mg/dia, administrada durante oito semanas em 76 hipercolesterolémicos, reduziu significativamente os níveis das OxLDL (p<0,0001) e aumentou, também significativamente, o TRAP (p<0,05)¹⁷⁴⁸.

19.4 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios

19.4.1 - hsPCR e AAT

No quadro 5 e gráfico 16 estão descritos os valores da hsPCR (mg/dl) e da AAT (g/l). Da sua análise salienta-se, para além dos altos valores basais dos grupos E e C, um aumento da concentração sérica da PCR após terapêutica com as estatinas.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
PCR 1 E	28	0,2746	0,20036	0,03786	0,1970	0,3523	0,583
C	12	0,3208	0,32191	0,09293	0,1163	0,5254	
PCR 2 E	28	0,3050	0,28077	0,05306	0,1961	0,4139	0,876
C	12	0,3208	0,32191	0,09293	0,1163	0,5254	
PCR 3 E	28	0,58	1,551	0,298	-0,03	1,20	0,568
C	12	0,32	0,322	0,093	0,12	0,53	
AAT1 E	28	1,291	0,3082	0,0582	1,171	1,410	0,845
C	12	1,272	0,1970	0,0569	1,147	1,397	
AAT2 E	28	1,327	0,2937	0,555	1,213	1,441	0,557
C	12	1,272	0,1970	0,0569	1,147	1,397	
AAT3 E	28	1,1439	0,24733	0,04674	1,0480	1,2398	0,122
C	12	1,2717	0,19697	0,05686	1,1465	1,3968	

Quadro 5
(hsPCR e AAT)

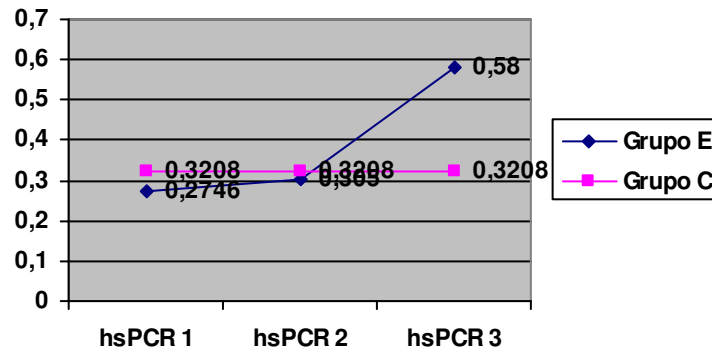


Gráfico 16

Tal como já defendemos em capítulo anterior, julgamos que os elevados valores apresentados por alguns dos participantes medicados com os hipolipemiantes e o pequeno número da amostra, justificam os valores elevados da PCR e o inesperado aumento verificado com as estatinas. Quatro dos nossos dislipidémicos apresentaram valores da PCR iniciais ou pós-terapêutica muito superiores a 10 mg/l (0,82→13,9→13,4; 5,1→4,5→41,5; 16,1→24,1→9; 2,4→2,4→22,5 e 9,9→14,1→8,5 mg/l), que como referimos já, são considerados

pela maioria dos autores não passíveis de ser admitidos como factor de risco da aterosclerose, mas muito provavelmente secundários a outro tipo de doença subjacente. Assim e como fizemos aquando da análise dos resultados globais, excluímos estes doentes (4) e os resultados foram os apresentados no quadro 6 e gráfico 17.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
PCR 1 E	25	0,2556	0,17970	0,03594	0,1814	0,3298	0,869
C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	
PCR 2 E	25	0,2628	0,19379	0,03876	0,1828	0,3428	0,796
C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	
PCR 3 E	24	0,1746	0,15951	0,03256	0,1072	0,2472	0,267
C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	

Quadro 6
(hsPCR)

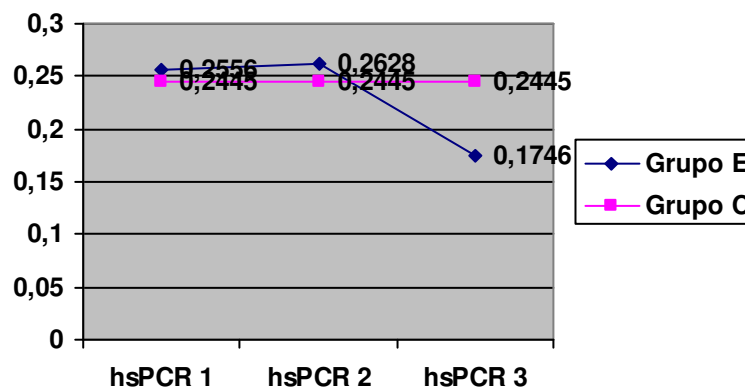


Gráfico 17

Da análise dos dados ressalta que os valores basais da PCR são sobreponíveis e elevados nos dois grupos, conferindo-lhes um moderado risco vascular. Verifica-se também que a terapêutica vitamínica não provocou qualquer alteração significativa ($p=0,723$) e que, com as estatinas, a concentração sérica da PCR apresentou uma redução de 33,56% ($p=0,001$), tornando-se ligeiramente inferior à do grupo C ($p=0,267$).

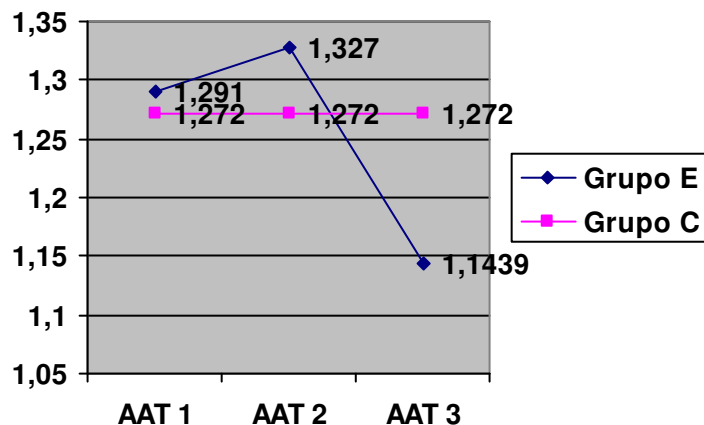


Gráfico 18

O comportamento da α 1-antitripsina neste sub-grupo E (Quadro 5 e Gráfico 18) foi perfeitamente sobreponível ao verificado no grupo de todos os dislipidémicos (grupo D). Os seus valores basais, quase sobreponíveis aos do grupo C ($p=0,845$), apresentaram um muito discreto aumento com as vitaminas antioxidantes ($p=0,218$) e uma posterior redução com as estatinas (13,79%; $p=0,000$), tornando-se inferiores aos do grupo C ($p=0,122$).

19.4.2 – Interleucinas

Relativamente à evolução apresentada pelos níveis séricos das diversas interleucinas, recordamos as considerações tecidas aquando da análise dos resultados conjuntos dos grupos medicados com as estatinas e com o fibrato. A propósito de cada molécula, teceremos os comentários que julgamos poder explicar alguns dos resultados obtidos no nosso estudo.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%	P
IL6 1 E	27	2,18252	1,388032	0,267127	1,63343 2,73161	0,022
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589 1,69777	
IL6 2 E	27	2,02519	1,156065	0,222485	1,56786 2,48251	0,023
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589 1,69777	
IL6 3 E	26	2,85473	1,332978	0,261419	2,31633 3,39313	0,000
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589 1,69777	

IL8 1	E	27	32,54237	122,493359	23,573858	-15,91439	80,99913	
	C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,088
IL8 2	E	27	20,04059	28,469382	5,478935	8,77848	31,30271	
	C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,000
IL8 3	E	26	37,02073	38,632717	7,576499	21,41664	52,62482	
	C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,007
IL18 1	E	27	311,66511	445,076274	85,654969	135,59880	487,73142	
	C	12	854,42767	577,429103	166,689424	487,54672	1221,30862	0,003
IL18 2	E	27	259,29596	197,011445	37,914870	181,36083	337,23110	
	C	12	854,42767	577,429103	166,689424	487,54672	1221,30862	0,000
IL18 3	E	26	498,14392	571,528920	112,086043	267,29840	728,98945	
	C	12	854,42767	577,429103	166,689424	487,54672	1221,30862	0,083
INF 1	E	27	26,72796	8,471471	1,630335	23,37676	30,07917	
	C	12	25,79667	10,359777	2,990610	19,21438	32,37895	0,769
INF 2	E	27	28,56230	6,844796	1,317282	25,85459	31,27001	
	C	12	25,79667	10,359777	2,990610	19,21438	32,37895	0,329
INF 3	E	26	29,6065	6,66983	1,30806	26,9125	32,3005	
	C	12	25,7967	10,35978	2,99061	19,2144	32,3790	0,180
VEGF1	E	27	191,88426	134,214843	25,829659	138,79064	244,97788	
	C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,716
VEGF2	E	27	220,53174	131,900678	25,384297	168,35357	272,70991	
	C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,319
VEGF3	E	26	215,09165	156,365519	30,665801	151,93425	278,24905	
	C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,442

Quadro 7
(Interleucinas)

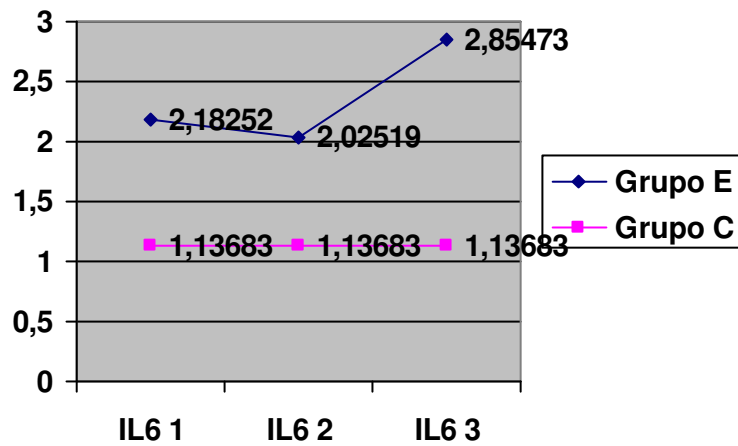


Gráfico 19

No quadro 7 e gráfico 19, verifica-se que o grupo E apresentou na avaliação basal uma concentração sérica da IL6 (pg/ml) significativamente superior à do grupo C ($p=0,022$). Esta diferença entre os dois grupos manteve-se praticamente inalterada com a terapêutica vitamínica e sofreu um aumento significativo com as estatinas ($p=0,024$), alargando-se assim a diferença com o grupo controlo ($p=0,000$).

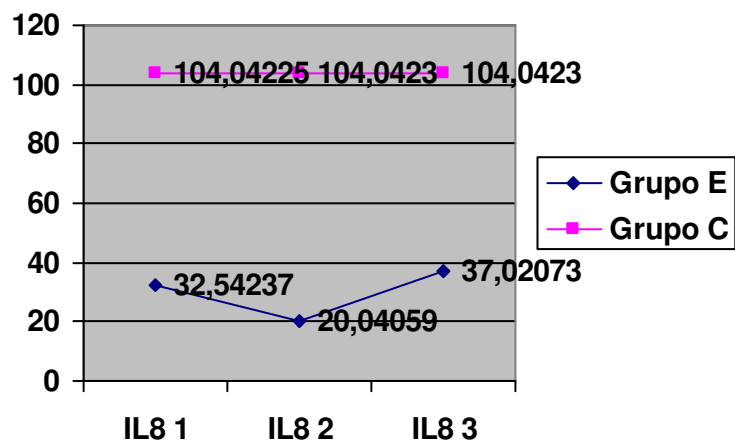


Gráfico 20

Tal como no grupo de todos os dislipidémicos, verifica-se no quadro 7 e gráfico 20, que os níveis da IL8 (pg/ml) foram sempre inferiores no grupo E relativamente aos controlos ($p=0,088$, $0,000$ e $0,007$, respectivamente na

primeira, segunda e terceira avaliação). Quer a terapêutica antioxidante (redução de 38,41%; $p=0,617$), quer a utilização das estatinas (aumento de 84,72%; $p=0,102$) não induziram qualquer alteração significativa nos níveis desta citocina.

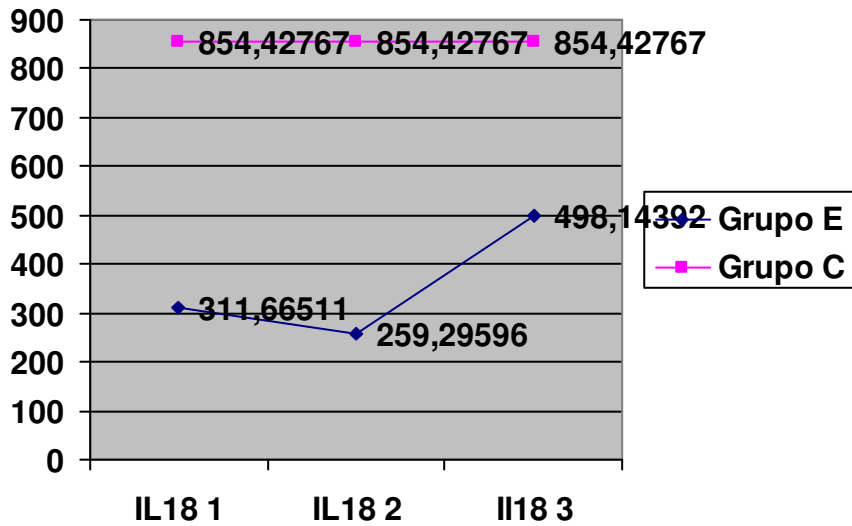


Gráfico 21

Os níveis séricos da IL18, em pg/ml, (Quadro 7 e Gráfico 21) mantiveram-se ao longo do estudo inferiores nos indivíduos E, relativamente aos do grupo C. Esta diferença foi significativa nas duas primeiras avaliações ($p=0,003$ e $0,000$), tendo perdido significado após terapêutica com as estatinas ($p=0,083$) que induziram um aumento de 92,11% ($p=0,042$) na concentração da IL18.

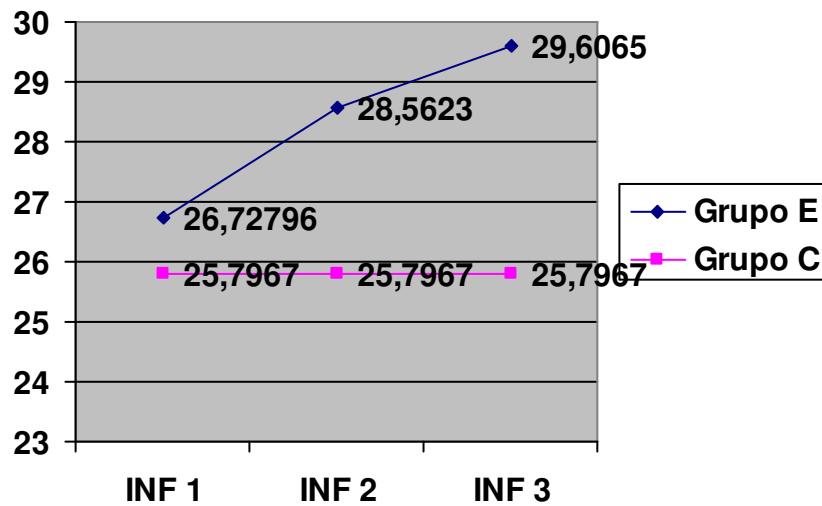


Gráfico 22

Os valores séricos do INFGama (Quadro 7 e Gráfico 22) apresentaram-se logo no início com valores superiores nos indivíduos E, embora sem atingir significado estatístico ($p=0,769$). A diferença nos níveis entre os dois grupos aumentou primeiro com a terapêutica vitamínica ($p=0,329$) e depois com as estatinas ($p=0,180$), aumentos estes não-significativos ($p=0,225$ e $0,483$, respectivamente com os primeiros e os segundos fármacos).

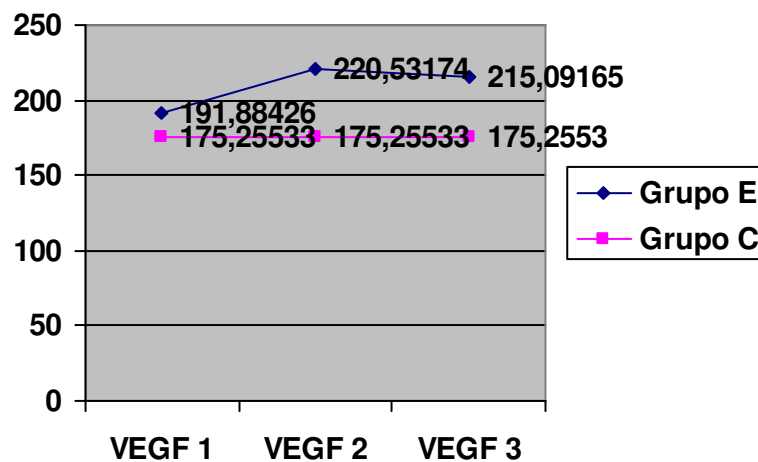


Gráfico 23

No quadro 7 e no gráfico 23, verifica-se que os níveis séricos do VEGF dos indivíduos E, mantiveram-se ao longo do estudo não significativamente superiores aos do grupo C. Verificou-se um ligeiro aumento com a terapêutica vitamínica ($p=0,181$) e uma redução também ligeira com as estatinas ($p=0,773$), sem no entanto voltarem aos níveis basais.

19.4.3 - Populações Linfocitárias

O quadro 8 refere-se à evolução apresentada pelas diferentes populações celulares.

		N	Média	Devio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
CD3 1	E	27	73,667	6,9088	1,3296	70,934	76,400	0,254
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329	80,438	
CD3 2	E	27	74,252	8,4062	1,6178	70,926	77,577	0,439
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329	80,438	
CD3 3	E	26	74,346	8,6428	1,6950	70,855	77,837	0,471
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329	80,438	
CD4 1	E	27	40,274	6,5877	1,2678	37,668	42,880	0,20
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056	51,411	
CD4 2	E	27	40,567	7,8836	1,5172	37,448	43,685	0,047
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056	51,411	
CD4 3	E	26	43,208	8,1412	1,5966	39,919	46,496	0,294
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056	51,411	
CD8 1	E	27	24,119	6,4428	1,2399	21,570	26,667	0,871
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876	29,124	
CD8 2	E	27	25,059	7,1819	1,3822	22,21	27,900	0,824
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876	29,124	
CD8 3	E	26	23,531	7,7777	1,5253	20,389	26,672	0,718
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876	29,124	
CD19 1	E	27	12,64	4,066	0,782	11,03	14,25	0,955
	C	12	12,72	3,879	1,120	10,25	15,18	
CD19 2	E	27	12,681	4,7997	0,9237	10,783	14,580	0,982
	C	12	12,717	3,8788	1,1197	10,252	15,181	
CD19 3	E	26	10,665	3,7245	0,7304	9,161	12,170	

	C	12	12,717	3,8788	1,1197	10,252	15,181	0,128
CD56 1	E	27	13,337	6,1987	1,1929	10,789	15,789	
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	0,230
CD56 2	E	27	12,974	7,8912	1,5187	9,852	16,096	
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	0,397
CD56 3	E	26	14,950	8,1184	1,5922	11,671	18,229	
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	0,117
CD56CD8 1	E	27	6,304	3,3847	0,6514	4,965	7,643	
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	0,184
CD56CD8 2	E	27	5,563	3,6308	0,6987	4,127	6,999	
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	0,530
CD56CD8 3	E	26	5,615	4,0750	0,7992	3,969	7,261	
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	0,543
DN1 1	E	27	3,200	2,1688	0,4174	2,342	4,058	
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	0,378
DN1 2	E	27	3,844	2,4697	0,4753	2,867	4,821	
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	0,963
DN1 3	E	26	4,719	2,7326	0,5359	3,616	5,823	
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	0,364
CD25 1	E	27	10,548	2,5071	0,4825	9,556	11,540	
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	0,023
CD25 2	E	27	11,419	2,8790	0,5541	10,280	12,557	
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	0,208
CD25 3	E	26	9,796	2,9121	0,5711	8,620	10,972	
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	0,007
CD26 1	E	27	41,13	9,068	1,745	37,54	44,71	
	C	12	46,99	11,392	3,289	39,75	54,23	0,093
CD26 2	E	27	42,493	8,5147	1,6387	39,124	45,861	
	C	12	46,992	11,3920	3,2886	39,754	54,230	0,179
CD26 3	E	26	45,354	9,4359	1,8505	41,543	49,165	
	C	12	46,992	11,3920	3,2886	39,754	54,230	0,644
CD25CD3 1	E	27	8,344	2,2531	0,4336	7,453	9,236	
	C	12	10,200	2,3460	0,6772	8,709	11,691	0,025
CD25CD3 2	E	27	9,13	2,343	0,451	8,20	10,05	
	C	12	10,20	2,346	0,677	8,71	11,69	0,195
CD25CD3 3	E	26	7,462	2,4311	0,4768	6,480	8,443	
	C	12	10,200	2,3460	0,6772	8,709	11691	0,002

CD26CD3 1	E	27	38,559	8,9662	1,7256	35,012	42,106	0,69
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	
CD26CD3 2	E	27	39,885	8,6306	1,6610	36,471	43,299	0,138
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	
CD26CD3 3	E	26	42,627	9,4628	1,8558	38,805	46,449	0,522
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	
CD25CD26CD3 1E	E	27	5,222	1,8873	0,3632	4,476	5,969	0,001
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	
CD25CD26CD3 2E	E	27	6,126	2,2681	0,4365	5,229	7,023	0,050
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	
CD25CD26CD3 3E	E	26	4,923	1,8593	0,3646	4,172	5,674	0,000
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	
CCR5 1	E	25	2,280	1,3678	0,2736	1,715	2,845	0,288
	C	12	2,942	2,3666	0,6832	1,438	4,445	
CCR5 2	E	27	3,30	2,251	0,433	2,41	4,19	0,651
	C	12	2,94	2,367	0,683	1,44	4,45	
CCR5 3	E	26	5,27	5,605	1,099	3,00	7,53	0,178
	C	12	2,94	2,367	0,683	1,44	4,45	
CCR5CD3 1	E	25	1,656	1,0844	0,2169	1,208	2,104	0,386
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	
CCR5CD3 2	E	25	2,030	1,1224	0,2160	1,586	2,474	0,975
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	
CCR5CD3 3	E	26	3,658	4,1152	0,8070	1,996	5,320	0,189
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	
CCR5CD4 1	E	25	1,136	0,8490	0,1698	0,786	1,486	0,706
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	
CCR5CD4 2	E	27	1,144	0,6925	0,1333	0,871	1,418	0,637
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	
CCR5CD4 3	E	26	2,381	3,4334	0,6733	0,994	3,768	0,188
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	1,530	0,1	
HLADR 1	E	27	27,378	7,8740	1,5154	24,263	30,493	0,007
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	
HLADR 2	E	27	23,863	7,1379	1,3737	21,039	26,687	0,131
	C	12	20,308	5,2219	1,507	16,991	23,626	
HLADR 3	E	26	23,550	4,7272	0,9271	21,641	25,459	0,065
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	
HLADRCD4 1	E	27	8,159	3,6706	0,7064	6,707	9,611	

	C	12	4,508	3,7833	1,0922	2,105	6,912	0,007
HLADRC4 2	E	27	6,85	2,963	0,570	5,68	8,02	
	C	12	4,51	3,783	1,092	2,10	6,91	0,043
HLADRC4 3	E	26	7,01	2,314	0,454	6,07	7,94	
	C	12	4,51	3,783	1,092	2,10	6,91	0,016
HLADRC8h 1	E	27	4,822	2,0376	0,3921	4,016	5,628	
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	0,001
HLADRC8h 2	E	27	4,022	2,2025	0,4239	3,151	4,894	
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	0,023
HLADRC8h 3	E	26	3,058	1,0685	0,2096	2,626	3,489	
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	0,109
HLADRC8low1	E	27	1,615	1,0010	0,1927	1,219	2,011	
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	0,027
HLADRC8low2	E	27	1,363	0,8390	0,1615	1,031	1,695	
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	0,086
HLADRC8low3	E	26	1,346	1,0191	0,1999	0,935	1,758	
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	0,149
HLADRC8 1	E	27	6,470	2,7589	0,5309	5,379	7,562	
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	0,001
HLADRC8 2	E	27	5,426	2,8669	0,5517	4,292	6,560	
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	0,022
HLADRC8 3	E	26	4,404	1,5270	0,2995	3,787	5,021	
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	0,060
CD95 1	E	27	20,759	11,6567	2,2433	16,148	25,371	
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	0,566
CD95 2	E	27	19,626	9,3786	1,8049	15,916	23,336	
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	0,749
CD95 3	E	26	18,735	10,8477	2,1274	14,353	23,116	
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	0,980
CD95L 1	E	27	2,73	1,905	0,367	1,98	3,49	
	C	12	2,00	1,004	0,290	1,36	2,64	0,218
CD95L 2	E	27	2,296	2,4588	0,4732	1,324	3,269	
	C	12	2,00	1,0036	0,2897	1,36	2,64	0,691
CD95L 3	E	26	2,354	2,3578	0,4624	1,401	3,306	
	C	12	2,00	1,0036	0,2897	1,36	2,64	0,622
CD95CD95L 1	E	27	0,448	0,4501	0,0866	0,270	0,626	
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	0,122

CD95CD95L 2	E	27	0,539	1,0284	0,1979	0,132	0,945	0,320
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	
CD95CD95L 3	E	26	0,404	0,4473	0,0877	0,224	0,585	0,215
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	
CD3CD95 1	E	27	17,515	10,3544	1,9927	13,419	21,611	0,966
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	
CD3CD95 2	E	27	17,037	9,1357	1,7582	13,423	20,651	0,909
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	
CD3CD95 3	E	26	16,023	9,3393	1,8316	12,251	19,795	0,657
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	
CD3CD95L 1	E	27	1,248	1,4017	0,2698	0,694	1,803	0,407
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	
CD3CD95L 2	E	27	1,074	2,0303	0,3907	0,271	1,878	0,763
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	
CD3CD95L 3	E	26	1,796	2,0832	0,4085	0,955	2,638	0,152
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	
CD62L 1	E	27	61,056	12,6663	2,4376	56,045	66,066	0,109
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	
CD62L 2	E	27	63,863	11,0970	2,1356	59,473	68,253	0,290
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	
CD62L 3	E	26	56,315	9,0083	1,7667	52,677	59,954	0,001
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	
CD3CD62L 1	E	27	45,030	11,0569	2,1279	40,656	49,404	0,097
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	
CD3CD62L 2	E	27	47,141	9,8041	1,8868	43,262	51,019	0,217
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	
CD3CD62L 3	E	26	39,085	8,0673	1,5821	35,826	42,343	0,000
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	
CD69 1	E	27	11,600	7,0951	1,3655	8,793	14,407	0,027
	C	12	16,750	4,5900	1,3250	13,834	19,666	
CD69 2	E	27	15,915	5,2724	1,0147	13,829	18,001	0,638
	C	12	16,750	4,5900	1,3250	13,834	19,666	
CD69 3	E	26	12,99	5,290	1,037	10,85	15,12	0,041
	C	12	16,75	4,590	1,325	13,83	19,67	
CD69CD3 1	E	27	5,422	4,1389	0,7965	3,785	7,060	0,004
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	
CD69CD3 2	E	27	7,985	3,5898	0,6909	6,565	9,405	

	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	0,170
CD69CD3	3 E	26	6,492	3,4372	0,6741	5,104	7,881	
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	0,012
CD69CD4	1 E	27	3,530	2,8760	0,5535	2,392	4,667	
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	0,012
CD69CD4	2 E	27	4,448	2,0064	0,3861	3,654	5,242	
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	0,037
CD69CD4	3 E	26	3,919	2,7824	0,5457	2,795	5,043	
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	0,028

Quadro 8
(Populações Celulares)

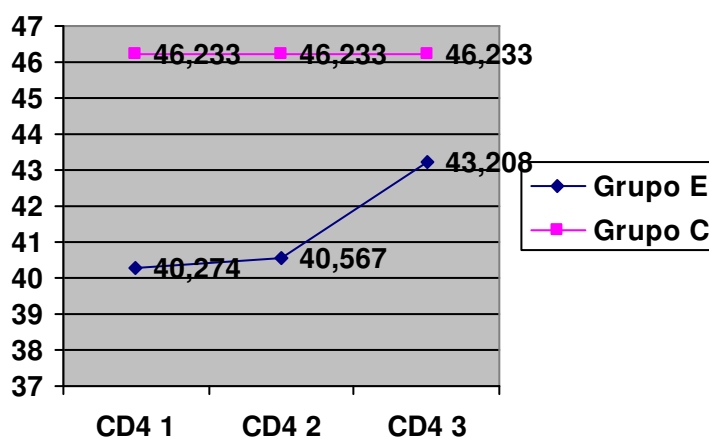


Gráfico 24

A concentração basal das células CD4+ (Quadro 8 e Gráfico 24) foi significativamente inferior no grupo dos dislipidémicos medicados com estatinas, relativamente ao grupo controlo ($p=0,020$). Estas células viram os seus níveis inalterados após terapêutica com as vitaminas antioxidantes ($p=0,754$) e a aumentar com a terapêutica hipolipemiante (6,51%; $p=0,007$).

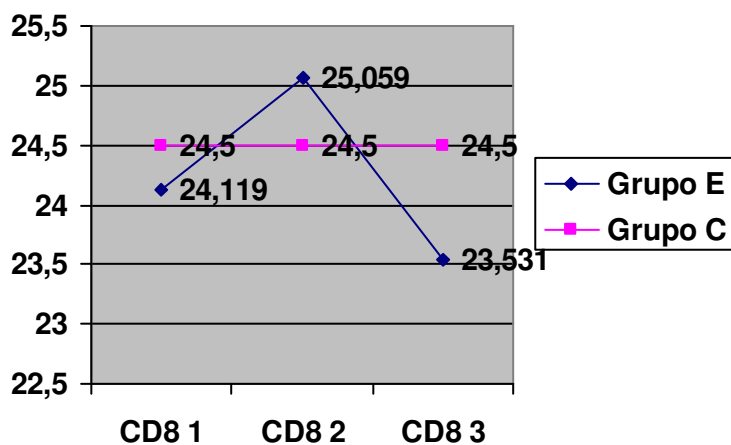


Gráfico 25

No quadro 8 e gráfico 25, verifica-se que na primeira avaliação as células CD8+ apresentaram uma concentração ligeira e não significativamente inferior nos indivíduos do grupo E ($p=0,871$). Os seus níveis sofreram um discreto aumento com as vitaminas E e C ($p=0,062$), tornando-se superiores aos do grupo controlo e uma redução significativa após terapêutica com as estatinas (6,09%; $p=0,031$), tornando-se de novo inferiores aos dos participantes C ($p=0,718$).

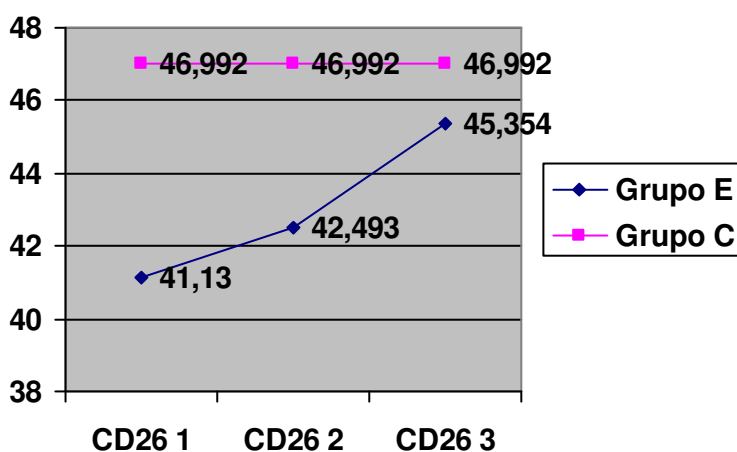


Gráfico 26

As células CD26+ (Quadro 8 e Gráfico 26) encontravam-se em concentrações basais inferiores nos participantes E ($p=0,093$), tendo

apresentado um aumento com as terapêuticas vitamínica ($p=0,378$) e hipolipemiante (6,73%; $p=0,026$), mantendo-se no entanto em níveis inferiores aos do grupo C (0,644).

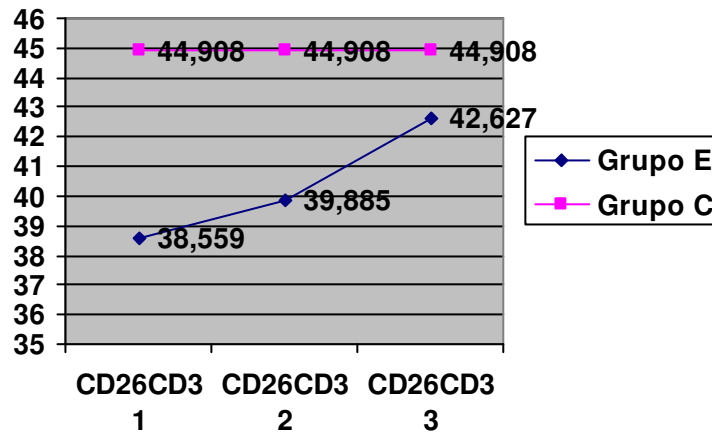


Gráfico 27

Os níveis das células CD26CD3+ (Quadro 8 e Gráfico 27) mantiveram-se sempre inferiores no grupo E, embora sem atingir significado estatístico, e apresentaram um progressivo aumento, primeiro com as vitaminas E e C ($p=0,395$) e depois com as estatinas (6,87%; $p=0,018$). Da primeira para a última avaliação e comparativamente ao grupo C, o valor do “p” foi de 0,069, 0,138 e 0,522.

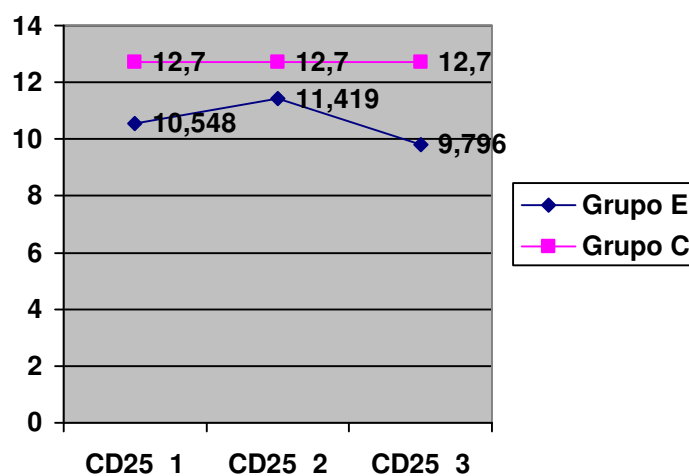


Gráfico 28

No quadro 8 e no gráfico 28, verifica-se que as células CD25+ se mantiveram sempre em concentrações inferiores no grupo E, inicialmente de uma forma significativa ($p=0,023$), com um pequeno aumento após terapêutica com as vitaminas antioxidantes ($p=0,191$) e uma posterior redução de 14,21% ($p=0,058$) com as estatinas ($p=0,007$ em relação ao grupo C).

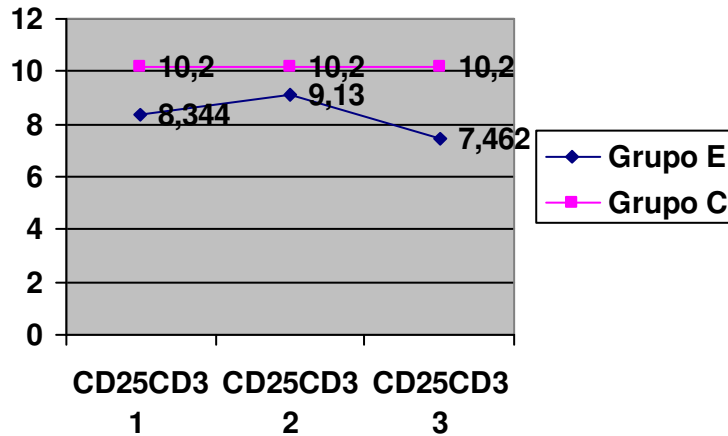


Gráfico 29

As células CD25CD3 apresentaram ao longo do estudo um comportamento paralelo ao das anteriores (Quadro 8 e Gráfico 29). Os seus níveis basais estavam significativamente inferiores nos participantes E ($p=0,025$), aumentaram ligeiramente com a terapêutica vitamínica ($p=0,195$), perdendo significado estatístico comparativamente ao grupo C ($p=0,195$) e após utilização das estatinas a sua concentração reduziu-se em 18,26% ($p=0,016$) voltando a ser significativamente inferior quando comparada aos controlos ($p=0,002$).

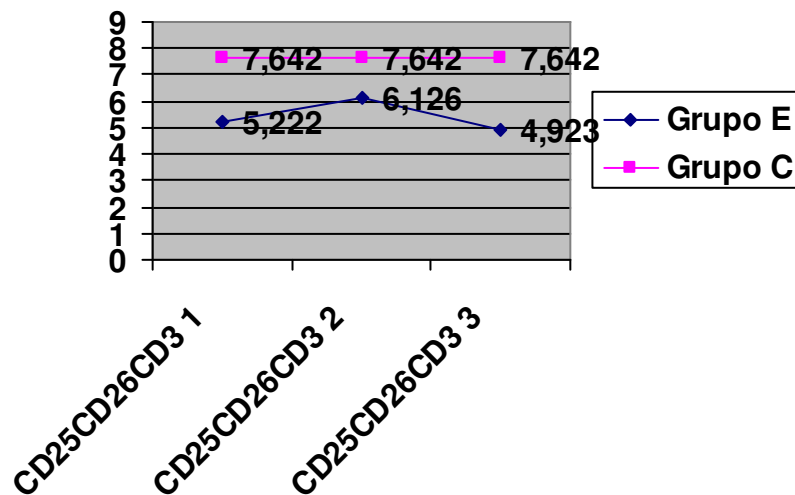


Gráfico 30

Mais uma vez se assistiu a um comportamento perfeitamente sobreponível das células CD25CD26CD3+ relativamente às anteriores (Quadro 8 e Gráfico 30), com os indivíduos do grupo E a apresentar níveis basais significativamente inferiores aos do grupo C ($p=0,001$), aumentando discretamente com as vitaminas antioxidantes ($p=0,103$) e sofrendo uma redução de 19,63% ($p=0,033$) com as estatinas. Na última avaliação as percentagens destas células nos indivíduos do grupo E foram significativamente inferiores relativamente às do grupo C ($p=0,000$).

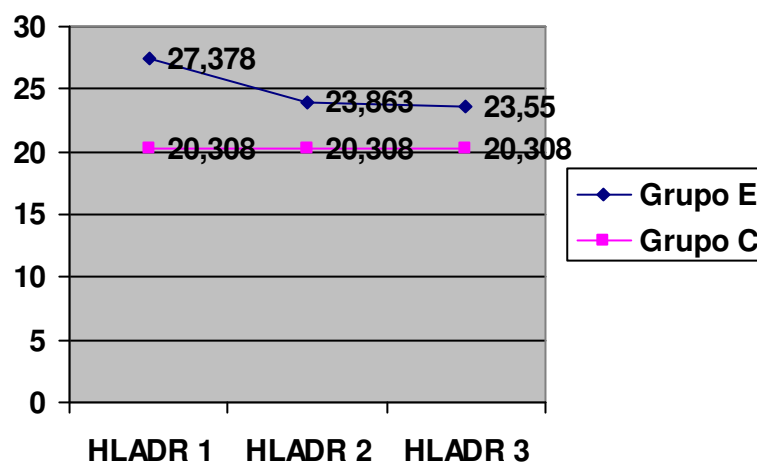


Gráfico 31

Tal como dissemos anteriormente, a principal função das células HLADR+ é apresentar os antígenos aos linfócitos CD4+, activando-os, sendo por isso também considerado um marcador da activação imunológica.

A concentração basal destas células (Quadro 8 e Gráfico 31) foi significativamente superior no grupo E ($p=0,007$). Após terapêutica vitamínica os seus níveis reduziram-se em 12,83% ($p=0,036$) aproximando-se dos do grupo C ($p=0,131$), tendo-se mantido praticamente inalterados com as estatinas ($p=0,907$).

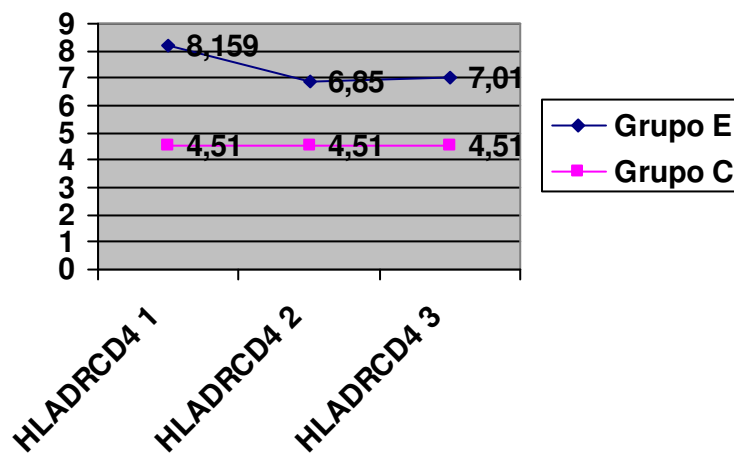


Gráfico 32

As células HLADRCDA4+ apresentaram um comportamento em tudo semelhante ao das anteriores (Quadro 8 e Gráfico 32). Os seus níveis basais significativamente superiores no grupo E ($p=0,007$), sofreram uma discreta redução após terapêutica com as vitaminas E e C ($p=0,122$) e um insignificante aumento com as estatinas ($p=0,821$). Na última avaliação mantiveram-se significativamente superiores no grupo E ($p=0,016$).

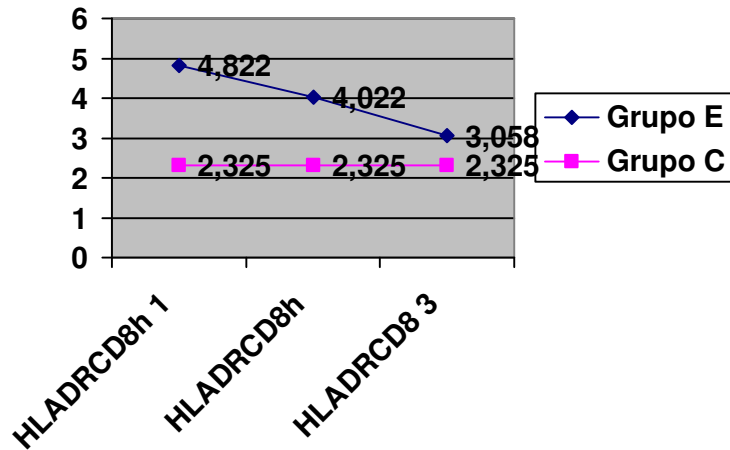


Gráfico 33

A concentração inicial das células HLADRCd8h+ (Quadro 8 e Gráfico 33) foi igualmente superior no grupo dos dislipidémicos ($p=0,001$). Após terapêutica com as vitaminas antioxidantes verificou-se uma redução de 16,59% ($p=0,112$) nos seus níveis, mantendo-se no entanto diferentes dos do grupo C ($p=0,023$). Com as estatinas obteve-se uma nova redução na sua concentração (23,96%; $p=0,047$), aproximando-se dos valores do grupo controlo ($p=0,109$).

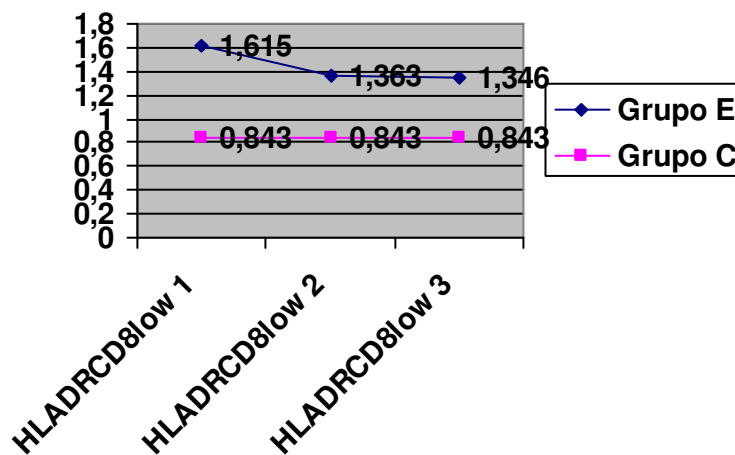


Gráfico 34

Como se pode ver no quadro 8 e no gráfico 34, o comportamento destas células HLADRCd8low+ foi sobreponível ao das anteriores, com níveis inicialmente superiores no grupo E ($p=0,027$), reduzindo-se posteriormente com a terapêutica vitamínica de uma forma muito discreta ($p=0,204$), mantendo-se

inalterados com as estatinas ($p=0,944$) e não significativamente superiores aos do grupo C ($p=0,149$) na última avaliação.

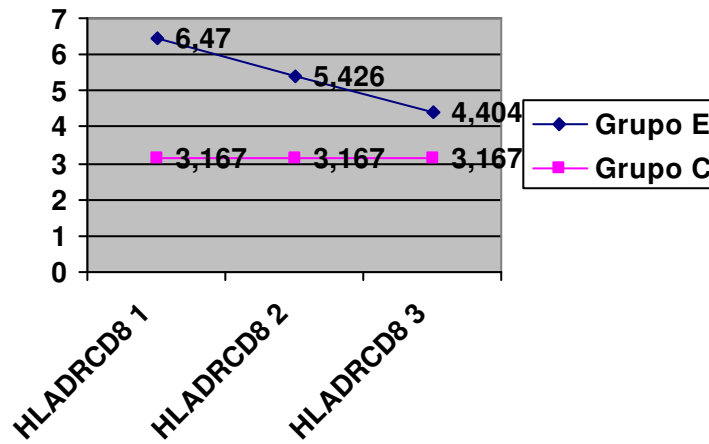


Gráfico 35

As células HLADRC8+ (Quadro 8 e Gráfico 35) apresentaram-se inicialmente em níveis significativamente superiores no grupo E ($p=0,001$), com uma posterior redução, primeiro com a terapêutica vitamínica (16,13%; $p=0,123$), mantendo-se ainda superiores aos do grupo C ($p=0,022$) e depois com as estatinas (18,83%; $p=0,115$), aproximando-se dos níveis dos controlos ($p=0,060$).

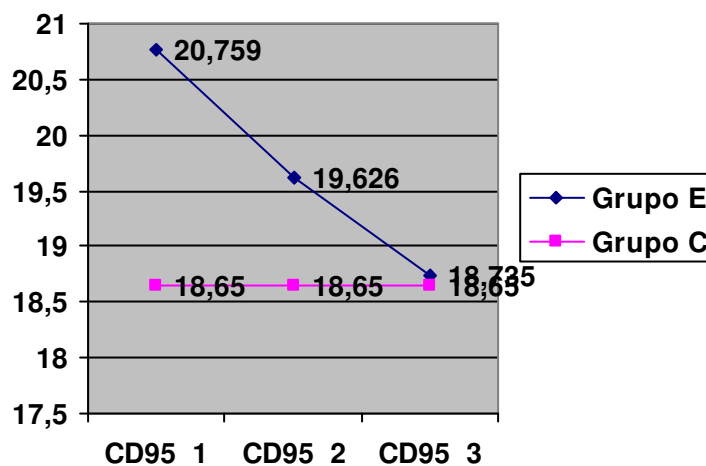


Gráfico 36

Recordamos que o antigénio CD95, também conhecido por antigénio Fas, pertence à superfamília dos receptores TNF, encontra-se nos linfócitos T e B activados e a sua principal função é a indução da apoptose. Como demonstra o quadro 8 e o gráfico 36, a sua concentração no início ligeiramente superior no grupo E ($p=0,566$), apresentou ao longo do estudo uma tendência descendente, primeiro com a terapêutica vitamínica ($p=0,709$) e depois com as estatinas ($p=0,689$), ficando os seus níveis praticamente sobreponíveis aos do grupo C.

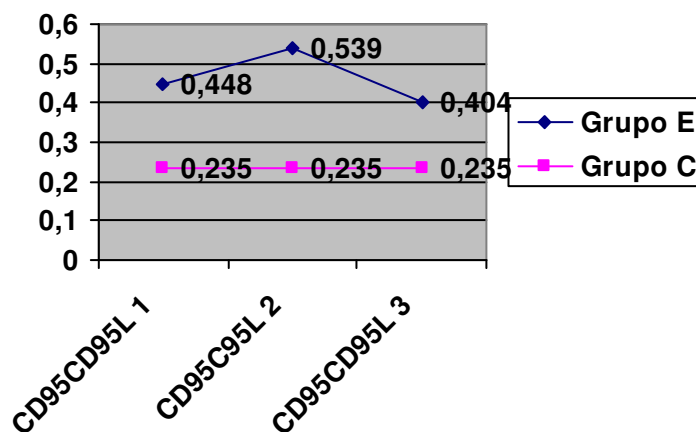


Gráfico 37

Como se vê no quadro 8 e no gráfico 37, a percentagem das células CD95CD95L+ foi, ao longo do estudo, sempre superior no grupo E, embora não significativamente. Apresentou um ligeiro aumento com as vitaminas ($p=0,488$) e uma discreta redução com as estatinas ($p=0,541$).

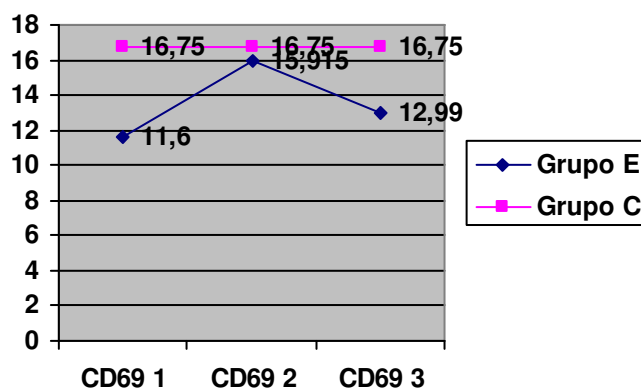


Gráfico 38

O CD69 é um marcador precoce da activação celular e as células positivas para ele, tal como todas as células CD25+ igualmente associadas à activação celular, encontravam-se em níveis basais significativamente inferiores no grupo E ($p=0,027$) (Quadro 8 e Gráfico 38). Os seus níveis aumentaram em 37,19% ($p=0,010$) com as vitaminas E e C e reduziram-se com as estatinas em 18,37% ($p=0,067$), adquirindo de novo uma diferença significativa relativamente ao grupo C ($p=0,041$).

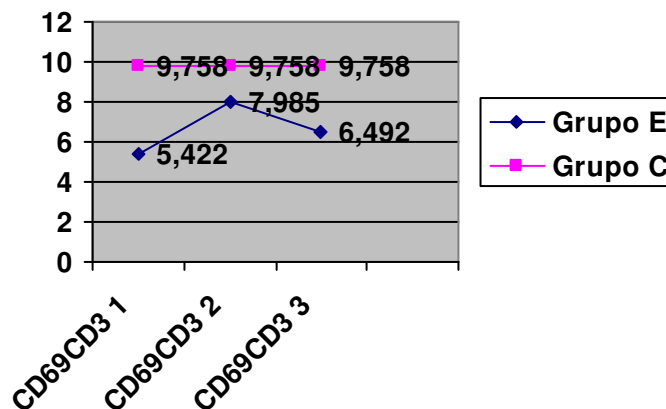


Gráfico 39

As células CD69CD3+ (Quadro 8 e Gráfico 39) encontravam-se no início do estudo em concentrações significativamente inferiores no grupo E ($p=0,004$). A terapêutica vitamínica induziu um aumento de 47,27% ($p=0,013$) nos seus níveis e as estatinas reduziram de novo a sua concentração em 18,69% ($p=0,164$) para valores significativamente inferiores às do grupo controlo ($p=0,012$)

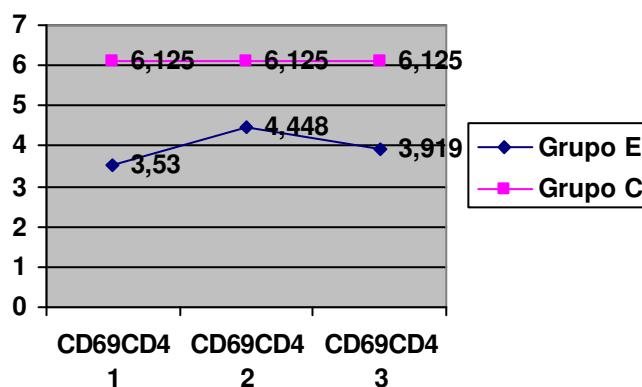


Gráfico 40

O comportamento apresentado pelas células CD69CD4+ (Quadro 8 e Gráfico 40) foi perfeitamente sobreponível ao das outras células CD69+. Os seus níveis basais significativamente inferiores no grupo E ($p=0,012$), apresentaram um discreto aumento com as vitaminas E e C ($p=0,135$) e uma posterior redução com as estatinas ($p=0,427$), mantendo-se inferiores aos do grupo C ($p=0,028$).

19.4.4 - Resumo e Comentários

hsPCR - Relativamente à hsPCR repetimos a metodologia adoptada no capítulo anterior, tendo excluído todos os participantes que, em alguma das avaliações do estudo, tivessem apresentado valores superiores a 10 mg/L. Esta proteína inicialmente mais elevada no grupo E, viu os seus níveis serem significativamente reduzidos em mais de 30% pelas estatinas.

A redução da PCR com as estatinas, verificada no nosso trabalho, está de acordo com múltiplos estudos de prevenção primária e secundária. Em vinte e dois dislipidémicos com características semelhantes aos do nosso estudo, dos dois sexos, com idade média de $47,2\pm 9,7$ anos, com CLDL >130 mg/dl e triglicédeos >200 e < 600 mg/dl, medicados com sinvastatina, ou pravastatina ou atorvastatina, respectivamente nas doses de 20, 40 e 10 mg/dia, verificaram-se ao fim de seis semanas reduções da hsPCR de 20,3, 22,8 e 28,3% ($p<0,025$). Nesse mesmo estudo a redução da PCR foi independente das alterações do CLDL ($p=0,7$) e do CHDL ($p=0,9$), mas apresentou uma relação significativa com a redução dos triglicédeos ($p=0,005$)¹⁴³⁹. No AFCAPS/TexCAPS, um estudo de prevenção primária realizado em mais de 6000 homens e mulheres, com CLDL médio de 149,1 mg/dl e CT/CHDL média de 5,96, a lovastatina, nas doses de 20 a 40 mg/dia, induziu uma redução de 14,8% nos níveis da PCR ($p<0,001$), independente das alterações lipídicas¹⁴³⁸. No CARE, realizado em doentes com EAM, a pravastatina, na dose de 40 mg/dia, reduziu os níveis da hsPCR em 37,8% ($p=0,002$) relativamente ao grupo placebo¹⁴³⁷. Um estudo prospectivo em que um dos objectivos primários foi a avaliação dos efeitos antiinflamatórios das estatinas, o PRINCE, realizado em indivíduos com e sem doença cardiovascular, medicados com 40 mg/dia de pravastatina e também já citado, demonstrou às vinte e quatro semanas, reduções da hsPCR de 16,9%

($p < 0,001$) e de 13,1% ($p < 0,005$), respectivamente no grupo de prevenção primária e secundária¹⁴⁴⁰. Em 566 dislipidémicos, a utilização de 40 mg/dia de pravastatina induziu, ao fim de quatro anos, uma redução de 12% ($p = 0,001$) nos níveis da PCR e a sua suspensão, levou a um aumento significativo desta proteína ($p < 0,05$)¹⁷⁵⁸. Este efeito sobre os níveis da PCR parece ser um efeito precoce, como ficou demonstrado em 71 doentes com EAM em que se administraram 40 mg/dia de pravastatina, iniciada nas primeiras 10 horas pós-evento isquémico. Das 48H para os 7 dias verificou-se uma redução do nível médio da PCR em 51,9% no grupo da estatina e em 15,9% no grupo placebo ($p = 0,002$)¹⁷⁵⁹. Em 131 doentes dos dois sexos, na fase aguda de AVC isquémico, a administração de 10 e 20 mg/dia de atorvastatina induziu aos 7 dias, reduções da hsPCR de 33,9 e 30,1%, significativamente superiores aos 9,1% verificados no grupo placebo ($p < 0,05$). Aos 14 dias as reduções verificadas nos grupos placebo, 10 e 20 mg de atorvastatina foram, respectivamente, de 34,3, 56,0 e 52,9% ($p < 0,05$, entre os grupos da atorvastatina e do placebo)¹⁷⁶⁰. A capacidade das estatinas de reduzir significativamente a concentração da PCR, estará para alguns autores dependente das doses utilizadas^{1761 1762 1763}, enquanto que para outros, esta relação dose-intensidade de resposta não se verificará^{1764 1760}. Apenas uma referência a um estudo realizado em 35 diabéticos tipo 2, com CLDL > 100 e colesterol não HDL (CñHDL) > 130 mg/dl, em que a PCR foi doseada nos dias 0, 1, 3, 7, 14, 21 e 28. A sinvastatina reduziu a hsPCR ao fim dos primeiros 7 dias, com um efeito máximo aos 14 dias ($p = 0,001$). Inesperadamente, ao 28º dia os níveis da PCR retornaram aos valores basais, concluindo os autores que nesta população de doentes e neste estudo, o efeito antiinflamatório da sinvastatina se esgotou ao fim de 28 dias¹⁷⁶⁵. Não podemos deixar de referir os resultados do estudo JUPITER, publicados muito recentemente e já comentados, em que a rosuvastatina na dose de 20 mg/dia, reduziu em 37% ($p \leq 0,001$) os níveis da hsPCR⁹²⁷.

AAT - A concentração basal da AAT, sobreponível à do grupo C, foi igualmente reduzida de uma forma significativa após terapêutica com as estatinas. No único trabalho que encontramos em que se analisou, entre outros parâmetros, a acção das estatinas sobre a AAT, quer a sinvastatina quer a pravastatina não tiveram qualquer efeito significativo na concentração desta proteína¹⁷⁶⁶.

IL6 – Esta interleucina, inicialmente em níveis mais elevados no grupo E, viu os seus níveis inesperadamente serem aumentados pela terapêutica hipolipemiante. Atendendo à relação existente entre a IL6 e a PCR, seria de esperar um comportamento diametralmente oposto. Julgamos que a grande dispersão de concentrações verificada e o reduzido número de participantes, poderão justificar estes resultados. É o caso de um dos dislipidémicos em que a IL6 apresentou uma concentração ascendente ao longo do estudo, com valores de 0,9, 1,2 e 9,04 pg/ml, da primeira para a última avaliação. Neste mesmo indivíduo a PCR apresentou uma evolução paralela (0,24, 0,34 e 7,97 mg/dl), apontando para uma possível patologia subjacente, infecciosa, inflamatória ou outra. Apesar do cuidado que tivemos na selecção dos dislipidémicos e dos controlos, nomeadamente na exclusão de patologias infecciosas e inflamatórias, não podemos afirmar que não tenha havido em algum, ou alguns dos participantes, uma ou varias doenças que, ou por se encontrar numa fase sub-clínica, ou por qualquer outra razão, possa ter alterado os parâmetros biológicos associados às reacções inflamatórias.

Como vimos em capítulo anterior as estatinas reduziram os níveis séricos basais e pós estimulação pelo LPS, da IL-6, em indivíduos dislipidémicos^{1446 1464}. Em 45 hipercolesterolémicos dos dois sexos, com idade média de 50 anos, a administração de 20 a 40 mg/dia de atorvastatina durante oito semanas, reduziu significativamente os níveis séricos da IL6, comparativamente ao grupo controlo (22,1 versus 2,0%; $p < 0,0001$)¹⁷⁶⁷. As estatinas mostraram também capacidade de reduzir a IL6 em doentes coronários. Em 50 indivíduos com síndromes coronárias agudas, alguns deles medicados com sinvastatina, na dose de 20 mg/dia, verificou-se logo às três semanas uma redução significativa nos níveis da IL6 e da hsPCR ($p < 0,001$). Não se verificou qualquer relação entre a redução destas moléculas inflamatórias e as alterações dos lípidos séricos mas os níveis da IL6 e da hsPCR mostraram uma correlação significativa ($p < 0,01$)¹⁷⁶⁸. Também em doentes com síndrome metabólica a administração de 40 mg/dia de sinvastatina durante oito semanas, reduziu significativamente os níveis da IL6 ($p < 0,025$) e da hsPCR ($p < 0,0005$). No mesmo trabalho, utilizando monócitos humanos, a lovastatina reduziu a actividade da Rho quinase e do NFkB, assim como a produção da IL6. Todos estes efeitos foram anulados com a administração do mevalonato e do genarilgeranilpirofosfato¹⁷⁶⁹. A intensidade do

efeito das diferentes estatinas sobre a IL6 poderá não ser igual para todas, como ficou demonstrado em 132 hipercolesterolémicos, em que a sinvastatina foi significativamente mais rápida do que a atorvastatina na redução da IL6 ($p=0,014$)¹⁷⁷⁰.

Nem todos os trabalhos conseguiram demonstrar estes efeitos das estatinas na concentração da IL6. Em 22 doentes com insuficiência cardíaca não isquémica, a administração de 10 mg/dia de atorvastatina, durante 16 semanas, não induziu qualquer alteração significativa nos níveis séricos da IL6, apesar de reduzir significativamente a concentração da hsPCR ($p=0,006$)¹⁷⁷¹. Em 30 indivíduos jovens do sexo masculino, saudáveis, a sinvastatina na dose de 20 mg/dia, não provocou qualquer alteração na concentração sérica da IL6 após estimulação pelo LPS¹⁷⁷².

IL8 - Os níveis da IL8 foram sempre significativamente inferiores no grupo E. Apresentaram uma redução com as vitaminas E e C e um aumento com as estatinas, ambos não significativos. Para estes resultados terão uma vez mais contribuído a grande dispersão nos níveis desta citocina. Por exemplo, na primeira avaliação, o grupo E apresentou valores mínimos de 0,001 e máximos de 641,233, enquanto que no grupo C os níveis da IL8 variaram entre 6,816 e 360,575. Também a resposta à terapêutica apresentou em alguns indivíduos variações que julgamos exageradas, como um dos casos em que a IL8, ao longo das três avaliações, passou de 0,001 para 5,921 e finalmente para 72,537. Noutro indivíduo a evolução foi exactamente no sentido oposto, com a concentração da citocina a reduzir de 641,233 para 7,712 e 4,185. Parece-nos que esta disparidade de valores e a pequena dimensão da amostra poderão justificar parcialmente os resultados obtidos no nosso estudo e que foram, de alguma forma, inesperados.

Não existem na literatura muitos estudos que tenham avaliado os potenciais efeitos das estatinas sobre os níveis séricos da IL8 e os seus resultados nem sempre são concordantes. Em 30 doentes coronários, medicados com atorvastatina (80 mg/dia) ou sinvastatina (20 mg/dia), analisaram-se os níveis basais e pós-terapêutica, do RNA mensageiro de algumas interleucinas e respectivos receptores. Para além dos níveis significativamente elevados da IL8 e do seu receptor nestes doentes, verificou-se uma redução significativa das suas concentrações após terapêutica com as

estatinas¹⁷⁷³. Resultados semelhantes foram obtidos em diabéticos tipo 1 em que a administração de 20 mg/dia de sinvastatina, durante 3 meses, para além da redução significativa da hsPCR (18% $p < 0,001$) e do CD40 solúvel (22% $p < 0,05$) induziu a redução da secreção monocítica, estimulada pelo LPS, da IL8 ($p < 0,03$) e do TNF ($p < 0,02$)¹⁷⁷⁴. Utilizando células musculares lisas vasculares humanas estimuladas pela Ag II, verificou-se que para além do aumento, pós-estimulação, da expressão do RNAm da IL8, a adição da fluvastatina ao meio celular reduziu a expressão basal e estimulada da interleucina. O efeito da fluvastatina foi completamente anulado pela adição do mevalonato ou do geranylgeranilpirofosfato¹⁷⁷⁵. No mesmo estudo, a utilização da cerivastatina (lipofílica), obteve o mesmo efeito a nível da expressão da IL8, o mesmo não tendo acontecido com a pravastatina (hidrofílica). Resultados diferentes foram obtidos noutros estudos. Em 44 doentes coronários, com angina instável ou EAM sem onda Q, estudaram-se os efeitos de 0,3 mg de cerivastatina, administrada de início, nos níveis séricos da hsPCR, da IL6 e da IL8 doseados às 24H. Apesar da redução dos níveis da PCR ($-6,73 \pm 3,93$ mg/L; $p = 0,004$) e da IL6 ($-0,76 \pm 0,52$; $p = 0,005$), não se verificou qualquer alteração significativa na concentração sérica da IL8¹⁷⁷⁶. Um outro estudo realizado em 22 hipercolesterolémicos analisou o efeito da sinvastatina na diferenciação das células mononucleares periféricas em células endoteliais. Verificou-se um aumento significativo da secreção da IL8 pelos monócitos ($p < 0,05$) assim como da diferenciação em células endoteliais¹⁷⁷⁷.

IL18 - Os níveis séricos da IL18, no início significativamente inferiores no grupo E, apresentaram um significativo aumento com as estatinas. A dispersão de valores apresentada pelos dislipidémicos E na avaliação basal (44,343 a 2232,668) contrastou com a verificada no grupo C (210,021 a 2364,008), o que poderá ser uma das explicações para os menores níveis no grupo dos dislipidémicos. Recordamos mais uma vez que 13 dos participantes E estavam medicados com aspirina, o que poderá ter também influenciado os nossos resultados. Em relação à evolução apresentada, inicialmente com a terapêutica vitamínica e depois com as estatinas, verificou-se uma ligeira redução na segunda ($p = 0,542$) e um aumento significativo na terceira avaliação ($p = 0,042$). Em indivíduos com hipercolesterolemia e medicados com fluvastatina, estudaram-se os efeitos nos níveis da IL18, da hsPCR e da MMP-9 e na função

endotelial. Ao fim de 12 semanas, verificaram-se reduções significativas nas concentrações das três moléculas, respectivamente de 247,6 para 196,4 pg/dl ($p < 0,001$), de 1,3 para 1,1 mg/dl ($p = 0,018$), e de 58 para 39,4 ng/dl ($p = 0,023$). Estas reduções não se correlacionaram com as alterações do perfil lipídico¹⁷⁷⁸. Contrariamente a estes efeitos, alguns autores atribuem às estatinas uma capacidade estimuladora da secreção da IL18 pelos monócitos humanos, acção inibida pelo mevalonato. Os autores atribuem a esta estimulação dos monócitos uma capacidade anti-tumoral, devido ao efeito activador dos linfócitos T e natural Killer e à inibição da angiogénese manifestado pela IL18^{1779 1780 1781}.

Os resultados obtidos no nosso estudo estão aparentemente de acordo com os destes últimos trabalhos. Com efeito, verificou-se um aumento significativo nas concentrações séricas da IL18 após terapêutica com as estatinas (498,143 versus 259,295; $p = 0,042$). Este aumento que poderia fazer antever um efeito indesejado destes fármacos, estimulando um ambiente pró-inflamatório, poderá estar associado aos possíveis efeitos anti-tumorais das estatinas. Estes resultados terão que ser interpretados com alguma reserva devido às limitações já referidas, nomeadamente à dispersão e ao tamanho da amostra.

INFGama - O INF gama, inicialmente em concentrações elevadas no grupo E e contrariamente à grande maioria da literatura consultada, viu os seus níveis serem aumentados pelas estatinas, embora não significativamente. Mais uma vez, a evolução dos níveis desta interleucina com a terapêutica hipolipemiante, foi paralela à evidenciada pela IL18.

Diversos estudos de experimentação celular, no animal e no homem têm-se debruçado sobre os efeitos das estatinas a nível do INFGama, a maioria deles demonstrando uma acção inibidora. Em 23 ratos Lewis, a quem foi induzida uma miocardite autoimune experimental, alguns deles medicados desde a indução da doença com atorvastatina, nas doses de 1 e de 10 mg/Kg/dia e outros com placebo, demonstrou-se nos animais medicados com estatinas, uma redução significativa nos níveis do INFGama e da IL2, citocinas Th₁ e um aumento dos níveis das IL4 e IL10, citocinas Th₂, não se tendo verificado qualquer diferença nos níveis dos lípidos entre os três grupos¹⁷⁸². Outros trabalhos no animal chegaram a conclusões semelhantes^{1783 1784 1785 1786 1787}. Em 20 doentes com EAM, sob terapêutica com 10 mg/dia de atorvastatina e noutros 18, também com

EAM mas medicados com placebo, avaliaram-se os efeitos deste hipolipemiante sobre as células mononucleares do sangue periférico. Quando comparada com a dos indivíduos medicados com placebo, a percentagem de células T produtoras de INFgama dos doentes sob terapêutica com a atorvastatina, foi significativamente menor $13,1 \pm 4,6$ versus $17,8 \pm 6,4\%$; $p < 0,05$)¹⁷⁸⁸. Resultados semelhantes foram obtidos noutro trabalho realizado em doentes asmáticos¹⁷⁸⁹. Vinte e cinco doentes com síndrome coronária aguda, com elevação da troponina, alguns deles medicados no pós-evento imediato com 20 mg/dia de rosuvastatina e outros com placebo, foram avaliados sobre os possíveis efeitos da estatina a nível da concentração plasmática e celular das interleucinas. Às 72 horas de terapêutica a rosuvastatina induziu uma significativa redução nos níveis séricos do TNF α e do INFgama ($p < 0,05$) e na produção destas interleucinas pelos linfócitos T estimulados ($p < 0,05$)¹⁶³⁶. Resultados diferentes foram obtidos noutros estudos. Em 30 hipercolesterolémicos com doença coronária angiograficamente comprovada, a terapêutica com 20 mg/dia de atorvastatina, durante 3 meses, não induziu qualquer alteração nos níveis do INFgama¹⁷⁹⁰. Num outro trabalho já citado, a sinvastatina estimulou a produção da IL18, do TNF α e do INFgama pelas células humanas mononucleares do sangue periférico¹⁷⁸¹.

A evolução dos níveis do INFgama verificada no nosso trabalho, ao aumentarem após a terapêutica com as estatinas, estão aparentemente de acordo com o resultado deste último estudo, mas em contradição com a maioria dos trabalhos. Para este aumento não significativo dos níveis do INFgama após terapêutica com as estatinas, poderá ter contribuído o período que decorreu desde o início da terapêutica e a determinação das concentrações séricas, muito superior ao verificado nos trabalhos consultados. Não sabemos se a inibição dos níveis celulares e/ou séricos do INFgama, demonstrada pelas estatinas, se mantem ou se eventualmente se atenua ao fim de um longo período de terapêutica.

VEGF - O VEGF inicialmente mais elevado nos dislipidémicos, sofreu uma redução não significativa nos seus níveis após terapêutica com estes hipolipemiantes. Este resultado, como vimos em capítulo anterior, esteve de acordo com alguns estudos e em desacordo com outros. Como exemplo dos primeiros, referimos um trabalho já citado, em que as concentrações séricas do

VEGF, inicialmente elevadas em 40 dislipidémicos, metade dos quais com lesões confirmadas de aterosclerose, foram significativamente reduzidas após três meses de terapêutica com estatinas¹⁶³⁹. Como referimos no capítulo sobre as estatinas e a neo-vascularização, o efeito destes fármacos estará aparentemente dependente das doses utilizadas.

Populações linfocitárias – A concentração basal das células CD4+ foi significativamente inferior no grupo dos dislipidémicos. Manteve-se inalterada após terapêutica com as vitaminas antioxidantes e apresentou um aumento significativo com a terapêutica hipolipemiante.

As células CD8+ apresentaram uma concentração basal ligeiramente inferior nos indivíduos do grupo E, aumentou discretamente com as Vit(s) E e C e reduziu de uma forma significativa após terapêutica com as estatinas.

O comportamento apresentado por estes dois tipos celulares frente às estatinas esteve de acordo com alguma da literatura consultada. Em 11 doentes com tiroidite de Hashimoto e com hipotiroidismo sub-clínico, a terapêutica com 20 mg/dia de sinvastatina, durante 8 semanas, induziu, para além de uma redução significativa da TSH ($p < 0,05$), um aumento das células CD4+ e B e uma redução das CD8+ e das NK ($p < 0,05$)¹⁷⁹¹. Resultados semelhantes foram obtidos em doentes transplantados renais, em que a terapêutica com fluvastatina induziu, ao fim de 2 meses, uma redução das células CD8+¹⁷⁹². Resultados, parcial ou totalmente diferentes, foram obtidos noutros estudos em que as estatinas reduziram a expressão de diversas moléculas imunorreguladoras da superfície celular, entre as quais o CD4 e o CD8¹⁷⁹³. Em 24 doentes com artrite reumatóide, aos quais se manteve inalterada a terapêutica habitual, administraram-se 10 mg /dia de sinvastatina, durante 12 semanas. Para além da melhoria clínica e da redução de outros parâmetros inflamatórios como a PCR e a VS, obtiveram-se reduções das relações Th₁/Th₂ e CD4/CD8¹⁷⁹⁴. Em 30 doentes coronários hipercolesterolémicos a terapêutica com atorvastatina durante 3 meses, na dose de 20 mg/dia, não alterou os níveis dos linfócitos CD4+ e CD8+¹⁷⁹⁵. Julgamos que os diferentes resultados destes estudos poderão estar na dependência dos níveis basais das células, próprios das diferentes patologias e/ou das metodologias utilizadas.

As células CD26+ mantiveram-se ao longo do estudo em concentrações inferiores no grupo E, tendo apresentado um aumento significativo com a terapêutica hipolipemiante.

Tal como dissemos em capítulo anterior o CD26 está envolvido, entre outras funções, na adesão celular. Não encontramos na pesquisa bibliográfica efectuada referências aos efeitos das estatinas concretamente nas células CD26+. Iremos assim comparar os nossos resultados com os obtidos noutros estudos em que se avaliaram outras moléculas igualmente envolvidas na adesão celular. Em 55 doentes hipercolesterolémicos, a terapêutica com 10 mg/dia de atorvastatina, durante 3 meses, reduziu significativamente os níveis séricos da ICAM-1 ($p < 0,0001$) e da VCAM-1 ($p < 0,002$), acompanhados de um aumento nos níveis da selectina-E ($p < 0,002$), independentemente das alterações lipídicas¹⁷⁹⁶. Um outro trabalho em insuficientes cardíacos com $CT < 220$ mg/dl, demonstrou que a atorvastatina, na dose de 10 mg/dia e ao fim de 4 semanas, reduziu os níveis séricos da VCAM-1 de 595 para 289 ng/ml ($p < 0,05$)¹⁷⁹⁷. No *Atorvastatin for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty* (ARMYDA-CAMs), a utilização da atorvastatina durante os sete dias que antecederam a angioplastia, acompanhou-se de níveis da ICAM-1, às 24 horas, significativamente inferiores comparativamente ao grupo placebo (282 ± 56 versus 325 ± 70 ng/ml; $p = 0,007$). Não se verificaram alterações nos níveis da VCAM-1¹⁷⁹⁸. Resultados semelhantes foram obtidos noutros estudos realizados em doentes coronários e diabéticos tipo 2^{1799 1800}. Num estudo com duração de um ano, em que doentes coronários foram medicados com 20 mg/dia de atorvastatina (N=28) ou sinvastatina (N=30), verificaram-se no final do estudo reduções significativas dos níveis séricos da ICAM-1 ($p < 0,001$), da selectina-E ($p = 0,022$) e da selectina-P ($p < 0,001$) e um aumento igualmente significativo dos níveis da VCAM-1 ($p = 0,003$). A análise por sub-grupos demonstrou que o aumento da VCAM-1 se verificou apenas no grupo da sinvastatina¹⁸⁰¹. Nem todos os estudos chegaram às mesmas conclusões dos anteriores. Em 55 adultos saudáveis não-fumadores (35–65 A), administraram-se durante 8 semanas 20 a 80 mg/dia de sinvastatina, ou 40 mg/dia de pravastatina ou placebo. Os níveis séricos da ICAM-1 aumentaram ligeiramente com as estatinas (de $12,2 \pm 4,2$ para $13,6 \pm 4,2$ ng/ml), tendo permanecido inalterados com o placebo. Os níveis da VCAM-1 apresentaram também aumentos ligeiros com

as estatinas (de $18,9 \pm 10,1$ para $21,1 \pm 7,4$ ng/ml) e uma redução igualmente discreta com o placebo¹⁷⁵⁵. Num estudo multicentrico, duplamente cego e controlado por placebo, realizado em indivíduos com antecedentes de doença cardiovascular, a utilização da sinvastatina (40 mg/dia) ou da atorvastatina (40 a 80 mg/dia), durante 8 semanas, não encontrou diferenças nos níveis das moléculas de adesão entre os grupos medicados com as diferentes doses das estatinas¹⁸⁰².

Tal como dissemos no capítulo anterior, quando analisámos os efeitos das vitaminas E e C, os nossos resultados apontam no sentido oposto ao da maioria dos trabalhos consultados. Como também dissemos, a diferente origem celular das moléculas, ICAM-1, VCAM-1 e CD26, poderá justificar os resultados divergentes do nosso estudo. Também não sabemos até que ponto é que as concentrações periféricas do CD26 espelham a sua concentração a nível da parede vascular e concretamente das placas de aterosclerose. Por todas estas razões não podemos concluir destes nossos resultados que a adesão celular tenha sido estimulada pelas estatinas.

Não podemos igualmente esquecer que o CD26 possui outras funções imunológicas igualmente importantes, nomeadamente na co-estimulação das células T e encontra-se nos timócitos maduros e nas células de memória.

Relativamente à actividade *dipeptidyl peptidase4* (DPP4) associada a esta molécula membranar e aos possíveis efeitos das estatinas, encontrámos na literatura um trabalho que demonstrou que a terapêutica conjunta, vildagliptina e sinvastatina, não produziu qualquer efeito diferente a nível da farmacocinética nem dos metabolitos activos, quando comparada com a administração isolada do inibidor da DPP4¹⁸⁰³. Apesar deste aumento da DPP4, teoricamente indesejável relativamente ao metabolismo glucídico, a glucose, neste mesmo grupo E, apresentou uma redução não significativa na sua concentração, de 108,14 para 106,57 mg/dl ($p=0,625$).

As moléculas CD26CD3 estão envolvidas na co-estimulação dos linfócitos T, na transdução do sinal TCR e na adesão celular. Os níveis das células CD26CD3+ mantiveram-se sempre inferiores no grupo E e apresentaram um progressivo aumento primeiro com as vitaminas E e C ($p=0,395$) e depois com as estatinas (6,87%; $p=0,018$).

O CD25, tal como dissemos em capítulo anterior, é um componente do receptor da IL2 e um marcador precoce da activação celular. Está presente em diversas células, tais como nos linfócitos B e T, nos monócitos e nos macrófagos activados. As células positivas para este marcador de superfície, sempre em concentração inferior no grupo E, viram a sua percentagem sofrer um discreto aumento com a terapêutica antioxidante e uma posterior redução igualmente não significativa ($p=0,058$), com as estatinas.

Em 80 hipercolesterolémicos moderados a sinvastatina na dose de 40 mg/dia, durante 6 semanas, reduziu significativamente a concentração da PCR, mas não alterou a proporção de células CD4+ e CD8+ com marcadores de superfície de activação precoce (CD25) ou tardia (HLADR)¹⁸⁰⁴. Em 26 doentes com angina pectoris estável, submetidos a intervenção coronária, procurou-se determinar se a terapêutica com estatinas durante seis meses, conseguia induzir alguma alteração nos marcadores de activação dos linfócitos T presentes nas placas de aterosclerose. O estudo imunocitoquímico das placas não mostrou qualquer diferença significativa nas percentagens de células T positivas para o CD25 ($7,8\pm 4,6\%$ versus $7,8\pm 5,9\%$; $p=0,97$) nem para o CD69 ($12,9\pm 4,6$ versus $15,5\pm 5,2\%$; $p=0,203$)¹⁸⁰⁵.

As células CD25CD3+ são importantes na transdução do sinal a partir do TCR e na activação celular. Apresentaram ao longo do estudo um comportamento paralelo ao das anteriores. Os seus níveis basais estavam significativamente inferiores nos participantes E e reduziram-se significativamente com as estatinas.

O comportamento das células CD25CD26CD3+ foi sobreponível ao das anteriores, com os indivíduos do grupo E a apresentar níveis basais significativamente inferiores aos do grupo C e com uma redução significativa após terapêutica com as estatinas.

A localização do TCR e de outras moléculas de sinalização nas *membrane rafts* (MR) é essencial para a activação dos linfócitos T. Durante a activação assiste-se à confluência das MR e à formação de sinapses intercelulares, essenciais à activação e à proliferação celular. Utilizando células mononucleares humanas, verificou-se que a atorvastatina inibiu significativamente a expressão das moléculas CD69 e CD25 e a activação e

proliferação das referidas células. Segundo os autores estas acções estiveram na dependência da inibição da prenilação de determinadas proteínas¹⁸⁰⁶.

As células HLADR, associadas à apresentação antigénica e à activação celular, todas inicialmente aumentadas nos dislipidémicos, apresentaram frente às estatinas, ou um comportamento neutro – HLADR, HLADRCD4, HLADRCD8low e HLADRCD8 – ou uma redução nas suas percentagens – HLADRCD8h.

Os nossos resultados relativos a todas estas células HLADR+ estão de acordo com os obtidos por alguns autores. Num estudo randomizado, duplamente cego e controlado por placebo, realizado em 80 hipercolesterolémicos, verificou-se uma ausência de efeito da sinvastatina, na dose de 40 mg/dia, durante 6 semanas, nas concentrações das células CD4+ e CD8+ expressando moléculas de activação precoce (CD25), ou tardia (HLA DR)¹⁸⁰⁴. Em 27 indivíduos saudáveis, compararam-se os efeitos de 40 mg/dia de sinvastatina com os de 20 mg/dia de atorvastatina, nos níveis das células T positivas para o HLADR e para um marcador de activação, o CD38. Enquanto que a atorvastatina induziu uma redução significativa nas referidas células ($p < 0,05$), a sinvastatina provocou um aumento das mesmas¹⁸⁰⁷. Em ratos com miocardite autoimune experimental (MAE), uma doença mediada pelos linfócitos T, a utilização durante 3 semanas, de altas (10 mg/kg /dia) ou de baixas doses (1 mg/kg /dia) de atorvastatina, reduziu a concentração nos cardiomiócitos das moléculas classe II MHC¹⁸⁰⁸. Resultados semelhantes foram obtidos na encefalomielite autoimune experimental (EAE) do rato, em que a atorvastatina reduziu a infiltração de células apresentadoras de antígeno positivas para as moléculas II MHC¹⁸⁰⁹.

A redução não significativa verificada nas células CD95+ e CD95CD95L+ com as estatinas, inicialmente mais elevadas no grupo E, esteve de acordo com alguns trabalhos. Após activação com esteres de forbol e ionomicina, os linfócitos T humanos apresentaram uma maior expressão da FasL, sendo este efeito prevenido pela atorvastatina e pela sinvastatina. Mais uma vez o mevalonato e o geranilgeranilpirofosfato anularam esta acção das estatinas, contrariamente ao farnesilpirofosfato, apontando para a geranilação das proteínas como o mecanismo envolvido na expressão desta proteína. As estatinas reduziram também a expressão da FasL a nível das placas carotídeas

humanas¹⁸¹⁰. Num outro estudo prospectivo, multicentrico, o ACTFAST, realizado em 2117 doentes coronários, equivalentes coronários ou com risco aos 10 anos > a 20%, com LDL entre 100 e 220 mg/dl e triglicéridos ≤ 600 mg/dl, estudaram-se os efeitos da atorvastatina (10 a 80 mg/dia) nos níveis séricos do Fas e do FasL. Verificou-se uma redução na concentração do Fas ($p < 0,05$) e uma ausência de efeito significativo na do FasL¹⁸¹¹. Resultados contrários foram obtidos em doentes com esclerose múltipla, em que o tratamento com INF-beta induziu um aumento nos níveis séricos do Fas e do FasL ($p < 0,01$ e $0,05$), não tendo sido este aumento impedido pela associação da atorvastatina¹⁸¹². O tratamento de células de melanoma com 5 μ M da atorvastatina, aumentou a percentagem de células positivas para o FasL. Para os autores esta acção está dependente da inibição da prenilação da proteína Rho e poderá comportar-se, dependendo do nível de expressão, como um indutor da apoptose dos linfócitos infiltrantes do tumor ou desencadeando uma forte reacção inflamatória anti-tumoral¹⁸¹³.

As células CD69+, CD69CD3+ e CD69CD4+, todas elas com menores percentagens no grupo E, apresentaram reduções não significativas com as estatinas.

Tivemos dificuldade em encontrar estudos que avaliassem o efeito das estatinas sobre as células CD69+. Um trabalho, realizado em doentes com várias conectivopatias refractárias à terapêutica convencional verificou que nos doentes com LES, a terapêutica com 80 mg/dia de sinvastatina, durante 8 dias, reduziu significativamente a apoptose dos linfócitos periféricos e a expressão do CD69 e do HLADR¹⁸¹⁴. Um outro trabalho feito em indivíduos saudáveis dos dois sexos e com idades entre os 26 e os 43 anos, obteve resultados diferentes. A administração de 20 mg/dia de atorvastatina durante 4 semanas não induziu qualquer alteração na concentração dos marcadores da activação celular, nomeadamente do HLADR, do CD25, do CD69 e do CD86, nem na dos da apoptose (CD95)¹⁸¹⁵. A não concordância entre os resultados destes dois estudos poderá ter sido devido às diferentes populações avaliadas. O primeiro em indivíduos sofrendo de doenças auto-imunes, muito provavelmente com todo o sistema imunológico estimulado e o segundo em pessoas saudáveis. Um outro estudo realizado em peças de aterectomia de doentes com angina estável e medicados com estatina, não mostrou qualquer diferença significativa nas

percentagens das células T positivas para o CD25 ($7,8\pm 4,6\%$ versus $7,8\pm 5,9\%$; $p=0,97$) ou para o CD69 ($12,9\pm 4,6$ versus $15,5\pm 5,2\%$; $p=0,203$), comparativamente aos doentes não medicados com esse tipo de fármaco¹⁸⁰⁵.

Resumindo o comportamento das diversas populações celulares, verificámos que as percentagens das células CD4+, inferiores no grupo E, foram significativamente aumentadas pelas estatinas, enquanto que as dos linfócitos CD8+, também mais baixas nos dislipidémicos, foram reduzidas, também significativamente, pelos referidos hipolipemiantes. As células CD26+ e CD26CD3+, associadas à adesão celular, encontravam-se em concentrações inferiores no grupo E, tendo sido aumentadas significativamente pela terapêutica com as estatinas. As células positivas para os marcadores da activação celular, como o CD25, o CD25CD3, o CD25CD26CD3, o CD69, o CD69CD3 e o CD69CD4, apresentaram-se em percentagens inferiores nos indivíduos do grupo E e sofreram reduções, algumas delas significativas (CD25CD3+ e CD25CD26CD3+), com as estatinas. As células HLADR, associadas à apresentação antigénica e à activação celular, todas inicialmente aumentadas nos dislipidémicos, apresentaram frente às estatinas, ou um comportamento neutro – HLADR, HLADRCD4, HLADRCD8low e HLADRCD8 – ou uma redução nas suas percentagens – HLADRCD8h. Por fim as células CD95+ e CD95CD95L+, associadas à apoptose, encontravam-se em concentrações superiores no grupo E e mostraram uma tendência para uma redução após terapêutica com as estatinas.

20 - Comparação grupo fibratos / grupo controlo (Sob-terapêutica)

Neste capítulo iremos analisar o comportamento dos indivíduos com hipertrigliceridemia ou dislipidemia mista, medicados com o fenofibrato (Grupo F), comparando-os, tal como nos grupos anteriores, com a única avaliação realizada aos participantes do grupo C.

20.1 - Determinações Lipídicas

Tal como dissemos nos capítulos anteriores, as alterações da ficha lipídica verificadas nos sub-estudos, não constituíram o nosso principal objectivo, porque os efeitos dos fibratos a este nível são bem conhecidos e comprovados em ensaios de grande escala. Por este motivo e à semelhança dos capítulos anteriores, iremos fazer uma análise, forçosamente breve, das alterações nas concentrações lipídicas após terapêutica com o fenofibrato.

Relativamente aos efeitos das vitaminas antioxidantes, a nível da ficha lipídica, foram já discutidos em capítulo anterior pelo que não iremos repetir a sua análise.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
CT1 F	10	287,80	86,086	27,223	226,22	349,39	0,001
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CT2 F	10	267,20	78,847	24,934	210,80	323,60	0,004
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
CT3 F	10	203,80	32,588	10,305	180,49	227,11	0,263
C	12	189,67	24,996	7,216	173,79	205,55	
HDL1 F	10	36,10	7,978	2,523	30,39	41,81	0,006
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
HDL2 F	10	39,30	7,454	2,357	33,97	44,63	0,30
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	
HDL3 F	10	43,10	12,940	4,092	33,84	52,36	0,300
C	12	48,33	10,120	2,922	41,90	54,76	

CT/HDL1	F	10	8,3468	3,71096	1,17351	5,6921	11,0014	
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	0,001
CT/HDL2	F	10	6,7217	1,15934	0,36662	5,8923	7,5510	
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	0,000
CT/HDL3	F	10	5,0110	1,24495	0,39369	4,1205	5,9016	
	C	12	4,0545	0,86027	0,24834	3,5079	4,6011	0,046
CLDL1	F	10	128,30	43,589	13,784	97,12	159,48	
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	0,322
CLDL2	F	10	142,50	45,513	14,392	109,94	175,06	
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	0,077
CLDL3	F	10	134,00	17,327	5,479	121,61	146,39	
	C	11	112,45	26,625	8,028	94,57	130,34	0,043
TRIG1	F	10	640,40	392,143	124,006	359,88	920,92	
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	0,000
TRIG2	F	10	439,00	172,328	54,495	315,72	562,28	
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	0,000
TRIG3	F	10	309,30	137,446	43,464	210,98	407,62	
	C	12	142,42	53,756	15,518	108,26	176,57	0,001

Quadro 1
(Variáveis Lipídicas)

O gráfico 1 representa a evolução da concentração sérica do colesterol total.

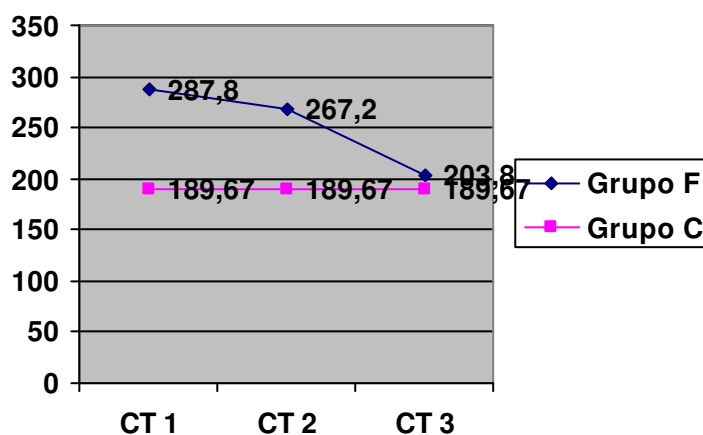


Gráfico 1

O colesterol total (Quadro 1 e Gráfico 1) apresentou concentrações mais baixas neste grupo F (287,8 mg/dl) do que no grupo D (307,74 mg/dl) e no grupo E (314,86 mg/dl). Este facto, como já foi referido, deveu-se aos critérios de selecção. Inicialmente os níveis dos indivíduos F estavam significativamente mais elevados do que nos controlos ($p=0,001$), tendo sofrido uma redução de 7,15% ($p=0,026$) após terapêutica vitamínica, mantendo-se ainda assim superiores aos do grupo C ($p=0,004$). O fenofibrato induziu uma redução de 23,72% ($p=0,008$) na concentração do CT, que se tornou idêntica à dos controlos ($p=0,263$).

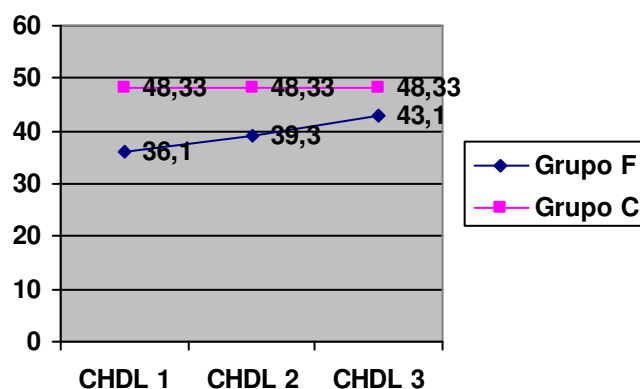


Gráfico 2

O CHDL (Quadro 1 e Gráfico 2) foi também inferior neste grupo F (36,1 mg/dl), comparativamente aos grupos D (49,79 mg/dl) e E (54,68 mg/dl). Os seus níveis basais, significativamente inferiores aos do grupo C ($p=0,006$), apresentaram um aumento com a terapêutica antioxidante de 8,86% ($p=0,172$), continuando inferiores aos níveis basais dos controlos ($p=0,030$) e um novo incremento de 9,66% ($p=0,149$) com o fenofibrato. Nesta última avaliação a concentração do CHDL do grupo F aproximou-se da do grupo C ($p=0,300$).

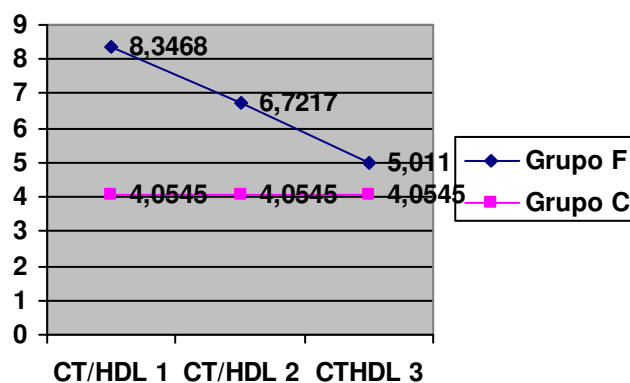


Gráfico 3

Como se pode ver no quadro 1 e no gráfico 3, a relação CT / CHDL apresentou-se mais elevada neste grupo F (8,3468) relativamente aos grupos D (6,5497) e E (5,9070). Na primeira avaliação encontrava-se significativamente mais elevada do que no grupo C ($p=0,001$), reduzindo-se em 19,46% ($p=0,111$) com as vitaminas antioxidantes e apresentou uma nova redução de 25,45% ($p=0,014$) com o fenofibrato, mantendo-se mesmo assim superior ao grupo controlo ($p=0,046$).

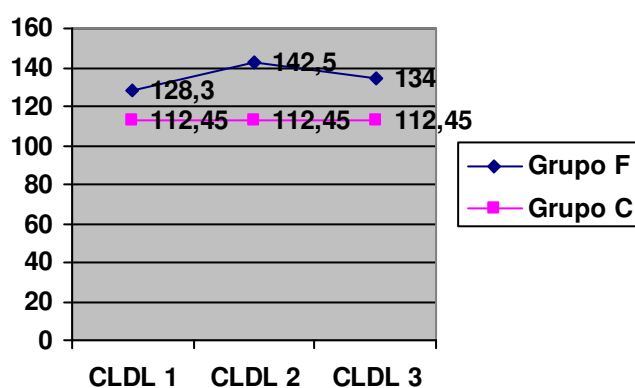


Gráfico 4

No grupo F a concentração basal do LDL (128,3 mg/dl) foi inferior à dos grupos D (172,18 mg/dl) e E (187,86 mg/dl), justificando-se mais uma vez estas diferenças pelos critérios de inclusão (Quadro 1 e Gráfico 4). Ao longo do estudo manteve-se superior à do grupo controlo, apresentando uma elevação de 11,06% ($p=0,142$) com as vitaminas E e C e uma discreta redução com o

fenofibrato (5,96%; $p=0,490$). Nas três avaliações e relativamente ao grupo C, o “p” foi respectivamente de 0,322, 0,077 e 0,043.

Se analisarmos o comportamento do CñHDL, a evolução terapêutica foi a seguinte:

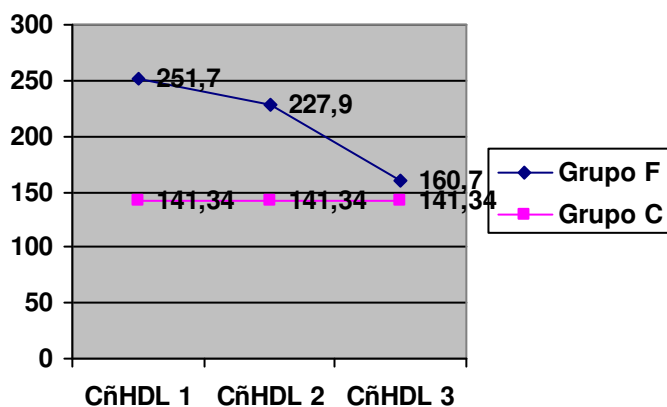


Gráfico 5

O CñHDL dos indivíduos F (Quadro 1 e Gráfico 5) foi sempre superior aos dos controlos, apresentando uma progressiva redução ao longo do estudo, primeiro com as vitaminas E e C, de 9,455% e depois de 29,486% após terapêutica com o fenofibrato.

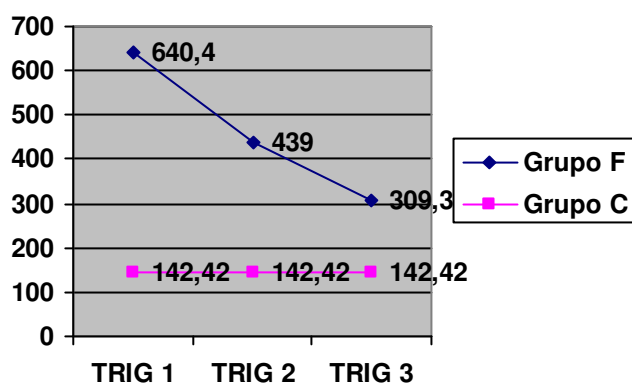


Gráfico 6

O quadro 1 e o gráfico 6 demonstram, como seria de esperar, que os valores séricos dos triglicerídeos do grupo F, para além de significativamente superiores aos do grupo C, ao longo do estudo ($p=0,000$, $0,000$ e $0,001$), foram, na primeira avaliação, igualmente superiores aos dos grupos D e E (285,47 e

158,71 mg/dl, respectivamente). Os valores basais dos triglicerídeos sofreram uma primeira redução de 31,45% ($p=0,053$) com as vitaminas antioxidantes e uma segunda redução de 29,54% ($p=0,029$) com o fibrato. A redução dos triglicerídeos induzida pelas vitaminas antioxidantes foi superior à obtida no grupo D (21,5%) e de alguma forma inesperada dada a sua magnitude. A relação entre estas lipoproteínas e as vitaminas E e C foi já abordada no capítulo dedicado ao grupo D.

Como vimos, estas alterações das concentrações das diferentes lipoproteínas estiveram de acordo com os efeitos dos fibratos.

No quadro seguinte apresentam-se os resultados obtidos a nível das diversas apoproteínas.

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
ApoA 1	F	10	144,70	21,276	6,728	129,48	159,92	0,132
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoA 2	F	10	150,00	20,287	6,415	135,49	164,51	0,334
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoA 3	F	10	155,70	40,434	12,786	126,78	184,62	0,834
	C	12	158,50	19,838	5,727	145,90	171,10	
ApoB100 1	F	10	147,80	37,097	11,731	121,26	174,34	0,001
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
ApoB100 2	F	10	146,80	32,303	10,215	123,69	169,91	0,001
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
ApoB100 3	F	10	111,80	14,054	4,444	101,75	121,85	0,114
	C	12	97,58	23,933	6,909	82,38	112,79	
Lp(a) 1	F	10	28,478	45,6013	14,4204	-4,143	61,099	0,294
	C	12	13,577	14,0976	4,0696	4,619	22,534	
Lp(a) 2	F	10	25,56	40,222	12,719	-3,21	54,34	0,345
	C	12	13,58	14,098	4,070	4,62	22,53	
Lp(a) 3	F	10	25,325	38,2541	12,0970	-2,040	52,690	0,334
	C	12	13,577	14,0976	4,0696	4,619	22,534	

Quadro 2
(Apoproteínas)

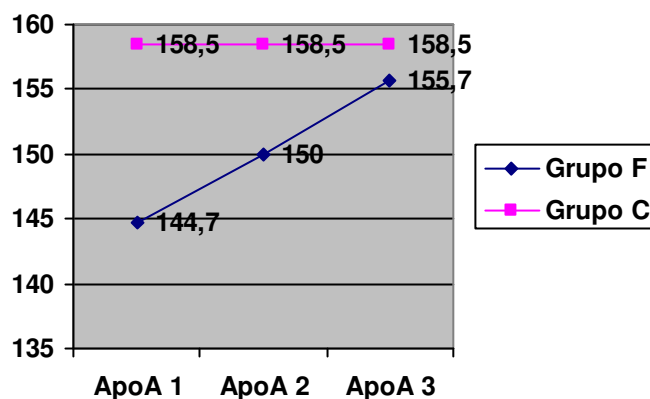


Gráfico 7

Como se vê no quadro 2 e no gráfico 7, os valores séricos da Apo A1 no grupo F foram, ao longo do estudo, sempre inferiores aos dos indivíduos C, sofrendo um primeiro aumento com a terapêutica vitamínica, de 3,66% ($p=0,037$) e um segundo incremento de 3,8% ($p=0,552$) com o fenofibrato. Relativamente à diferença entre os dois grupos, o valor do “p” foi de 0,132, 0,334 e 0,834, respectivamente da primeira para a terceira avaliação. Como seria de esperar este comportamento apresentou um paralelismo ao do CHDL. Os valores basais desta apoproteína no grupo F (144,7 mg/dl), foram, tal como os do CHDL, inferiores aos dos grupos D (163,42 mg/dl) e E (170,11 mg/dl).

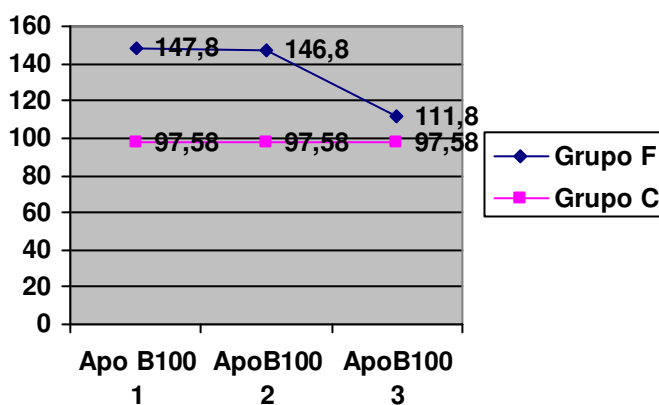


Gráfico 8

Nos indivíduos pertencentes ao grupo F (Quadro 2 e Gráfico 8), a concentração sérica basal da Apo B100 (147,8 mg/dl), foi inferior à dos participantes D (164,82 mg/dl) e E (170,89 mg/dl). Neste mesmo grupo e na

primeira avaliação, esta apoproteína estava em níveis significativamente superiores, comparativamente aos indivíduos C ($p=0,001$). No mesmo gráfico, verifica-se que a concentração desta apoproteína não se alterou significativamente com as vitaminas antioxidantes ($p=0,821$) e apresentou uma redução de 23,84% com o fenofibrato ($p=0,004$), perdendo significado a diferença para o grupo controlo ($p=0,114$).

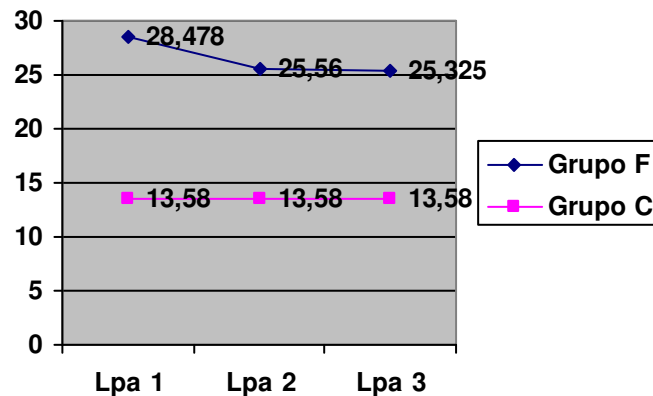


Gráfico 9

Como se vê no quadro 2 e no gráfico 9, a Lp(a) apresentou-se nos dislipidémicos do grupo F, em concentrações inferiores às do grupo de todos os dislipidémicos (41,919 mg/dl) e às dos indivíduos pertencentes ao grupo das estatinas (46,897 mg/dl). Ao longo do estudo, os seus níveis séricos mantiveram-se sempre superiores aos do grupo C, sem nunca atingir significado estatístico – o valor de “p” foi, da primeira para a terceira avaliação, de 0,294, 0,345 e 0,334. Verificaram-se reduções muito discretas da sua concentração, quer com as vitaminas E e C ($p=0,358$), quer com o fenofibrato ($p=0,853$).

20.2 - Resumo e Comentários

Relativamente à terapêutica com o fenofibrato, salientamos os seguintes aspectos:

Redução significativa do CT, dos triglicédeos e da relação CT/CHDL. O LDL manteve-se praticamente inalterado mas houve uma redução significativa do CñHDL. O CHDL apresentou um discreto aumento com o fenofibrato.

Relativamente às apoproteínas houve um discreto aumento da ApoA1 e uma significativa redução da ApoB100, mantendo-se a Lp(a) previsivelmente inalterada. Como dissemos no capítulo anterior, o único fármaco capaz de reduzir significativamente a concentração sérica da Lp(a) é o ácido nicotínico, pelo que os nossos resultados, relativamente a esta lipoproteína, foram os esperados.

20.3 - Avaliação do Estado Oxidante/Antioxidante

20.3.1 – Concentrações séricas da Transferrina e da Ceruloplasmina

No quadro 3, apresentam-se os valores médios das concentrações séricas da transferrina e da ceruloplasmina na população F, sob terapêutica com fenofibrato.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
Transf 1 F	10	2,8050	0,49323	0,15597	2,4522	3,1578	0,279
C	6	3,3783	1,51070	0,61674	1,7930	4,9637	
Transf 2 F	10	2,9100	0,43359	0,13711	2,5998	3,2202	0,364
C	6	3,3783	1,51070	0,61674	1,7930	4,9637	
Transf 3 F	10	2,932	0,3746	0,1185	2,664	3,200	0,379
C	6	3,378	1,5107	0,6167	1,793	4,964	
Cerul 1 F	10	0,3300	0,05312	0,01680	0,2920	0,3680	0,016
C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	
Cerul 2 F	10	0,3290	0,06724	0,02126	0,2809	0,3771	0,029
C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	
Cerul 3 F	10	0,2520	0,05996	0,01896	0,2091	0,2949	0,726
C	12	0,2617	0,06645	0,01918	0,2194	0,3039	

Quadro 3
(Transferrina e Ceruloplasmina)

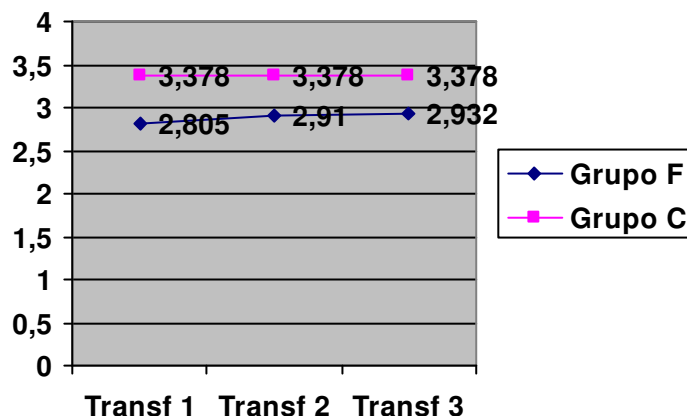


Gráfico 10

A concentração sérica da transferrina (Quadro 3 e Gráfico 10) manteve-se, ao longo do estudo, não significativamente inferior no grupo F, verificando-se uma quase ausência de efeito com as vitaminas E e C ($p=0,538$) e com o fenofibrato ($p=0,867$).

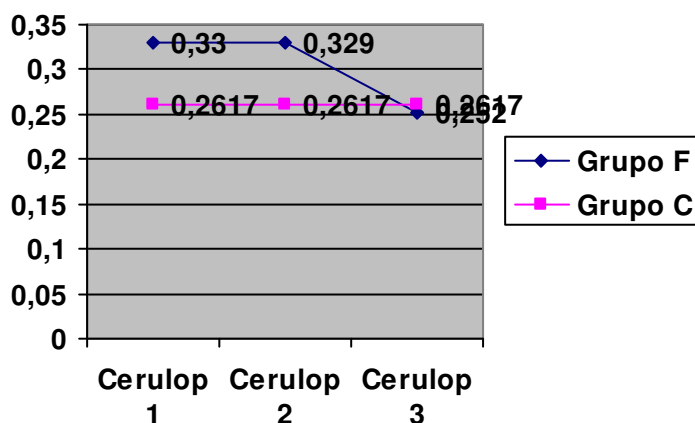


Gráfico 11

A ceruloplasmina, neste grupo F, apresentou-se numa concentração basal significativamente superior à do grupo C ($p=0,016$) (Quadro 3 e Gráfico 11). A terapêutica vitamínica não obteve qualquer efeito ($p=0,885$), mas o fenofibrato induziu uma redução de 23,4% ($p=0,007$) nos níveis desta proteína, que ficaram praticamente sobreponíveis aos dos controlos ($p=0,726$).

20.3.2 - Vitamina E, “Total Radical-trapping Antioxidant Parameter” e LDL oxidadas no Plasma

Os resultados obtidos para os parâmetros plasmáticos Vit E, OxLDL e TRAP estão apresentados no quadro 4.

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
VitE 1	F	10	82,307	31,7938	10,0541	59,563	105,051	0,000
	C	12	28,479	3,3984	0,9810	26,320	30,638	
VitE 2	F	10	95,752	36,1937	11,4455	69,861	121,643	0,000
	C	12	28,479	3,3984	0,9810	26,320	30,638	
VitE 3	F	10	56,2830	12,08832	3,82266	47,6355	64,9305	0,000
	C	12	28,4792	3,39837	0,98102	26,3199	30,6384	
VitE/TG 1	F	10	13,165	4,9172	1,5550	9,647	16,683	0,011
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitE/TG 2	F	10	19,630	4,0795	1,2901	16,712	22,548	0,926
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitE/TG 3	F	10	18,260	6,7225	2,1258	13,451	23,069	0,656
	C	12	19,433	5,4580	1,5756	15,965	22,901	
VitE/TG+CLDL1F	F	10	8,000	1,2658	0,4003	7,095	8,905	0,008
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
VitE/TG+CLDL2F	F	10	11,136	2,2300	0,7052	9,541	12,731	0,000
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
VitE/TG+CLDL3F	F	10	8,190	1,4510	0,4589	7,152	9,228	0,006
	C	11	6,555	0,9720	0,2931	5,902	7,208	
OxLDL1	F	10	111,6430	26,13805	8,26558	92,9450	130,3410	0,001
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
OxLDL2	F	10	117,7930	28,46610	9,00177	97,4296	138,1564	0,000
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
OxLDL3	F	10	93,6030	12,05467	3,81202	84,9796	102,2264	0,008
	C	12	73,1992	19,03151	5,49392	61,1071	85,2912	
TRAP 1	F	10	1363,533	245,5655	77,6546	1187,866	1539,200	0,782
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	
TRAP 2	F	10	1386,180	203,5317	64,3624	1240,582	1531,778	0,540
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	

TRAP 3	F	10	1349,180	231,2028	73,1127	1183,788	1514,572	0,911
	C	12	1340,058	142,3175	41,0835	1249,634	1430,483	

Quadro 4
(Vitamina E e Oxidação)

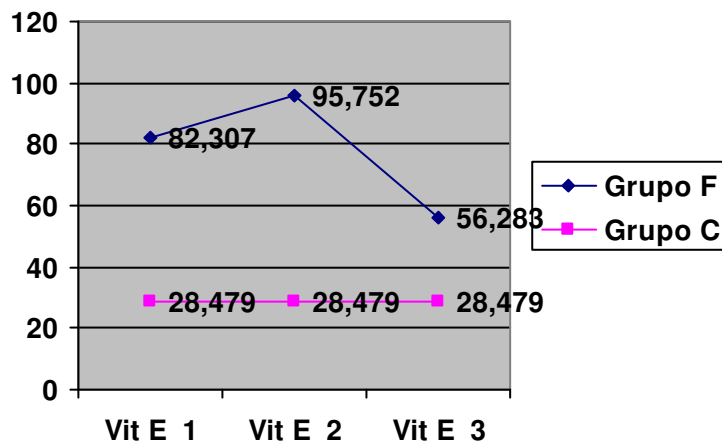


Gráfico 12

Neste grupo de dislipidémicos medicados com o fenofibrato, grupo F, verificaram-se níveis basais da Vit E significativamente superiores aos do grupo C ($p=0,000$), diferença que se manteve ao longo do estudo (Quadro 4 e Gráfico 12). Os níveis desta vitamina apresentaram um aumento de 16,34% ($p=0,140$) após terapêutica combinada com as vitaminas E e C e uma redução de 41,22% ($p=0,006$) com o fenofibrato.

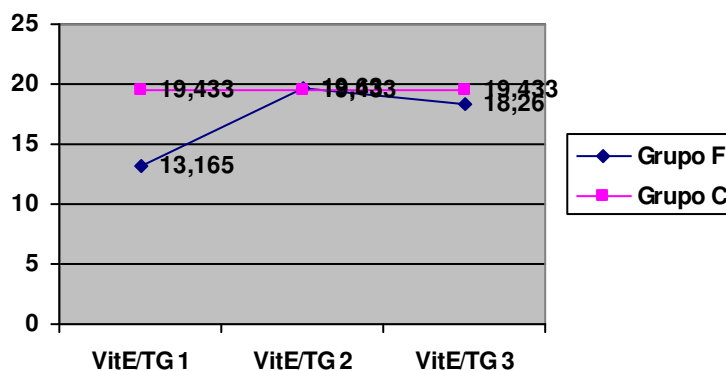


Gráfico 13

Tal como nos capítulos anteriores, fizemos a relação mMolar entre a Vit E e os triglicerídeos (Quadro 4 e gráfico 13). Inicialmente e contrariamente aos níveis séricos desta vitamina, esta relação apresentou-se significativamente inferior no grupo F, comparativamente ao grupo C ($p=0,011$). Após terapêutica vitamínica, verificou-se um aumento de 49,1% ($p=0,008$), ficando os seus valores praticamente sobreponíveis aos do grupo controlo ($p=0,926$). Com o fenofibrato verificou-se uma quase ausência de alteração da razão Vit E/TG ($p=0,544$).

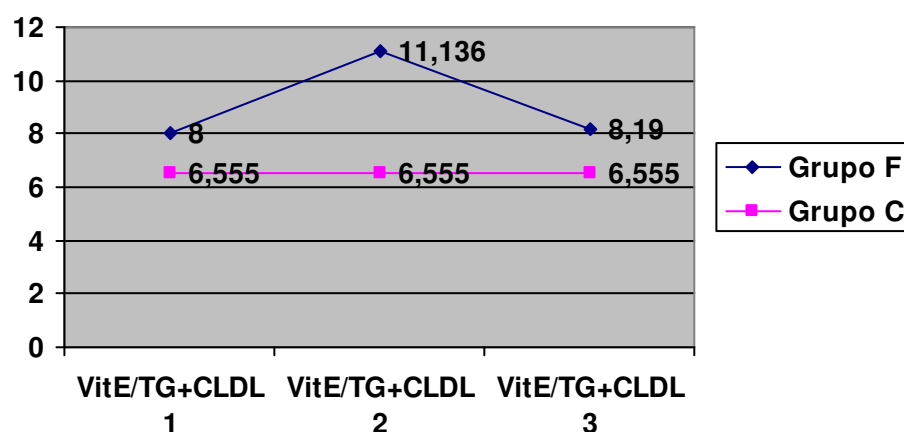


Gráfico 14

Ao relacionar os níveis do α -tocoferol com os triglicerídeos e com o CLDL (Quadro 4 e gráfico 14), o comportamento foi paralelo ao verificado com os níveis totais da Vit E. Inicialmente superiores no grupo F ($p=0,008$), os seus níveis apresentaram um aumento de 39,2% ($p=0,002$) com a terapêutica vitamínica e uma posterior redução de 26,45% ($p=0,005$), mantendo-se no final do estudo superiores no grupo F ($p=0,006$).

Em relação aos valores médios obtidos para as OxLDL, o quadro 4 e o gráfico 15 mostram a variação na população F, em comparação com a população controlo.

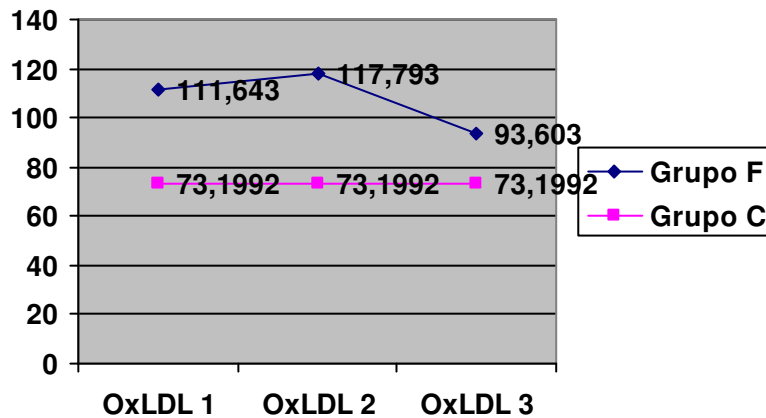


Gráfico 15

A concentração inicial das OxLDL foi significativamente superior no nosso grupo F ($p=0,001$), estando assim de acordo com os valores da Vit E ajustados para os triglicerídeos, inferiores nestes indivíduos. A terapêutica com a associação Vit E e C não induziu uma redução nos níveis das lipoproteínas oxidadas, como seria previsível, tendo mesmo provocado um ligeiro aumento de 5,5% ($p=0,199$). Com a terapêutica hipolipemiante (fenofibrato), apesar de uma redução de 20,53% ($p=0,022$), a concentração das OxLDL manteve-se superior no grupo F ($p=0,008$). A redução das LDL oxidadas, conseguida pelo fibrato, foi muito superior à redução verificada para o CLDL (5,96%).

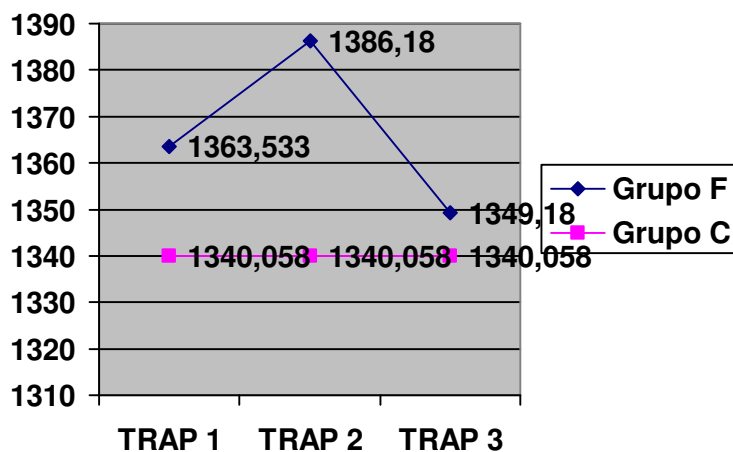


Gráfico 16

Neste grupo F, os valores do TRAP foram semelhantes, embora ligeiramente superiores, aos do grupo C, mantendo-se essa diferença sem significado ao longo do estudo ($p=0,782$, $0,540$ e $0,911$) (Quadro 4 e Gráfico 16). A terapêutica vitamínica induziu um muito discreto aumento ($p=0,627$) neste parâmetro, tendo havido uma redução igualmente ligeira com o fenofibrato ($p=0,593$).

20.3.3 - Resumo e Comentários

O fenofibrato não teve praticamente qualquer efeito na concentração da transferrina. Este comportamento foi ligeiramente diferente do verificado nos grupos anteriores. Com efeito, se a concentração desta proteína era no início, também não significativamente inferior nos grupos D e E, relativamente ao grupo C, foi reduzida e viu a sua diferença atingir significado estatístico na última avaliação, respectivamente após terapêutica com as estatinas ou os fibratos (grupo D) ou só com as estatinas (grupo F). Parece ter havido uma diferente acção das duas famílias de hipolipemiantes sobre os níveis da transferrina, embora, dado o reduzido tamanho da amostra, não possamos tirar grandes ilacções. Não encontramos na literatura qualquer referência aos possíveis efeitos dos fibratos sobre a concentração plasmática desta proteína.

Relativamente à ceruloplasmina, o fibrato induziu uma significativa redução nos seus níveis, o que, atendendo à associação positiva que parece existir entre esta proteína e a doença vascular, poderá ser interpretado como um resultado favorável. Não podemos no entanto esquecer que o Cu, através da reacção de Fenton, é um dos geradores de radicais livres e não sabemos se a redução, pelo fenofibrato, da sua proteína fixadora, poderá ser indutora de uma maior produção de radicais e das reacções de peroxidação.

Os nossos hipertrigliceridémicos apresentaram níveis de α -tocoferol significativamente superiores aos dos controlos. Este achado, poderá ser explicado pela concentração inicial dos triglicerídeos, substancialmente superior à apresentada pelo grupo C. Sendo o α -tocoferol uma vitamina lipossolúvel, presente nas lipoproteínas, é de esperar que altas concentrações de triglicerídeos sejam acompanhadas de elevados níveis de Vit E. Os teores séricos desta vitamina apresentaram um aumento, não significativo, com as

vitaminas E e C e uma redução de 41,22% ($p=0,006$) com o fenofibrato, que julgamos ter estado na dependência da redução significativa dos triglicerídeos (29,54%) e do facto de apenas metade dos participantes terem sido, nesta fase, medicados com as vitaminas antioxidantes. O aumento verificado com a terapêutica vitamínica, terá sido atenuado pela concomitante redução nos níveis dos triglicerídeos, de 640,40 para 439,42 mg/dl e pela redução da Vit E presente nestas lipoproteínas. Este efeito das vitaminas antioxidantes a nível da concentração sérica dos triglicerídeos não estando, como vimos já, de acordo com toda a literatura, é suportada por alguns autores¹⁶⁷⁰. Relativamente ao efeito do fenofibrato na concentração da Vit E, explicado parcialmente pela redução das lipoproteínas, referimos um estudo realizado em 21 homens com hiperlipidemia mista, tratados durante 12 semanas com o genfibrozil. Este fármaco induziu reduções nos níveis séricos da ubiquinona-10 ($p<0,001$), do α e do gama-tocoferol ($p<0,001$)¹⁸¹⁶.

Tal como nos grupos anteriores, relacionámos os níveis da Vit E com os lípidos, primeiro com os triglicerídeos, VitE /TG e depois com o somatório TG+CLDL. A razão Vit E/TG apresentou-se significativamente inferior nos dislipidémicos, aumentou significativamente com a terapêutica vitamínica e manteve-se praticamente inalterada com o fenofibrato. Ao associar o CLDL aos triglicerídeos na relação com a Vit E, Vit E/TG+CLDL, o comportamento foi em tudo semelhante ao apresentado pelos níveis séricos do α -tocoferol. A redução, não significativa, da Vit E/TG após terapêutica com o fenofibrato, contrastou com os resultados que o mesmo fármaco obteve nos níveis séricos do α -tocoferol e na relação Vit E/TG+CLDL (redução significativa). Este comportamento foi semelhante ao verificado no grupo das estatinas, com a diferença de que nos indivíduos hipercolesterolémicos, a redução não significativa, com a atorvastatina e a sinvastatina, verificou-se na relação Vit E/TG+CLDL. Julgamos que a explicação dada relativamente ao grupo E, poder-se-á aplicar a este grupo F. A relação entre o número de moles da Vit E e o número de moles dos triglicerídeos, foi pouco reduzida pelo fibrato, ao reduzir preferencialmente o número de moles dos lípidos. Logo, a redução da razão VitE /TG, não atingiu significado estatístico. Por outro lado, a razão entre o número de moles do α -tocoferol e o do somatório TG+CLDL, foi significativamente reduzida pelo fenofibrato, pois este fármaco teve um efeito praticamente nulo sobre o CLDL e

assim, o número de moles da associação, foi menos reduzido do que o número de moles da Vit E e conseqüentemente a relação reduziu de uma forma significativa. Julgamos assim que, nas hipertrigliceridemias, o melhor parâmetro para avaliar o conteúdo em vit E, será o seu relacionamento com os triglicérides ou a determinação do conteúdo destas lipoproteínas em α -tocoferol.

Num estudo realizado em 45 indivíduos com hiperlipidemia combinada familiar, as terapêuticas com a atorvastatina ou com o fenofibrato, reduziram a relação α -tocoferol / lípidos totais em mais de 30% ($p < 0,001$)¹⁸¹⁷.

Relativamente ao nível das OxLDL, foi significativamente superior no grupo F, compatível com a menor razão Vit E/Trig apresentada por estes indivíduos. Manteve-se praticamente inalterado pela terapêutica vitamínica e reduziu-se significativamente com o fenofibrato. A resposta à terapêutica antioxidante pode ter sido devida ao aumento, também verificado, na concentração das LDL (11,06%). A redução das OxLDL pelo fenofibrato, em cerca de 20%, não poderá ser explicada apenas pela redução da concentração do CLDL (5,96%), sendo de admitir uma acção directa do fármaco a nível de certas enzimas e/ou de outros mecanismos antioxidantes.

Num estudo em que se compararam os efeitos da pravastatina, da colestiramina e do bezafibrato, em 18 hipercolesterolémicos, verificaram-se, para além dos efeitos lipídicos esperados para cada fármaco, uma redução da oxidabilidade das LDL induzida pelo cobre. Ao analisar as partículas LDL pós-terapêutica, a pravastatina reduziu o MDA em 22%, os peróxidos em 18% e os dienos conjugados em 20%. A colestiramina reduziu os mesmos marcadores oxidativos em 41, 25 e 63% e o bezafibrato em 41, 38 e 45%. O conteúdo em Vit E das LDL foi reduzido em 49, 36 e 8%, respectivamente pela pravastatina, pela colestiramina e pelo bezafibrato¹⁸¹⁸. O genfibrozil, nas doses de 450 mg, 2id, durante 8 semanas, aumentou significativamente o *lag time* da oxidação das LDL em 18,2% e a relação entre a Vit E e os peróxidos lipídicos das mesmas lipoproteínas em 67,6%. Não houve qualquer alteração nos níveis da Vit E nem do beta-caroteno das LDL¹⁸¹⁹. Em 36 doentes hipertrigliceridémicos (≥ 2 mmol/L) e positivos para o HIV, as terapêuticas com 200 mg/dia de fenofibrato micronizado, ou com 500 mg/dia de Vit E, durante 3 meses, induziram um aumento da resistência das LDL à oxidação¹⁸²⁰. Num trabalho já citado e

realizado em 45 indivíduos com hiperlipidemia combinada familiar, determinou-se a intensidade do stresse oxidativo, através das concentrações plasmáticas dos oxisteróis (7-cetocolesterol e 7beta-hidroxicolesterol). Comparativamente a um grupo de normolipidémicos, os 45 dislipidémicos apresentaram níveis mais elevados dos oxisteróis ($p < 0,001$) e uma menor relação α -tocoferol / lípidos totais. Tanto a atorvastatina como o fenofibrato induziram uma significativa redução do 7beta-hidroxicolesterol ($p < 0,001$) e a normalização dos níveis do 7-cetocolesterol¹⁸¹⁷. Resultados diferentes foram obtidos num outro trabalho, realizado em 28 doentes com hipertrigliceridemia, em que o genfibrozil, nas doses de 1200 mg/dia, não afectou a resistência à oxidação *in vitro* das LDL¹⁸²¹. Em indivíduos com dislipidemia mista, a terapêutica com genfibrozil reduziu os níveis dos antioxidantes séricos (ubiquinona-10 e α -tocoferol) corrigidos para o CT e o C LDL ($p < 0,001$)¹⁸¹⁶.

Relativamente ao TRAP, seria de esperar um comportamento inverso ao da concentração das OxLDL. Uma maior capacidade antioxidativa total do plasma, traduzido por um maior TRAP, deveria acompanhar-se de uma menor concentração das OxLDL, o que não se verificou no nosso estudo, em que o grupo F apresentou simultaneamente maiores níveis de LDL oxidadas e de TRAP. Quer a terapêutica vitamínica, quer a hipolipemiante, não induziu alteração significativa neste parâmetro. Parece que neste sub-grupo de dislipidémicos, o TRAP não terá traduzido fielmente as defesas antioxidativas totais do plasma.

Num estudo realizado em 55 indivíduos, 35 dos quais com obesidade visceral e hipertrigliceridemia (> 180 mg/dl) e 20 saudáveis, o tratamento com 267 mg/dia de fenofibrato micronizado, durante 4 semanas, reduziu significativamente ($p < 0,05$) as concentrações séricas dos TBARS (33%) e aumentou também de uma forma significativa ($p < 0,05$) os níveis séricos da catalase (35%), da glutathiona-peroxidase (63%) e da superóxido-dismutase (31%)¹⁸²². Em 20 indivíduos com dislipidemia mista, dos dois sexos e com idade média de 54 ± 10 anos, o fenofibrato, na dose de 300 mg/dia, durante 8 semanas, reduziu em 42% os níveis circulantes dos dienos conjugados ($p < 0,0001$) e do MDA (não significativamente). O mesmo fármaco induziu um aumento nos níveis da glutathiona peroxidase (90%, $p < 0,001$)¹⁸²³.

20.4 - Avaliação de alguns parâmetros inflamatórios

20.4.1 - hsPCR e AAT

No quadro 5, apresentamos a evolução manifestada ao longo do estudo pela PCR e pela AAT nos indivíduos medicados com fenofibrato.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
PCR1 F	10	0,5700	0,45522	0,14395	0,2444	0,8956	0,149
C	12	0,3208	0,32191	0,09293	0,1163	0,5254	
PCR2 F	10	0,7240	0,70540	0,22307	0,2194	1,2286	0,091
C	12	0,3208	0,32191	0,09293	0,1163	0,5254	
PCR3 F	10	0,78	1,220	0,386	-0,09	1,65	0,222
C	12	0,32	0,322	0,093	0,12	0,53	
AAT1 F	10	1,210	0,1790	0,0566	1,082	1,338	0,455
C	12	1,272	0,1970	0,0569	1,147	1,397	
AAT2 F	10	1,245	0,2215	0,701	1,087	1,403	0,768
C	12	1,272	0,1970	0,0569	1,147	1,397	
AAT3 F	10	1,2410	0,29976	0,09479	1,0266	1,4554	0,776
C	12	1,2717	0,19697	0,05686	1,1465	1,3968	

Quadro 5
(hsPCR e AAT)

Ao analisar os valores basais da hsPCR e a sua evolução ao longo do estudo, salienta-se de imediato a elevada concentração desta proteína de fase aguda, nos hipertrigliceridémicos e nos controlos (> 3 mg/L), colocando-os a todos eles num risco cardio-vascular elevado (Quadro 5 e Gráfico 17). Na primeira avaliação a hsPCR apresentou-se mais elevada no grupo F (p=0,149), aumentando progressivamente com a terapêutica vitamínica e depois com o fenofibrato.

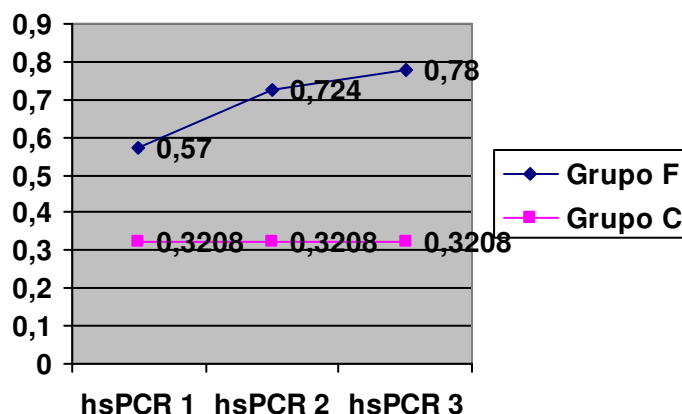


Gráfico 17

Analisando individualmente cada participante relativamente aos valores desta proteína, verificámos que um deles apresentou na segunda avaliação uma concentração de 14,1 mg/L, um outro, valores na primeira e segunda avaliações, respectivamente de 16,1 e 24,1 mg/L e um terceiro elemento, uma concentração de 41,5 mg/L na última avaliação. Considerando o pequeno tamanho da amostra, estes valores da PCR nitidamente superiores à média e à concentração aceite como limite para ser considerada como factor de risco cardio-vascular, terão inflacionado os nossos resultados. Tal como fizemos com os outros grupos de doentes, o grupo D (todos os dislipidémicos) e o sub-grupo E (hipercolesterolémicos, medicados com estatinas), optámos por fazer uma nova análise, retirando todos os elementos que apresentassem, em alguma das três avaliações, concentrações da hsPCR superiores a 10 mg/L.

No quadro 6 e no gráfico 18 apresentam-se os valores obtidos.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
PCR1	F	7	0,3700	0,23216	0,08775	0,1553 0,5847	0,231
	C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150 0,3741	
PCR2	F	7	0,4243	0,27724	0,10479	0,1679 0,6807	0,123
	C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150 0,3741	

PCR3	F	7	0,2686	0,17121	0,06471	0,1102	0,4269	
	C	11	0,2445	0,19279	0,05813	0,1150	0,3741	0,792

Quadro 6
(hsPCR)

A concentração da hsPCR (Quadro 6 e Gráfico 18) reduziu-se nos dois grupos de participantes, com os indivíduos do grupo C a passarem de um elevado risco de doença cardio-vascular para um risco moderado (2,445 mg/L). O grupo F, apesar da redução verificada nos níveis desta proteína, continuou com concentrações superiores a 3 mg/L, mantendo-se assim com um elevado risco de doença.

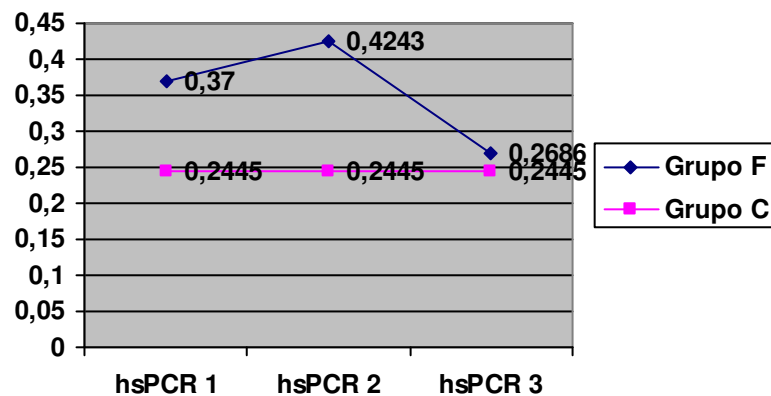


Gráfico 18

Os valores basais da hsPCR foram não significativamente superiores no grupo F ($p=0,231$) e apresentaram um discreto aumento com as vitaminas antioxidantes ($p=0,567$), comportamento semelhante ao verificado nos grupos D e E. A terapêutica com o fenofibrato induziu uma redução de 36,69% ($p=0,117$) na concentração da hsPCR, com o grupo F a apresentar na última avaliação, níveis séricos próximos dos apresentados pelo grupo C ($p=0,792$).

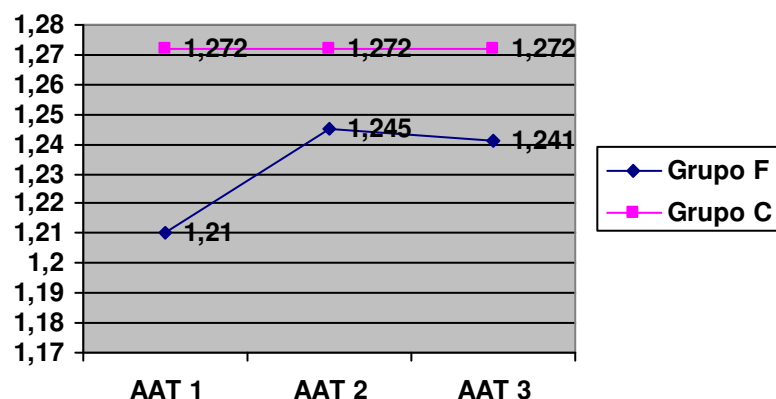


Gráfico 19

Os valores da AAT apresentados pelo grupo F (Quadro 6 e Gráfico 19), foram, nas diversas avaliações, sempre não significativamente inferiores aos do grupo C. Relativamente à evolução apresentada ao longo do estudo, houve um discreto aumento após terapêutica vitamínica ($p=0,314$), mantendo-se praticamente inalterados com o fenofibrato ($p=0,969$).

20.4.2 – Interleucinas

Antes de analisarmos o comportamento das diversas interleucinas, relembremos as considerações que tecemos nos capítulos anteriores e as limitações que a grande dispersão de valores apresentada pelas diversas moléculas, quer nos seus níveis basais, quer na evolução ao longo do estudo, associadas à pequena dimensão da amostra colocaram ao nosso trabalho. Recordamos, também, que o facto de 4 dos 10 hipertrigliceridémicos do nosso estudo estarem medicados com 100 mg/dia de AAS, poderá ter alterado os níveis desta moléculas.

O quadro 7 refere-se à evolução verificada nas diversas interleucinas.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
IL6 1 F	10	2,14850	1,855729	0,586833	0,82099	3,47601	0,109
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589	1,69777	

IL6 2 F	10	2,61510	2,762320	0,873522	0,63906	4,59114	
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589	1,69777	0,094
IL6 3 F	10	3,11630	1,347744	0,426194	2,15218	4,08042	
C	12	1,13683	0,882856	0,254859	0,57589	1,69777	0,001
IL8 1 F	10	67,50390	100,564844	31,801396	-4,43586	139,44366	
C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,419
IL8 2 F	10	16,7190	25,614707	8,100082	-1,60456	35,04276	
C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,020
IL8 3 F	10	36,57460	32,986576	10,431271	12,97742	60,17178	
C	12	104,04225	105,771630	30,533639	36,83816	171,24634	0,067
IL18 1F	10	463,00580	585,206998	185,058702	44,37393	881,63767	
C	12	854,42767	577,429103	166,689424	487,54672	1221,30862	0,131
IL18 2F	10	530,31270	633,906378	200,458798	76,84339	983,78201	
C	12	854,42767	577,429103	166,689424	487,54672	1221,30862	0,224
IL18 3F	10	463,52290	305,354381	96,561534	245,08554	681,96026	
C	12	854,42767	577,429103	166,689424	487,54672	1221,30862	0,069
INF 1 F	10	30,94320	9,291453	2,938215	24,29649	37,58991	
C	12	25,79667	10,359777	2,990610	19,21438	32,37895	0,239
INF 2 F	10	23,69820	9,894139	3,128802	16,62036	30,77604	
C	12	25,79667	10,359777	2,990610	19,21438	32,37895	0,635
INF 3 F	10	27,3127	11,64504	3,68249	18,9823	35,6431	
C	12	25,7967	10,35978	2,99061	19,2144	32,3790	0,750
VEGF1F	10	254,40180	273,094943	86,360204	59,04145	449,76215	
C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,377
VEGF2F	10	223,87640	154,708517	48,923129	113,20459	334,54821	
C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,420
VEGF3F	10	303,50170	189,501089	59,925506	167,94079	439,06261	
C	12	175,25533	122,608142	35,393922	97,35384	253,15683	0,070

Quadro 7
(Interleucinas)

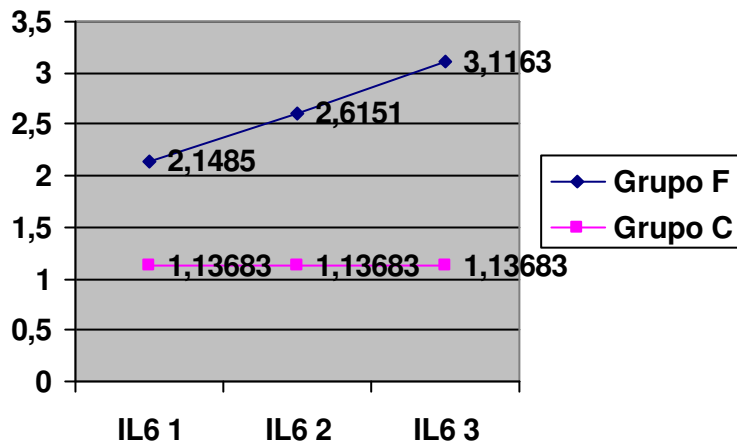


Gráfico 20

A concentração da IL6 foi sempre superior no grupo F (Quadro 7 e Gráfico 20). Inicialmente sem significado estatístico ($p=0,109$), a diferença foi sendo dilatada ao longo do estudo devido ao ligeiro aumento da concentração, primeiro com as vitaminas E e C ($p=0,519$) e depois com o fibrato ($p=0,106$), tendo atingido significado na última avaliação ($p=0,001$).

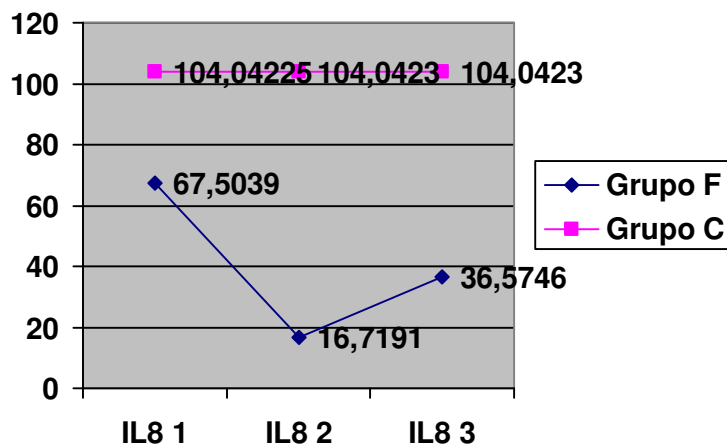


Gráfico 21

O comportamento apresentado pela IL8 neste grupo F foi em tudo semelhante ao verificado no grupo E (Quadro 7 e Gráfico 21). Os seus níveis basais, não significativamente inferiores nos dislipidémicos ($p=0,419$), apresentaram uma redução sem significado, com as vitaminas antioxidantes

($p=0,106$), diferindo significativamente na segunda avaliação, dos valores verificados no grupo C ($p=0,020$). Aumentaram posteriormente com o fenofibrato (118,75%; $p=0,031$), tendo a sua diferença para o grupo dos controlos, perdido novamente significado ($p=0,067$).

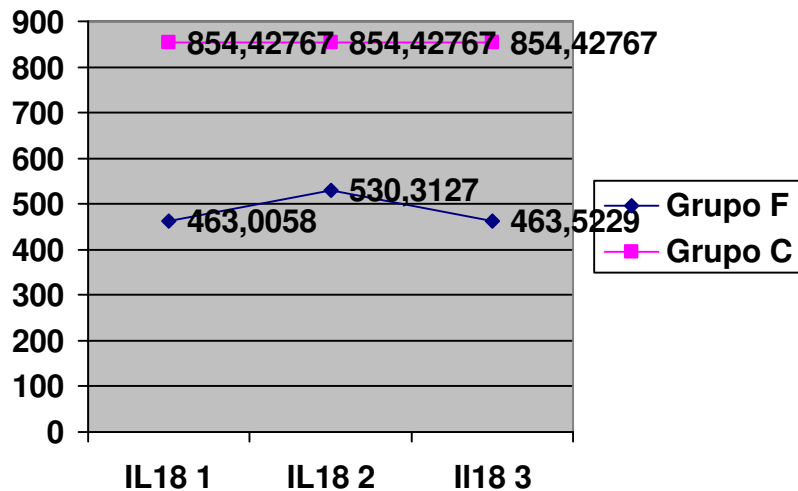


Gráfico 22

A IL18 (Quadro 7 e Gráfico 22) manteve-se ao longo das três avaliações sempre inferior nos indivíduos dislipidémicos, embora sem nunca atingir significado estatístico. Apresentou um discreto aumento com as vitaminas E e C ($p=0,645$), regressando de novo aos níveis iniciais após ligeira redução com o fenofibrato ($p=0,798$). Esta evolução foi diferente da apresentada pelo grupo E, em que, a uma redução dos níveis séricos com as vitaminas antioxidantes, seguiu-se um aumento com as estatinas

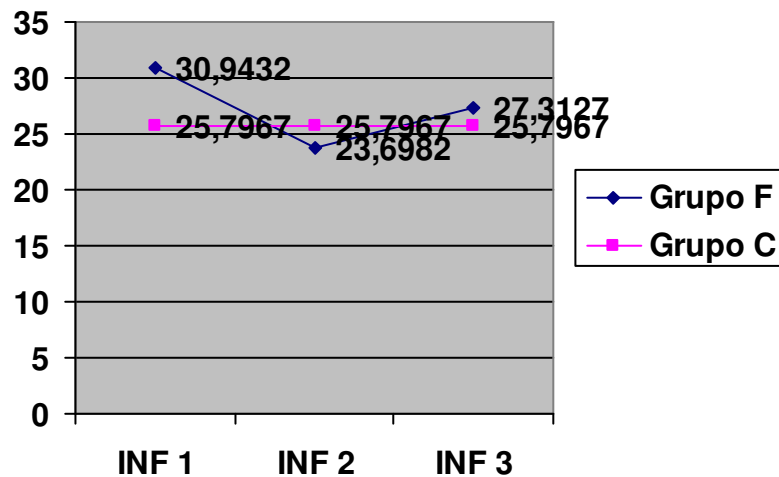


Gráfico 23

Os níveis séricos do INFgama encontravam-se, no início do estudo, não significativamente superiores no grupo F ($p=0,239$) (Quadro 7 e Gráfico 23). Sofreram uma redução de 23,41% ($p=0,061$) com as vitaminas antioxidantes, ficando inferiores aos do grupo C ($p=0,635$) e um aumento não significativo ($p=0,368$) após terapêutica com o fenofibrato, voltando a “cruzar” os níveis do grupo controlo ($p=0,750$).

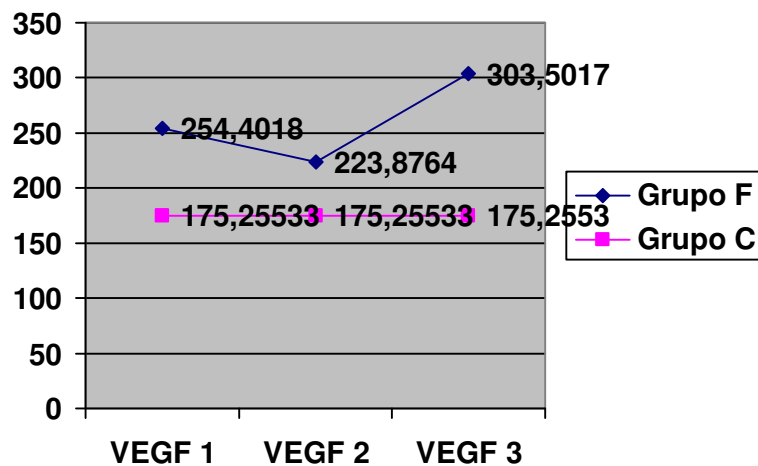


Gráfico 24

Como se pode ver no quadro 7 e no gráfico 24, na primeira avaliação, a concentração do VEGF foi discretamente mais elevada no grupo F ($p=0,377$).

Apesar de uma ligeira redução com as vitaminas antioxidantes ($p=0,570$) manteve-se no segundo controlo em níveis mais elevados nos dislipidémicos ($p=0,420$). A sua concentração apresentou uma elevação insignificante com o fenofibrato ($p=0,357$), afastando-se ligeiramente dos valores do grupo C ($p=0,070$).

20.4.3 - Populações Linfocitárias

Apresentamos de seguida, no Quadro 8, a evolução verificada pelas populações celulares neste grupo F.

	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Intervalo Confiança 95%		P
CD3 1	F	10	73,080	9,3788	2,9658	66,371 79,789	0,339
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329 80,438	
CD3 2	F	10	74,420	5,9123	1,8696	70,191 78,649	0,466
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329 80,438	
CD3 3	F	10	74,970	5,0986	1,6123	71,323 78,617	0,578
	C	12	76,383	6,3816	1,8422	72,329 80,438	
CD4 1	F	10	40,370	10,4354	3,3000	32,905 47,835	0,154
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056 51,411	
CD4 2	F	10	43,190	6,1229	1,9362	38,810 47,570	0,342
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056 51,411	
CD4 3	F	10	45,400	9,5087	3,0069	38,598 52,202	0,827
	C	12	46,233	8,1492	2,3525	41,056 51,411	
CD8 1	F	10	23,310	6,0817	1,9232	18,959 27,661	0,686
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876 29,124	
CD8 2	F	10	22,060	5,6254	1,7789	18,036 26,084	0,397
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876 29,124	
CD8 3	F	10	23,480	8,4898	2,6847	17,407 29,553	0,765
	C	12	24,500	7,2770	2,1007	19,876 29,124	
CD19 1	F	10	12,58	4,694	1,484	9,22 15,94	0,941
	C	12	12,72	3,879	1,120	10,25 15,18	
CD19 2	F	10	12,470	4,2356	1,3394	9,440 15,500	0,888
	C	12	12,717	3,8788	1,1107	10,252 15,181	

CD19 3	F	10	12,180	4,6847	1,4814	8,829	15,531	
	C	12	12,717	3,8788	1,1197	10,252	15,181	0,772
CD56 1	F	10	14,270	7,9992	2,5296	8,548	19,992	
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	0,237
CD56 2	F	10	13,040	6,0011	1,8977	8,747	17,333	
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	0,364
CD56 3	F	10	12,800	4,1341	1,3073	9,843	15,757	
	C	12	10,842	5,1078	1,4745	7,596	14,087	0,342
CD56CD8 1	F	10	5,310	2,8497	0,9012	3,271	7,349	
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	0,675
CD56CD8 2	F	10	4,840	2,7702	0,8760	2,858	6,822	
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	0,995
CD56CD8 3	F	10	4,250	2,2476	0,7108	2,642	5,858	
	C	12	4,833	2,4103	0,6958	3,302	6,365	0,567
DN1 1	F	10	2,790	2,0685	0,6541	1,310	4,270	
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	0,258
DN1 2	F	10	2,150	1,3285	0,4201	1,200	3,100	
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	0,048
DN1 3	F	10	3,280	1,8695	0,5912	1,843	4,617	
	C	12	3,883	2,2910	0,6614	2,428	5,339	0,512
CD25 1	F	10	12,500	3,8850	1,2285	9,721	15,279	
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	0,891
CD25 2	F	10	9,960	3,5211	1,1135	7,441	12,479	
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	0,058
CD25 3	F	10	9,000	1,9276	0,6096	7,621	10,379	
	C	12	12,700	2,8832	0,8323	10,868	14,532	0,002
CD26 1	F	10	34,78	15,561	4,921	23,65	45,91	
	C	12	46,99	11,392	3,289	39,75	54,23	0,046
CD26 2	F	10	39,900	9,6344	3,0467	33,008	46,792	
	C	12	46,992	11,3920	3,2886	39,754	54,230	0,135
CD26 3	F	10	43,820	8,5308	2,6977	37,717	49,923	
	C	12	46,992	11,3920	3,2886	39,754	54,230	0,476
CD25CD3 1	F	10	8,580	1,6982	0,5370	7,365	9,795	
	C	12	10,200	2,3460	0,6772	9,709	11,691	0,084
CD25CD3 2	F	10	7,62	2,579	0,816	5,78	9,46	
	C	12	10,20	2,346	0,677	8,71	11,69	0,023
CD25CD3 3	F	10	6,910	1,7093	0,5388	5,691	8,129	

	C	12	10,200	2,3460	0,6772	8,709	11,691	0,001
CD26CD3 1	F	10	32,500	15,6201	4,9395	21,326	43,674	
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	0,044
CD26CD3 2	F	10	37,630	9,5315	3,0141	30,812	44,448	
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	0,125
CD26CD3 3	F	10	41,350	7,9999	2,5298	35,627	47,073	
	C	12	44,908	11,4119	3,2943	37,658	52,159	0,417
CD25CD26CD3 1F	F	10	4,980	1,2900	0,4079	4,057	5,903	
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	0,001
CD25CD26CD3 2F	F	10	4,750	2,1864	0,6914	3,186	6,314	
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	0,003
CD25CD26CD3 3F	F	10	4,670	1,5326	0,4847	3,574	5,766	
	C	12	7,642	1,8676	0,5391	6,455	8,828	0,001
CCR5 1	F	10	2,120	1,1487	0,3633	1,298	2,942	
	C	12	2,942	2,3666	0,6832	1,438	4,445	0,329
CCR5 2	F	10	2,50	1,519	0,480	1,41	3,59	
	C	12	2,94	2,367	0,683	1,44	4,45	0,617
CCR5 3	F	10	4,38	3,585	1,134	1,82	6,94	
	C	12	2,94	2,367	0,683	1,44	4,45	0,273
CCR5CD3 1	F	10	1,470	1,0155	0,3211	0,744	2,196	
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	0,301
CCR5CD3 2	F	10	1,880	1,4748	0,4664	0,825	2,935	
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	0,822
CCR5CD3 3	F	10	3,210	2,8431	0,8991	1,176	5,244	
	C	12	2,017	1,3381	0,3863	1,166	2,867	0,210
CCR5CD4 1	F	10	0,900	0,5164	0,1633	0,531	1,269	
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	0,674
CCR5CD4 2	F	10	1,150	0,8250	0,2609	0,560	1,740	
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	0,722
CCR5CD4 3	F	10	2,250	2,4928	0,7883	0,467	4,033	
	C	12	1,025	0,7944	0,2293	0,520	1,530	0,122
HLADR 1	F	10	24,090	7,2979	2,3078	18,869	29,311	
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	0,172
HLADR 2	F	10	27,140	7,7875	2,4626	21,569	32,711	
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	0,023
HLADR 3	F	10	23,430	4,4749	1,4151	20,229	26,631	
	C	12	20,308	5,2219	1,5074	16,991	23,626	0,152

HLADRC4 1	F	10	6,540	4,2416	1,3413	3,506	9,574	0,249
	C	12	4,508	3,7833	1,0922	2,105	6,912	
HLADRC4 2	E	10	8,56	2,628	0,831	6,68	10,44	0,010
	C	12	4,51	3,783	1,092	2,10	6,91	
HLADRC4 3	F	10	6,60	2,254	0,713	4,99	8,21	0,141
	C	12	4,51	3,783	1,092	2,10	6,91	
HLADRC8h 1	F	10	3,580	1,4117	0,4464	2,570	4,590	0,073
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	
HLADRC8h 2	F	10	3,920	1,3273	0,4197	2,970	4,870	0,023
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	
HLADRC8h 3	F	10	3,180	1,8540	0,5863	1,854	4,506	0,266
	C	12	2,325	1,6526	0,4771	1,275	3,375	
HLADRC8low1	F	10	1,400	0,8894	0,2813	0,764	2,036	0,154
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	
HLADRC8low2	F	10	1,150	0,4950	0,1565	0,796	1,504	0,335
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	
HLADRC8low3	F	10	0,910	0,3929	0,1242	0,629	1,191	0,825
	C	12	0,843	0,8695	0,2510	0,291	1,396	
HLADRC8 1	F	10	4,980	1,1419	0,3611	4,163	5,797	0,039
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	
HLADRC8 2	F	10	5,070	1,2284	0,3885	4,191	5,949	0,033
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	
HLADRC8 3	F	10	4,120	2,0612	0,6518	2,646	5,594	0,331
	C	12	3,167	2,3689	0,6838	1,662	4,672	
CD95 1	F	10	21,930	10,6660	3,3729	14,300	29,560	0,397
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	
CD95 2	F	10	21,330	14,7551	4,6660	10,775	31,885	0,582
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	
CD95 3	F	10	19,930	13,1987	4,1738	10,488	29,372	0,774
	C	12	18,650	7,0150	2,0251	14,193	23,107	
CD95L 1	F	10	2,54	0,957	0,303	1,86	3,22	0,214
	C	12	2,00	1,004	0,290	1,36	2,64	
CD95L 2	F	10	3,600	3,1436	0,9941	1,351	5,849	0,110
	C	12	2,000	1,0036	0,2897	1,362	2,638	
CD95L 3	F	10	1,780	1,1223	0,3549	0,977	2,583	0,633
	C	12	2,000	1,0036	0,2897	1,362	2,638	
CD95CD95 1	F	10	0,530	0,3234	0,1023	0,299	0,761	

	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	0,012
CD95CD95 2	F	10	1,000	1,0708	0,3386	0,234	1,766	
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	0,024
CD95CD95 3	F	10	0,352	0,5133	0,1623	-0,015	0,719	
	C	12	0,235	0,1699	0,0490	0,127	0,343	0,465
CD3CD95 1	F	10	17,500	10,9450	3,4611	9,670	25,330	
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	0,974
CD3CD95 2	F	10	17,380	11,5155	3,6415	9,142	25,618	
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	0,999
CD3CD95 3	F	10	17,290	12,0164	3,7999	8,694	25,886	
	C	12	17,375	6,8094	1,9657	13,049	21,701	0,984
CD3CD95L 1	F	10	1,140	0,9192	0,2907	0,482	1,798	
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	0,462
CD3CD95L 2	F	10	1,490	0,9826	0,3107	0,787	2,193	
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	0,099
CD3CD95L 3	F	10	1,181	1,0828	0,3424	0,406	1,956	
	C	12	0,892	0,6302	0,1819	0,491	1,292	0,443
CD62L 1	F	10	57,320	18,7085	5,9161	43,937	70,703	
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	0,109
CD62L 2	F	10	68,490	11,4209	3,6116	60,320	76,660	
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	0,907
CD62L 3	F	10	52,990	8,4444	2,6703	46,949	59,031	
	C	12	67,933	10,5455	3,0442	61,233	74,634	0,002
CD3CD62L 1	F	10	40,450	17,1706	5,4298	28,167	52,733	
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	0,085
CD3CD62L 2	F	10	50,010	10,3845	3,2839	42,581	57,439	
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	0,729
CD3CD62L 3	F	10	36,690	6,6824	2,1131	31,910	41,470	
	C	12	51,700	11,8714	3,4270	44,157	59,243	0,002
CD69 1	F	10	11,990	7,1687	2,2669	6,862	17,118	
	C	12	16,750	4,5900	1,3250	13,834	19,666	0,074
CD69 2	F	10	11,000	4,0033	1,2660	8,136	13,864	
	C	12	16,750	4,5900	1,3250	13,834	19,666	0,006
CD69 3	F	10	14,87	7,031	2,223	9,84	19,90	
	C	12	16,750	4,590	1,325	13,83	19,67	0,459
CD69CD3 1	F	10	5,590	4,8677	1,5393	2,108	9,072	

	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	0,035
CD69CD3 2	F	10	5,220	2,0789	0,6574	3,733	6,707	
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	0,003
CD69CD3 3	F	10	8,690	3,4793	1,1002	6,201	11,179	
	C	12	9,758	3,7922	1,0947	7,349	12,168	0,503
CD69CD4 1	F	10	3,460	3,0012	0,9491	1,313	5,607	
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	0,040
CD69CD4 2	F	10	3,270	1,1851	0,3748	2,422	4,118	
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	0,006
CD69CD4 3	F	10	5,510	2,8544	0,9026	3,468	7,552	
	C	12	6,125	2,6840	0,7748	4,420	7,830	0,609

Quadro 8
(Populações Celulares)

Antes de analisarmos os efeitos da terapêutica com o fenofibrato a nível das diferentes populações linfocitárias, gostaríamos de referir que existem muito poucos trabalhos sobre este tema. Foi-nos assim difícil comentar os nossos resultados e especialmente compará-los com outros, afim de avaliar da sua concordância ou discordância com o “estado da arte”.

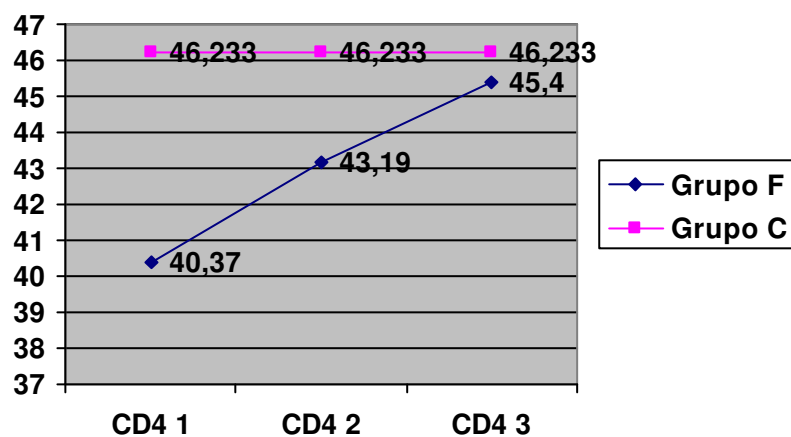


Gráfico 25

Neste grupo F, as células CD4+ (Quadro 8 e Gráfico 25) apresentaram-se no início em concentrações discretamente inferiores relativamente ao grupo C ($p=0,154$). Os seus níveis séricos aumentaram ligeira e progressivamente,

primeiro com as vitaminas antioxidantes ($p=0,207$) e depois com o fenofibrato ($p=0,277$), aproximando-se, na terceira avaliação, dos valores do grupo C ($p=0,827$).

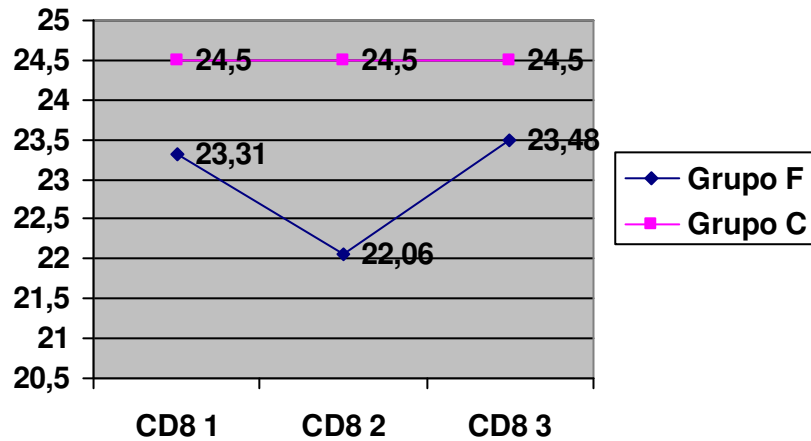


Gráfico 26

Como se pode ver no quadro 8 e no gráfico 26, na primeira avaliação as células CD8+ encontravam-se em concentrações ligeiramente inferiores no grupo F ($p=0,686$). Sofreram uma discreta redução com as vitaminas E e C ($p=0,416$) e um aumento, igualmente ligeiro, com o fibrato ($p=0,462$), ambos sem significado, voltando praticamente aos níveis basais.

O fenofibrato induziu um discreto aumento, não significativo, nas concentrações das células CD4+ e CD8+.

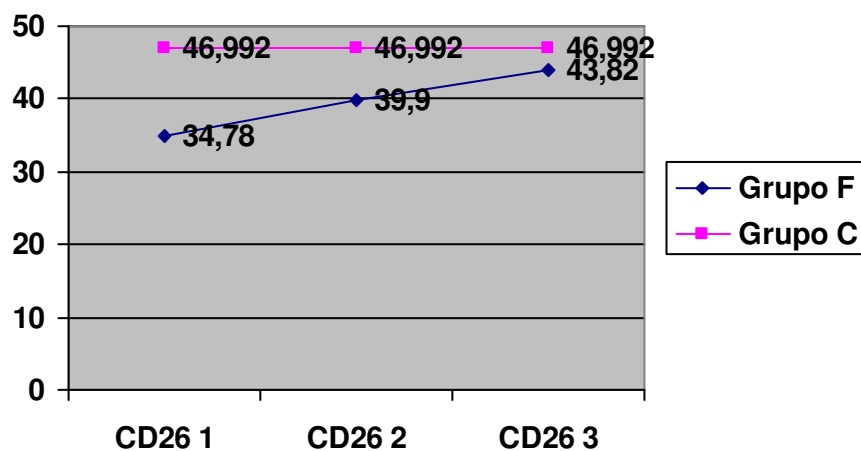


Gráfico 27

Na primeira avaliação, as células CD26+ (Quadro 8 e Gráfico 27) encontravam-se em concentrações significativamente inferiores nos dislipidémicos F ($p=0,046$). Após terapêutica com as vitaminas antioxidantes, os seus níveis aumentaram ligeiramente ($p=0,357$), o mesmo acontecendo na terceira avaliação, depois da terapêutica com o fenofibrato ($p=0,319$).

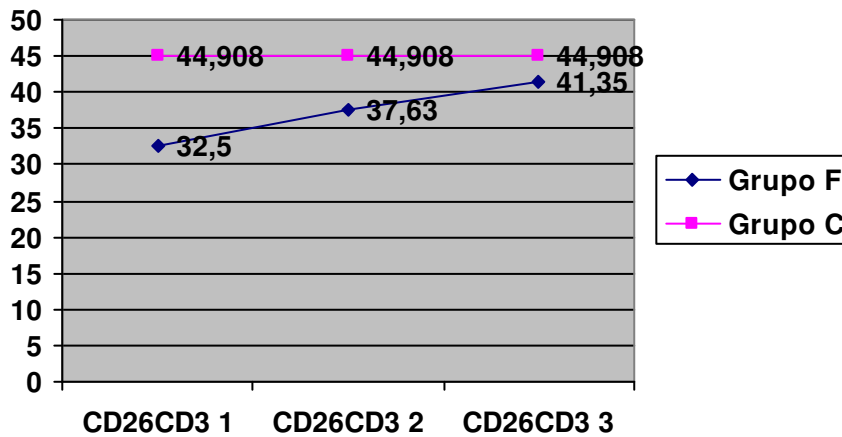


Gráfico 28

Como indicado no quadro 8 e no gráfico 28, o comportamento das células CD26CD3+ foi em tudo semelhante ao das anteriores. Os seus níveis basais estavam significativamente inferiores no grupo F ($p=0,044$) e aumentaram ligeira e progressivamente, primeiro com a terapêutica vitamínica ($p=0,345$) e depois com o fenofibrato ($p=0,325$), sempre sem significado. Este comportamento foi sobreponível ao verificado no grupo medicado com as estatinas.

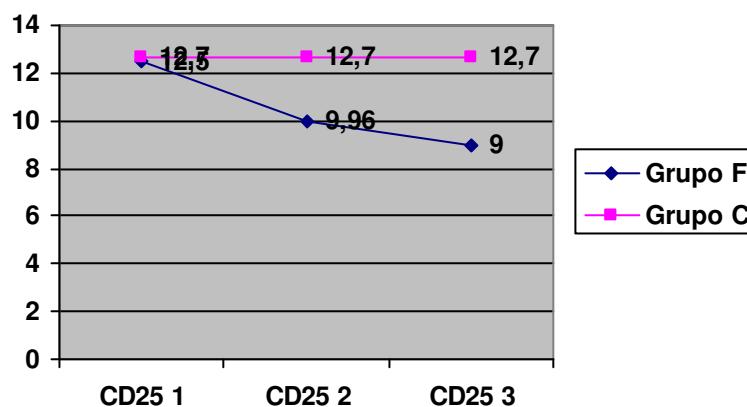


Gráfico 29

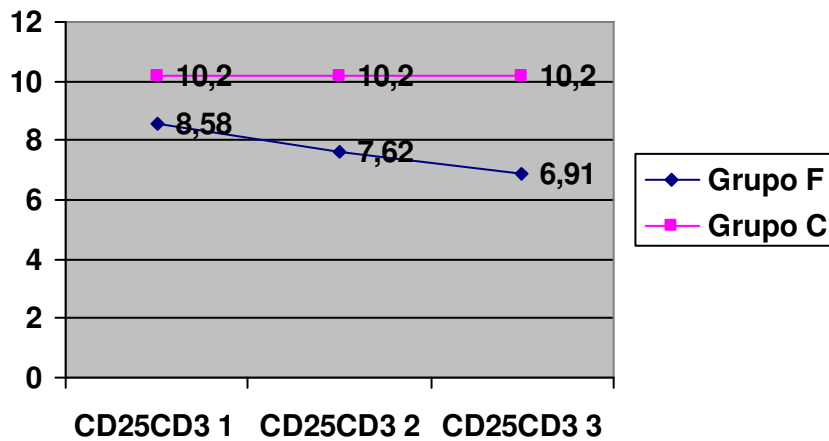


Gráfico 30

O comportamento das células CD25+ e CD25CD3+ (Quadro 8 e Gráficos 29 e 30) foi perfeitamente sobreponível. Encontravam-se na primeira avaliação em concentrações não significativamente inferiores no grupo F ($p=0,891$ e $p=0,084$, respectivamente). Posteriormente, com a terapêutica vitamínica, apresentaram uma ligeira redução ($p=0,091$ e $0,100$, respectivamente), mantendo essa tendência com o fenofibrato ($p=0,477$ e $p=0,500$, respectivamente). Na terceira avaliação a diferença para o grupo C atingiu significado estatístico ($p=0,002$ e $p=0,001$, respectivamente).

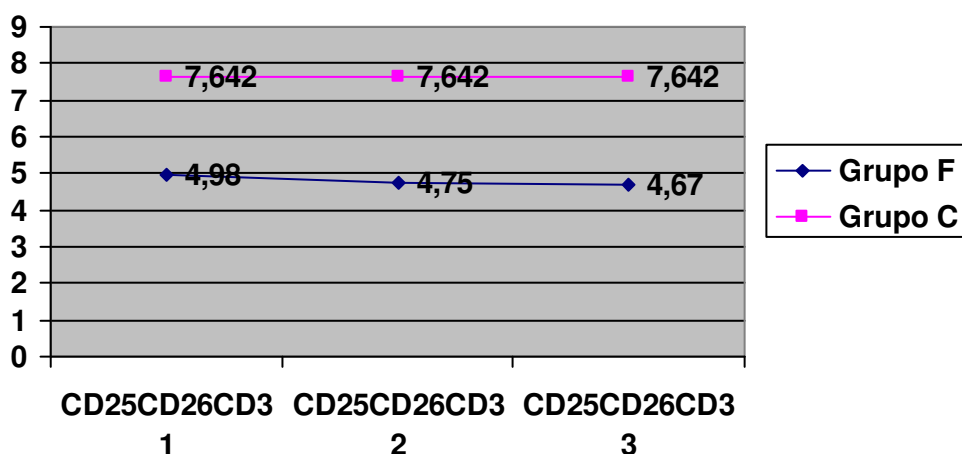


Gráfico 31

Como se pode verificar no quadro 8 e gráfico 31, as células CD25CD26CD3+ apresentaram ao longo do estudo concentrações sempre significativamente inferiores no grupo F ($p=0,001$, $0,003$ e $0,001$). Tanto as vitaminas E e C ($p=0,709$) como o fenofibrato ($p=0,928$) não tiveram praticamente qualquer efeito nos níveis destas células.

Os gráficos 32, 33, 34, 35 e 36 referem-se à evolução apresentada pelas diversas células HLA+.

Recordamos que a principal função das células HLADR+ é a de apresentar os antígenos aos linfócitos CD4+, activando-os, sendo também considerado um marcador da activação imunológica.

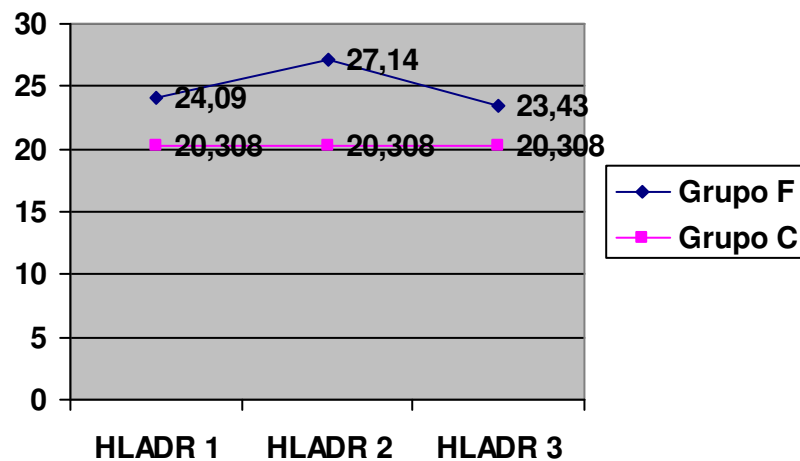


Gráfico 32

Na primeira avaliação do nosso estudo estas células HLADR+ (Quadro 8 e Gráfico 32) apresentaram-se numa concentração discretamente mais elevada no grupo F ($p=0,172$), tendo esta diferença atingido significado estatístico após terapêutica antioxidante ($p=0,023$), depois de um discreto aumento induzido pelas vitaminas E e C ($p=0,316$). Com o fenofibrato, os seus níveis séricos sofreram uma ligeira redução ($p=0,175$) e ficaram sobreponíveis aos da avaliação basal.

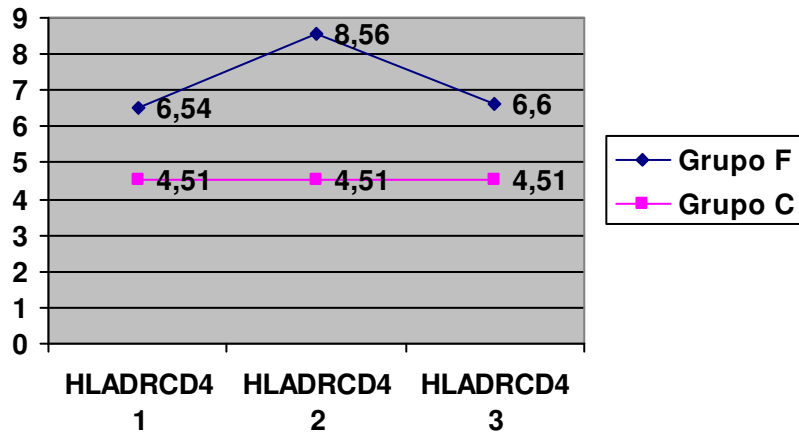


Gráfico 33

Como se pode ver no quadro 8 e gráfico 33, o comportamento das células HLADRC4+ foi perfeitamente semelhante ao das anteriores. Os seus níveis basais, ligeiramente superiores no grupo F ($p=0,141$), aumentaram discretamente com as vitaminas E e C ($p=0,135$) e apresentaram uma posterior redução de 22,89% com o fenofibrato ($p=0,021$).

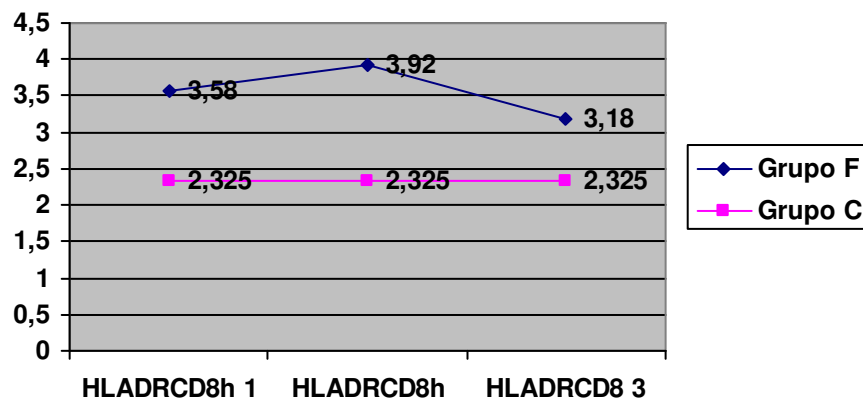


Gráfico 34

Também as células HLADRC8h tiveram um comportamento sobreponível ao das anteriores (Quadro 8 e Gráfico 34), com um discreto aumento na segunda avaliação ($p=0,471$) e uma igualmente discreta redução no último controlo do estudo ($p=0,222$).

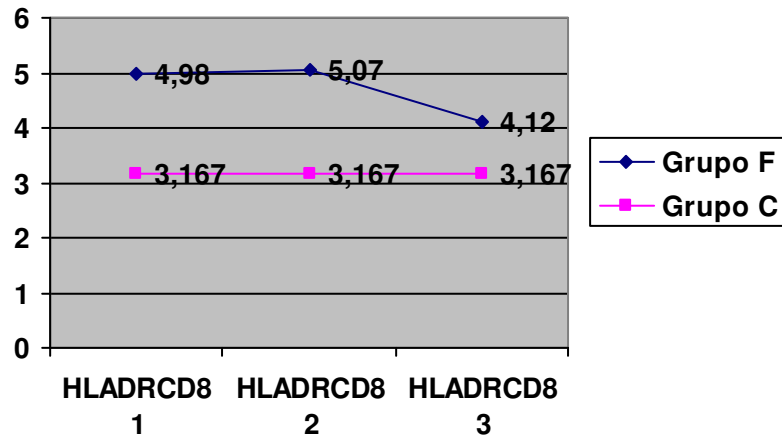


Gráfico 35

Como se documenta no quadro 8 e no gráfico 35, as células HLADRC8+ apresentaram, no seu comportamento, um paralelismo relativamente às populações anteriores. De salientar apenas que os níveis iniciais destas células eram significativamente superiores nos dislipidémicos ($p=0,039$), mantiveram essa diferença com a terapêutica antioxidante ($p=0,033$) e apresentaram uma redução não significativa com o fenofibrato ($p=0,156$), tendo-se assim aproximado dos níveis do grupo C ($p=0,331$).

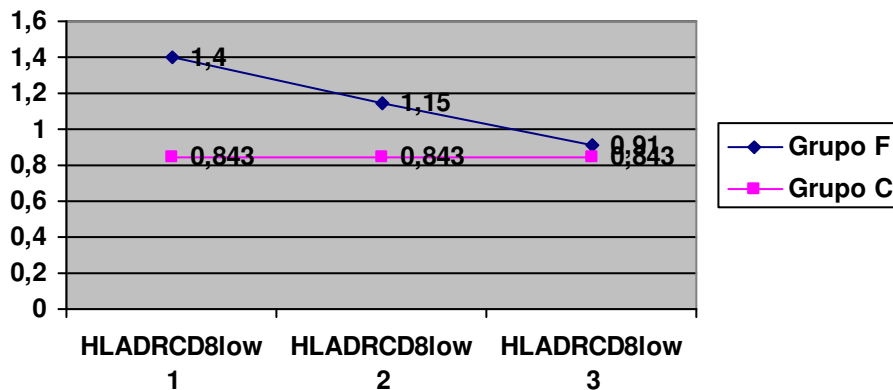


Gráfico 36

As células HLADRC8low tiveram um comportamento ligeiramente diferente do das anteriores (Quadro 8 e Gráfico 36). De início em níveis não significativamente superiores no grupo F ($p=0,154$), apresentaram uma redução progressiva e sem significado, primeiro com as vitaminas antioxidantes ($p=0,467$)

e depois com o fenofibrato ($p=0,128$), atingindo na última avaliação, níveis praticamente iguais aos do grupo C ($p=0,825$).

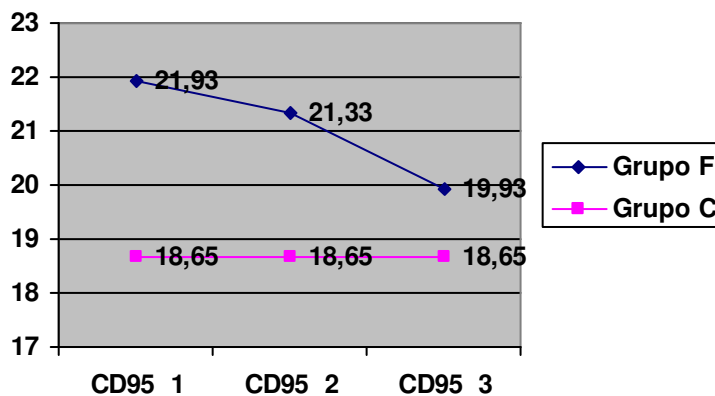


Gráfico 37

As células CD95+ (Quadro 8 e Gráfico 37) apresentaram-se, inicialmente, em concentrações ligeiramente superiores no grupo dos dislipidémicos, grupo F ($p=0,397$). Os seus níveis mantiveram-se praticamente inalterados, embora com uma tendência descendente, não significativa, quer com as vitaminas E e C ($p=0,932$), quer com o fenofibrato ($p=0,828$). Na terceira avaliação, a sua concentração aproximou-se da do grupo controlo ($p=0,774$).

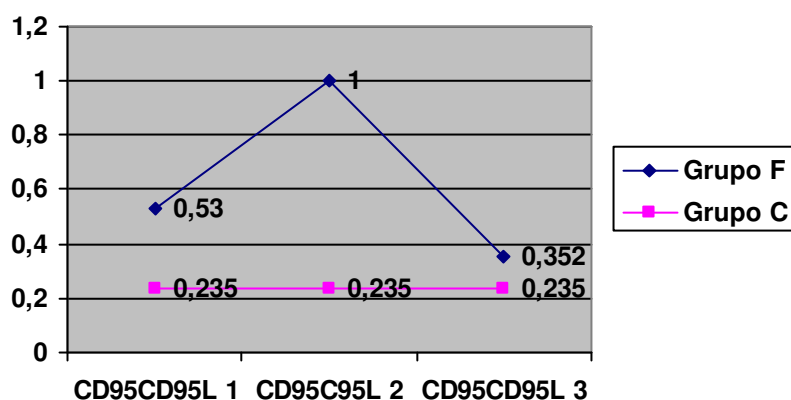


Gráfico 38

Como se pode ver no quadro 8 e no gráfico 38, na avaliação basal, as células simultaneamente positivas para o CD95 e o seu ligante CD95L, encontravam-se também em níveis ligeiramente superiores no grupo F

($p=0,462$). Verificou-se um discreto aumento na sua concentração com as vitaminas antioxidantes ($p=0,201$) e uma redução, igualmente discreta, com o fenofibrato ($p=0,118$), com aproximação dos seus níveis aos do grupo C ($p=0,443$).

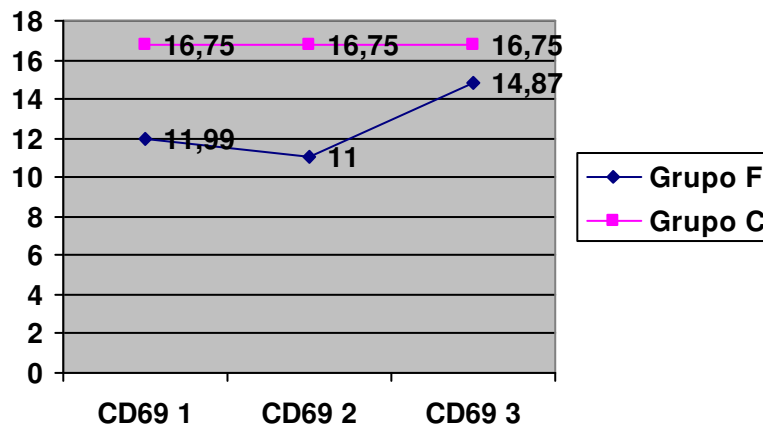


Gráfico 39

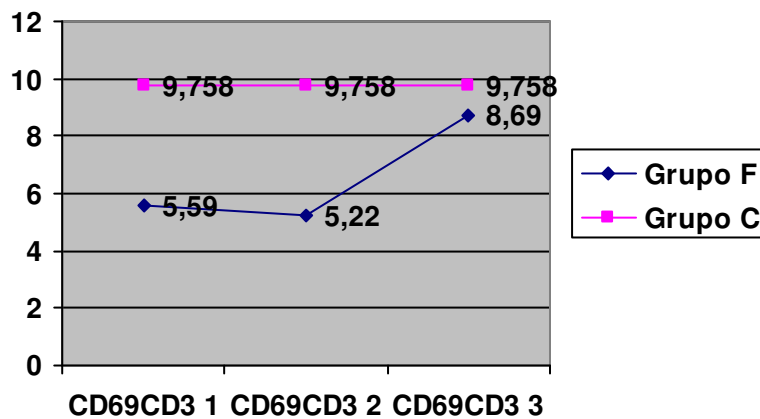


Gráfico 40

As diferentes células CD69, CD69+ e CD69CD3+ (Quadro 8 e Gráficos 39 e 40), apresentaram um comportamento perfeitamente sobreponível. As duas populações, encontravam-se na primeira avaliação, em percentagens inferiores nos indivíduos dislipidémicos, as primeiras sem ($p=0,074$) e as segundas com significado estatístico ($p=0,035$). Viram as suas percentagens serem ligeiramente reduzidas pelas vitaminas antioxidantes ($p=0,516$ e $p=0,758$, respectivamente) e

sofrerem um aumento, não significativo as primeiras e com significado as segundas, após terapêutica com o fenofibrato ($p=0,153$ e $0,021$, respectivamente).

20.4.4 - Resumo e Comentários

Ao analisar em conjunto o comportamento das diversas moléculas e células pró-inflamatórias, gostaríamos de recordar mais uma vez a dificuldade e por vezes a impossibilidade de encontrar outros estudos, particularmente no que se refere aos marcadores celulares, com os quais tivesse sido possível comparar os nossos resultados, o que reforça o interesse do presente trabalho de investigação. Tivemos assim de nos socorrer de alguns trabalhos que analisando parâmetros diferentes dos nossos, avaliaram igualmente determinadas acções imunológicas, como a apresentação, a adesão e a activação celulares. Queremos também mais uma vez ressaltar o facto da determinação das concentrações e percentagens das diversas moléculas e células no sangue periférico poder não traduzir fielmente o que se passa a nível da parede vascular e das próprias placas. Também o facto das diversas análises terem sido realizadas em amostras congeladas e armazenadas durante alguns meses, poderá ter alterado os nossos resultados. Por último o pequeno número de participantes do grupo F, somente dez, torna difícil e por vezes arriscada, a interpretação dos resultados obtidos, gerando apenas hipóteses e nunca conclusões definitivas.

É tendo em mente todas estas considerações e limitações que tecemos alguns comentários a propósito dos resultados obtidos neste grupo F.

hsPCR - Na primeira avaliação, a hsPCR esteve mais elevada nos dislipidémicos, embora não significativamente, com valores superiores a 3mg/L , tendo a terapêutica com o fenofibrato induzido uma redução de $36,69\%$ ($p=0,567$) nos seus níveis.

Vimos, em capítulo anterior, que os activadores dos PPAR- α assim como os dos PPAR-gama, possuem propriedades antiinflamatórias, inibindo algumas das moléculas importantes nestes mecanismos. Iremos agora ver que os nossos resultados estão parcialmente de acordo com os de alguns trabalhos consultados. Numa população de dislipidémicos com características

semelhantes aos nossos - níveis séricos de triglicéridos ≥ 200 mg/dl e hsPCR ≥ 3 mg/L - o fenofibrato, nas doses de 200 mg/dia, reduziu significativamente os níveis desta proteína ($p=0,026$). No mesmo estudo, o fenofibrato não induziu qualquer alteração nos níveis da PCR, quando os seus valores basais eram inferiores a 3 mg/L¹⁸²⁴. Resultados semelhantes foram obtidos em 300 doentes com diabetes tipo 2, com duas ou mais das seguintes alterações - CLDL > 100 mg/dl, triglicéridos > 200 mg/dl ou CHDL < 40 mg /dl. O fenofibrato, na dose de 160 mg/dia e ao fim de 12 semanas, reduziu significativamente os níveis da PCR (-14,6%; $p=0,004$). Também neste estudo a redução da hsPCR esteve dependente dos seus níveis basais, com uma maior redução quando eles eram > 2 mg/L (-18,9%; $p=0,002$)¹⁸²⁵. Em doentes hipercolesterolémicos (CLDL > 130 mg/dl), o fenofibrato, na dose de 160 mg/dia, induziu ao fim de 28 dias de tratamento, uma redução significativa nos níveis da PCR¹⁸²⁶. Resultados sobreponíveis foram obtidos em doentes com dislipidemia mista (Triglicéridos >200 e < 500 mg/dl e CT > 200 mg/dl)¹⁸²⁷. O mecanismo subjacente a esta acção antiinflamatória dos fibratos, parece ser o aumento do I κ B e a consequente inibição do factor de transcrição NF κ B^{1828 1829}. Nem todos os estudos têm conseguido demonstrar esta capacidade dos fibratos em reduzir os níveis da PCR. Em 3122 indivíduos com doença cardíaca coronária crónica, o tratamento com bezafibrato, durante dois anos, não induziu alteração significativa nos níveis da hsPCR, relativamente ao grupo medicado com placebo. Verificou-se um aumento na concentração desta proteína de 3% no grupo do bezafibrato e de 3,7% no grupo do placebo¹⁸³⁰. Num outro trabalho realizado em 24 hipertriglicéridémicos, a terapêutica durante 4 semanas com 400 mg/dia de bezafibrato, para além das alterações esperadas no perfil lipídico, não conseguiu alterar significativamente os níveis séricos da PCR, da IL6 nem do MCP-1¹⁸³¹.

AAT - A AAT apresentou ao longo do estudo concentrações não significativamente inferiores no grupo F, não sofrendo qualquer alteração com o fibrato.

IL6 - A IL6, no início do estudo em níveis superiores nos dislipidémicos, apresentou uma discreta elevação após terapêutica com o fenofibrato. Este resultado, em contradição com o da hsPCR, no mesmo grupo e com a maioria

da literatura, poderá ter sido devido à dispersão dos valores séricos verificada nos participantes.

Num estudo realizado em 14 doentes com dislipidemia tipo IIb, verificou-se uma redução significativa na libertação da IL1 beta (43%), da IL6 (22%) e do MCP-1 (29%) por parte dos monócitos, após 1 mês de terapêutica com o fenofibrato micronizado¹⁸³². Em 18 hipertrigliceridémicos sem doença cardiovascular, a terapêutica com 400 mg/dia de bezafibrato, durante 6 semanas, reduziu significativamente a produção do TNF- α e da IL6 pelo sangue total, *in vitro*, após estimulação pelo LPS¹⁸³³. Esta acção dos fibratos sobre a IL6 parece ter estado dependente do polimorfismo 174 G/C, dado que a presença do alelo C, se acompanhou de uma maior redução absoluta com o fenofibrato ($p=0,04$). Segundo os autores, este polimorfismo poderá explicar o diferente comportamento desta interleucina observado nos diversos estudos¹⁸³⁴. Num estudo já citado e realizado em 24 hipertrigliceridémicos, o bezafibrato na dose de 400 mg/dia, durante 4 semanas, apesar das alterações significativas a nível das lipoproteínas, não conseguiu qualquer efeito a nível da IL6 nem do MCP-1¹⁸³¹.

Vemos assim, que os nossos resultados não estão de acordo com a maioria dos estudos. Para além das explicações já dadas anteriormente, baseadas fundamentalmente na grande dispersão dos valores e no pequeno número de participantes, julgamos que o facto de a maioria dos estudos analisarem a produção celular da IL6 *in vitro*, enquanto o nosso estudo determinou a sua concentração no vivo, poderá ter contribuído para os diferentes resultados. De acordo com esta nossa explicação, está o último estudo citado em que, como no nosso, se analisou o comportamento da IL6 sérica e que também não encontrou alteração significativa nos seus níveis. Por outro lado, o próprio polimorfismo do 174 G/C poderá, tal como vimos, explicar alguns resultados menos concordantes.

IL8 - Relativamente à IL8, quer os seus níveis basais quer o seu comportamento com o fenofibrato, não foram os previsíveis, atendendo por um lado à relação que parece existir entre a IL8 e a doença aterosclerótica e por outro ao esperado efeito antiinflamatório do derivado do ácido fíbrico. Relativamente aos níveis basais, remetemos o leitor para as nossas explicações aquando da análise dos resultados do grupo D. Quanto ao comportamento

verificado com o fenofibrato, um aumento dos níveis, esteve aparentemente em desacordo com os resultados de um estudo realizado em células musculares lisas humanas. O tratamento destas células com o fenofibrato inibiu completamente o aumento da produção da IL8 induzido pelas LDL nativas¹⁸³⁵. Notamos que este estudo foi realizado *in vitro* e por isso não poderemos, com propriedade, comparar os seus resultados com os nossos. Não encontramos na literatura estudos que tenham analisado no homem, a resposta da IL8 sérica às doses habituais de um fibrato.

IL18 - A IL18, inicialmente em concentrações inferiores no grupo F, não manifestou qualquer evolução significativa com as diversas terapêuticas. Não encontramos na literatura referências a possíveis relações entre a terapêutica com fibratos e os níveis da IL18.

INFgama - O INFgama, inicialmente em níveis discretamente superiores no grupo F, não sofreu qualquer alteração significativa com o fenofibrato.

Em doentes com dislipidemia tipo IIb, analisaram-se os níveis do TNF- α , da IL1 e do INFgama, comparando-os com os de um grupo controlo. Os autores verificaram que os níveis destas interleucinas estavam significativamente mais elevados nos dislipidémicos - TNF α ($19,2 \pm 1,6$ versus $9,9 \pm 1,1$ pg/ml; $p < 0,01$) e INFgama ($44,4 \pm 5,3$ versus $19,4 \pm 2,1$ pg/ml; $p < 0,01$). Após 1 mês de terapêutica com o fenofibrato micronizado, verificaram-se reduções significativas na concentração do TNF α ($9,2 \pm 1,0$ pg/ml; $p < 0,01$) e do INFgama ($24,8 \pm 2,9$ pg/ml; $p < 0,01$). Esta redução correlacionou-se com as reduções do CT, do CLDL e dos triglicérides¹⁸³⁶.

A evolução apresentada pelo nosso grupo F não esteve de acordo com o resultado do estudo anterior. Atendendo aos efeitos antiinflamatórios associados aos fibratos, seria de esperar uma redução nos níveis do INF-gama, o que não se verificou. O facto dos níveis apresentados pelos nossos dislipidémicos serem inferiores aos do referido estudo ($23,70$ versus $44,4$ pg/ml), poderá ser uma das explicações para este diferente resultado.

VEGF - Os mesmos comentários se aplicam ao comportamento do VEGF, também em concentrações iniciais não significativamente superiores nos dislipidémicos, não tendo manifestado qualquer tendência para uma redução com o fenofibrato.

Num trabalho realizado no ratinho, o fenofibrato suprimiu o crescimento tumoral, através da redução da produção do VEGF e da inibição da angiogénese¹⁸³⁷. Em 20 dislipidémicos e sem doença vascular, a terapêutica, durante 3 meses, com o fenofibrato, reduziu os níveis séricos do VEGF ($p < 0,05$), sem alterar significativamente os níveis do seu receptor Flt-1¹⁸³⁸

Os resultados que obtivemos foram parcialmente contrários aos destes estudos, com o VEGF a apresentar um aumento não significativo dos seus níveis, após terapêutica com o fenofibrato. Foram no entanto trabalhos diferentes do nosso, o primeiro por ser no animal e o segundo por se tratar de indivíduos sem doença vascular, contrariamente aos nossos, com alterações no estudo doppler e pela sua duração, nitidamente inferior.

Populações celulares - As células CD4+ e CD8+ encontravam-se inicialmente em percentagem inferior no grupo F. Ao longo do estudo, as primeiras viram os seus níveis aumentarem de uma forma não significativa, primeiro com as vitaminas E e C e depois com o fenofibrato, sempre sem significado, enquanto que as segundas se mantiveram inalteradas. Não encontramos na literatura estudos que analisassem o comportamento destas células frente aos fibratos.

Relativamente às diversas células CD26, CD26+ e CD26CD3+, envolvidas no processo da adesão celular, encontravam-se também numa percentagem inferior no grupo F, sofrendo aumentos ligeiros, sem significado, com as vitaminas e com o fibrato.

Não encontramos qualquer estudo que tenha abordado especificamente o efeito dos fibratos sobre este tipo de células. Assim, como esta molécula CD26 é um marcador da adesão celular, optámos, tal como fizemos em capítulo anterior, por analisar alguns trabalhos que avaliaram os fibratos a este nível. Num estudo realizado em 20 dislipidémicos tipo IIa ou IIb, avaliaram-se os efeitos de um mês de terapêutica com a sinvastatina ou com o fenofibrato, na concentração do MCP-1 e do ICAM-1. Os níveis da ICAM-1 e do MCP-1 estavam significativamente mais elevados nos dislipidémicos, relativamente aos controlos e foram ambos significativamente reduzidos pelo fenofibrato, respectivamente em 17 e em 12,5%¹⁸³⁹. Resultados semelhantes foram obtidos noutra grupo de 29 indivíduos, com dislipidemia mista, em que o ciprofibrato reduziu significativamente os níveis séricos da ICAM-1¹⁸⁴⁰. Também em 22 indivíduos

com doenças do tecido conjuntivo e dislipidemia secundária à corticoterapia, o bezafibrato, para além de reduzir os níveis dos marcadores da activação plaquetar (CD62p plaquetar: $15,11 \pm 2,03$ versus $10,38 \pm 8,53\%$; $p < 0,05$ e CD63p plaquetar: $12,12 \pm 9,17$ versus $9,90 \pm 7,20\%$; $p < 0,05$) reduziu também a concentração da VCAM-1 (724 ± 191 versus 666 ± 157 ng/ml; $p < 0,01$)¹⁸⁴¹.

Torna-se difícil comparar os nossos resultados com os dos trabalhos referidos. Na realidade, no nosso estudo determinámos a concentração de marcadores celulares que, embora relacionados com o fenómeno da adesão, têm igualmente outras funções, como por exemplo a coestimulação das células T. Por outro lado, nos estudos referidos, foram analisados outros tipos de moléculas pelo que a comparação entre os seus resultados e o nosso poderá ser abusiva. Aparentemente no nosso estudo e neste sub-grupo de dislipidémicos, os marcadores da adesão celular estavam em menores concentrações basais do que nos normolipidémicos e assistiu-se a um aumento não significativo da sua concentração com o fenofibrato o que, com as limitações já referidas, esteve em desacordo com a literatura consultada.

Relativamente à actividade *dipeptidyl peptidase*, não encontramos na nossa consulta bibliográfica, qualquer referência a uma possível acção dos fibratos. Apenas como curiosidade e julgando não se poder tirar qualquer conclusão, atendendo ao reduzido tamanho da amostra, o aumento não significativo das células CD26+, após terapêutica com o fenofibrato, acompanhou-se de uma aumento significativo na concentração da glicose, de 99,30 para 112,40 mg/dl ($p = 0,025$).

As células positivas para o CD25, CD25+, CD25CD3+ e CD25CD26CD3+, envolvidas na activação celular, encontravam-se igualmente em percentagens inferiores nos dislipidémicos, as últimas significativamente e mostraram uma tendência para a redução não significativa da sua concentração, após terapêutica com o fibrato.

Mais uma vez, a nossa pesquisa bibliográfica sobre as possíveis relações entre a terapêutica com os derivados do ácido fíbrico e estes marcadores celulares, foi infrutífera. Para podermos interpretar estes nossos resultados à luz de outros estudos, tivemos de nos socorrer de alguns trabalhos que, embora não analisando especificamente o comportamento destas moléculas CD25, relativamente à terapêutica com os fibratos, avaliaram a activação e a

diferenciação celular através de outros parâmetros. Como dissemos, o CD25 está envolvido na activação e proliferação celular, nomeadamente dos linfócitos T, pelo que julgamos que a nossa estratégia, à falta de melhor, terá sido aceitável.

Alguns dos estudos que encontrámos, foram realizados na encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo animal da esclerose múltipla. Num deles, avaliaram-se os efeitos da terapêutica com o fenofibrato na secreção das interleucinas da família da IL-12 (IL12, IL23 e IL27) que, como se sabe, estão envolvidas na activação e na diferenciação das células T, importantíssimas na modulação da esclerose múltipla e da EAE. Nesse estudo, o fenofibrato inibiu a secreção das referidas citocinas pela micróglia estimulada pelo LPS¹⁸⁴². Num outro estudo, o genfibrozil, o ciprofibrato e o fenofibrato estimularam a produção da IL4, inibiram a proliferação dos linfócitos T, específicos da proteína básica da mielina e induziram uma melhoria dos sinais clínicos da EAE¹⁸⁴³.

Tal como para as populações celulares anteriores, os parâmetros utilizados nestes estudos para avaliação da activação celular foram diferentes dos nossos. Enquanto que nesses estudos, se avaliaram essencialmente citocinas relacionadas com a activação e a proliferação celular, no nosso, determinaram-se os níveis dos CD25, CD26 e CD3, que, para além da activação celular, estão envolvidos noutras acções como na adesão e na transdução de sinal pelo TCR. Assim, mais uma vez se torna difícil a comparação entre os diferentes trabalhos e o nosso. No entanto, em termos de activação celular e não esquecendo as limitações referidas, julgamos que os nossos resultados estarão, pelo menos parcialmente, de acordo com os dos referidos estudos, verificando-se uma tendência, embora não significativa, para a redução dos marcadores relacionados com esta acção.

Relativamente às células envolvidas na apresentação antigénica, como as HLADR+, as HLADRCD4+, as HLADRCD8h+, as HLADRCD8+ e as HLADRCD8low+, encontravam-se inicialmente em percentagens superiores no grupo F (as HLADRCD8+, significativamente), mostrando uma tendência para aumentar com a terapêutica antioxidante e para uma redução dos seus níveis com o fenofibrato (as HLADRCD4+ reduziram significativamente).

Não encontrámos, na pesquisa bibliográfica realizada, qualquer referência a trabalhos sobre potenciais efeitos dos fibratos nas células HLADR+, ou na

apresentação antigénica. Não pudemos assim comparar os nossos resultados com os de outros estudos. Verificámos no entanto, um efeito semelhante ao obtido com as estatinas no sub-grupo E. Desconhecemos se este paralelismo de resposta aos dois tipos de fármacos, estatinas e fibratos, se deveu a uma eventual acção pleiotrópica comum, ou aos efeitos a nível das lipoproteínas. Julgamos que, não se podendo excluir esta segunda hipótese, ela não é muito provável, atendendo por um lado aos diferentes perfis lipídicos dos grupos E e F e por outro, aos efeitos dos próprios fármacos a nível das várias lipoproteínas. Um efeito comum às estatinas e ao fenofibrato, nos dois sub-grupos do nosso estudo, foi a redução na concentração das OxLDL. Atendendo a que estas lipoproteínas oxidadas constituem um dos principais antigénios activadores da cascata imunológica, incluindo a quimiotaxia, a adesão e a activação das células mononucleares, poderemos especular, dizendo que a sua redução poderá ter contribuído para a inibição, entre outras acções, da apresentação antigénica e da activação celular.

As células envolvidas na apoptose, as CD95+ e CD95CD95L+, encontravam-se inicialmente em percentagens não significativamente superiores nos dislipidémicos e tiveram um comportamento semelhante após terapêutica com o fenofibrato, com uma tendência não significativa para a redução.

Tal como verificado anteriormente com as estatinas, também com o fenofibrato parece esboçar-se uma tendência para induzir uma redução dos níveis das células CD95+ e CD95CD95L+ e conseqüentemente, dos fenómenos apoptóticos a que estão ligadas estes tipos celulares.

Os nossos resultados estiveram aparentemente de acordo com alguma da pouca bibliografia que encontrámos sobre os efeitos dos fibratos a nível da apoptose. Num estudo realizado em ratos NFkB p50 -/- e em ratos normais, o tratamento com ciprofibrato (0,01% da dieta durante 10 dias) induziu a nível hepático, uma redução dos índices apoptóticos¹⁸⁴⁴. Também em ratos a quem se induziu um quadro colestático cirúrgico, a administração do fenofibrato reduziu a apoptose a nível dos canalículos biliares ($p < 0,01$)¹⁸⁴⁵. Outros estudos obtiveram resultados diferentes, demonstrando uma aparente indução da apoptose por parte dos fibratos. Baseados em alguns trabalhos que mostraram uma potencial acção anti-neoplásica por parte dos activadores dos PPAR- α , os autores de um trabalho realizado no rato, demonstraram que o ácido clofíbrico inibiu

significativamente o crescimento do cancro do ovário, prolongando a sobrevida¹⁸⁴⁶. Os autores concluíram que o fármaco tinha demonstrado efeitos anti-tumorais, resultantes da redução da angiogénese (redução do VEGF) e da indução da apoptose. Num outro estudo realizado no porco, o clofibrato estimulou significativamente a apoptose a nível hepático¹⁸⁴⁷.

Por último as células CD69+ e CD69CD3+, envolvidas entre outros processos na activação celular, para além de se encontrarem inicialmente em menor concentração no grupo F, as segundas significativamente, apresentaram uma inesperada tendência para um aumento das suas concentrações com o fenofibrato, mais uma vez com significado nas CD69CD3+.

O CD69 está envolvido, como vimos, na activação precoce dos linfócitos, dos monócitos e das plaquetas e promove a lise celular pelas células NK. Neste grupo F, o comportamento destas células diferiu do verificado nos grupos D e E. Nestes dois últimos grupos, as células CD69+ apresentaram um discreto aumento com as vitaminas antioxidantes e uma posterior redução com a terapêutica hipolipemiante. No grupo F, existiu uma muito discreta redução com as vitaminas E e C e um posterior e igualmente discreto aumento com o fenofibrato. Comparando com os outros marcadores associados à activação celular, como o CD25, em que as células positivas apresentaram uma tendência para uma redução das suas percentagens com o fenofibrato, verificou-se um comportamento diferente das CD69+, ao verem aumentada a sua concentração com o referido hipolipemiante. Não sabemos se este diferente comportamento tem algum significado, traduzindo nomeadamente uma diferente acção das estatinas e do fenofibrato, sobre este tipo celular, se estas diferenças têm alguma relação com as diferentes dislipidemias associadas ou se, pura e simplesmente, não se podem valorizar, atendendo mais uma vez ao reduzido número de participantes. Pensamos que, perante a resposta tendencialmente sobreponível apresentada por todas as populações celulares às estatinas e ao fenofibrato, não seria de esperar uma diferença apenas num tipo de células, tanto mais que tal não se verificou noutras também relacionadas com a activação celular.

21 - Comentários finais e conclusões

Ao chegar a esta fase final do nosso trabalho, gostaríamos de chamar a atenção para algumas das suas limitações:

Desde logo o pequeno número de participantes, o que dificultou a interpretação de alguns dos resultados e terá justificado muito provavelmente alguns outros menos esperados.

A dispersão de valores de algumas das variáveis que, associado ao pequeno tamanho da amostra impossibilitou uma análise correcta. Se esta dispersão foi secundária a patologia sub-clínica desconhecida, nomeadamente inflamatória ou imunológica, a problemas da colheita, da preparação, do transporte ou do congelamento das amostras, ou a quaisquer outros factores, não nos foi possível esclarecer. Reconhecemos que a dispersão verificada no nosso estudo, teria um impacto muito menor numa população mais numerosa.

Relativamente à utilização, em alguns dos participantes, do ácido acetilsalicílico em doses antiagregantes, teoricamente sem actividade anti-inflamatória, não nos é possível garantir em absoluto uma ausência de efeitos a nível de determinadas moléculas testadas. Seria interessante comparar os indivíduos medicados com este fármaco com os restantes, mas mais uma vez optámos por não o fazer pelas razões já expostas.

A determinação de alguns parâmetros menos comuns neste tipo de trabalhos, como foi o caso das populações linfocitárias, para as quais não conseguimos encontrar estudos que permitissem qualquer tipo de comparação.

Algumas das nossas questões iniciais ficaram sem resposta:

Não conseguimos, uma vez mais provavelmente pelo pequeno número de participantes e também pela duração do estudo e falta de padronização da metodologia de avaliação das lesões carotídeas, detectar qualquer evolução ocorrida a nível das lesões destes vasos. Com efeito, na esmagadora maioria dos doentes as lesões mantiveram-se inalteradas ao longo dos três anos, o que, em termos clínicos e de história da doença, constitui um resultado positivo. Seria necessário um maior número de participantes e/ou eventualmente prolongar o estudo no tempo para tirar qualquer outra conclusão.

Também optámos por não incluir a análise de uma possível relação entre o consumo de álcool e os fenómenos oxidativos e/ou inflamatórios. Sendo nossa

convicção que essa relação existe, julgámos não ter condições para aceitar como válida qualquer relação estatística, eventualmente encontrada, nem possibilidade de testar a sua correlação clínica.

A utilização das vitaminas antioxidantes associada à terapêutica hipolipemiante em metade dos participantes, com o objectivo de comparar diferentes evoluções clínicas e laboratoriais, no final do estudo, deparou com o problema do pequeno número da amostra e não foi igualmente analisada.

Seria também interessante correlacionar o comportamento de algumas variáveis relacionadas com os fenómenos inflamatórios e oxidativos, como a hsPCR e as OxLDL, com o comportamento manifestado pelas diversas lipoproteínas. Era nossa intenção esclarecer se a evolução das primeiras teria estado unicamente na dependência das alterações lipídicas induzidas pelos diversos fármacos, ou se eram independentes destas. Mais uma vez optámos por não realizar essa análise, pelos motivos já expostos.

A possível correlação entre os fenómenos oxidativos e os inflamatórios, que julgamos existir e que constituía, igualmente, um dos nossos objectivos, não foi também analisada, mais uma vez pela pequena dimensão da amostra. Ao longo do estudo fizemos algumas referências a eventuais relações existentes entre a inflamação e a oxidação mas sempre como hipóteses, sem qualquer pretensão de certeza.

Apesar de todas estas limitações o trabalho que agora concluímos e que só foi possível graças à boa-vontade dos diversos colaboradores, deu-nos um grande prazer na sua realização e julgamos permitir-nos fazer alguns comentários à laia de conclusão.

21.1 - A resposta das diversas lipo e apoproteínas aos hipolipemiantes utilizados, não sendo como várias vezes referimos um dos principais objectivos do nosso estudo, foi perfeitamente previsível e compatível com os efeitos conhecidos dos fármacos empregues. O grande mérito da análise das variáveis lipídicas, ao debruçar-se sobre comportamentos perfeitamente conhecidos e testados, foi verificar que, apesar da pequena dimensão da amostra, ela teve um comportamento previsível e uniforme, servindo para conferir alguma credibilidade aos resultados obtidos noutras variáveis menos estudadas.

21.2 – Contrariamente às nossas expectativas, a concentração média das OxLDL no nosso grupo C foi superior à média indicada pela Mercodia

(laboratório responsável pelo Kit de determinação). Este laboratório encontrou valores médios de 61 UI/L, com uma variação de 26 a 117 UI/L (população sueca), enquanto que o valor médio da nossa população controlo foi de 73,19 UI/L, embora numa gama mais estreita (61,10 a 85,29) UI/L. Estes valores foram significativamente superiores nos nossos dislipidémicos, traduzindo a sua associação com os factores de risco cardiovascular e/ou com a aterosclerose sub-clínica. A esperança de que uma eventual dieta mediterrânica conferisse aos nossos controlos menores níveis de OxLDL foi assim frustrada. Não podemos no entanto esquecer que a população sueca, que serviu de padrão para o laboratório responsável pelo Kit, terá muito provavelmente um tipo de dieta igualmente protectora contra os fenómenos peroxidativos. Seria assim necessário, comparar os nossos normolipidémicos com uma população que apresentasse hábitos dietéticos tipicamente menos saudáveis.

21.3 – Em indivíduos dislipidémicos, a Vit E deverá ser correlacionada com as diversas lipoproteínas ou, se possível, calculado o conteúdo destas em α -tocoferol. A determinação, nesses indivíduos, da concentração sérica total da vitamina, dará valores muito elevados e muito provavelmente não significando uma actividade antioxidante igualmente exacerbada. Como molécula lipossolúvel, o α -tocoferol encontra-se essencialmente nas membranas celulares e nas lipoproteínas, protegendo-as da oxidação. Assim, será mais relevante a sua relação com as lipoproteínas do que propriamente os seus níveis séricos. Chamamos a atenção para a redução verificada na concentração das OxLDL, quer com as estatinas, quer com os fibratos, apesar da redução concomitante da Vit E sérica, justificada em parte por apenas metade dos participantes estarem simultaneamente medicados com um hipolipemiante e o complexo vitamínico. Embora outras moléculas antioxidantes possam ter contribuído para esta evolução (redução das OxLDL), a redução dos níveis séricos da Vit E, não traduziu, como vimos, igual comportamento da sua relação com as lipoproteínas. Sugerimos assim que, quando se analisa o comportamento da vitamina E durante a terapêutica hipolipemiante, se utilize a razão mMolar Vit E/TG+LDL ou Vit E/LDL, nas hipercolesterolemias sob terapêutica com as estatinas e a razão mMolar Vit E/TG, nas hipertrigliceridemias, medicadas com fibratos.

21.4 – A administração da associação das Vit(s) E e C acompanhou-se de um aumento significativo nos níveis séricos do α -tocoferol e talvez mais

importante, da sua relação mMolar com as diversas lipoproteínas. A esta evolução da vitamina E, associou-se uma redução significativa dos níveis das OxLDL e um aumento, igualmente significativo do TRAP. Assim a utilização da Vit E, na dose de 400 UI, associada à vitamina C e a outros antioxidantes (ver composição em materiais e métodos), foi eficaz não só no aumento dos níveis do α -tocoferol mas, mais importante, na redução das LDL oxidadas.

21.5 – A PCR foi a proteína inflamatória com o comportamento mais previsível e de acordo com a literatura. Um pouco inesperadamente, encontrava-se na avaliação basal em níveis elevados, quer nos dislipidémicos quer nos controlos (> 2 mg/L), colocando-os num risco intermédio para a doença vascular. Julgamos que o IMC superior a 25 nos dois grupos de participantes poderá ter contribuído para estes valores elevados da PCR. Atendendo à relação existente entre os marcadores inflamatórios, particularmente a PCR, com a doença vascular cerebral isquémica e sendo esta a principal causa de morbi-mortalidade em Portugal, julgamos poder pensar que estes níveis elevados, mesmo nos indivíduos normolipidémicos, possa estar associada à elevada incidência do AVC isquémico no nosso país.

A PCR não sofreu qualquer alteração com as vitaminas E e C e viu os seus níveis serem significativamente reduzidos com as estatinas. A redução verificada com o fenofibrato, superior a 35%, não atingiu no entanto significado estatístico.

21.6 – O comportamento das interleucinas 6, 8, 18, do INFgama e do VEGF, não permitiu, como vimos, extrair qualquer conclusão

21.7 – Relativamente às diversas populações linfocitárias testadas, tivemos algumas (muitas) dificuldades em interpretar o seu comportamento. Por um lado, as diversas funções associadas aos vários tipos celulares, por vezes comuns a vários deles, tornam difícil identificar qual a função principal de cada tipo de célula. Por outro, a escassez ou mesmo a ausência de estudos relativamente à associação destes tipos celulares com a doença ou os factores de risco cardio-vasculares, dificultou a interpretação dos resultados obtidos. Optámos por analisar apenas as populações que, na primeira avaliação, apresentaram diferenças mais ou menos marcadas entre os participantes dislipidémicos e os controlos.

Decidimos agrupar, talvez um pouco arbitrariamente, as diversas células pelas suas funções principais e interpretar o seu comportamento em conjunto.

Os linfócitos CD4+, envolvidos no reconhecimento dos antígenos e na activação celular dependente do MHC classe II, apresentaram percentagens significativamente inferiores nos dislipidémicos, enquanto que os CD8+, que são activados e reconhecem os antígenos ligados ao MHC classe I, não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos.

Nenhum destes tipos celulares manifestou qualquer alteração significativa com a terapêutica vitamínica.

As estatinas induziram um aumento significativo das CD4+ e uma redução igualmente significativa das células CD8+. O resultado final foi o aumento da relação CD4+ / CD8+.

Supostamente, o predomínio da imunidade celular nos nossos dislipidémicos, no início do estudo, foi invertido após terapêutica com as estatinas, que induziram, aparentemente, um aumento da imunidade humoral. Se a imunidade celular for a principal responsável pelo desencadear/perpetuar da aterosclerose, este efeito das estatinas poderá ter sido eventualmente benéfico.

Os fibratos não tiveram qualquer efeito significativo na concentração destes tipos celulares.

As células relacionadas com a adesão celular, como as CD26+, encontravam-se em percentagens significativamente inferiores nos indivíduos com dislipidemia.

As vitaminas E e C não induziram qualquer alteração nos níveis destas células.

Por sua vez, as estatinas induziram um aumento significativo da sua percentagem. Apesar do efeito inibidor do CD26 sobre as incretinas, o aumento significativo deste marcador com as estatinas, não induziu qualquer aumento nos níveis da glucose.

Relativamente à terapêutica com o fenofibrato, houve uma discreta tendência para um aumento das CD26+, que se acompanhou de um aumento significativo da glicemia. Como é óbvio, não podemos afirmar uma relação causa-efeito entre o aumento do CD26 pelo fenofibrato e o da glucose.

Os tipos celulares envolvidos nos fenómenos da activação precoce, como as CD25CD3+, as CD25CD26+, as CD25CD26CD3+ e as CD69+ apresentaram igualmente percentagens mais baixas nos dislipidémicos. Não sabemos se a expressão destes marcadores celulares, inferior nos indivíduos do grupo D, relativamente aos normolipidémicos, poderá traduzir diferentes estádios da doença vascular, muito provavelmente mais precoce nos nossos controlos. Seria interessante conhecer o comportamento das células CD4CD25+ que, como se sabe, estão relacionadas com os fenómenos da tolerância imunológica. De realçar, no entanto, que os nossos participantes D apresentaram simultaneamente menores níveis de CD4 e de CD25. Podemos especular que esta redução paralela poderá traduzir menores níveis da população CD4CD25+ e uma menor tolerância imunológica nos nossos dislipidémicos.

Também nestas populações celulares não se verificou qualquer acção das vitaminas antioxidantes.

A terapêutica com as estatinas reduziu, quase sempre significativamente, as percentagens destas células envolvidas na activação celular precoce.

O fenofibrato não obteve qualquer alteração nas percentagens destes tipos celulares.

As células relacionadas com a apresentação do antigénio e com a activação celular tardia, como as HLADR+, as HLADRCD4+, as HLADRCD8h+ e as HLADRCD8low, encontravam-se em percentagens mais elevadas nos indivíduos dislipidémicos. Parece que estes indivíduos, com doença vascular sub-clínica, apresentaram uma exacerbação da função apresentadora de antigénio, assim como uma maior activação celular tardia do que os normolipidémicos. Este facto poderá traduzir diferentes estádios de evolução da aterosclerose nas duas populações.

Não houve qualquer efeito da terapêutica vitamínica nestas células.

As estatinas também não induziram qualquer alteração significativa nos seus níveis. Apenas nas HLADRCD8h se verificou uma redução significativa da sua percentagem com estes fármacos.

Com o fenofibrato, apenas as HLADRCD4+ apresentaram uma alteração significativa, com redução dos seus níveis.

Conhecendo-se a importância que o fenómeno da apresentação antigénica tem na fisiopatologia da aterosclerose, julgamos ter sido benéfica a

redução de alguns dos marcadores desta acção por parte das estatinas e dos fibratos.

Por último, as populações celulares envolvidas na apoptose, como as CD95+ e as CD95CD95L+, apresentaram concentrações mais elevadas nos participantes dislipidémicos.

A associação vitamínica utilizada não induziu qualquer alteração significativa nestas células relacionadas com a apoptose.

As estatinas, não tendo obtido efeitos significativos nos níveis destas células, apresentaram no entanto uma discreta tendência para a sua redução, o que poderá indiciar uma actividade supressora da apoptose por parte destes fármacos.

A terapêutica com o fenofibrato, à semelhança das outras, não obteve qualquer efeito na concentração destes tipos celulares.

Tendo sempre em mente as limitações já referidas, poderemos concluir, da análise do nosso estudo que:

1 - O complexo vitamínico utilizado e cuja composição se encontra descrita em capítulo próprio induziu aumentos significativos na concentração sérica da vitamina E e das razões mMolar, quer com os triglicéridos, quer com o somatório dos triglicéridos com o LDL. Mais importante, foi capaz de aumentar significativamente o TRAP e de reduzir, também significativamente, a concentração das OxLDL. Julgamos que esta associação antioxidante, poderá ter um efeito protector na doença vascular, ao reduzir os níveis séricos de um dos principais desencadeadores dos fenómenos iniciais da aterosclerose, as LDL oxidadas.

2 – Quer as estatinas quer o fenofibrato, induziram reduções significativas na concentração das OxLDL.

3 – A PCR encontrava-se elevada em todos os nossos participantes, dislipidémicos com doença vascular sub-clínica e nos normolipidémicos, tendo sido significativamente reduzida pelas estatinas. Atendendo à associação existente entre esta proteína de fase aguda e a doença cardio-cerebrovascular, julgamos que, também através desta acção antiinflamatória, as estatinas têm uma importante acção na prevenção deste tipo de patologia. O fenofibrato induziu também uma redução nos níveis da PCR, embora sem atingir significado.

4 – Verificámos um predomínio da imunidade celular nos nossos dislipidémicos, tendo a relação CD4+/CD8+ sido aumentada pelas estatinas. Se a imunidade celular for a principal responsável pelo desencadear e manutenção da aterosclerose, estes hipolipemiantes terão tido uma acção protectora.

5 – Os nossos dislipidémicos poderão ter apresentado menores índices de activação celular precoce, traduzida por reduzidos níveis das diversas células CD25 e CD69, em provável relação com a evolução da aterosclerose sub-clínica. As estatinas induziram reduções mais ou menos significativas neste parâmetro

6 – Relativamente à apresentação antigénica e à activação celular tardia, mais elevadas na população com dislipidemia e doença vascular sub-clínica, quer as estatinas quer o fenofibrato conseguiram reduções de alguns dos seus marcadores.

6 – Os fenómenos da apoptose, aparentemente também mais intensos nos participantes D, apresentaram uma tendência para uma redução não significativa com as estatinas, acção esta que julgamos benéfica atendendo à relação existente entre a apoptose e a aterosclerose.

Assim, quer o complexo vitamínico, quer os hipolipemiantes, foram eficazes na redução da concentração das LDLoxidadas. Relativamente aos fenómenos inflamatórios e imunológicos, as estatinas foram os fármacos que apresentaram maior capacidade de os alterar. Resta saber se as alterações verificadas ou indiciadas por estes fármacos serão sempre no sentido de uma protecção da saúde vascular.

Para terminar, julgamos que este nosso trabalho, com as suas limitações evidentes, terá sido pioneiro em alguns aspectos, nomeadamente no estudo alargado das populações linfocitárias e gostaríamos que pudesse servir como indutor da realização de outros, com melhor metodologia e amostras populacionais mais representativas, afim de confirmar ou negar algumas das suas conclusões ou sugestões

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Halliwell B, Gutteridge J. "What is a free radical?". Free radicals in biology and medicine; Clarendon Press – Oxford-1985
- 2 Manso C. "Formas activas de oxigênio". Arquivos Portugueses das Ciências Biológicas, 1988;tomo23;9-16
- 3 Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999; 93: 1464–1476.
- 4 Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000; 86: 494–501
- 5 Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase mox1. *Nature*. 1999; 401: 79–82
- 6 Lassège B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001; 88: 888–894.
- 7 Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers QIV, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997; 80: 45–71
- 8 Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NADPHoxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res*. 2000;86:494-501
- 9 Suh A, Arnold S, Lassegue B. Cell transformation by superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999;401:79-82
- 10 Griendling K, Sorescu D, Lassegue B. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology . *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2000;20:2175-2183
- 11 Steinbrecher P, Pritchard H. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet activating factor acetylhydrolase. *J lipid Res*,1989;30:305-315
- 12 Plate H, Breier G, Weich A, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potent tumour angiogenic factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 1992;359:845-848
- 13 Brown F, Yeo T, Berse B, Yeo K. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Esp. Med.*,1992;176:1375-1379
- 14 Aiello P, Avery L, Arring G, Keyt A. Vascular endothelial growth factor in ocular fluids of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.*,1994;331:1480-1487
- 15 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *FASEB J.*,1999;13:9-22
- 16 Kuzuya M, Ramos M, Kanda S,Koike T. VEGF protects against oxidized LDL toxicity to endothelial cells by na intracellular glutathione-dependent mechanism through the KDR receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:765
- 17 Dillard J, Litov RE, Savin WM. Effects of exercise, vitamin E and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978;45(6):927-32
- 18 Silva, J M. "Dismetabolismo Lipidico e Aterosclerose". Dissertação de Doutorado, edição do autor, Coimbra 1997
- 19 Chisolm G, Steinberg D."The oxidative modificatio hypothesis of atherogenesis:na overview"Free Radical Biology and Medicine,2000;28:1815-1826
- 20 Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991;88:1785-1792.
- 21 Parthasarathy S. *Modified Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Austin, Tex: RG Landes Co; 1994:91-119.
- 22 Parthasarathy S. Mechanism(s) of cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. In: Nohl H, Esterbauer H, Rice Evans C, eds. *Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology*. London, England: Richelieu Press; 1994:163-179.
- 23 Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1994;344:793-795.
- 24 Brown MS, Goldstein JL. Scavenging for receptors. *Nature*. 1990;343:508-509.
- 25 Freeman M, Ashkenas J, Rees DJ, Kingsley DM, Copeland NG, Jenkins NA, Krieger M. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:8810-8814.
- 26 Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1989; 264:2599-2604.
- 27 Hessler R, Robertson L, Chisolm M. LDL induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis*, 1979; 32:213-229

-
- 28 Hessler R, Morel W, Lewis J, Chisolm M. Lipoprotein oxidation and lipoprotein induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis*, 1983;3:215-222
- 29 Morel W, Hessler R, Chisolm M. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res.*, 1983;24:1070-1076
- 30 Morel W, DiCorleto E, Chisolm M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*, 1984;4:357-364
- 31 Chisolm G, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000;28:1815-1826
- 32 Steinberg D. Oxidized low density lipoprotein-an extreme example of lipoprotein heterogeneity. *Isr.J. Med. Sci.*, 1996;32:469-472
- 33 Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld E, Parthasarathy S. Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.*, 1989;84:1086-1095
- 34 Palinski W, Rosenfeld E, Yla-Herttuala S, Gurtner C. LDL undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989;86:1372-1376
- 35 Watson D, Subbanagounder G, Welsbie S, Faull F. Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1999;274:24787-24798
- 36 Hodis N, Krams M, Avogaro P, Bittolo-Bon G. Biochemical and cytotoxic Characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein(LDL). *J. Lipid Res.* ,1994;35:669-677
- 37 Sevanian A, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hodis H. LDL is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J. Lipid Res.* ,1997;38:419-428
- 38 Horkko S, Binder J, Shaw X, Chang M. Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000;28:1771-1779
- 39 Podrez E, Abu-Soud M, Hazen L. Myeloperoxidase generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* ,2000;28:1717-1725.
- 40 Meagher A, FitzGerald A. Inducers of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* ,2000;28:1745-1750
- 41 Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;28:1685-1696
- 42 Subbanagounder G, Watson D, Berliner A. Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities. *Free Radic. Biol. Med.* ,2000;28:1751-1761
- 43 Marathe K, Harrison A, Murphy C, Prescott M. Bioactive phospholipid oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.*,2000;28:1762-1770
- 44 Chisolm M, Chai C. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.*,2000;28:1697-1707
- 45 Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified LDL induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5134-5138.
- 46 Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature.* 1990;344:254-257.
- 47 Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991;88:2039-2046.
- 48 Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. M-CSF gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1992;140:301-316.
- 49 Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:5252-5256.
- 50 Hodis H, Hashimoto S, Mack W, Sevanian A. Probucol reduces oxysterol formation in hypertensive rabbits. *Hypertension*, 2000;36:436-441
- 51 Fox L, Chisolm M, DiCorleto P. "Lipoprotein-mediated inhibition of endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein depends on free radical lipid peroxidation". *J. Biol. Chem.*, 1987;262:6046-6054
- 52 Brown A, Jessup W. "Oxysterols and atherosclerosis". *Atherosclerosis*, 1999;142:1-28
- 53 Geng J, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with IL-1 Beta-converting enzyme. *Am. J. Pathol.*, 1995;147:251-266

-
- 54 Isner M, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and reestenosis. *Circulation*,1995;91:2703-2711
- 55 Chisolm M, Ma G, Irwin C, Martin L. 7 beta-hydroperoxycholest-5-en-3 beta ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1994;91:11452-11456
- 56 Brown J, Leong L, Dean T, Jessup W. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized LDL and human atherosclerotic plaque. *J. Lipid. Res.* ,1997;38:1730-1745
- 57 Morel W, Chisolm M. Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J. Lipid Res.* ,1989;30:1827-1834
- 58 Rangaswamy S, Penn S, Saidel M, Chisolm M. Exogenous oxidized LDL injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo. *Circ. Res.* ,1997;80:37-40
- 59 Rong X, Rangaswamy S, Shen L, Dave R. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1998;18:1885-1894
- 60 Kugiyam K, Kerns S, Morriset J, Roberts R. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature*,1990;344:160-162
- 61 Rocchi E, Bursi F, Ventura P, Ronzoni A. Anti- and pro-oxidant factors and endothelial dysfunction in chronic cigarette smokers with coronary heart disease. *European Journal of Internal Medicine*, 2007;18:314-320
- 62 Steinberg D, Lewis A. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*,1997;95:1062-1071
- 63 The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. Chisolm G, Steinberg D. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000;28:1815-1826
- 64 Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes*, 1996;19:257-267
- 65 Baynes J. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*,1991;40:405-412
- 66 Baumgartner-Parzer S, Wagner L, Pettermann M, Grillari J. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes*, 1995;44:1323-1327
- 67 Ho Feng, Liu S, Liao C, Huang P. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH2-terminal kinase and caspase-3. *Circulation*,2000;101:2618
- 68 Zanetti M, Zwacka R, Engelhardt J, Katusic Z. Superoxide anions and endothelial cell proliferation in normoglycemia and hyperglycemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:195
- 69 Gey F, Puska P, Jordan P, Moser K. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr*, 1991;53(1 suppl):326S-345
- 70 Verlangieri J, Kapeghian C, el-Dean S, Bush M. Fruit and vegetables consumption and cardiovascular mortality. *Med Hypotheses*, 1985;16:7-15
- 71 Riemersma A, Wood A, Macyntrye C, Elton A. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet*,1991;337:1-5
- 72 Luoma V, Nayha S, Sikkila K, Hassi J. High serum alpha-tocopherol, albumin, selenium and cholesterol, and low mortality from coronary heart disease in northern Finland. *J Intern Med*, 1995;237:49-54
- 73 Leppala M, Virtamo J, Fogelholm R, Huttunen k. Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler Thrombosis Vasc Biol*, 2000;20:230-235
- 74 Stephens N, Parsons A, Schofield P, Kelly F. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *The Lancet*, 1996;347:781-786
- 75 Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *The New England Journal of Medicine*, 2000;342:154-160
- 76 Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *The Lancet*, 1999;354:447-455
- 77 Wick G, Millonig G, Xu Q. The Autoimmune Pathogenesis of Atherosclerosis – An Evolutionary-Darwinian Concept. *Atherosclerosis and Autoimmunity*,2001;5-16
- 78 Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*,1992;13:341-390
- 79 Rice –Evans C, Bruckdorfer R. Free radicals , lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Molecular aspects of medicine*, 1992;13:1-111
- 80 Parthasarathy S, Khoo C, Miller E, Barnett J. LDL rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1990;87:3894-3898

-
- 81 Palinski W, Rosenfeld M, Yla-Herttuala R, Gurtner G. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*,1989;86:1372-1376
- 82 Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*,1989;86:1046-1050
- 83 Folcik VA, Cathcart MK. Predominance of esterified hydroperoxy-linoleic acid in human monocyte-oxidized LDL. *Journal of Lipid Research*,1994;35:1570-1582
- 84 Soberman J, Harper W, Betteridge D, Lewis A. Characterization and separation of arachidonic acid 5-lipoxygenase and linoleic acid 6-lipoxygenase (arachidonic acid 15-lipoxygenase) of human polymorphonuclear leukocytes. *J.Biol.Chem.*,1985;260:4508-4515
- 85 Engels F, Kessels C, Henricks A, Nijkamp P. Preferential formation of 13-hydroxylinoleic acid by human peripheral blood eosinophils. *Prostaglandins*,1996;52:117-124
- 86 Engels F, Kessels C, Schreurs J, Nijkamp P. Production of arachidonic acid and linoleic acid metabolites by human bronchoalveolar lavage cells. *Prostaglandins*,1991;42:441-450
- 87 Reddy N, Everhart A, Eling T, Glasgow W. Characterization of a 15-lipoxygenase in human breast carcinoma BT-20 cells: stimulation of 13-HODE formation by TGF/EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1997;231:111-116
- 88 Hui R, Everhart L, Glasgow C. Epidermal growth factor-stimulated production of esterified 13(S)-hydroxyoctadecadienoic acid is associated with tumor suppressor phenotype in Syrian hamster embryo fibroblasts. *J.Lipid Res.*,1997;38:49-60
- 89 Godessart N, Camacho M, Lopez-Belmonte J, Anton R. Prostaglandin H-synthase2 is the main enzyme involved in biosynthesis of octadecanoids from linoleic acid in human dermal fibroblasts stimulated with interleukin-1 beta. *J. Invest. Dermatol.*,1996;107:726-732
- 90 Fang X, Kaduce T, Spector A. 13-(S)-Hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) incorporation and conversion to novel products by endothelial cells. *Journal of Lipid Research*,1999;40:699-707
- 91 Augé N, Santanam N, Mori N, Keshava C. Uptake of 13-Hydroperoxylinoleic acid by cultured cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1999;19:925-931
- 92 Savenkova M, Mueller D, Heinecke J. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*,1994;269:20394-20400
- 93 Moore P, Darley-Usmar V, Morrow J, Roberts J. Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ.Res.*,1995;77:335-341
- 94 Cromheek K, Kockx M, De Meyer G, Bosmans J. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation / peroxidation in human atherosclerotic plaques. *Cardiovascular Research*,1999;43:744-754
- 95 Liu X, Miller S, Joshi S, Thomas D. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998;95:2175-2179
- 96 Beckman S, Koppenol H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*,1996;271:C1424-C1437
- 97 Arnal J, Tack I, Besombes J, Pipy B. Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. *The American Physiological Society*,1996
- 98 Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*,1999;1411:378-384
- 99 Patel P, McAndrew J, Sellak H, White R. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta*,1999;1411:383-400
- 100 Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and LDL oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys.*,1995;324:15-25
- 101 Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation: formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*,1994;269:26066-26075
- 102 Radi R. Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem Res Toxicol*,1996;9:828-835
- 103 Bloodsworth A, O'Donnell V, Freeman B. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2000;20:1707-1715
- 104 Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai, Masuko. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease, 2000;86:494-501
- 105 Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Cir Res*, 1994;74:1141-1148

-
- 106 Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH Oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *The Journal of Clinical Investigation*, 1996;97:1916-1923
- 107 Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II induces p67 phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*, 1998;32:331-337
- 108 Jaimes EA, Galceran JM, Rajij L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int*, 1998;54:775-784
- 109 Bayraktutan U, Blayney L, Shah M. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H Oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000;20:1903-1911
- 110 Schultz D, Harrison D. Seeking the Source of Pathogenic Oxygen Radicals in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc*, 2000;20:1412-1413
- 111 Guzik T, West N, Black E, McDonald D. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*, 2000;102:1744-1747
- 112 Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y. Expression of NADP/NADPH Oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation*, 1999;100:1494-1498
- 113 Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K et al. Polymorphism of the NADH / NADPH Oxidase p22phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 1998;97:135-137
- 114 Cai H, Juarte N, Wilcken DE et al. NADH/NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism and coronary artery disease in Australian population. *Eur J Clin Invest*, 1999;29:744-748.
- 115 Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 2000;86:494-501
- 116 Whitehead A, FitzGerald G. Twenty-First Century Phox: Not Yet Ready for Widespread Screening. *Circulation*, 2001;103:7-9
- 117 Rosenblat M, Belinky P, Vaya J, Levy R et al. Macrophage Enrichment with the Isoflavan Glabridin inhibits NADPH Oxidase-induced Cell-mediated Oxidation of Low Density Lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274:13790-13799
- 118 Camejo G, Rosengren B, Olson U, Lopez F. Molecular basis of the association of arterial proteoglycans with low density lipoproteins: its effect on the structure of the lipoprotein particle. *Eur. Heart J. (Suppl. E)*, 1990;11:164-173
- 119 Camejo G, Hurt-Camejo E, Rosengren B, Wiklund O. Modification of copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein by proteoglycans and glycosaminoglycans. *J. Lipid Res.*, 1991;32:1983-1991
- 120 Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.*, 1992;12:569-583
- 121 Craig Y, Poulin E, Neveux M, Palomaky E. Anti-oxidized LDL antibodies and antiphospholipid antibodies in healthy subjects: relationship with lipoprotein and oxidation related analytes. *J. Autoimmun.*, 1995;8:713-726
- 122 Stocker R, Frei B. in *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants* (Sies, H Ed), 1991;213-243, Academic Press, London
- 123 Palinski W, M.E. Rosenfeld, S. Yla-Herttuala, G.C. Gurtner. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989;86: 1372-1376
- 124 Parums D V, Brown D L, Mitchinson M. Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis. *Arch. Pathol. Lab. Med*, 1990;114:383-387
- 125 Palinski W, Ord V, Breslow A, Steinberg D. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis: demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arteriosclerosis Thrombosis*, 1994;14:605-616
- 126 Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M. Crossreactivity between antibodies to oxidized low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 1993;341:923-925
- 127 Wu R, Huang Y, Elinder S, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1998;18:626-630
- 128 Itabe H, Yamamoto H, Suzuki M. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. *J Biol Chem*, 1996;271:33208-33217
- 129 Horkko S, Miller E, Dudl E. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. *J Clin Invest*, 1996;98:815-825

-
- 130 Chang K, Bergmark C, Laurila A. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999;96:6353-6358
- 131 Salonen T, Herttuala S, Butler R, Korpela H. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 1992;339:883-887
- 132 Maggi E, Finardi G, Poli M, Bollati P. Specificity of autoantibodies against oxidized LDL as an additional marker for atherosclerotic risk. *Coron. Artery Dis*, 1993;4:1119-1122
- 133 Virella G, Virella I, Leman R, Pryor M. Antioxidized low density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Intl. J. Clin. Res.*, 1993;23:95-101
- 134 Branch W, Mitchell M, Miller E, Palinski W. Pre-eclampsia and serum antibodies to oxidized low density lipoprotein. *Lancet*, 1994;343:645-646
- 135 Armstrong W, Wieland E, Diedrich F, Renner A. Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein in pre-eclampsia and coronary heart disease (letter). *Lancet*, 1994;343:1570
- 136 Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler. Thromb.*, 1994;14:1892-1899
- 137 Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch. Intern. Med.*, 1994;154:2605-2609
- 138 Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta F. Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes*, 1995;44:60-66
- 139 Bergmark C, Wu R, Faire U, Lefvert A. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*, 1995;15:441-445
- 140 Heitzer T, Herttuala S, Luoma J, Kurz S. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia: role of oxidized LDL. *Circulation*; 1996;93:1346-1353
- 141 Horkko S, Miller E, Dudi E, Reaven P. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. *J. Clin. Invest.*, 1996;98:815-825
- 142 Watson D, Leitinger N, Navad M. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem*, 1997;272:13597-13607
- 143 Palinski W, Horkko S, Miller E. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoproteins in human plasma. *J Clin Invest*, 1996;98:800-814
- 144 Kearney J. Immune recognition of OxLDL in atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000;105:1683-1685
- 145 Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher U. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. *J. Clin. Invest*, 1996;98:800-814
- 146 Meraviglia M, Maggi E, Bellomo G, Corsi M. Autoantibodies against oxidatively modified lipoproteins and progression of carotid endarterectomy. *Stroke*, 2002;33:1139-
- 147 Cherubini A, Mecocci P, Senin U. Autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins in older stroke patients. (Letter) *JAGS*, 1997;45:125
- 148 Puurunen M, Manttari, Manninen V, Tenkanen L. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Medicine*, 1994;154:2605-2609
- 149 Bui M, Sack M, Moutsatsos G, Lu D. Autoantibody titers to oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *American Heart Journal*, 1996;131:663-667
- 150 Schumacher M, Eber B, Tatzber F, Kaufmann P. Transient reduction of autoantibodies against oxidized LDL in patients with acute myocardial infarction. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995;18:1087-1091
- 151 Hulthe J, Bokemark L, Fagerberg B. Antibodies to oxidized LDL in relation to intima-media thickness in carotid and femoral arteries in 58-year-old subjectively clinically healthy men. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2001;21:101
- 152 Virella G, Virella I, Leman B, Pryor B. Anti-oxidized low density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res*, 1993;23:95
- 153 Hulthe J, Wikstrand J, Lidell A, Wendelhag I. Antibody titers against oxidized LDL are not elevated in patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1998;18:1203-1211
- 154 Van de Vijver L, Steyger R, Van Poppel G, Bóer J. Autoantibodies against MDA-LDL in subjects with severe and minor atherosclerosis and healthy population controls. *Atherosclerosis*, 1996;122:245-253

-
- 155 Uusitupa M, Niskanen L, Luoma J, Vilja P. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1996; 16:1236-1242
- 156 Jang Y, Lee J, Cho E, Chung N. Differences in body fat distribution and antioxidant status in Korean men with cardiovascular disease with or without diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001;73:68-74
- 157 Wu R, de Faire U, Lemme C, Witztum L. Autoantibodies to oxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. *Hypertension*,1999;33:53-59
- 158 Nilsson J, Calara F, Regnstrom J, Hultgardh-Nilsson A. Immunization with homologous oxidized low density lipoprotein reduces neointimal formation after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *J Am Cardiol* , 1997;30: 1886-1891
- 159 Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Calar F. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1996;16:1074-1079
- 160 Palinski W, Miller E, Witztum J. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1995;92:821-825
- 161 Horkko S, Bird D, Miller E, Itabe H. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins,1999;103:117-128
- 162 Shaw P, Horkko S, Tsimikas S, Chang M. Human-derived anti OxLDL autoantibodies blocks uptake of OxLDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001;21:1333-1339
- 163 Chang M, et al. monoclonal antibodies against oxidized low density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages:evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition.*Proc Natl.Acad.Sci*,1999;96:6353-6358.
- 164 Kantor B, Merrill E, Herzenberg A,Hilson L. Na unbiased analysis ofV(H)-D-J(H) sequences from B-1^a, B-1b, and conventional B cells. *J. Immunol.*,1997;158:1175-1186
- 165 Shaw P, Horkko S, Chang M, Curtiss L.Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity.*J. Clin. Invest.*,2000;105:1731-1740
- 166 Tsimikas S, Shortal B, Witztum J, Palinski W. In vivo uptake of radiolabeled MDA2, an oxidation-specific monoclonal antibody, provides an accurate measure of atherosclerotic lesions rich in oxidized LDL and is highly sensitive to their regression. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2000;20:689
- 167 Henriksen T, Mahoney E, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 1981;78:6499-6503
- 168 Steinbrecher U, Lougheed M, Kwan W, Dirks M. Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989;264:15216-15223
- 169 Brown M, Goldstein J. Lipoprotein metabolism in the macrophage:implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.*,1983;52:223-261
- 170 Terpstra V, Bird D, Steinberg D. Evidence that the lipid moiety of oxidized low density lipoprotein plays a role in its interaction with macrophage receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:1806-1811
- 171 Sambrano G, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by na oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995;92:1396-1400
- 172 Krieger M, Acton S, Askenas J, Pearson A. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. *J Biol Chem.*,1993;268:4569-4572
- 173 Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem*, 1995;230:408-415
- 174 Sambrano GR, Parthasarathy S, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*,1994;91:3265-3269
- 175 El-Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*,1996;382:716-719
- 176 Sparrow C, Parthasarathy S, Steinberg D.A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem.*, 1984;264:2599-2604

-
- 177 Krieger M, Herz J. Structure and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, 1994;63:601-637
- 178 Kodama T, Dóí T, Suzuki H, Takahashi K. Collagenous Macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipidol*, 1996 ;7 :287-291.
- 179 Dóí T, Higashino K, Kurihara Y, Wada Y. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem*, 1993;268:2126-2133
- 180 Matsumoto A, Naito M, Itakura H, Ikemoto S. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;9:133-9137
- 181 Naito M, Suzuki H, Mori T, Matsumoto A. Coexpression of type I and II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1992;141:591-599
- 182 Takeya M, Tomokiyo I, Jinnouchi K, Sakaguchi H. Macrophage scavenger receptors: structure, function, and tissue distribution. *Acta Histochem Cytochem*, 1999;32:47-51
- 183 Ogata H, Takeya M, Yoshimura T, Takagi K. The role of MCP-1 in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *J Pathol*, 1997;182:106-114
- 184 Kawasaki S, Lander B. Molecular biology of M-CSF. In: *Colony-Stimulating Factors, Molecular and Cellular Biology*, In: Dexter M, Garland M. New York-Basel, (Immunol Ser), 1990;49:155-176
- 185 Nicholson C, Frieda S, Pearce A, Silverstein L. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines: evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arteriosclerosis, thrombosis and Vascular Biology*, 1995;15:269-275
- 186 Huh HY, Pearce SF, Yesner M, Shindler L. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation. Potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*, 1996;87:2020-2028
- 187 Han J, Hajjar P, Febbraio M, Nicholson C. Native and modified LDL increase in functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 1997;272:21654-21659
- 188 Huh Y, Pearce A, Yesner L, Silverstein L. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: Potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*, 1996;87:2020-2028
- 189 Yesner L, Huh H, Pearce A, Silverstein R. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterio and Thromb*, 1996;16:1019-1025
- 190 Han J, Hajjar P, Febbraio M, Nicholson C. Native and modified LDL increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem*, 1997;272:21654-21659.
- 191 Han J, Hajjar P, Tauras M, Nicholson C. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J Lipid Res*, 1999;40:830-838
- 192 Tontonoz P, Nagy L, Alvarez J, Thomazy V. PPAR promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of OxLDL. *Cell*, 1998;93:241-252
- 193 Nagy L, Tontonoz P, Alvarez J, Chen H. OxLDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR. *Cell*, 1998;93:229-240
- 194 Tontonoz P, Hu E, Spiegelman B. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by PPAR gamma. *Curr Opin Genet Dev*, 1995;5:571-576
- 195 Yesner L, Huh H, Pearce A, Silverstein R. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterio and Thromb*, 1996;16:1019-1025
- 196 Nakagawa T, Nozaki S, Nishida M. OxLDL increases and INFgamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thrombo Vasc Biol*, 1998;18:1350-1357
- 197 Nicholson A, Han J, Febbraio M, Frieda A S. CD36 the macrophage class B scavenger receptor: regulation and role in atherosclerosis. In *Atherosclerosis and Autoimmunity*, Ed Shoenfeld Y, Harats D, Wick G, 2001, 41-47
- 198 Acton S, Rigotte A, Landschulz T, Xu S. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996;271:518-522
- 199 Pearson A, Lux A, Krieger M. Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:4056-4060
- 200 Ramprasad P, Fisher W, Witzum L. The 94 to 97 kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxLDL and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of CD68. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9580-9584
- 201 Ramprasad P, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxLDL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996;93:14833-14838
- 202 Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (letter), 1997;386:73-77

-
- 203 Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T. Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1998;18:1541-1547
- 204 Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circulation Research*, 1998;83:322-327
- 205 Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF- α . *Federation of European Biochemical Societies*, 1998;440:29-32
- 206 Murase T, Kume N, Korenaga R, Ando J. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circulation research*, 1998; 83:328-333
- 207 Li Y, Zhang C, Philips I, et al. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation : *Circulation Research*, 1999 ;84 :1043-1049
- 208 Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*, 1999;99:3110-3117
- 209 Yoshida H, Kondratenko N, Green S, Steinberg D. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem. J.*,1998;334:9-13
- 210 Aoyama T, Chen M, Fujiwara H, Masaki T. LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells. *Federation of European Biochemical Societies*,2000;467:217-220
- 211 Cominacini L, Pasini A, Garbin U, Davoli A. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF- κ B through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000;275:12633-12638
- 212 LI D, Mehta J. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*,2000;101:2889
- 213 Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J Biol Chem*,1997;272:31217-31220
- 214 Nakao J, Ooyama T, Ito H, Chang W. Comparative effect of Lipoxygenase products of arachidonic acid on rat aortic smooth muscle cell migration. *Atherosclerosis*, 1982;44:339-342
- 215 Han H, Tangirala K, Green R, Quehenberger O. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes:a regulatory role for plasma LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis and Vascular Biology*, 1998;18:1983-1991
- 216 Tangirala K, Murao K, Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor by cytokines. *J Biol Chem.*,1997;271:8050-8056
- 217 Patricia M, Kim J, Harper C, Shih P. Lipoxygenase products increase monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,1999;19:2615-2622
- 218 Sultana C, Shen Y, Rattan V, Kalva VK. Lipoxygenase metabolitos induced expresión of adhesión and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is linked to protein kinase C activation. *J Cell Physiol.*,1996;167:477-487
- 219 Khan B, Parthasarathy S, Alexander R, Medford R. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J. Clin Invest*, 1995;95:1262-1270
- 220 Marui N, Offermann M, Swerlick R, Kunsch C. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. . *J. Clin Invest*, 1993;92:1866-1874
- 221 Knauss, C, Fátima E, Abboud H. Phosphatidic acid modulation of DNA synthesis, phospholipase C, and platelet derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells: role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*,1990; 265:14457-14463
- 222 Van Corven J, Groenink A, Jalink K, Eichhottz. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G-proteins. *Cell*,1989;59:45-54
- 223 Van Corven J, Rijsnijk A, Jalink K, Vanderbend R. Mitogenic action of lysophosphatidic and phosphatidic acid on fibroblasts: dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem*, 1992;281:163-169
- 224 Natarajan V, Scribner W, Hart C, Parthasarathy S. Oxidized low density lipoprotein-mediated activation of phospholipase D in smooth muscle cells: a possible role in cell proliferation and atherogenesis. *J. Lipid Res.*,1995;36:2005-2016
- 225 Barbacid M. *Annu. Ver. Biochem.*, 1987;56:779

-
- 226 Bos j. *Câncer Res*,1989;49:4682
- 227 Qiu R, Chen J, Kim D, McCormick F. *Nature*,1995;374:457
- 228 Irani K, Xia Y, Zweier J, Sollott S. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, 1997;275:1649-1651
- 229 Boucher M, Wiegmann K , Futterer A, Pfeffer K. *J Exp Med*,1995;181:2059-2068
- 230 Kim Y, Linardic C, Hannun A. *J.Biol. Chem*, 1991;266:484-489
- 231 Obeid M, Hannun A. *J. Cell. Biochem*, 1995;58:191-198
- 232 Auge N, Andrieu N, Nègre-Salvayre A, Thiers J. The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996;271:19251-19255
- 233 Ross R, Bawen-Pope DF, Raines W e tal. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philosoph Trans R Soc London B Biol Sci*, 1990;327:155-169
- 234 Zhao S, Xu D. Oxidized lipoprotein(a) increases the expression of platelet-derived growth factor-B in human umbilical vein endothelial cells. *Clinica Chimica Acta*, 2000;296:121-133
- 235 Dvorak F, Brown F, Detmar M, Dvorak M. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* , 1995;146:1029-1039
- 236 Plate H, Breier G, Weich A, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 1992;359:845-848
- 237 Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.*Nature*, 1992;359:843-845
- 238 Koch E, Harlow A, Haines K, Amento P. Vascular endothelial growth factor: cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 1994;152:4149-4156
- 239 Tontonoz P, Alvarez G, Thomazy A, Evans M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*,1998;93:241-251
- 240 Marx N, Bourcier T, Sukhova K, Libby P. PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression :PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1999;19:546-551
- 241 Inoue M, Itoh H, Tanaka T, Chun T.Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptorY. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,2001;21:560-566
- 242 Ramos M, Kuzuya M, Esaki T, Miura S. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1998;18:1188-1196
- 243 Brasen J, Kivela A, Roser K, Rissanen t. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor-BB expression, iron deposition, and oxidation-specific epitopes in stented human coronary arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,2001;21:1720
- 244 Platt N, Suzuki H, Kodama T, Gordon S. Apoptotic thymocyte clearance in scavenger receptor class A-deficient mice is apparently normal. *The Journal of Immunology*,2000;164:4861-4867
- 245 Hockenber M, Oltvai N, Yin M, Milliman L, Korsmeyer J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*,1993;75:241-251
- 246 Rothstein D, Bristol A, Hosler B, Brown H. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1994;91:4155-4159
- 247 Troy M, Shelanski L. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1994;91:6384-6387
- 248 Malorni W, Rivabene R, Santini T, Donelli G. N-acetylcysteine inhibits apoptosis and decreases viral particles in HIV-chronically infected U937 cells. *FEBS Lett.*,1993;327:75-78
- 249 Sandstrom A, Roberts B, Folks M, Buttke M. HIV gene expression enhances T cell susceptibility of hydrogen peroxide-induced apoptosis. *AIDS Res. Human Retroviruses*,1993;9:1107-1113
- 250 Tishler B, Calderwood K, Coleman N, Price D. Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res.*,1993;53:2212-2216
- 251 Lowe W, Schmitt M, Smith W, Osborne A. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 1993;362:847-849
- 252 Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995;267:1449-1456
- 253 Griffith S, Brunner T, Fletcher S, Green D. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*,1995;270:1189-1192
- 254 Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J.A role of CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*,1995;377:630-632
- 255 Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95)ligand:implications for tumor immune escape. *Science*,1996;274:1363-1366

-
- 256 Niehans A, Brunner T, Frizelle S, Liston J. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer*, 1997;57:1007-1012
- 257 Sata M, Walsh K. TNF α regulation of Fas ligand expression on endothelium modulates leukocyte infiltration of the blood vessel wall: *Nat. Med.*, 1998;4:415-420
- 258 Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J. Clin. Invest.*, 1998;102:1682-1689
- 259 Li Dayuan, Mehta J. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000;20:1116
- 260 Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the Lectin-like Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:955
- 261 Minami M, Kume N, Kataoka H, Morimoto M. Transforming growth factor-Beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:357-361
- 262 Aoyama T, Chen M, Fujiwara H, Masaki T. LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells. *FEBS Letter.* 2000;467:217-220
- 263 Du X, Sui G, Farber K, Weib J. Induction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia*, 1998;41:249-256
- 264 Thomas C, Jackson F, Ohlweiler D, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *Journal of Lipid Research*, 1994;35:417-427
- 265 Sugiyama S, Kugiyama K, Matsumura T, Suga S. Lipoproteins regulate C-type natriuretic peptide secretion from cultured vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1995;15:1968-1974
- 266 Davies J, Richardson D, Wolf N, Katz R. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage and smooth muscle cell content. *Br Heart J.*, 1993;69:377-381
- 267 Lendon L, Davies J, Born R, Richardson D. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophage density is increased. *Atherosclerosis*, 1991;87:87-90
- 268 Galis S, Sukhova K, Kranzhofer K, Clark S. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:402-406
- 269 Shah K, Falk E, Badimon J, Levy G. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in atherosclerotic fibrous caps: potential role of matrix degrading metalloproteinases and implication for plaque rupture: *Circulation*, 1995;92:1565-1569
- 270 Fisher J, Datta C, Talwar S, Wang Q. Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature*, 1996;379:335-339
- 271 Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*, 1993;8:395-405
- 272 Logan K, Garabedian J, Campbell E, Webe Z. Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and its transcription factors. *J Biol Chem*, 1996;271:7774-7782
- 273 Xu X, Meisel S, Ong J, Kaul S. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 1999;99:993-998
- 274 Watson D, Berliner A, Hama Y, La Du N. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.*, 1995;96:2882-2891
- 275 Watson D, Navab M, Hama Y, Sevanian A. Effect of platelet-activating factor acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.*, 1995;95:774-782
- 276 Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic S. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma. *Circulation*, 1998;97:2433-2444
- 277 Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated lipid peroxidation of LDL. *Atherosclerosis*, 1995;115:201-215
- 278 Keidar S, Kaplan M, Aviram M. Angiotensin II-modified LDL is taken up by macrophages via the scavenger receptor leading to cellular cholesterol accumulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1996;16:97-105
- 279 Keidar S, Kaplan M, Shapira C, Brook G. LDL isolated from patients with essential hypertension exhibit increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis*, 1994;107:71-84

-
- 280 Keidar S, Brook G, Aviram M. Angiotensin II enhances lipid peroxidation of low density lipoproteins: *News Physiol Sci*,1993;8:245-248
- 281 Hayek T, Attias J, Coleman R, Brodsky S. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovascular Research*,1999;44:579-587
- 282 Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized LDL. A possible role for Interleukin-6. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,2001;21:1464
- 283 Griendling K, Minieri C, Ollerenshaw J, Alexander R. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*,1994;74:1141-1148
- 284 Ushio-Fukai M, Zafari A, Fukui T, Ishizaka N. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates Angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996;271:23317-23321
- 285 Maziar Z, Masuko U, Marjorie A, Qiqin Y. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in Angiotensin II-induced hypertrophy. *Hypertension*,1998;32:488-495
- 286 Rao N, Berk C. Active oxygen species stimulate vascular smooth cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation Research*, 1992;70:593-599
- 287 Baas S, Berk C. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 1995;77:29-36
- 288 Ushio-Fukai M, Alexander W, Akers M, Griendling K. p38 MAPKinase is a critical component of the redox-sensitive signalling pathways by angiotensin II: role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.*,1998;273:15022-15029
- 289 Eguchi S, Inagami T. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept.*,2000;91:13-20
- 290 Ushio-Fukai M, Griendling K, Becker P, Hilaenski L. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:489
- 291 Natarajan R, Gonzales N, Lanting L, Nadler J. Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Hypertension*,1994;23(suppl):I-142-I-147
- 292 Zhu W, Roma P, Pellegatta F, Catapano L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1994;200:389-394
- 293 Zhu W, Roma P, Pirillo A, Pellegatta F. Oxidized LDL induce hsp70 expression in human smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 1995;372:1-5
- 294 Madamanchi N, Li S, Patterson C, Runge M. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,2001;21:321-326
- 295 Pirillo A, Norata G, Zanelli T, Catapano A. Overexpression of Inducible heat shock protein in COS.1 cells fails to protect from cytotoxicity of oxidized LDLs. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,2001;21:248
- 296 Berridge J. Calcium oscillations. *Journal Biol. Chem.*,1990;265:9583-9586
- 297 Roveri A, Coassin M, Majorino M, Zamburlini A. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch. Biochem. Biophys.*,1992;297:265-270
- 298 Grover K, Samson S. Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am. J. Physiol.*,1988;255:C297-C303
- 299 Grover K, Samson S. Protection of Ca pump of coronary artery against inactivation by superoxide radical. *Am. J. Physiol.*,1989;256:C666-C673
- 300 Suzuki J, Ford D. Inhibition of Ca²⁺-ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates. *Am. J. Physiol.*,1991;261:H568-H574
- 301 Boraso A, Williams A. Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel by H₂O₂ and dithiothreitol. *Am. J. Physiol.*,1994;267:H1010-H1016
- 302 Stoyanovsky A, Salama G, Kagan E. Ascorbate/iron activates Ca²⁺ release channels of skeletal sarcoplasmic reticulum vesicles reconstituted in lipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.*,1994;308:214-221
- 303 Suzuki J, Monterubio J, Hughes A, Cleemann L. Hydrogen peroxide regulates the ryanodine receptor and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in rat cardiac myocytes: *Bulletin.MDIBL*,1996;35:33-34
- 304 Rooney A, Renard C, Sass J, Thomas P. Oscillatory cytosolic calcium waves independent of stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*,1991;266:12272-12282
- 305 Sweetman L, Zhang Y, Peterson H, Gopalakrishna R. Effect of linoleic acid hydroperoxide on endothelial cell calcium homeostasis and phospholipids and phospholipids hydrolysis. *Arch. biochem. Biophys.*, 1995;323:97-107

-
- 306 Suzuki Y, Forman H, Stevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*,1997;22:269-285
- 307 Murphy K, Hoyal R, Livingston R, Forman J. Modulation of the alveolar macrophage respiratory burst by hydroperoxides. *Free Radical Biology and Medicine*,1995;18:37-45
- 308 Doan N, Gentry L, Taylor A, Elliott J. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca²⁺ flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochem. J.*,1994;297:209-215
- 309 Maki A, Berezesky K, Fargnoli J, Holbrook J. Role of Ca²⁺ in induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. *FASEB J.*,1992;6:919-924
- 310 Chan M, Chen E, Tatoyan A, Shargill S. Stimulation of tyrosine-specific protein phosphorylation in the rat liver plasma membrane by oxygen radicals. *Biochem. Biophys. Commun.*,1986;139:439-445
- 311 Zick Y, Sagi-Eisemberg R. A combination of H₂O₂ and vanadate concomitantly stimulates protein tyrosine phosphorylation and polyphosphoinositide breakdown in different cell lines. *Biochemistry*,1990;29:10240-10245
- 312 Gamou S, Shimizu N. Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Letters*,1995;357:161-164
- 313 Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein Kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene*,1996;13:713-719
- 314 Larsson R, Cerutti P. Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C following exposure in mouse epidermal cells to oxidants. *Cancer Res.*, 1989;49:5627-5632
- 315 Stevenson A, Pollock S, Coleman N, Calerwood K. Irradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res.*,1994;54:12-15
- 316 Cunnick J, Dorsey J, Standley T, Turkson J. Role of Tyrosine Kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid stimulated mitogen activated protein kinase pathway. *The Journal of biological Chemistry*, 1998;273:14468-14475
- 317 Stevanian A, Wratten L, McLeod L, Kim E. Lipid peroxidation and phospholipase A₂ activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: A structural basis for enzyme activation. *Biochem. Biophys. Acta*,1988;961:316-327
- 318 Elliot J, Meszaros G, Schilling P. Effect of oxidant stress on calcium signalling in vascular endothelial cells: *Free Radical Biolo. Med.* ,1992;13:635-650
- 319 Robinson T, Sevanian A, Forman H. Inhibition of arachidonic acid release by nordihydroguaiaretic acid and its antioxidant action in rat alveolar macrophages and chinese hamster lung fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*,1990;105:113-122
- 320 Pentland P, Morrison R, Jacobs C, Aruza L. Tocopherol analogs suppress arachidonic acid metabolism with phospholipase inhibition. *J. Biol. Chem.* ,1992;267:15528-15584
- 321 Berridge J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*,1993;361:315-325
- 322 Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*,1992;258:607-612
- 323 Bonventre V, Swindler M. Calcium dependency of prostaglandin E₂ production in rat glomerular mesangial cells. Evidence that protein kinase C modulates the calcium dependent activation of phospholipase A₂. *J. Clin. Invest.*,1988;82:168-176
- 324 Rivera M, Greenberg E. Growth factor-induced gene expression: The ups and downs of c-fos regulation. *New Biol.*,1990;2:751-758
- 325 Haliday M, Ramesha S, Ringold G. TNF induces c-fos via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxygenase metabolite. *EMBO J.*,1991;10:109-115
- 326 Barchowsky A, Munro R, Morana J, Vincent P. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF- κ B and AP-1 in endothelial cells. *Am. J. Physiol.*,1995;269:L829-L836
- 327 Crawford D, Zbinden I, Amstad P, Cerutti P. Oxidant stress induces the proto-oncogenes c-fos and c-myc in mouse epidermal cells. *Oncogene*,1988;3:27-32
- 328 Rao N, Berk C. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.*,1992;70:593-599
- 329 Burton H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic. Biol.*,1995;18:775-794
- 330 Harrington A, Edenberg J, Saxman S, Pedigo M. Cloning and characterization of the murine promoter for the colony-stimulating factor-1-encoding gene. *Gene*,1991;102:165-170
- 331 Shvy J, Li J, Kolattukudy E. Structure of human monocyte chemotactic protein gene and its regulation by TPA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1990;169:346-351

- 332 Collins T, Williams A, Johnson I, Kim J. Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule. *J. Biol. Chem.*,1991;266:2466-2473
- 333 Schreck R, Rieber P, Baeuerle A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*,1991;10:2247-2258
- 334 Schreck R, Albermann K, Baeuerle A. Nuclear factor κ B: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (areview). *Free Radic. Res. Commun.*,1992;17:221-237
- 335 Lião F, Andalibi A, deBeer C, Fogelman M. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B like transcription factor activation in response to atherogenic diet in mice. *J. Clin. Invest.*,1993;91:2572-2579
- 336 Yan D, Schmidt M, Anderson M, Zhang J. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptor/binding proteins. *J. Biol.Chem.*, 1994;269:9889-9897
- 337 Natarajan R, Reddy M, Malik K, Fatima S. Signaling mechanisms of nuclear factor- κ B-mediated activation of inflammatory genes by 13-hydroxyoctadecadienoic acid in cultured vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis and Vascular Biology*,2001;21:1408
- 338 Rao G, Alexander R, Runge M. Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun and c-Myc mRNA expression, Mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. *J.Clin. Invest.*,1995;96:842-847
- 339 Gu J, Pei H, Thomas L, Nadler J. Ribozyme-mediated inhibition of rat leukocyte-type 12-lipoxygenase prevents intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*,2001;103:1446
- 340 Nagy L, Tontonoz P, Alvarez J, Chen H. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*,1998;93:229-240
- 341 Tontonoz P, Nagy L, Alvarez J, Thomazy V. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *CELL*,1998;93:241-252
- 342 Matthews N, Neale L, Jackson K, Stark M. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology*,1987;62:153-155
- 343 Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumour necrosis factor and its implication in the killing of tumour cells in vitro. *Cancer*,1989;49:1671-1675
- 344 Staal T, Roederer M, Herzenberg A. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor κ B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl. Acad. Sci USA*,1990;87:9943-9947
- 345 Schieven L, Kirihara M, Burg L, Geahlen L. p72^{syk} tyrosine kinase is activated by oxidizing conditions that induce lymphocyte tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ signals. *J Biol. Chem.*,1993;268:16688-16692
- 346 Garcia-morales P, Minami Y, Luong E, Klausner D. Tyrosine phosphorylation in T cells is regulated by phosphatase activity: Studies with phenylarsine oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990;87:9255-9259
- 347 Schreck R, Meier B, Mannel N, Droge W. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J. Exp. Med.*,1992;175:1181-1194
- 348 Suzuki J, Aggarwal B, Packer L. α Lipoic acid is a potent inhibitor of NF- κ B activation in human T cells. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 1992;189:1709-1715
- 349 Ushio-Fukai M, Alexander R, Akers M, Griendling K. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signalling pathways by Angiotensin II. *The Journal of Biological Chemistry*,1998;273:15022-15029
- 350 Fukai M, Alexander R, Akers M, Yin QiQin. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/Protein kinase B by Angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*,1999;274:22699-22704
- 351 Nigris F, Youssef T, Franconi F, Anania V. Evidence for oxidative activation of c-myc-dependent nuclear signaling in human coronary smooth muscle cells and in early lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*, 2000;102:2111
- 352 Patel R, Moellering D, Murphy-Ullrich J, Jo H. Cell signalling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000;28:1780-1794
- 353 Roberts B. Transforming growth factor- β : activity and efficacy in animal models of wound healing. *Wound Rep.Reg.*,1995;3:408-418
- 354 Lawrence A. Transforming growth factor- β : a general review. *Eur.Cytokine Netw.*,1996;7:363-374
- 355 Barcellos H, Dix A. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol. Endocrinol.*,1996;10:1077-1083
- 356 Garrett I, Boyce F, Oreffo C, Bonewald L. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.*,1990;85:632-639
- 357 Bax E, Alam T, Banerji B, Bax R. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1992;183:1153-1158

-
- 358 Steinbeck J, Appel H, Verhoeven J, Karnovsky J. NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone: *J. Cell Biol.*, 1994;126:765-772
- 359 Griendling K, Minieri A, Ollerenshaw D, Alexander W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 1994;74:1141-1148
- 360 Sundaresan M, Yu X, Ferrans J, Irani K. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995;270:296-299
- 361 Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993;57:715S-725S
- 362 Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol. Biol.*, 1996;44:25-28
- 363 Janero R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 1990;9:515-540
- 364 Thorpe R, Baynes W. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. 1996;9:69-77
- 365 Hazen L, Hsu F, d'Avignon A, Heinecke W. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochem.*, 1998;37:6864-6873
- 366 Keaney F, Frei B. Antioxidant protection of low-density lipoprotein and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease. In: Frei B, ed. *Natural antioxidants in human health and disease*. New York: Academic Press; 1994:303-351
- 367 Halliwell B, Grootveld M. The measurement of free radical reactions in humans. *FEBS Lett*, 1987;213:9-14
- 368 O'Brien D, Alpers E, Hokanson E, Wang S. Oxidation-specific epitopes in human coronary atherosclerosis are not limited to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, 1996;94:1216-1225
- 369 Springfield R, Levitt D. Pitfalls in use of breath pentane measurements to assess lipid peroxidation. *J. Lipid Res.*, 1994;35:1497-1504
- 370 Kneepkens F, Lepage G, Roy C. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1994;17:127-160
- 371 Whithead P, Thorpe G, Maxwell J. Enhanced chemiluminescence assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal Chim Acta*, 1992;266:265-277
- 372 Uotila T, Kirkkola L, Rorarius M, Tuimala R. The total peroxy-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free Rad Biol Med*, 1994;16:581-590
- 373 Morrow D, Hill E, Burk F, Nammour M. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;87:9383-9387
- 374 Morrow D, Robert J. Quantification of noncyclooxygenase derived prostanoid as a marker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1991;10:195-200
- 375 Awad A, Morrow D, Hill E, Robert J. Detection and localization of lipid peroxidation in selenium and vitamin E-deficient rats using F₂-isoprostanes. *J Nutr*, 1994;124:810-816
- 376 Morrow D, Awad A, Kato T, Takahashi K. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Clin Invest*, 1992;90:2502-2507
- 377 Longmire W, Swift L, Roberts J, Awad A. Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1994;47:1173-1177
- 378 Morrow D, Harris M, Roberts J. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramification for measurement of eicosanoids. *Analyt Biochem*, 1990;184:1-10
- 379 Morrow D, Harris M, Roberts J. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramification for measurement of eicosanoids. *Analyt Biochem*, 1990;184:1-10
- 380 Morrow D, Awad A, Boss J, Blair A. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:10721-10725
- 381 Sevanian A, Kim E. Phospholipase A₂ dependent release of fatty acids from peroxidized membranes. *J Free Radic Biol Med*, 1985;1:263-271
- 382 Morrow D, Roberts J. Mass spectrometry of prostanoids F₂-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical catalyzed mechanism. *Methods. Enzymol.*, 1994;233:163-174
- 383 Sodergren E, Vessby B, Basu S. Radioimmunological measurement of F₂-isoprostanes after hydrolysis of lipids in tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Acids*, 2000 Sep;63(3):149-152
- 384 Hecker M, Ulrich V, Fischer C, Meese O. Identification of novel arachidonic acid metabolites formed by prostaglandin H synthase, 1987;169:113-123

- 385 Pratico D, Lawson A, Fitzgerald A. Cyclooxygenase-dependent formation of isoprostane, 8-epi-prostaglandin F₂α. *J Biol Chem*, 1995;270:9800-9808
- 386 Catella F, Reilly P, Delanty N, Lawson A. Physiological formation of 8-epi-PGF₂α in vivo is not affected by cyclooxygenase inhibition. *1995;23:233-236*
- 387 Longmire W, Swift L, Roberts J, Burk F. Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1994;47:1173-1177
- 388 Morrow D, Moore P, Awad A, Ravenscraft D, Marini G. Marked overproduction of non-cyclooxygenase derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in the hepatorenal syndrome. *J Lipid Mediators*, 1993;6:417-420
- 389 Morrow D, Minton A, Badr F, Roberts J. Evidence that the F₂-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F₂α, is formed in vivo. *Biochem Biophys Acta*, 1994;1210:244-248.
- 390 Morrow D, Hill E, Burk F, Nammour M. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;87:9383-9387
- 391 Takahashi K, Nammour M, Fukunaga M, Ebert J. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F₂, in the rat. *J Clin Invest*, 1992;90:136-141
- 392 Banerjee M, Ho K, Morrow D, Roberts J. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF₂α, in rabbit lung in situ. *Am J Physiol*, 1992;263:H660-H663
- 393 Kang K, Morrow D, Roberts J, Newman H. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F₂α in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol*, 1993;74:460-465
- 394 Fukunaga M, Makita N, Roberts J, Morrow D. Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1993;264:C1619-C1624
- 395 Yura T, Fukunaga M, Grygorczyk R, Makita N. Molecular and functional evidence for the distinct nature of F₂-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 1995;23:237-239
- 396 Kinsella T, Fitzgerald A, O'Mahony J. The isoprostane, 8-epi-prostaglandin F₂α, induces elevation in intracellular calcium by activation of the cloned human thromboxane A₂ receptor. *FASEB J*, 1995;9:A40
- 397 Audoly L, Rocca B, Fabre J, Koller B. Cardiovascular Responses to the Isoprostanes iPF₂α-III and iPE₂-III are mediated via the Thromboxane A₂ receptor in vivo. *Circulation*, 2000;101:2833-2840
- 398 Morrow D, Minton A, Roberts J. The F₂-isoprostanes, 8-epi-prostaglandin F₂α, a potent agonist of the vascular thromboxane / endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins*, 1992;44:155-163
- 399 Pratico D, Smyth M, Violi F, Fitzgerald A. Local amplification of platelet function by 8-epi-prostaglandin F₂α is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem*, 1996;271:14916-14924
- 400 Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S. The F₂-isoprostane 8-Epi-prostaglandin F₂α increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1998;18:1249-1256
- 401 Kunapuli P, Lawson A, Rokach A, Fitzgerald A. Functional characterization of the ocular PGF₂α receptor: activation by the isoprostane 12-epi-PGF₂α. *J Biol Chem*, 1997;272:27147-27154
- 402 Morrow D, Frei B, Longmire W, Gaziano M. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers—Smoking as a cause of oxidative damage. *New England J of Medicine*, 1995;332:1198-1203
- 403 Gopaul K, Anggard E, Mallet I, Betteridge J. Plasma 8-epi-PGF₂α levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*, 1995;368:225-229
- 404 Catella-Lawson F, Kapoor S, Pratico D, Braunstein N. Oxidative stress and diabetes mellitus. *J Invest Med*. 1996;44:223A
- 405 Ciabattini G, Consoli A, Vitacolonna E, Mezzetti A. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F₂α in diabetes mellitus: effects of tight metabolic control and vitamin E supplementation. *Thrombo Haemost*. In press. Abstract
- 406 Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G. In vivo formation of 8-epi-PGF₂α is increased in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*. In Press
- 407 Pratico D, Iuliano L, Spagnoli L, Mauriello A. Localization of distinct F₂ isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1997;100:2028-2034
- 408 Gniwotta C, Morrow J, Roberts L, Kuhn H. Prostaglandin F₂-Like Compounds, F₂-Isoprostanes, are present in increased amounts in Human Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997;17:3236-3241
- 409 Delanty N, Reilly M, Pratico D, Lawson A. 8-epi PGF₂α generation during coronary reperfusion: a potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. *Circulation*. 1997;96:2492-2499
- 410 Ferreira R, Llesuy S, Milei J, Scordo D. Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. *Am Heart J*. 1988;115:307-312

-
- 411 Breisblatt M, Stein L, Wolfe J, Follansbee P. Acute myocardial dysfunction and recovery: a common occurrence after coronary bypass surgery. *J Am Coll Cardiol.*,1990;15:1261-1269
- 412 Morrow J. Quantification of isoprostanes as indice of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2005;25:279
- 413 Santanam N, Auge N, Zhou M, Keshava C. Overexpression of human catalase gene decreases oxidized lipid-induced cytotoxicity in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,1999;19:1912-1917
- 414 Lewis P,Stefanovic N, Pete J, Calkin C. Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2007;115:2178-87.
- 415 Morrison A, Jacobsen W, Sprecher L, Robinson K. Serum glutathione in adolescent males predicts parental coronary heart disease.*Circulation*, 1999;100:2244-2247
- 416 Bor V, Cevik C, Uslu I, Guneral F. Selenium levels and glutathione activities in patients with acute myocardial infarction.*Acta Cardiol.*,1999;54:271-276
- 417 Mihailovic B, Avramovic M, Jovanovic B,Pesut J. Blood and plasma selenium levels and GSH-Px activities in patients with arterial hypertension and chronic disease. 1998,17:285-289
- 418 Ceballos I, Witko V, Merad M, Nguyen T.Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med.* 1996,21:845-853
- 419 Zachara A, Trafikowska U, Adamowicz A, Nartwicz E. Selenium, glutathione peroxidases, and some other antioxidant parameters in blood of patients with chronic renal failure. *J Trace Elem Med Biol.* 2001,15:161-166.
- 420 Jarvik G, Rozek L, Brophy V, Hatsukami T. Paraoxonase(PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1 192 or PON1 55 genotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2000;20:2441
- 421 Mackness B, Davies G, Turkie W, Lee E. Paraoxonase status in coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:1451-1457
- 422 Voetsch B, Benke K, Damasceno B, Siqueira L.Paraoxonase 192 Gln→Arg polymorphism.*Stroke*,2002;33:1459
- 423 James R, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation*,2000;101:2252
- 424 Hjalmarsson K, Marklund S, Engstrom A, Edlund T. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1987,84:6340-6344
- 425 Stralin P, Karlsson K, Johansson O, Marklund L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,1995;15:2032-2036
- 426 Sentman M, Brannstrom T, Westerlund S, Laukkanen M. Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:1477
- 427 Nilsson J. Absence of EC-SOD does not promote atherogenesis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:1387
- 428 Jiang F, Guo Y, Salvemini D, Dusting J. Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein (E)-deficient mice.*Br J Pharmacol.*,2003;139:1127-1134
- 429 Siemianowicz K, Gmink J, Francuz T, Wojcik A. Activity of antioxidant enzymes in children from families at high risk of premature coronary heart disease. *Scand J Clin Lab Invest.*, 2003;63:151-158
- 430 Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A. Inhibition of LDL oxidation by nitric-oxide:potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.*, 1993;334:170-174
- 431 Yates T, Lambert E, Whitten P, McDonald I. A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of LDL by mouse macrophages. *FEBS Lett*,1992;309:135-138
- 432 Jessup W, Dean T. Autoinhibition of murine macrophage-mediated oxidation of LDL by nitric oxide synthesis. *Atherosclerosis*,1993;101:145-155
- 433 Malo-Ranta U, Yla-Herttuala S, Metsa-Ketela T,Jaakkola O. Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein.*FEBS Lett.*,1994;337:179-183
- 434 Packer L, Fuchs J,. Vitamin C in health and disease. New York: Marcel Dekker, 1997
- 435 Niki E, Yamamoto Y, Kamiya Y, Role of uric acid,cysteine, and glutathione as Cain breaking antioxidant in aqueous phase.*Chem. Lett.*,1985:1267-1270
- 436 Pryor A, Stahl W, Rock L. Beta carotene: from biochemistry to clinical trials. *Nutr. Rev.* (Inn press); 2000
- 437 McCall R, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?Free Radic. Biol. Med.,1999;26:1034-1053

- 438 Keaney F, Frei B. Antioxidant protection of low density lipoprotein and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease. In Frei B. ed. Natural antioxidants in human health and disease. San Diego, CA: Academic Press; 1994:303-351
- 439 Harats D, Bem-Naim M, Dabach Y, Hollander G. Effect of vitamin C and E supplementation on susceptibility of plasma lipoproteins to peroxidation induced by acute smoking. *Atherosclerosis*, 1990;85:47-54
- 440 Diaz M, Frei B, Vita A, Keaney F. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl. J. Med.*, 1997;337:408-416
- 441 Calzada C, Bruckdorfer R, Rice-Evans A. The influence of antioxidant nutrients on platelet function in healthy volunteers. *Atherosclerosis*, 1997;128:97-105
- 442 Mower R, Steiner M. Synthetic byproducts of tocopherol oxidation as inhibitors of platelet function. *Prostaglandins*, 1982;24:137-147
- 443 Colette C, Pares-Herbute N, Monnier H, Catry E. Platelet function in type I diabetes effects of supplementation with large doses of vitamin E. *Am J. Clin. Nutr.* 1988;47:256-261
- 444 De Lorgeril M, Boissonnat P, Salen P, Monjaud I. The beneficial effect of dietary antioxidant supplementation on platelet aggregation and cyclosporine treatment in heart transplant recipients. *Transplantation*, 1994;58:193-194
- 445 Steiner M, Glantz M, Lekos A. Vitamin E plus aspirin compared with aspirin alone in patients with transient ischemic attacks. *Am J. Clin. Nutr.*, 1995;62(Suppl.);1381S-1384S.
- 446 Yoshikawa T, Yoshida N, Manabe H, Terasawa Y. Alpha-tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors*, 1998;7:15-19
- 447 May M, Qu C, Morrow D. Interaction of ascorbate and α -tocopherol in resealed human erythrocyte ghosts. Transmembrane electron transfer and protection from lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 1996;271:10577-10582
- 448 Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991;54:1113S-1118S.
- 449 Jialal I, Fuller C, Huet A. The effect of α -tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose-response study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995;15:190-198
- 450 Devararaj S, Adams-Huet B, Fuller C, Jialal I. Dose-Response Comparison of RRR- α -Tocopherol and All-Racemic- α -Tocopherol on LDL Oxidation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17:2273-2279
- 451 Iuliano L, Micheletta F, Maranghi M, Frati G. Bioavailability of vitamin E as function of food intake in healthy subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:34
- 452 Carroll F, Schade S. Timing of antioxidant ingestion alters postprandial proatherogenic serum markers. *Circulation*, 2003;108:24-31
- 453 Kim M, White H. Effect of vitamin E on the anticoagulant response to warfarin. *Am J. Cardiol.*, 1996;77:545-546
- 454 Freedman J, Farhat J, Loscalzo J, Keaney J. Alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein C-dependent mechanism. *Circulation*, 1996;94:2434-2440
- 455 Bettger J, Olson E. Effect of alpha-tocopherol and alpha-tocopherolquinone on vitamin K-dependent carboxylation. *Fed Proc*, 1982;41:344
- 456 Dowd P, Zheng B. On the mechanism of the anti-clotting action of vitamin E quinone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:8171-8175
- 457 Arrowsmith B, Faich A, Tomita K. Morbidity and mortality among low birthweight infants exposed to an intravenous vitamin E product, E-Ferol. *Pediatrics*, 1989;83:244-249
- 458 Hittner M, Godio B, Rudolph J. Retrolental fibroplasias: efficacy of vitamin E in a double-blind clinical study of preterm infants. *N Engl Med*, 1981;305:1365-1371
- 459 Stephens G, Parsons A, Schofield M, Kelly F. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). *Lancet*, 1996;347:781-786
- 460 Kappus H, Diplock T. Tolerance and safety of vitamin E: as toxicological position report. *Free Radical Biol Med.*, 1992;13:55-74
- 461 Gebhart E, Wagner H, Grziwok K. The actions of anticlastogens in human lymphocyte cultures and their modification by rat liver S9 mix: studies with vitamin C and E. *Mutat Res*, 1985;149:83-94
- 462 Weldon H, Bhatt A, Keller P. vitamin E: a long-term toxicity and carcinogenicity in rats. *Int J Vitam Nutr Res*, 1983;53:287-296
- 463 Williams J, Motteram M, Sharp H, Gallagher J. Dietary vitamin E and the attenuation of early lesion development in modified Watanabe rabbits. *Atherosclerosis*, 1992;94:153-159
- 464 Verlangieri J, Bush J. Effects of d- α -tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 1992;11:131-138

-
- 465 Jorge R, Neyra C, Ozaki M, Almeida E. Improvement in the endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits treated with vitamin E. *Atherosclerosis*,1998;140:333-339
- 466 Keaney J, Guo Y, Cunningham D, Shwaery G. Vascular incorporation of α -tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. *J. Clin. Invest.*,1996;98:386-394
- 467 Pratico D, Tangirala R, Rader D, Rokach J. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ap ω E-deficient mice. *Nature Medicine*,1998;4:1189-1192
- 468 Parker R, Sabrah T, Cap M, Gill B. Relation of vascular oxidative stress, α -tocopherol, and hypercholesterolemia to early atherosclerosis in hamsters. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.1995;15:349-358
- 469 Schwenke D, Rudel L, Sorci-Thomas M, Thomas M. alpha-Tocopherol protects against diet induced atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *Journal of Lipid Research*,2002; 43:1927-1938
- 470 Shaish A, George J, Gilburd B, Keren P. Dietary β -carotene and α -tocopherol combination does not inhibit atherogenesis in an ApoE- deficient mouse model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,1999;19:1470-1475
- 471 Boscoboinik D, Szezewyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. *The journal of biological chemistry*, 1991;10:6188-6194
- 472 Devaraj S, Li D, Jialal I. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. *J. Clin. Invest.*, 1996;98:756-763
- 473 Harats D, Ben-Naim M, Dabach Y, Hollander G. Effect of vitamin C and E supplementation on susceptibility of plasma lipoproteins to peroxidation induced by acute smoking. *Atherosclerosis*,1990;85:47-54
- 474 Brown M, Morrice C, Duthie G. Vitamin E supplementation suppresses indexes of lipid peroxidation and platelet counts in blood of smokers and nonsmokers but plasma lipoprotein concentrations remain unchanged. *Am. J. Clin. Nutr.*1994;60:383-387
- 475 Mol M, de Rijke B, Demacher M. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis*,1997;129:169-176
- 476 Cadenas S, Rojas C, Mendez J, Herrero A. Vitamin E decreases urine lipid peroxidation products in young healthy human volunteers under normal conditions. *Pharmacol. Toxicol.* 1996;79:247-253
- 477 Meraji S, Ziouzenkova O, Resh U, Khosehsorur A. Enhanced plasma level of lipid peroxidation in Iranians could be improved by antioxidants supplementation. *Eur.J. Clin. Nutri.*,1997;52:318-325
- 478 Reilly M, Delanty N, Lawson A, FitzGerald A. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*, 1996;94:19-25
- 479 Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F₂-alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis Vascular Biology*,1997;17:3230-3235
- 480 Hoshino E, Shariff R, Van Gossum A, Allard P. Vitamin E suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers. *J. Parenter. Enter. Nutr.*,1990;14:300-305
- 481 Jialal I, Fuller J, Huet A. The effect of alpha-tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose-response study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1995;15:190-197
- 482 Simons L, Von Konigsmark M, Balasubramaniam S. What dose of vitamin E is required to reduce susceptibility of LDL to oxidation? *Aust. NZ J. Med.*,1996;26:496-503
- 483 Bowry W, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *J. Am. Soc.*,1993;115:6029-6040
- 484 Thomas R, Neuzil J, Mohr D, Stocker R. Coantioxidants make alpha-tocopherol an efficient antioxidant for low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.*,1995;62:1357S-1364S
- 485 Machin J. Vitamin E: a comprehensive treatise. New York: Marcel Dekker, 1980
- 486 Rosemberg H. Vitamin needs of older Americans. *Back-Grounder*,1999;7:1-11
- 487 Willett W. Nutritional epidemiology. New York: Oxford University Press;1998
- 488 Gey F, Puska P, Jordan P, Moser K. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.*,1991;53:326S-334S.
- 489 Gey F, Brubacher B, Stahelin B. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J. Clin. Nutri.* 1987;45:1368-1377
- 490 Gey F, Stahelin B, Puska P, Evans A. Relationship of plasma vitamin C to mortality from ischemic heart disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1987;498:110-123
- 491 Gey F. Vitamin E and other essential antioxidants regarding coronary heart disease: risk assessment studies. Epidemiological basis of the antioxidant hypothesis of cardiovascular disease. In: Packer L, Fuchs J. Vitamin E in health and disease. New York, NY: marcel Dekker, Inc, 1993;589.633

-
- 492 Riemersma A, Wood A, Macintyre A, Elton A, Gey F. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A,C and E and carotene. *Lancet*,1991;337:1-5
- 493 Riemersma A, Wood A, Macintyre A, Elton R. Low plasma vitamins E and C: increased risk of angina in Scottish men. *Ann.NY. Acad. Sci*,1989;570:291-295
- 494 Kardinaal M, Kok J, Ringstad J,Gomez J. Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study.*Lancet*,1993;342:1379-1384
- 495 Kostner K, Hornykewycz S, Yang P, Neunteufl T.Is oxidative stress causally linked to unstable angina pectoris?A study in 100 CAD patients and matched controls. *Cardiovasc.Res.*,1997;36:330-336
- 496 Stampfer J, Hennekens H, Manson E, Colditz A. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N. Engl. J. Med.* 1993;328:1444-1449
- 497 Manson E, Stampfer J, WillettC. A prospective study of vitamin C and incidence of coronary heart disease in women. *Circulation*, 1992;85:865
- 498 Buring E, Hennekens H. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Nutr. Rev.* 1997;55:S53-S60
- 499 Rimm B, Stampfer J, Ascherio A, Giovannuci E.Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.*,1993;328:1450-1456
- 500 Losonczy G, Harris B, HavlikJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the established populations for epidemiological studies of the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.*,1996;64:190-196
- 501 Meyer F, Bairati I, Dagenais R. Lower ischemic heart disease incidence and mortality among vitamin supplement users.*Can. J. Cardiol.*,1996;12:930-934
- 502 Moushumi L, Sumati B. Studies on possible protective effect of plant derived phenols and the vitamin precursors-beta-caroteno and alpha-tocopherol on 7,12.dimethylbenz(a)anthracene induced tumour initiation events. *Phytother. Res.*,1994;4:237-240
- 503 Kushi H. Vitamin E and heart disease: a case study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999;69:1322S-1329S
- 504 Bellizzi C, Franklin F, Duthie G, James T. Vitamin E and coronary heart disease: the European paradox.*Eur. J. Clin. Nutr.*,1994;48:822-831
- 505 Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am. J. Epidemiol.*,1994;139:1180-1189
- 506 Kushi H, Folsom R, Prineas J. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med*,1996;334:1156
- 507 Kromhout D, Blomberg M, Feskens M, Hertog L. Alcohol, fish, fibre and antioxidant vitamins intake do not explain population differences in coronary heart mortality. *Int. J. Epidemiol.*,1996;25:753-759
- 508 Sahyoun R, Jacques F, Russell M. Carotenoids,vitamins C and E, and mortality in an elderly population. *Am. J. Epidemiol.*,1996;144:501-511
- 509 Hense W, Stender M, Bors W, Keil U. Lack of an association between serum vitamin E and myocardial infarction in a population with higt vitamin E levels. *Atherosclerosis*, 1993;103:21-28
- 510 Riemersma A, Wood A, Macintyre A, Elton A. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A,C and E and carotene.*Lancet*,1991;337:1-5
- 511 Miwa K, Miyagi Y, Igawa A, Nakagawa K. Vitamin E deficiency in variant angina. *Circulation*,1996;94:14-18
- 512 Street J. Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation*,1994;90:1154-1161
- 513 Singh B, Ghosh S, Niaz A, Singh R. Dietary intake, plasma levels of antioxidant vitamins, and oxidative stress in relation to coronary artery disease in elderly subjects. *Am. J. Cardiology*,1995;76:1233-1238
- 514 Kim Y, Lee-Kimm C, Kim K, Suh Y. FERUM levels of antioxidant vitamins in relation to coronary artery disease:a case control study of Koreans. *Biomed. Environ. Sci.*,1996;9:229-235
- 515 Iribarren C, Folsom R, Jacobs R, Gross D. Association os serum vitamins, LDL susceptibility to oxidation,and auto antibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis:a case control study.*Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.*,1997;17:1171-1177
- 516 Kritchevsky B, Shimakawa T, Tell S, Dennis B. Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC study. *Circulation*, 1995;92:2142-2150
- 517 Rengstrom J, Nilsson J, Moldeus P, Strom K. Inverse relation between the concentration of low-density-lipoprotein vitamin E and the severity of coronary artery disease. *Am. J. Clin. Nutr.*,1996;63:377-385
- 518 Azen P, Qian D, Mack J, Sevanian A. Effect of supplementary antioxidant vitamin intake on carotid arterial wall intima-media thickness in a controlled clinical trial of cholesterol lowering. *Circulation*,1996;94:2369-2372

-
- 519 Bonithon C, Coudray C, Berr C, Touboul J. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y:the EVA study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997;65:121-127
- 520 Salonen T, Nyyssonen K, Parviainen M, Kantola M. Low plasma beta carotene, vitamin E, and selenium levels associate with accelerate carotid atherogenesis in hypercholesterolemic eastern Finnish men. *Circulation*, 1993;87:678
- 521 Tardif C, Côté G, Lespérance J, Bourassa M. Probucol and multivitamins in prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N. Engl. J. Med.*, 1997;337:365-372
- 522 Ruffini I, Belcaro G, Cesarone R, Geroulakos G. Evaluation of the local effects of vitamin E (E-Mousse) on free radicals in diabetic microangiopathy: a randomized, controlled trial. *Angiology*, 2003;54:415-421
- 523 Motoyama T, Kawaano H, Kugiyama K, Hirashima O. Vitamin E administration improves impairment of endothelium dependent vasodilatation in patients with coronary spastic angina. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1998;32:1672-1679
- 524 Singh B, Niaz A, Rastogi S, Rostogi S. Usefulness of antioxidant vitamins in suspected acute myocardial infarction (the Indian experiment of infarct survival-3). *Am. J. Cardiol.*, 1996;77:232-236
- 525 Rasool H, Rehman A, Wan N, Rahman R. Vitamin E and its effect on arterial stiffness in postmenopausal women-a randomized controlled trial. *Int J Clin Pharmacol Therap.*, 2003;41:587-592
- 526 Livingstone D, Jones C. Treatment of intermittent claudication with vitamin E. *Lancet*, 1958;2:602-604
- 527 Williams G, Fenna D, MacBeth A. Alpha tocopherol in treatment of intermittent claudication. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1971;132:662-666
- 528 Haeger K. Long-time treatment of intermittent claudication with vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1974;27:1179-1181
- 529 Tornwall E, Virtamo J, Haukka K, Aro A. Effect of alpha tocopherol (vitamin E) and beta carotene supplementation on the incidence of intermittent claudication in male smokers. *Arteriosclerosis, thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17:3475-3480
- 530 The Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group: The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med*, 1994;330:1029
- 531 Virtamo J, Rapola M, Ripatti S, Heinonen P. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.*, 1998;158:668-675
- 532 Rapola J, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen J. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet*, 1997;349:17115-1720
- 533 Rapola M, Virtamo J, Ripatti S, Haukka K. Effects of alpha tocopherol and beta carotene supplements on symptoms, progression, and prognosis of angina pectoris. *Heart*, 1998;79:454-458
- 534 Mitchinson J, Stephens G, Parsons A, Bligh E. Mortality in the CHAOS trial. *Lancet*, 1999;353:381-382
- 535 Marchiolo R, GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*, 1999;354:447-455
- 536 Brown M. Do vitamin E and fish oil protect against ischaemic heart disease? *Lancet*, 1999;354:441-442
- 537 Blot J, Li Y, Taylor R, Guo W. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993;85:1483-1492
- 538 Salonen J, Nyyssonen K, Salonen R, Lakka H-M. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 2000;248:377-386
- 539 The heart outcomes prevention evaluation study investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *The New England Journal of Medicine*, 2000;342:154-160
- 540 Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, Doris I. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis; The study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation*, 2001;103:919
- 541 Brown B, Zhao X, Chait A, Fisher L. Simvastatin and Niacin, Antioxidants Vitamins, or the Combination for the Prevention of Coronary Disease. *The New England Journal of Medicine*, 2001;345:1583-1592
- 542 Cheung M, Zhao X, Chait A, Albers J. Antioxidant supplements block the response of HDL to simvastatin-niacin in patients with coronary artery disease and low HDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:1320

- 543 Arrol S, Mackness I, Durrington N. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesterol ester transfer activity. *Atherosclerosis*,2000;150:129-134
- 544 Evans W, Shaten J, Day W, Kuller H. for the MRFIT Research Group. Prospective association between lipid soluble antioxidants and coronary heart disease in men: The Multiple Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiolo.*,1998;147:180-186
- 545 Jackson P, Loughrey M, Lighbody H,Mc Namee P. Effect of haemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin. Chem*,1995;41:1135
- 546 Loughrey M, Young S, Lightbody H, McMaster D, McNamee P. Oxidative stress in hemodialysis. *Q.J.Med.*,1994;87:679
- 547 Westhuyzen J, Adama E, Fleming A,. Evidence for oxidative stress during in vitro dialysis. *Nephron*,1995;70:49-54
- 548 Dasgupta A, Hussain S, Ahmad S. Increased lipid peroxidation in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron*,1992;60:56-59
- 549 Daschner M, Lenhartz H, Botticher D. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels. *Kidney International*,1996 ;50 :1268-1272
- 550 Haklar G, Yegenaga I, Yalcin S. Evaluation of stress in chronic hemodialysis patients is use of different parameter. *Clin Chim Acta*,1992;234:1394-1399
- 551 McEneny J, Loughrey M,McNamee T. Susceptibility of VLDL to oxidation in patients on regular haemodialysis *Atherosclerosis*,1997;129:215-220
- 552 Panzetta O, Cominacini L, Garbin U. Increased susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients on maintenance haemodialysis:effects of fish oil and vitamin E administration. *Clin Nephrol*,1995;44:303-309
- 553 Maggi E, Bellazi R, Falaschi F. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: are additional mechanisms for accelerated atherosclerosis? *Kidney International*,1994;45:876-883
- 554 Islam K, O'Byrne D, Devaraj S,Palmer B. Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysistherapy. *Atherosclerosis*,2000;150:217-224
- 555 Takanami Y, Iwane H, Kawai Y, Shimomitsu T. Vitamin E supplementation and endurance exercise. *Sports Medicine*,2000;29:73-83
- 556 Dillard J, Litov E, Savin M. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol*,1978;45:927-932
- 557 Sumida S, Yanaka H. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int J Biochem*,1989;21:835-838
- 558 Viinikka L, Vuori J, Ylikorkala O. Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise. *Med Sci Sports Exerc*,1984;16:275-277
- 559 Rokitzki L, Logemann E, Sagredos N. Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta Physiol Scand*,1994;151:149-158
- 560 Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:1681
- 561 Takanami Y, Iwane Y. Vitamin E supplementation prevents low density lipoprotein from oxidative modification induced by maximal exercise. *Med Sci Sports Exerc*,1994;26:S7
- 562 Kawai Y, Katsumura T, Takanami Y. The effect of prolonged exercise on the formation of oxidized LDL and total antioxidant capacity in serum. *Descent sports sci*, 1998;19:229-238
- 563 Simons L, Konigsmark M, Simons J, Stocker R. Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. *Atherosclerosis*,1999; 143:193-199
- 564 Koh K, Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R. Vascular effects of estrogen and vit E therapies in postmenopausal women. *Circulation*,1999;100:1851-1857
- 565 Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilatation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol*,1998;32:1672-1679
- 566 Heitzer T, Yla Hertuala S, Wild E, Luoma J. Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *J Am Coll Cardiol*,1999;33:499-505
- 567 Green D, O'Driscoll G, Rankin M, Maiorana J. Beneficial effect of vitamin E administration on nitric oxide function in subjects with hypercholesterolaemia. *Clin Sci*, 1998;95:361-367
- 568 Keaney F, Gaziano M, Xu A, Frei B. Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*.1993;90:11880-11884
- 569 Keaney F, Gaziano M, Xu A, Frei B. Low-dose alpha tocopherol improves and high dose alpha tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol fed rabbits. *J Clin Invest*,1994;93:844-851
- 570 Gaziano M. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Proc Assoc Am Physicians*,1999;111:2-9

-
- 571 Zieske E, Takei H, Fallon B. Smoking and atherosclerosis in youth. *Atherosclerosis*,1999;144:403-408
- 572 Steinberg D, Lewis A. Connor memorial lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*,1997;95:1062-1071
- 573 Eiserich P, Vliet A, Handelman G, Halliwell B. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *American Journal of Clinical Nutrition*,1995;62:1490S-1500S
- 574 Hoshino E, Shariff R, Gossum A, Allard J. Vitamin E suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1990;14:300-305
- 575 Habib M, Clements N, Garewal H. Cigarette smoking and ethane exhalation in humans. *Am J Respir Crit Care Med*,1995;151:1368-1372
- 576 Do B, Garewal H, Clements N, Peng Y. Exhaled ethane and peroxidation vitamin supplements in active smokers. *CHEST*, 1996;110:159-164
- 577 Habib M, Tank L, Lane L, Garewal H. Effect of vitamin E on exhaled ethane in cigarette smokers. *CHEST*,1999;115:684-690
- 578 Reilly M, Delanty N, Lawson J, FitzGerald G. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*,1996;94:19-25
- 579 Patrignani P, Panara M, Tacconelli S, Seta F. Effects of vitamin E supplementation on F2-Isoprostane and Thromboxane biosynthesis in healthy cigarette smokers. *Circulation*,2000;102:539
- 580 Mol M, Rijke Y, Rijke Y, Demacker P, Stalenhoef A. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetics mellitus and cigarette smoking: effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis*,1997;129:169-176
- 581 Martin A, Foxall T, Blumberg B, Meydani M. Vitamin E inhibits low density lipoprotein induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997;17:429-436
- 582 Kwiterovich O. The effect of dietary fat, antioxidants, and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. *J Am Diet Assoc*,1997;97(7suppl):S31-S41
- 583 Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997;17:1583-1590
- 584 Stocker R, Bowry W, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA*,1991;88:1646-1650
- 585 Carr C, Tijerina T, Frei B. Vitamin C protects and reverses specific hypochlorous acid and chloramin dependent modifications of low-density lipoprotein. *Biochem J*,2000;346:491-499
- 586 Retsky L, Freeman W, Frei B. Ascorbic acid oxidation products protect human low density lipoprotein against atherogenic modification: anti rather prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J. Biol Chem.*,1993;268:1304-1309
- 587 Frei B, England L, Ames N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma: *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;86:6377-6381
- 588 May M, Cobb E, Mendiratta S, Hill E. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, 1998;273:23039-23045
- 589 Park B, Levine M. Purification cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils: identification as glutaredoxin. *Biochem J*. 1996;315:931-938
- 590 Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*,1996;94:6-9
- 591 Ting H, Timimi K, Haley A, Roddy A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation*, 1997;95:2617-2622
- 592 Levine N, Frei B, Koulouris N, Gerhard D. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*,1996;93:1107-1113
- 593 Heitzer T, Schlinzig T, Krhon K, Meinertz T. Endothelial dysfunction, Oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 2001;104:2673
- 594 Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem.*,1994;269:9397-9400
- 595 Stamler S, Singel J, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science*,1992;258:1898-1902
- 596 Huang A, Vita A, Venema C, Keaney F. Ascorbic acid enhances endothelial nitric activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.*,2000;275:17399-17406
- 597 Indik J, Goldman S, Gaballa M. Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2001;281:H1767-H1770
- 598 Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. *Circulation*,2002;106:3073

-
- 599 Ellis G, Anderson R, Lang D, Blackman D. Neutrophil superoxide anion generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short and long term vitamin C therapy. *Journal of the American College of Cardiology*,2000;36:1474-1482
- 600 Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 1998;97:363-368
- 601 Ellis R, Anderson A, Chirkov Y, Morris J. Acute effects of vitamin C on platelet responsiveness to nitric donors and endothelial function in patients with chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*.,2001;37:564-570
- 602 Richartz M, Werner S, Ferrari M, Figulla R. Reversibility of coronary endothelial vasomotor dysfunction in idiopathic dilated cardiomyopathy: acute effects of vitamin C. *Am J Cardiol*.,2001;88:1001-1005
- 603 Silvestro A, Scopacasa F, Oliva G, de Cristofaro T. Vitamin C prevents endothelial dysfunction induced by acute exercise in patients with intermittent claudication. *Atherosclerosis*,2002;165:277-283
- 604 Williams J, Sutherland H, McCormick P, de Jong A. Vitamin C improves endothelial dysfunction in renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*.,2001;16:1251-1255
- 605 Nightingale K, Blackman J, Field R, Glover J. Role of nitric oxide and oxidative stress in baroreceptor dysfunction in patients with chronic heart failure. *Clin. Sci.* ,2003;104:529-535
- 606 Mak S, Egri Z, Tanna G, Colman R. Vitamin C prevents hyperoxia-mediated vasoconstriction and impairment of endothelium-dependent vasodilatation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.,2002;282:H2414-H2421
- 607 Pleiner J, Schaller G, Mittermayer F, Bayerle-Eder M. FFA-induced endothelial dysfunction can be corrected by vitamin C. *J. Clin Endocrinol Metab*.,2002;87:2913-2917
- 608 Rossig L, Hoffmann J, Hugel B, Mallat Z. Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation*,2001;104:2182
- 609 Vitamin C Augments the Inotropic Response to Dobutamine in Humans With Normal Left Ventricular Function. *Circulation*,2001;103:826-830
- 610 Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*,2001;104(22):2673-2678
- 611 Hamabe A, Takase B, Uehata A, Kurita A. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in the brachial artery in variant angina pectoris and the effect of intravenous administration of vitamin C. *Am J Cardiol*.,2001;87:1154-1159
- 612 Singh B, Niaz A, Kumar R, Bishnoi I. Plasma levels of antioxidant vitamins and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol*.,1994;49:441-452
- 613 Morel O, Jesel L, Hugel B, Douchet MP. Protective effects of vitamin C on endothelium damage and platelet activation during myocardial infarction in patients with sustained generation of circulating microparticles. *J Thromb Haemost*.,2003;1:171-177
- 614 Enstrom E, Kanim E, Klein A. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology*,1992;3:194
- 615 Kushi H, Folsom R, Prineas J. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med*, 1996;334:1156
- 616 Nyyssonen K, Parviainen T, Salonen R. Vit C deficiency and risk of myocardial infarction: Prospective population study of men from eastern Finland. *BMJ*,1997;314:634
- 617 Blot J, Li Y, Taylor R, Guo W. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst*.,1993;85:1483-1492
- 618 Kritchevsky B, Shimakawa T, Tell S. Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC Study. *Circulation*,1995;92:2142
- 619 Hodis N, Mack J, LaBree L. Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA*,1995;273:1849
- 620 Fang C, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomized trial. *Lancet*,2002;359:1108-1113
- 621 Diplock A. Safety of antioxidant vitamins and Beta-carotene. *Am J. Clin Nutr*,1995;62:1510S-1516S
- 622 Lavy A, Ben-Amotz A, Aviram M. Preferential inhibition of LDL oxidation by The all-trans isomer of beta-carotene in comparison to the 9-cis-beta-carotene. *Eur J Clin Chem CLIN biochem*,1993;31:83-90
- 623 Levy Y, Ben-Amotz A, Aviram M. Effect of dietary supplementation of different beta-carotene isomers on lipoprotein oxidative modification. *J Nutr Med*,1995;5:13-22
- 624 Ben-Amotz A, Levy Y. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans beta-carotene in human serum. *Am J Clin Nutr* ,1996;63:729-734

-
- 625 Levy Y, Zaltsberg H, Ben-Amotz A, Kanter Y. Dietary supplementation of a natural isomer mixture of beta carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2000;44:54-60
- 626 Stahl W, Scharz W, Sies H: Human serum concentration of all-trans beta-carotene and alpha-carotene but not 9-cis-beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina*. *J Nutr*, 1993;123:847-851
- 627 Lidebjer C, Leanderson P, Enerudh J, Jonasson L. Low plasma levels of oxygenated carotenoids in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17:448-56.
- 628 Rimm Eb, Stampfer MJ, Ascherio A. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, 1993;328:1450
- 629 Kardinaal F, Kok J, Ringstad J. Antioxidants in adipose tissue and the risk of myocardial infarction. The EURAMIC Study. *Lancet*, 1993;342:1379
- 630 Street A, Comstock W, Salkeld M. Serum antioxidants and myocardial infarction: Are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation*, 1994;90:1154
- 631 Kohlmeier L, Kark D, Gomez-Gracia E. Lycopene and myocardial infarction risk in EURAMIC Study. *Am J Epidemiol*, 1997;146:618
- 632 Klipstein-Grobusch K, Geleijnse JM, den Breeijen H, Boeing H. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr*. ,1999;69:261-266
- 633 The ATBC: the effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and others cancers in male smokers. *N Engl J Med*, 1994;330:1029
- 634 Virtamo J, Rapola M, Ripatti S. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch Intern Med*, 1998;158:668
- 635 Greenberg R, Baron A, Karagas R. Mortality associated with low plasma concentration of beta carotene and the effect of oral supplementation. *JAMA*, 1996;275:699
- 636 Omenn S, Goodman E, Thornquist D. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 1996;334:1150.
- 637 Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997;17:1583-1590
- 638 Redlich C, Chung J, Cullen M, Blaner W. Effect of long-term beta-carotene and vitamin A on serum cholesterol and triglyceride levels among participants in the Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET). *Atherosclerosis*, 1999;145:425-432
- 639 Hennekens H, Buring E, Manson E. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 1996;334:1145
- 640 Kostic D, White S, Olson A. Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr*, 1995;62:604
- 641 Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2002;360:23-33.
- 642 Hercberg S, Preziosi P, Faure H, Arnaud J. The SU.VI.MAX Study: a primary trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers. *Food Chem Toxicol*. 1999;37:925-930
- 643 Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*. 2004;164:2335-42
- 644 Vivekananthan P, Penn S, Sapp K, Hsu A. Use of antioxidants for the prevention of cardiovascular disease: metaanalysis of randomised trials. *Lancet*, 2003;361:2017-2023
- 645 Manson E, Gaziano M, Spelsberg A, Ridker M. A secondary prevention trial of antioxidant vitamins and cardiovascular disease in women. Rationale, design, and methods. The WACS Research Group. *Ann Epidemiol*. , 1995;4:333-335
- 646 Bassuk S, Albert M, Cook R, Zaharris E. The women's antioxidant cardiovascular study: design and baseline characteristics of participants. *J Womens Health (Larchmt)*, 2004;13: 99-117
- 647 Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Zaharris E. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med*. 2007;167:1610-8
- 648 Rexrode M, Lee M, Cook R, Hennekens H. Baseline characteristics of participants in the Women's Health Study. *J Womens Health Gen Based Med*. 2000;9:19-27
- 649 Asplund K. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease—a systematic review. *J Intern Med*. , 2002;251:372-392

- 650 Manson E, Bassuk S, Stampfer J. Does vitamin E supplementation prevent cardiovascular events?. *J Womens Health*, 2003;12:123-136
- 651 Pruthi S, Allison G, Hensrud D. Vitamin E supplementation in the prevention of coronary heart disease. *Mayo Clinic Proc.*, 2001;76:295
- 652 Kita T, Nagano Y, Yokode M, Ishii K. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 1987;84:5928-5931
- 653 Hodis H, Hashimoto S, Mack W, Sevanian A. Probucol reduces oxysterol formation in hypertensive rabbits. *Hypertension*, 2000;36:436-441
- 654 Witting K, Pettersson K, Letters J, Stocker R. Site-specific antiatherogenic effect of probucol in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000;20:26-33
- 655 Zhang S, Reddick R, Avdievich E, Surlis L. Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, 1997;99:2858-2866
- 656 Johanson J, Olsson A, Bergstrand L, Schafer L. Lowering of HDL2b by probucol partly explains the failure of the drug to affect femoral atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995;15:1049-1056
- 657 Anderson J, Meridith B, Yeung C, Frei B. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium dependent coronary vasomotion. *New England Journal of Medicine*, 1995;332:488-493
- 658 Kamei M, Fujita T, Ranke T, Sasaki K. The distribution and content of ubiquinone in foods. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1986: 56:57
- 659 Ghirlanda G, Oradei A, Manto A, Lippa S. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Pharmacol.*, 1993;33:226-229
- 660 Kishi T, Okamoto T, Kishi H, Okada A. Serum levels of Coenzyme Q10, in patients receiving total parenteral nutrition and relationship to serum lipids. In: *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*. Vol 5. Folkers K, Yamamura Y. Eds Elsevier, p119, 1986
- 661 Kishi T, Watanabe T, Folkers K. Bioenergetics in clinical medicine. VII. Prevention by forms of coenzyme Q of the inhibition by Adriamycin of CoQ enzymes in mitochondria of the myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1976;73:4653
- 662 Takeshige K, Takayanagi K, Minakami S. Reduced CoQ as antioxidant of lipid peroxidation in bovine heart mitochondria. In *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*. Vol 2. Folkers K, Yamamura Y. Eds Elsevier, pp. 15-26, 1980
- 663 Battino M, Ferri E, Gattavecchia E, Sassi S. CoQ as a possible membrane protecting agent against Y-irradiation damages. In *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*. Vol 2. Folkers K, Yamamura Y. Eds Elsevier, pp. 15-26, 1980
- 664 Kishi Y, Takahasi K, Mayumi T, Hama T. Protective effect of Coenzyme Q on adriamycin toxicity in beating heart cells. In *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*. Vol 6. Folkers K, Yamagami T. Eds Elsevier, pp. 181-190, 1991.
- 665 Myers E, McGuire P, Liss H, Grotsmyer K. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 1977;194:165
- 666 Judy V, Hall M, Dugan W, Toth D. Coenzyme Q10 reduction of adriamycin cardiotoxicity. In: *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*. Vol 4. Folkers K, Yamamura Y. Eds Elsevier, pp. 231-240, 1984
- 667 Crestanello A, Kamelgard J, Lingle D, Mortenson A. Elucidation of a tripartite mechanism underlying the improvement in cardiac tolerance to ischemia by Coenzyme Q10 pretreatment. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996;111:443-450
- 668 Beyer R. An analysis of Coenzyme Q in free radical generation and as antioxidant. *Biochem Cell Biol*, 1992;70:390-403
- 669 Kagan E, Serbinova A, Koynova m, Kitanova A. Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes: *Free Radi. Biol. Med*, 1990;9:117-126
- 670 Mukai K, Kikuchi S, Urano S. Stopped flow kinetic study of the regeneration reaction of tocopheroxyl radical by reduced ubiquinone-10 solution. *Biochim. Biophys Acta*, 1990;1035:77-82
- 671 Yokoyama H, Lingle D, Crestanello J, Kamelgard J. Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery*, 1996;120:189-196
- 672 Playford A, Watts F, Croft D, Burke V. Combined effect of CoQ and fenofibrate on forearm microcirculatory function in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2003;168:169-170
- 673 Witting P, Pettersson K, Letters J, Stocker R. Anti-atherogenic effect of coenzyme Q10 in apolipoprotein E gene knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000;29:295-305
- 674 Ernster I, Forsmark P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.*, 1993;71:S60-S65

-
- 675 Kagan V, Serbinova E, Packer L. Antioxidant effects of ubiquinones and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1990;169:851-857
- 676 Miksicek J. Estrogenic flavonoids:structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995;208:44-50
- 677 Cassidy A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc* ,1996;55:399-417
- 678 Reinli K, Block G. Phytoestrogen content of foods-a compendium of literature values. *Nutr Cancer*,1996;26:123-148
- 679 Hodgson M, Croft D, Puddey B, Mori A. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein in serum. *J Nutr Biochem*,1996;7:664-669
- 680 Ruiz Larrea, Mohan R, Paganga G, Miller J. Antioxidant activity of phytoestrogen isoflavones. *Free Radical Res*, 1997;26:63-70
- 681 Kapiots S, Hermann M, Held I, Seelos C. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17:2868-74
- 682 Wiseman H, O'Reilly J, Lim P, Garnett P. Antioxidant properties of the isoflavone phytoestrogen functional ingredient in soya products. In:Sadler M, Saltmarsh M eds. *Functional foods, the consumer, the products and the evidence*. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 1998:80-86
- 683 Wiseman H, O'Reilly J, Adlercreutz H, Mallet A. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of LDL to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, 2000;72:395-400
- 684 Shishehbor H, Aviles J, Brennan L. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA*,2003;289:1675-1680
- 685 Wassmann S, Laufs U, Muller K. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2002;22:300-305
- 686 Laufs U, La Fata V, Plutzky J. Upregulation of endothelial nitric synthase by HMG CÔA reductase inhibitors. *Circulation*,1998;97:1129-1135
- 687 Wassmann S, Laufs U, Muller K. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2002;22:300-305
- 688 Laufs U, La Fata V, Plutzky J. Upregulation of endothelial nitric synthase by HMG CÔA reductase inhibitors. *Circulation*,1998;97:1129-1135
- 689 Shishehbor M, Brennan M, Aviles R, Fu X. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*, 2003;108:426-431
- 690 Stenvinkel P, Rodriguez-Ayala E, Massy Z, Quresbi A. Statin treatment and diabetes affect myeloperoxidase activity in maintenance hemodialysis patients. *Soc Nephrol*, 2006 ;1 :281-287
- 691 Erdos B, Snipes J, Tulbert C,Katakam P. Rosuvastatin improves cerebrovascular function in Zucker obese rats by inhibiting NAD(P)H oxidase-dependent superoxide production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, March 1, 2006; 290(3): H1264 - H1270
- 692 Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, Nattel S. Effect of Simvastatin and Antioxidant Vitamins on Atrial Fibrillation Promotion by Atrial-Tachycardia Remodeling in Dogs. *Circulation*, 2004; 110(16): 2313 - 2319.
- 693 Deakin S, Leviev I, Guernier S,James R. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increase serum paraoxonase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003;23:2083
- 694 Silva J, Filipe P, Fernandes A, Manso C. Efeito antioxidante de fármacos usados em terapêutica cardiovascular. *Revista Portuguesa de Cardiologia*,1998;17:495-503
- 695 Dailly E. Étude de l' inhibition de la peroxydation lipidique dans le sang humain par diverses molécules endogènes et exogènes. *Ann Pharm Fr*, 2000 ;58 :303-307
- 696 Dailly E, Urien S, Wulfroth P, Tillement P. *Pharmaceutical Research*,1996;13:457-461
- 697 Dailly E, Urien S, Tillement P. *Free radical research*,1998;28:205-214
- 698 Duffy S, Biegelsen E, Holbrook M, Russel J. Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 2001;103:2799
- 699 Malarkey B. The influence of age on endocrine responses to ultraendurance stress. *J Gerontol.*,1993;48:M134-M139
- 700 Morales J. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metabol.*,1994;78:1360-1367
- 701 Shealy N. A review of dehydroepiandrosterone. *Integr. Physiol. Behav. Sci.*,1995;30:308-313
- 702 Coleman D. Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in diabetic mice. *Diabetes*, 1982;31:830-833
- 703 Yen T. Prevention of obesity in Avy/ a mice by dehydroepiandrosterone. *Lipids*,1977;12:409-413

- 704 Bocuzzi G. Opposite effects of dehydroepiandrosterone on the growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinomas. *Anticancer Res.* 1992;12:1479-1483
- 705 Barret Connor E. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 1995;774:259-270
- 706 Barret-Connor. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. *N. Eng. J. Med.*, 1986;315:1519-1524
- 707 Gallo M. Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur. J. Endocrinol.*, 1999;141:35-39
- 708 Aragno M. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999;26:1467-1474
- 709 Khalil A. Dehydroepiandrosterone protects LDL against peroxidation by free radicals produced by gamma-radiolysis of ethanol-water mixtures. *Atherosclerosis*, 1998;136:99-107
- 710 Bocuzzi G. Protective effect of dehydroepiandrosterone against copper-induced lipid peroxidation in the rat. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997;22:1289-1294
- 711 Khalil A. Dehydroepiandrosterone protects LDL against peroxidation by free radicals produced by gamma-radiolysis of ethanol-water mixtures. *Atherosclerosis*, 1998;136:99-107
- 712 Khalil A, Fortin J, LeHoux J, Fulop T. Age related decrease of dehydroepiandrosterone concentrations in LDL and its role in the susceptibility of LDL to lipid peroxidation. *J. Lipid Res.* 2000;41:1552-1561
- 713 Hough L, Zilverman B. Effect of 17 beta estradiol on aortic cholesterol content and metabolism in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis*, 1986;6:57-63
- 714 Adams R, Kaplan R, Manuck B. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-betaestradiol in ovariectomized monkeys. *Arteriosclerosis*, 1990;10:1051-1057
- 715 Sudoh N, Toba K, Akishita M, Ako J. Estrogen Prevents Oxidative Stress-Induced Endothelial Cell Apoptosis in Rats. *Circulation*, 2001;103:724
- 716 Sack M, Rader D, O Cannon III R. Oestrogen and inhibition of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *The Lancet*, 1994;343:269-270
- 717 Muchamal K, Conigrave K, Mittleman M, Camargo C. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *The new england journal of medicine*, 2003;348:109-118
- 718 Lorgeril M, Salen P, Martin J, Boucher F. Wine drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. *Circulation*, 2002;106:1465
- 719 Truelson T, Gronbaek M, Schnohr P, Boysen G. Intake of beer, wine and spirits and risk of stroke; the Copenhagen city heart study. *Stroke*, 1998;29:2467-2472
- 720 Djouné L, Ellison C, Beiser A, Scaramucci A. Alcohol consumption and risk of ischemic stroke. *Stroke*, 2002;33:907
- 721 Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati M. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*, 2002; 105:2836
- 722 Mukamal K, Jensen M, Grønbaek M, Stampfer M. Drinking Frequency, Mediating Biomarkers, and Risk of Myocardial Infarction in Women and Men. *Circulation*. 2005;112:1406-1413
- 723 Hansen S, Marckmann P, Dragsted O, Finne L. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors and other risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr*, 2005;59:449-455
- 724 Fremont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66:663-673
- 725 Vinson, J. A., Teufel, K. & Wu, N. Red wine, dealcoholised red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in hamster model. *Atherosclerosis*, 2001; 156:67-72
- 726 Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*, 2000;101:805-811
- 727 Nigdikar V, Williams R, Griffin A. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr.*, 1998;68:258-265
- 728 Kerry L, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 1997;135:93-102
- 729 Frankel E. N., Kanner J., German J. B., Parks E.. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;341:454-457
- 730 Miyagi Y., Miwa K., Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am. J. Cardiol.* 1997;80:1627-1631
- 731 Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to undergo lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr.*, 1995
- 732 Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*, 1994;334:193-194
- 733 Renaud S, de Lorgeril M. Wine alcohol, platelets and the French paradox. *Lancet*, 1992;339:1523-1526

-
- 734 Lee I, Burckart J. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol.*, 1998;38:981-993
- 735 Blanco-Colio L, Valderrama M, Alvarez-Sala L, Bustos C. Red wine intake prevents nuclear factor-kB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation*, 2000;102:1020
- 736 Feng N, Chen L. Red wine inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression and modestly reduces neointimal hyperplasia after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. *Circulation*, 1999;100:2254-2259
- 737 Xu R, Yokohama H, Irving D. Effect of dietary catechin and vitamin E on aortic fatty streak accumulation in hypercholesterolemic hamsters. *Atherosclerosis*, 1998;137:29-36
- 738 Williams J, Motteram M, Sharp H. Dietary vitamin E and attenuation of early lesion development in modified Watanabe rabbits. *Atherosclerosis*, 1992;94:153-159
- 739 da Luz L, Serrano Júnior V, Chacra P. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. *Exp Mol Pathol.*, 1999;65:150-159
- 740 Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem.* 2005;16:1-8
- 741 Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:299-313
- 742 Ditchl W, Nilsson L, Gonçalves I. VLDL activates nuclear factor-kB in endothelial cells. *Circulation*, 1999;84:1085-1094
- 743 Draczynska-Lusiak B, Chen M, Sun Y. Oxidized lipoproteins activate NF-kB binding activity and apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport.*, 1998;9:527-532
- 744 Chrysohoou C, Pangiotakos B, Pitsavov C. Effects of chronic alcohol consumption on lipid levels, inflammatory and haemostatic factors in the general population: the 'ATTICA' Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2003; 10(5):355-61
- 745 Sierksma A, van der Gaaf S, Kluft C, Hendriks F. Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56(11):1130-6
- 746 Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem.* 2005;16:1-8
- 747 Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:299-313
- 748 Hirano-Olumori R, Takahashi R, Momiyama Y, Taniguchi H. Green tea consumption and serum malondialdehyde-modified LDL concentrations in health subjects. *Journal of the American college of nutrition*, 2005;24:342-346
- 749 Nyssonen K, Porkkala-Sarataho E, Kaikkonen J, Salonen J. Ascorbate and urate are the strongest determinants of plasma antioxidative capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men. *Atherosclerosis*, 1997;130:223-233
- 750 Waring S, Convery A, Mishra V, Shenkin A. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci*, 2003;
- 751 Sevanian A, Davies A, Hochstein P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *A, J. Clin. Nutr.*, 1991;54:1129S-1134S
- 752 Halliwell B, Gutteridge C. The antioxidant of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 1990;280:1-8
- 753 Burton W, Ingold U. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 1986;19:194-201
- 754 Niu X, Zammit V, Upston J, Dean R. Coexistence of oxidized lipids and alpha-tocopherol in all lipoprotein density fractions isolated from advanced human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999;19:1708-1718
- 755 Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of alpha-tocopherol and ascorbate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995;15:1616-1624
- 756 Bowry W, Stocker R. Tocopherol mediated peroxidation. The pro-oxidant effect of vitamin E on the radical initiated oxidation of human low-density lipoprotein. 1993;115:6029-6044
- 757 Witting K, Upston M, Stocker R. The role of alpha tocopheroxyl radical in the initiation of lipid peroxidation in human low density lipoprotein exposed to horseradish peroxidase. *Biochemistry*, 1997;36:1251-1258
- 758 Witting K, Upston M, Stocker R. in *Subcellular Biochemistry: Fat Soluble Vitamins* (Quinn P, Kagan V. eds), London 1998;345-390

- 759 Niki E, Kawakami A, Saito M, Yamamoto Y. Effect of phytyl chain of vit E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.*,1985;260:2191-2196
- 760 Waldeck R, Stocker R. Radical initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins:Insights obtained from kinetic modeling. *Chem. Res. Toxicol.*,1996;9:954-964
- 761 Halliwell B, Gutteridge C. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed., Clarendon, Oxford,1989
- 762 Neuzil J, Thomas R, Stocker R. Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radical Biology Medicine*,1997;22:57-71
- Kagan E, Serbinova A, Koynova M, Kitanova A. Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Radi. Biol. Med*,1990;9:117-126
- 763 Bowry W, Stanley K, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier pf lipid hidroperoxides in fasted human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1992;89:10316-10320
- 764 Mohr D, Stocker R. Radical mediated oxidation of isolated human very low density lipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1994;14:1186-1192
- 765 Neuzil J, Thomas R, Stocker R. Requirement for promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical induced of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Rad Biol. Med.*, 1997;22:57-71
- 766 Traber G, Sokol J, Burton W, Ingold U. Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol- *J. Clin. Invest.* ,1990;85:397-407
- 767 Ziouzenkova O, Sevanian A, Abuja M, Ramos P. Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms. *Free Radical Biology Medicine*, 1998;24:607-623
- 768 Pratico D, e tal. *Nat. Med* ,1998;4:1189-1192
- 769 Witting K, e tal. *FASEB*, 1999;13:667-675
- 770 Killion L, e tal. *Atherosclerosis*, 1996;126:289-297
- 771 Weinberg R, Vander-Werken B, Anderson R, Stegner J. Pro-Oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:1029
- 772 Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *TIBS*, 1999;24:219-223
- 773 Doba T, Burton W, Ingold U. antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C either alone on in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1985;835:298-303
- 774 Bowry W, Mohr D, Cleary J, Stocker R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation of ubiquinol-10 free human low density lipoprotein . *J. Biol.* ,1995;270:5756-5763
- 775 Ingold U, Bowry W, Stocker R, Walling C. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids. The unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by the oxidation of human low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1993;90:45-49
- 776 Phair D, Hammond G, Bowden A, Fried M. A preliminary model for human lipoprotein metabolism in hyperlipoproteinemia. *Federation Proc.*,1975;34:2263-2270
- 777 Stocker R, Frei B. *Oxidants and antioxidants*(sies, H.,Ed.),1991;213-243, Academic Press, London
- 778 Sattler W, Mohr D, Stocker R. Rapid isolation of lipoproteins and assesment of their peroxidation by HPLC postcolumn chemiluminescence. *Methods Enzynol.*,1994;233:469-489
- 779 Jessup W, Mohr D, Gieseg P, Dean T. The participation of nitric oxide in cell and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*,1992;1180:73-82
- 780 Hazell J, Stocker R. Oxidation pf low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem. J.* ,1993;290:165-172
- 781 Ingold U, Bowry W, Stocker R,Walling C. Autooxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids. The unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by the osidation of human low density lipoprotein: *Proc. Natl. Acade. Sci USA*, 1993;90:45-49
- 782 Thomas S, Leichtweis S, Petterson K, Croft K. Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q10 inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2001;21:585
- 783 Thomas R, Neuzil J, Stocker R. Co-supplementation with coenzyme Q prevents the pro-oxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of low-density lipoprotein towards transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,1996;16:687-696
- 784 Stocker R, Bowry W, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoproteins more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991;88:1640-1650
- 785 Stocker R, Suarna C. Extracellular reduction of ubiquinone-1 and -10 by human Hep G2 and blood cells.*Biochem. biophys.Acta.*,1993;1158:15-22

-
- 786 Takahashi T, Yamaguchi T, M Shitashige, Okamoto T. Reduction of ubiquinone lipids by rat liver cytosol and its involvement in the cellular defence system against lipid peroxidation. *Biochem. J.* 1995;309:883-890
- 787 Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin is an efficient co-antioxidant for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 1994;269:16712-16719.
- 788 Thomas R, Witting K, Stocker R. 3-Hydroxyanthranilic acid is an efficient, cell derived co-antioxidant for alpha-tocopherol, inhibiting human low density lipoprotein and plasma lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 1996;271:32714-32721
- 789 Frei B, Stocker R, Ames N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988;85:9748-9752
- 790 Frei B, England L, Ames N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:6377-6381
- 791 Kagan E, Serbinova A, Forte T, Scita G. Recycling of vitamin E in human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 1992;33:385-397
- 792 Sharma K, Buettner R. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Radi. Biol. Med.* 1993;14:649-653
- 793 Rubbo H, Radi R, Anselmi D, Kirk M. Nitric oxide reaction with peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation: greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J Biol Chem*, 2000;275:10812-10818
- 794 Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2002;22:438
- 795 Wang X, Rainwater D, VandeBerg J, Mitchell B. Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:1190-1195
- 796 Woo J, Leung S, Lam C, Ho S. Plasma total antioxidant capacity in an adult Hong Kong Chinese population. *Clinical Biochemistry*, 1997;7:553-557
- 797 Jarvik G, Rozek L, Brophy V, Hatsukami T. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than PON1 192 or PON1 55 genotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000;20:2441-2447
- 798 James R, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 2000;2252-2257
- 799 Savenkova M, Mueller D, Heinecke J. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for initiation of lipid peroxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1994;269:20394-20400
- 800 Hokanson J. Gene-environment interaction in the expression of antioxidant status: a role for genes in the relationship between smoking and coronary disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:1102-1103
- 801 Liao F, Andalibi A, Qiao J, Allayee H. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest*, 1994;94:877-884
- 802 Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P. *Heart*, 2003 ;89 :993-997
- 803 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993;362:801-809
- 804 Wilcox N, Smith M, Williams T, Schwartz M. *J. Clin. Invest*, 1988;82:1134-1143
- 805 Ross R. *Science*, 1990;248:1009-1012
- 806 Barret T, Bendit P. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988;85:2810-2814
- 807 Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in a rabbit endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1993;13:197-204
- 808 Cybulsky MI, Liyama K, Li H. A major role for VCAM-1 but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1255-1262
- 809 De Caterina R, Libby P, Peng HB. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995;96:60-68
- 810 Lee T, Yamamoto C, Feng Y. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2001;276:13847-13851
- 811 Boring L, Gosling J, Cleary M. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 1998;394:894-897
- 812 Qiao H, Tripathi J, Mishra K. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 1997;150:1687-1699

-
- 813 Hansson G, Libby P. The role of the lymphocyte. In: Fuster V, Ross R, Topol E, eds. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. New York, NY: Lippincott-Raven;1996:557-568
- 814 Bjarne O, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiological Reviews*,2003;83:1069-1112
- 815 Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 1999;340:115-126
- 816 Boyle J, Bowyer D, Weissberg P, Bennett M. Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-Ligand/Fas interactions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:1402
- 817 Nieman-Jonsson A, Ares M, Yan Z, Bu D. Increased rate of apoptosis in intimal smooth muscle cells through endogenous activation of TNF receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2001;21:1909
- 818 Libby P, Geng Y-J, Aikawa M. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*.1996;7:330-335
- 819 Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;104:365-372
- 820 Libby P, Simon I. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation*,2001;103:1718-1720
- 821 Collins T, Cibulsky M. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*.,2001;107: 255-264
- 822 Li N, Karin M. Is the NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB*,1999;13:1137-1143
- 823 Brand K. Dysregulation of monocyticNF- κ B by OxLDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1997;17:1901-1909
- 824 Khan V, Parthasarathy S, Alexander W. Modified LDL and its constituents augment cytokine-activated VCAM-1 in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*,1995;95: 1262-1270
- 825 Palmetshofer A, Robson C, Nehls V. Lysophosphatidic acid activates NF- κ B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 1999;82:1532-1537
- 826 Calara F. An animal model to study local oxidation of LDL and its biological effects in the arterial wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1998;18:884-893
- 827 Pueyo E. AgII stimulates endothelial VCAM-1 via NF- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2000; 20:645-651
- 828 Han Y, Runge S, Brasier R. AgII induces IL-6 transcription in vascular smooth cells through pleiotropic activation of NF- κ B transcription factors. *Circ. Res.* 1999; 84:695-703
- 829 Tummala E. AgII induces VCAM-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*, 1999;100:1223-1229
- 830 Schmidt M, Yan D, Wautier L, Stern D. Activation of receptor for AGE : a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Cir Res.*, 1999;84:489-497
- 831 Morigi M. Leukocyte endothelial interaction is augmented by high glucose concentration and hyperglycemia in a NF- κ B dependent fashion. *J.Clin Invest*,1998;101:1905-1915
- 832 Welch N, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Eng J Med*,1998;338:1042-1050
- 833 Outinen A. Homocysteine induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*,1999; 94:959-967
- 834 Speir E, Shihutani T, Yu X, Ferrans V. Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response in human smooth muscle cells to viral infection. *Circ. Res.* 1996;79:1143-1152
- 835 Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway. *J. Clin.Invest.* 2001;107:143-151
- 836 Wang Y, Mayo W, Korneluk G, Goeddel V. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and C-IAP1 and C-IAP2 to suppress caspase-8 induction. *Science*, 1998;281:1680-1683
- 837 Hajra L. The NF- κ B signal transduction pathway in endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad. Sci.*, 2000;97:9052-9057
- 838 Ridker M, Hennekens H, Buring E. C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, 2000;342:836-843
- 839 Ridker M, Rifai N, Stampfer J. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 2000;101:1767-1772
- 840 Harris B, Ferruci L, Tracy P. Association of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 1999;106:506-512
- 841 Ridker M, Rifai N, Pfeffer M. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, 2000;101:2149-2153

-
- 842 Hwang J, Ballantyne M, Sharrett R. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. ARIC study. *Circulation*, 1997;96:4219-4225
- 843 Ridker M, Hennekens H, Roitman B. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*, 1998;351:88-92
- 844 Ridker M, Buring E, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*, 2001;103:491-495
- 845 Kuller H, Tracy P, Shaten J. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol.*, 1996;144:537-547
- 846 Ridker M, Hennekens H, Buring E. C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, 2000;342:836-843
- 847 Tracy P, Lemaitre N, Psaty M. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17:1121-1127
- 848 Ridker M, Buring E, Shih J. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*, 1998;98:731-733
- 849 Koenig W, Sund M, Frohlich M. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*, 1999;99:237-242
- 850 Roivonen M, Viik-Kajander M, Paluso T. Infections, inflammation, and the risk of coronary heart disease. *Circulation*, 2000;101:252-257
- 851 Mendall A, Strachan P, Butland K. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality, and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J*. 2000;21:1584-1590
- 852 Pickup C, Crook A. Is type diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, 1998;41:1241-1248
- 853 Pradhan D, Manson E, Rifai N. C-reactive protein, interleukin 6 and the risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 2001;286:327-334
- 854 Meier-Ewert K, Ridker M, Rifai N. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem*. 2001;47:426-430
- 855 Rifai N, Tracy P, Ridker M. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clin Chem* 1999;45:2136-2141
- 856 Roberts L, Moulton L, Law C. Evaluation of nine automated high sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. *Clin Chem*. 2001;47:418-423
- 857 Macy M, Hayes E, Tracy P. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy adults: implications for reference interval and epidemiologic methods. *Clin Chem.*, 1997;43:52-58
- 858 Torzewski M, Rist C, Mortensen F. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000;20:2094-2099
- 859 Bhakdiz S, Torzewski M, Klouche M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999;19:2384-2354
- 860 Pasceri V, Willerson T, Yeh T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, 2000;102:2165-2168
- 861 Pasceri V, Chang J, Willerson T. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, 2001;103:2531-2534
- 862 Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I. Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Mar;36(3):405-10.
- 863 Zwaka P, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*, 2001;103:1194-1197
- 864 Torzewski M, Rist C, Mortensen F. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000;20:2094-2099
- 865 Wang C, Li S, Weisel R, Fedak P. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation*, 2003;107:1783
- 866 Biasucci M, Liuzzo G, Colizzi C. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J*. 2001;2:164-171

-
- 867 Horne D, Muhlestein B, Carlquist F. Statin therapy, lipid levels, C-reactive protein and the survival of patients with angiographically severe coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1774-1780
- 868 Liuzzo G, Biasucci M, Gallimore R. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *New England Journal of Medicine*, 1994;331:417-424
- 869 Heinisch H, Zanetti R, Comin F, Fernandes L. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1:245-50. [Links](#)
- 870 Cianflone D, Ciccirillo F, Buffon A. Comparison of coronary angiographic narrowing in stable angina pectoris, unstable angina pectoris, and in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1995;76:215-219
- 871 Solberg A, Strong P. Risk factors and atherosclerotic lesions: a review of autopsy studies. *Arteriosclerosis*, 1983;3:187-198
- 872 Francis E, Camp J, Dewberry M. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation*, 1999;99:861-866
- 873 Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 2000;343:1139-1147
- 874 Sabatine S, Morrow A, de Lemos A. Multimarker approach to risk stratification of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation*, 2002;105:1760-1763
- 875 Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003;23:1398
- 876 Ridker M, Stampfer J, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*. 2001;285:2481-1465
- 877 Danesh J, Whincup P, Walker M. Low grade inflammation and coronary heart disease: protective study and updated meta-analyses. *BMJ*, 2000;321:199-204
- 878 Ridker M, Hennekens H, Buring E. C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, 2000;342:836-843
- 879 Ridker M, Glynn J, Hennekens H. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*, 1998;97:2007-2011
- 880 John S. Yudkin; C. D. A. Stehouwer; J. J. Emeis; S. W. Coppack. C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999;19:972-978.)
- 881 Ridker P, Buring J, Shih J, Matias M. Prospective study of CRP and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*, 1998; 98:731-733
- 882 Koenig W, Khuseynova N, Baumert J, Thorand B. Increased concentrations of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2745-51
- 883 Zakai NA, Katz R, Jenny NS, Psaty BM. Inflammation and hemostasis biomarkers and cardiovascular risk in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1128-35.
- 884 Ridker P, Buring J, Cook N, Rifai N. C-Reactive Protein, the metabolic syndrome and the risk of incident cardiovascular events. *Circulation*, 2003;107:391
- 885 Sattar N, Gaw A, Scherbakova O. Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*, 2003; 108:414-419
- 886 Aronson D, Sella R, Sheikh-Ahmad M, Kerner A. A associação entre a boa forma cardiorrespiratória e a PCR em sujeitos com síndrome metabólica. *J Am Coll Cardiol*, 2004;44:2003-07)
- 887 Ridker M, Cook N. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham Risk Scores. *Circulation*, 2004;109:1955-1999
- 888 Ridker M, Cushman M, Stampfer J. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England Journal of Medicine*, 1997; 336:973-979
- 889 Blackburn R, Giral P, Bruckert E, Andre J. Elevated C-reactive protein constitutes an independent predictor of advanced carotid plaques in dyslipidemic subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:1962
- 890 Gonzalez-Gay A, Gonzalez-Juanatey C, Pineiro A, Garcia-Porrua C. High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005;32(7):1219-23

-
- 891 Ridker M, Rifai N, Pfeffer A. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. CARE Investigators. *Circulation*, 1998;98:839-844.
- 892 Ridker M, Rifai N, Pfeffer A. Long term effects of pravastatin on plasma concentration of c-reactive protein. The cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*, 1999;100:230-235
- 893 Ridker M, Rifai N, Lowenthal P. Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation*, 2001;103:1191-1193
- 894 Ridker M, Rifai N, Clearfield M. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *New England Journal of Medicine*, 2001;344:1959-1965
- 895 Albert A, Danielson E, Rifai N. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels. The Pravastatin Inflammation on CRP Evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*, 2001;286:64-70
- 896 Jialal I, Stein D, Balis D. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation*, 2001;103:1933-1935
- 897 Albert A, Danielson E, Rifai N. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels. The Pravastatin Inflammation on CRP Evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*, 2001;286:64-70
- 898 Ridker M, Rifai N, Clearfield M. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *New England Journal of Medicine*, 2001;344:1959-1965
- 899 Downs R, Clearfield M, Weis. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. *JAMA*, 1998;279:1615-1622
- 900 Gussekloo J, Schaap C, Frolich M. C-reactive protein is a strong but nonspecific risk factor of fatal stroke in elderly persons. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000;20:1047-1051
- 901 Ford S, Giles H. Serum C-reactive protein and self-reported stroke: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000;20:1052-1056
- 902 Ridker M, Hennekens H, Buring E. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*, 2000;342:836-843
- 903 Rost S, Wolf A, Kase C. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic and transient ischemic attack: the Framingham Study. *Stroke*, 2001;32:2575-2579
- 904 Engstrom G, Lind P, Hedblad B. Effects of cholesterol and inflammation-sensitive plasma proteins on incidence of myocardial infarction and stroke in men. *Circulation*, 2002;105:2632-2637
- 905 Dijk E, Prins N, Vermeer S, Vrooman H. C-Reactive Protein and Cerebral Small-Vessel Disease-The Rotterdam Scan Study. *Circulation*, 2005; 112: 900-905
- 906 Tanne D, Benderly M, Goldbourt U, Haim M. C-Reactive Protein as a Predictor of Incident Ischemic Stroke Among Patients With Preexisting Cardiovascular Disease. *Stroke*. 2006;37:1720.
- 907 Ridker M, Manson E, Buring E. Homocysteine and risk of cardiovascular disease among postmenopausal women. *JAMA*, 1999;281:1817-1821
- 908 Stampfer J, Malinow R, Willett C. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*, 1992;268:877-881
- 909 Evans W, Shaten J, Hempel D. Homocysteine and risk of cardiovascular disease in Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17:1947-1953
- 910 Chasen-Taber L, Selhub J, Rosenberg H. A prospective study of folate and vitamin B6 and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Coll Nutr.*, 1996;15:136-143
- 911 Ridker M, Hennekens H, Buring E. C reactive protein and the others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N England J Med*. 2000;342:836-843
- 912 Sakkinen P, Abbot D, Curb D. CRP and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol*, 2002;55:445-451
- 913 Ray K, Cannon C, Cairns R, Morrow D. Relação entre os factores de risco não controlados e a concentração da PCR em doentes com síndromes coronárias agudas tratados por terapêutica intensiva com estatinas no ensaio PROVE IT-TIMI 22. *J Am Coll Cardiol*, 2005;46:1417-24
- 914 Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997; 336: 973-979.
- 915 Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000; 342: 836-843.
- 916 Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1959-1965.
- 917 Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1557-1565.
- 918 Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative Observational Study. *JAMA*. 2002; 288: 980-987.

-
- 919 Ridker M, Glynn J, Hennekens H. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*, 1998;97:2007-2011
- 920 Ridker P, Rifai N, Rose L, Buring J. Comparison of c-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *The New England Journal of Medicine*, 2002;347:1557-1565
- 921 Ridker M. Clinical Application of C-Reactive Protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*, 2003;107:363
- 922 Ridker M, Buring E, Shih J. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*, 1998;98:731-733
- 923 Ridker M. Should statin therapy be considered for patients with elevated C-reactive protein? The need for a definitive clinical trial. *Eur Heart J*. 2001;22:2135-2137
- 924 Bohr N. C-Reactive protein- To screen or not to screen? *The New England Journal of Medicine*, 2002;347:1615-1617
- 925 Ridker M. Should statin therapy be considered for patients with elevated C-reactive protein? The need for a definitive clinical trial. *Eur Heart J*, 2001;22:2135-2137
- 926 Mora S, Ridgker PM. Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER); can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention? *Am J Cardiol*, 2006;97 (2A):33A-41A
- 927 Ridker P, Danielson E, Fonseca F, Genest J. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *The New England Journal of Medicine*, 2008;359:2195-2207
- 928 Smith S, Anderson C, Cannon R, Fadl Y. CDC/AHA workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. Application to Clinical and Public Health Practice: Report From the Clinical Practice Discussion Group. *Circulation*, 2004;110:e550-e553
- 929 Luster D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 1998;338:436-445
- 930 Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith K. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res*, 1999;19:91-104
- 931 Wang X, Yue L, Ohlstein H, Sung P. Interferon inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *J Biol Chem*, 1996;242:286-24293
- 932 Adams H, Lloyd R. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, 1997;349:490-495
- 933 Bagglioni M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*, 2002;250:91-104
- 934 Shin S, Szuba A, Rockson G. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis*, 2002;160:91-102
- 935 Aukrust P, Damas K, Gullestad L, Froland S. Chemokines in myocardial failure-pathogenic importance and potential therapeutic targets. *Clin Exp Immunol*, 2001;124:343-345
- 936 Kobusiak-Prokopowicz M, Orzeszko J, Mazur G, Mysiak A. Chemokines and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *European Journal of Internal Medicine*, 2007 ;18 :288-294
- 937 Schechter D, Rollins J, Zhang J, Charo F. Tissue factor is induced by MCP-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem*, 1997;272:28568-28573
- 938 Holm T, Damas JK, Holven K, Nordoy I. CXC-chemokines in coronary artery disease: possible pathogenic role of interactions between oxidized low-density lipoprotein, platelets and peripheral blood mononuclear cells. *J Thromb Haemost*. 2003;1(2):257-62
- 939 Aukrust P, Berge RK, Ueland T, Aaser E. Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(2):485-91.
- 940 Grau AJ, Reis A, Bugge F, Al-Khalaf A. Monocyte function and plasma levels of interleukin-8 in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2001;192(1-2):41-7
- 941 Aukrust P, Berge RK, Ueland T, Aaser E. Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(2):485-91.
- 942 Shin S, Szuba A, Rockson G. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis*, 2002;160:91-102
- 943 Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987;149:755-761
- 944 Alcocer-Varela J, Valencia X. Cytokines in autoimmunity. In *Textbook of the Autoimmune Diseases*, Ed Robert G Lahita, 2000;101-116
- 945 Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I. Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Mar;36(3):405-10.

- 946 Tripathy K, Sinha N, Nityamand S. IL-8 in Takayasu arteritis: plasma levels and relationship with disease activity. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(6 Suppl 36):S27-30
- 947 Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M. Circulating cytokine profile in anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: prediction of outcome? *Mediators Inflamm*. 2004 Aug;13(4):275-83.
- 948 Goldenberg-Cohen N, Kramer M, Bahar I, Monselise Y, Weinberger D. Elevated plasma levels of interleukin 8 in patients with acute anterior ischaemic optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*. 2004 Dec;88(12):1538-40.
- 949 van Aken BE, Reitsma PH, Rosendaal FR. Interleukin 8 and venous thrombosis: evidence for a role of inflammation in thrombosis. *Br J Haematol*. 2002;116(1):173-7.
- 950 Holven KB, Myhre AM, Aukrust P, Hagve TA. Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo. Dependency of xanthomas/xanthelasms, smoking and gender. *Eur Heart J*. 2003;24(19):1756-62
- 951 Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, Kowalska I. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(10):4602-6
- 952 Boekholdt SM, Peters RJ, Hack CE, Day NE, Luben R. IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1503-8.
- 953 Romuk E, Skrzep-Poloczek B, Wojciechowska C, Tomasik A. Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(9):657-61
- 954 Hillis GS, Terregino CA, Taggart P, Killian AJ. Inflammatory cytokines provide limited early prognostic information in emergency department patients with suspected myocardial ischemia. *Ann Emerg Med*. 2003;42(3):337-42
- 955 Mazurov VI, Stvolov SV, Linetskaia NE, Baldueva IA. Levels of anti-inflammatory cytokines interleukin-2, interleukin-8, and soluble interleukin-2 receptor in blood of patients with various forms of ischemic heart disease. *Ter Arkh*. 2001;73(12):14-7
- 956 Aukrust P, Berge RK, Ueland T, Aaser E. Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(2):485-91.
- 957 Grau AJ, Reis A, Bugge F, Al-Khalaf A. Monocyte function and plasma levels of interleukin-8 in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2001;192(1-2):41-7
- 958 Kirk G, Hickman P, McLaren M, Stonebridge PA. Interleukin-8 (IL-8) may contribute to the activation of neutrophils in patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;18(5):434-8.
- 959 Frenette P, Wagner D. Adhesion molecules-Part1. *N Eng J Med*,1996 ;334 :1526-1529
- 960 Li H, Cybulsky I, Gimbrone A, Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am J Pathol*, 1993;143:1551-1559
- 961 Richardson M, Hadcock J, DeReske M, Cybulsky I. Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipidemic and hyperlipidemic diabetic rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis*,1994;14:760-769
- 962 Chae Tu, Lee RT, Rifai N, Ridker M. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension*, 2001;38:399-403
- 963 Ridker M, Hennekens H, Roitman-Johnson B, Stampfer J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*,1998;351:88-92
- 964 Hwang J, Ballantyne M, Sharrett R. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: ARIC study. *Circulation*, 1997;96:4219-4225
- 965 Haim M, Tanne D, Boyko V. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention Study. *J Am Coll Cardiol*, 2002;39:1133-1138
- 966 Blankenberg S, Rupprecht J, Bickel C. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 2001;104:1336-1342
- 967 Hwang J, Ballantyne M, Sharrett R. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: ARIC study. *Circulation*, 1997;96:4219-4225
- 968 de Lemos A, Hennekens H, Ridker M. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*,2000;36:423-426
- 969 Ridker M, Buring E, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*,2001;103:491-495

- 970 Malik I, Danesh J, Whincup P. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet*,2001;358:971-976
- 971 Letonturier P. Reação imunitária de mediação celular-mecanismos de imunidade celular. In Guia Prático de Imunologia Geral, Limepsi Editores, 2004
- 972 Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 217-221
- 973 Christen S, Thomas SR, Garner B, Stocker R. Inhibition by interferon gamma of human mononuclear cell-mediated low density lipoprotein oxidation: participation of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *J Clin Invest*. 1994; 93: 2149-2158
- 974 Fong LG, Fong TAT, Cooper AD. Inhibition of mouse macrophage degradation of acetyl low density lipoprotein by interferon-gamma. *Biol Chem*. 1990; 265: 11751-11760
- 975 LaMarre J, Wolf BB, Kittler ELW, Quesenberry PJ, Gonias SL. Regulation of macrophage 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Clin Invest*. 1993; 91: 1219-1224
- 976 Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1β. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 19-27
- 977 Sempowski GD, Derdak S, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon-discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *J Cell Physiol*. 1996; 167: 290-296
- 978 Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon-induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1565-1571
- 979 Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon- enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol*. 2000; 157: 1819-1824
- 980 Gupta S, Pablo A, Jiang X, Wang N. Inf-gamma potentiates atherosclerosis in Apo E knock-out mice. *J Clin Invest*. 1997;99:2752-2761
- 981 Tavakoli N, Harris A, Bao S, Hambly B. Interferon-gamma contributes to neointimal proliferation following arterial angioplasty in a mouse model. *Atherosclerosis (Supplements)*, 2007;8:65
- 982 Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, Warriar RR, Pham N, Fogelman AM, Modlin RL. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2130-2138
- 983 de Boer OJ, van der Wal AC, Verhagen CE, Becker AE. Cytokine secretion profiles of cloned T cells from human aortic atherosclerotic plaques. *J Pathol*. 1999; 188: 174-179
- 984 Profumo E, Buttari B, Tosti ME, Siracusano A. Association of intracellular pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood with the clinical or ultrasound indications for carotid endarterectomy in patients with carotid atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(1):120-6
- 985 Profumo E, Esposito C, Buttari B, Tosti M. Intracellular expression of cytokines in peripheral blood from patients with atherosclerosis before and after carotid endarterectomy. *Atherosclerosis*.2007;191(2):340-7.
- 986 Thornberry A, Bull G, Calaycay R. A novel heterodimeric cysteine protease is required for IL-1 beta processing in monocytes. *Nature*,1992;356:768-774
- 987 Collins T, Cybulsky I. NF-kB:pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*.2001;107:255-264
- 988 Dinarello C. The IL-1 family:10 years of discovery. *FASEB*,1994;8:1314-1325
- 989 Mann D. TNF and viral myocarditis: The fine line between innate and inappropriate immune response in the heart. *Circulation*, 2001;103:626
- 990 Bazzoni F, Beutler B. The TNF ligand and receptor families, *N Engl J Med*,1996;334:1717-1725
- 991 Strasser A, O'Connor L, Dixit M. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*,2000;69:217-245
- 992 Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I. TNF-α plays a protective role in acute viral myocarditis in mice. *Circulation*, 2001;103:743
- 993 Levine B, Kalman J, Mayer, Fillit M. Elevated circulating levels of TNF in severe heart failure. *New England J Medicine*, 1990;323:236-241
- 994 McMurray J, Abdullah I, Dargie H, Shapiro D. Increased concentrations of TNF in cachectic patients with severe heart patients. *Br H Journal*,1991;66:356-358
- 995 Vaddi K, Nicolini A, Metha P, Metha L. Increased secretion of TNF, and interferon gamma by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease: relevance in superoxide anion generation. *Circulation*, 1994;90:694-699
- 996 Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol*. 1995;146:419-428

-
- 997 Mizia-Stec K, Zahorska-Markiewicz B, Mandecki T, Janowska J. Hyperlipidaemias and serum cytokines in patients with coronary artery disease. *Acta Cardiol.* 2003;58:9-15
- 998 Bozkurt B, Torre-Amione G, Warren M, Whitmore J. Results of Targeted anti-TNF therapy with Etanercept(ENBREL) in patients with advanced heart failure. *Circulation*, 2001;103:1044-1047
- 999 Ridker M, Rifan N, Pfeffer M, Sacks F. Elevation of TNF-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, 2000;101:2149-2153
- 1000 Skoog T, Dichtl W, Boquist S. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J*, 2002;23:376-383
- 1001 Alcocer-Varela J, Valencia X. Cytokines in autoimmunity. In *Textbook of the Autoimmune Diseases*, Ed Robert G Lahita, 2000;101-116
- 1002 Luster D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Eng J Med*,1998;338:436-445
- 1003 Van Lenten B, Hama Y, de Beer F. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*,1995;96:2758-2767
- 1004 Ridker M, Rifai N, Stampfer J, Hennekens H. Plasma concentration of IL-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*,2000;101:1767-1772
- 1005 Biasucci M, Liuzzo G, Fantuzzi G. Increasing levels of interleukin(IL)-1ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation*,1999;99:2079-2084
- 1006 Shu J, Ren N, Du JB, Zhang M. Increased levels of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 are of cardiac origin in acute coronary syndrome. *Scand Cardiovasc J.* 2007;41:149-54.
- 1007 Lindmark E, Diderholm E, Wallentin I, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA*,2001;2107-2113
- 1008 Volpato S, Guralnik J, Ferruci L, Balfour J. Cardiovascular disease, IL-6 and risk of mortality in older women. *Circulation*, 2001;103:947
- 1009 Mysliwska J, Wieckiewicz J, Hak L, Siebert J. Interleukin 6 polymorphism corresponds to the number of severely stenosed coronary arteries. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:181-8.
- 1010 Clark C, Kamen R. The human hemopoietic growth factors: *Science*, 1987;236:1229-1237
- 1011 Brizzi F, Garbarino G, Rossi R. Interleukin 3 stimulates proliferation and triggers endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 gene activation of human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1993;91:2887-2892
- 1012 Khew-Goodall Y, Butcher M, Litwin S. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukine-3. *Blood*,1996;87:1432-1438
- 1013 Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.*,1999;340:115-123
- 1014 Dentelli P, Del Sorbo L, Rosso A. Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation. *J Immunol.* 1999;163:2151-2159
- 1015 Brizzi M, Formato L, Dentelli P, Rosso A. Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth cells. *Circulation*, 2001;103:549
- 1016 Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 1995; 378: 88-91
- 1017 Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol.* 1998; 63: 658-664
- 1018 Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 2000; 11: 483-486
- 1019 McInnes IB, Gracie JA, Leung BP, et al. Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today.* 2000; 21: 312-315
- 1020 Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation.* 2001; 104: 1598-1603
- 1021 Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med.* 2002; 195: 245-257
- 1022 Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med.* 2002; 195: 245-257
- 1023 Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, et al. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol.* . 1998; 70: 281-312
- 1024 Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, et al. Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNF-alpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* . 1998; 101: 711-721

- 1025 Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, et al. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 734–739
- 1026 Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ Res.* 2002; 90: E34–E38
- 1027 Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res.* 2001; 89: E41–E45
- 1028 Maffia P, Grassia G, Di Meglio P, Carnuccio R. Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury. *Circulation.* 2006;114:430-7.
- 1029 Jurcut R, Arsenescu I, Puscariu T, Uscatescu V. Is interleukin-18 correlated with endothelial dysfunction and platelet activation in patients with unstable angina? *Rom J Intern Med.* 2005;43:199-209.
- 1030 Yamagami H, Kitagawa K, Hoshi T, Furukado S. Associations of serum IL-18 levels with carotid intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2005; 25:1458-62.
- 1031 Chapman M, McQuillan M, Beilby P, Thompson L. Interleukin-18 levels are not associated with subclinical carotid atherosclerosis in a community population. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS). *Atherosclerosis.* 2006;189:414-9.
- 1032 Zitlik A, Abdullah M, Gerdes N, MacFarlane L. Interleukin-18, the metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:2043-9.
- 1033 Seta Y, Kanda T, Tanaka T, et al. Interleukin 18 in acute myocardial infarction. *Heart.* 2000; 84: 668
- 1034 Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D. Interleukin-18 Is a Strong Predictor of Cardiovascular Death in Stable and Unstable Angina. *Circulation*, 2002;106:24
- 1035 Mallat Z, Henry P, Fressonnet R, Alouani S. Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndromes. *Heart.* 2002;88:467-9.
- 1036 Youssef A, Chang T, Hanq L, Wu J. Level and value of interleukin-18 in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty. *Circ J.* 2007;71:703-8.
- 1037 Kawasaki D, Tsujino T, Morimoto S, Masai M. Plasma interleukin-18 concentration: a novel marker of myocardial ischemia rather than necrosis in humans. *Coron Artery Dis.* 2005;16:437-41.
- 1038 Tiret L, Godefroy T, Lubos E, Nicaud V. Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease. *Circulation.* 2005;112(5):643-50.
- 1039 Chalikias K, Tziakas N, Kaski C, Hatzinikolaou I. Interleukin-18: interleukin-10 ratio and in-hospital adverse events in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis.* 2005;182:135-43.
- 1040 Chalikias K, Tziakas N, Kashi C, Kekes A. Interleukin-18/interleukin-10 ratio is an independent predictor of recurrent coronary events during a 1-year follow-up in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol.* 2007;117:333-9.
- 1041 Nakamura A, Shikata K, Hiramatsu M, Nakatou T. Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28:2890-5.
- 1042 Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Cir Res*, 2001;88:877-887
- 1043 Wang P, Wu P, Siegel I, Egan W. IL-10 inhibits NF-kB activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*, 1995;270:9558-9563
- 1044 O'Sullivan J, Thomas R. CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of Nf-kB. *J Immunol*, 2002;168:5491-5498
- 1045 Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E. Expression of IL-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible NO synthase expression and cell death. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1999;19:611-616
- 1046 Pinderski J, Fischbein P, Subbanagounder G, Fishbein C. Overexpression of IL-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Cir Res*, 2002;90:1064-1071
- 1047 Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V. Protective role of IL-10 in atherosclerosis. *Circ Res*, 1999;85:17-24
- 1048 Pinderski J, Hedrick C, Olvera T, Hagenbaugh A. IL-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1999;19:2847-2853
- 1049 Smith A, Irving D, Sheldon J, Cole D. Serum levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation*, 2001;104:746-749
- 1050 Heeschen C, Dimmeler S, Hamm W, Fichtlscherer S. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;107:2109-14.
- 1051 Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S. Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:44-9.

-
- 1052 Exel E, Gussekloo J, Craen A, Bootsma-van der Wiel A. Inflammation and Stroke-The Leiden 85 plus Study. *Stroke*, 2002;33:1135
- 1053 Tziakas DN, Chalikiakos GK, Kaskas JC, Kekes A. Inflammatory and anti-inflammatory variable clusters and risk prediction in acute coronary syndrome patients: a factor analysis approach. *Atherosclerosis*. 2007;193:196-203.
- 1054 Borkowski P, Robinson J, Kusiak W, Borkowski A. Studies on TGFbeta 1 gene expression in the intima of the human aorta in regions with high and low probability of developing atherosclerotic lesions. *Mod Pathol*,1995;8:478-482
- 1055 Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B. Inhibition of TGF- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*, 2001;89:930-934
- 1056 Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P. TGF- β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2002;22:975-982
- 1057 Virmani R, Kolodgie F, Burke A, Farb A. Inflammation and coronary artery disease. In *Inflammation and cardiac diseases*, Editors Feurstein g, Libby P, Mann D, 2003
- 1058 Huizinga G, van der Plas M, Kroon J. Crystal structure of the A# domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure*,1997;5:1147-1156
- 1059 Lee O, Rieu P, Arnout A. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of the Integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, 1995;80:631-638
- 1060 Nakakura K, Shorthouse A, Zheng B, McCabe M. Long-term survival of solid organ allografts by brief anti-lymphocyte functional-associated antigen-1 monoclonal antibody monotherapy. *Transplantation*, 1996;62:547-552
- 1061 Phipps P. Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000;97:6930-6932
- 1062 Henn V, Slupsky R, Grafe M. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*,1998;391:591-594
- 1063 Mach F, Schonbeck U, Sukhova K. 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;94:1931-1936
- 1064 Alderson R, Armitage J, Tough W. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med.*,1993;178:669-674
- 1065 Lutgens E, Gorelik L, Daemen J. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med* 1999;5:1313-1316
- 1066 Schonbeck U, Mach F, Sukhova G, Galina K. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circulation Research*, 1997;81:448-454
- 1067 Henn V, Slupsky R, Grafe M. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*,1998;391:591-594
- 1068 Garlich C, John S, Schmeiber A, Eskafi S. Upregulation of CD40 and CD40 Ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation*, 2001;104:2395
- 1069 Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Febbo C. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia. *Circulation*, 2002;106:399
- 1070 Mach F, Schonbeck U, Sukhova K. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*,1998;394:200-203
- 1071 Schonbeck U, Sukhova K, Shimizu K, Mach F. Inhibition of CD40 signalling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000;97:7458-7463
- 1072 Aukrust P, Muller F, Ueland T. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. *Circulation*, 1999;100:614-620
- 1073 Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*, 2001;104:2266-2268
- 1074 Heeschen C, Dimmeler S, Hamm W. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Eng J Med*, 2003;348:1104-1111
- 1075 Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*. 1999; 56: 794-814
- 1076 Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tjiburg P, Borden L, Connolly D, Stern D, Kao J. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*. 1993; 81: 2767-2773
- 1077 Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res*. 1998; 83: 832-840

- 1078 Gille H, Kowalski J, Li B, Moffat B, Zioncheck T, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 and KDR: a reassessment using novel highly receptor-specific VEGF mutants. *J Biol Chem*. 2000; 276: 3222–3230
- 1079 Groszek E, Grundy SM. The possible role of the arterial microcirculation in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Chronic Dis*. 1980; 33: 679–684
- 1080 Lee RT, Libby P. The instable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 1859–1867
- 1081 Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol*. 1999; 188: 189–196
- 1082 McCarthy MJ, Loftus IM, Thompson MM, Jones L, London NJ, Bell PR, Naylor AR. Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg*. 1999; 30: 261–268
- 1083 Brasen J, Kivela A, Roser K, Rissanen T. Angiogenesis, Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor-BB Expression, Iron Deposition, and Oxidation-Specific Epitopes in Stented Human Coronary Arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001;21:1720
- 1084 Bassus S, Herkert O, Kronemann N, Grolach A. Thrombin Causes Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells: Role of Reactive Oxygen Species. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2001; 21: 1550-1555
- 1085 Asselbergs FW, de Boer RA, Diercks GF, Langeveld B. Vascular endothelial growth factor: the link between cardiovascular risk factors and microalbuminuria? *Int J Cardiol*. 2004;93(2-3):211-5
- 1086 Panatsopoulos D, Papalambros E, Sigala F, Zafiroopoulos A. Protein and mRNA expression levels of VEGF-A and TGF-beta1 in different types of human coronary atherosclerotic lesions. *Int J Mol Med*. 2005;15(4):603-10
- 1087 Papalambros E, Sigala F, Georgopoulos S, Panou N. Vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 expression in human carotid atherosclerotic plaques: relationship with plaque destabilization via neovascularization. *Cerebrovasc Dis*. 2004;18(2):160-5
- 1088 Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T. Vascular Endothelial Growth Factor-Expressing Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Acute Myocardial Infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25:1168
- 1089 Couturier C, Brouillet A, Couriaud C, Koumanov K. IL1Beta induces type II-secreted phospholipase A2 gene in vascular smooth muscle cells by a NFkB peroxisome proliferators activated receptor mediated process. *J Biol Chem*, 1999; 274:23085-23093
- 1090 Packard J, O'Reilly S, Caslake J. Lipoprotein associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*, 2000;343:1148-1155
- 1091 Blake J, Dada N, Fox C, Manson E. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol*, 2001;38:1302-1306
- 1092 Oei H, Meer I, Hofman A, Koudstaal P. Lipoprotein associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke. *Circulation*, 2005;111:570-575
- 1093 Lavi S, McConnell J, Rihal C, Prasad A. Local production of Lipoprotein-associated Phospholipase A2 and Lysophosphatidylcholine in the coronary circulation. *Circulation*, 2007;115:2715-2721
- 1094 Podrez A, Schmitt D, Hoff F, Hazen L. MPO-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest*, 1999;103:1547-1560
- 1095 Zhang R, Brennan L, Fu X. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*, 2001;286:2136-2142
- 1096 Baldus S, Heeschen C, Meinertz T. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2003;108:1440-1445
- 1097 Fu X, Kassim Y, Parks C, Heinecke W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrix metalloproteinase (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 2001;276:41279-41287
- 1098 Bayes-Genis A, Conover A, Overgaard T. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2001;345:1022-1029
- 1099 Shalinsky R, Brekken J, Zou H, McDermott D. Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. *Ann NY Acad Sci*, 1999;878:236-270
- 1100 Witte B, Thornton J, Kiyama T, Efron T. TIMPs and wound healing: A novel enhancer of wound strength. *Surgery*, 1998;124:464-470
- 1101 Sierevolgel J, Pasterkamp G, Velema E, Jaeger T. Oral matrix metalloproteinase inhibition and arterial remodeling after balloon dilation. *Circulation*, 2001;103:302-306

-
- 1102 Dabek j, kulach A, Gasior Z. The role of matrix metalloproteinases in acute coronary syndromes. *European Journal of Internal Medicine*, 2007; 18:463-466
- 1103 Montfort I, Perez-Tamayo R. The distribution of collagenase in normal rat tissues. *J Histochem Cytochem*, 1975;23:910-920
- 1104 Tyagi C, Matsubara L, Weber T. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem*, 1993;26:191-198
- 1105 Coker S, Thomas V, Doscher A. Matrix metalloproteinase expression and activity in adult ventricular myocytes: influence of basement membrane adhesion. *Circulation*, 1997;96:I-689
- 1106 Spinale G, Coker L, Thomas V, Walker D. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure. *Circ Res*, 1998;82:482-495
- 1107 Li Y, Feldma M, Sun Y, McTiernan. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation*, 1998;1728-1734
- 1108 Orbe J, Montero I, Rodriguez JA, Beloqui O. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5:91-7..
- 1109 Kameda K, Matsunaga T, Abe N, Fujiwara T. Increased pericardial fluid level of matrix metalloproteinase-9 activity in patients with acute myocardial infarction: possible role in the development of cardiac rupture. *Circ J*. 2006;70:673-8.
- 1110 Hoffmeister A, Rothenbacher D, Bode G, Persson K. Current Infection with *Helicobacter pylori*, but not Seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* or Cytomegalovirus, Is associated with an Atherogenic, modified lipid profile. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:427-
- 1111 Grunfeld C, Kotler P, Shigenaga K. Circulating interferon-alpha levels and hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, 1991;90:154-162
- 1112 Memon A, Grunfeld C, Moser H. TNF mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology*, 1993;132:2246-2253
- 1113 Memon A, Feingold R, Moser H. Differential effects of interleukin-1 and TNF on ketogenesis. *Am J Physiol*, 1992;263:E301-E309
- 1114 Nonogaki K, Moser H, Pan M. Lipoteichoic acid stimulates lipolysis and hepatic triglyceride secretion in rats in vivo. *J Lipid Res*. 1995;36:1987-1995
- 1115 Feingold R, Staprans I, Memon A. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J Lipid Res*. 1992;33:1765-1776
- 1116 Hardardottir I, Sipe J, Moser H, Fielding J. LPS and cytokines regulate extra hepatic mRNA levels of apolipoproteins during the acute phase response in Syrian hamsters. *Biochim Biophys Acta*, 1997;1344:210-220
- 1117 Feingold R, Grunfeld C. Tumour necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J Clin Invest*, 1987;80:184-190
- 1118 Feingold R, Serio K, Adi S, Moser H. TNF stimulates hepatic lipid synthesis and secretion. *Endocrinology*, 1989;124:2336-2342
- 1119 Feingold R, Soued M, Serio K, Moser H. Multiple cytokines stimulate hepatic synthesis in vivo. *Endocrinology*, 1989;125:267-274
- 1120 Feingold R, Soued M, Staprans I. Effect of TNF on lipid metabolism in the diabetic rat. *J. Clin Invest*, 1989;83:1116-1121
- 1121 Nonogaki K, Fuller M, Fuentes L. IL-6 stimulates hepatic triglycerides secretion in rats. *Endocrinology*, 1995;136:2143-2149
- 1122 Memon A, Holleran M, Moser H. Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1998;18:1257-1265
- 1123 Memon R, Strapanas I, Noor M. Infection and inflammation induce low density lipoprotein oxidation in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, (in press)
- 1124 Stafforini M, McIntyre M, Zimmerman A, Prescott M. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem*, 1997;272:17895-17898
- 1125 Steinbrecher P, Pritchard H. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet activating factor acetylhydrolase. *J lipid Res*, 1989;30:305-315
- 1126 Pruzanski W, Vadas P, Browning J. Secretory non pancreatic group II phospholipase A2: a role in physiologic and inflammatory processes. *J Lipid Mediat*, 1993;8:161-167
- 1127 Leitinger N, Watson D, Hama Y. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis. Potential involvement of biologically active oxidized phospholipids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999;19:1291-1298

-
- 1128 Memon A, Holleran M, Moser H. Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1998;18:1257-1265
- 1129 Feingold R, Hardardottir I, Memon R. Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *J Lipid Res*, 1993;34:2147-2158
- 1130 Schissel L, Tweedie-Hardman J, Rapp H, Graham G. Rabbit aorta and human atherosclerosis lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low density lipoproteins. Proposed role for arterial wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J. Clin Invest*, 1996;98:1455-1464
- 1131 Marathe S, Schissel L, Yellin J. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide mediated cell signaling. *J Biol Chem*, 1998;273:4081-4088
- 1132 Memon A, Holleran M, Uchida Y. Regulation of glycosphingolipid metabolism in liver during the acute phase response. *J Biol Chem*, 1999;274:19707-19713
- 1133 Mukhin N, Chao F, Kruth S. Glycosphingolipid accumulation in the aortic wall is another feature of human atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995;15:1607-1615
- 1134 Chatterjee B, Dey S, Shi Y, Thomas K. Accumulation of glycosphingolipids in human atherosclerotic plaque and unaffected aorta tissues. *Glycobiology*, 1997;7:57-65
- 1135 Cabana G, Siegel N, Sabesin M. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J Lipid Res*, 1989;30:39-49
- 1136 Auerbach J, Parks S. Lipoprotein abnormalities associated with lipopolysaccharide-induced lecithin:cholesterol acyltransferase and lipase deficiency. *J Biol Chem* 1989;264:10264-10270
- 1137 Ettinger H, Miller D, Alberts J, Smith K. Lipopolysaccharide and TNF cause a fall in plasma concentration of lecithin:cholesterol acyltransferase in cynomolgus monkeys. *J Lipid Res*, 1990;31:1099-1107
- 1138 Feingold R, Memon A, Moser H. PON activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis*, 1998;139:307-315
- 1139 Hardardottir I, Kunitake T, Moser H. Endotoxin and cytokines increase hepatic messenger RNA levels and the serum concentrations of apolipoprotein J (clusterin) in Syrian hamsters. *J Clin Invest*, 1994;94:1304-1309
- 1140 Hoffman S, Benditt P. Changes in high density lipoprotein content following endotoxin administration in the mouse. Formation of serum amyloid protein-rich subfractions. *J Biol Chem*, 1982;257:10510-10517
- 1141 Ly H, Francone L, Fielding J. Endotoxin and TNF lead to reduced plasma LCAT activity and decreased hepatic LCAT mRNA levels in Syrian hamsters. *J Lipid Res*, 1995;36:1254-1263
- 1142 Hardardottir I, Moser H, Fuller J, Fielding C. Endotoxin and cytokines serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in Syrian hamsters. *J Clin Invest*, 1996;97:2585-2592
- 1143 Feingold R, Memon A, Moser H, Shigenaga K. Endotoxin and IL-1 decrease hepatic lipase mRNA levels. *Atherosclerosis*, 1999;142:379-87
- 1144 Jiang C, Bruce C. Regulation of murine plasma phospholipid transfer protein activity and mRNA levels by lipopolysaccharide and high cholesterol diet. *J Biol Chem*, 1995;270:17133-17138
- 1145 Howard M, Miller E, Miwa M, Olson S. Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *J Biol Chem*, 1997;272:27543-27548
- 1146 Memon A, Fuller J, Moser H, Feingold R. In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response. *Am J Physiol*, 1999;277:R94-103
- 1147 Khovidhunkit W, Memon A, Shigenaga K. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in HIV infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism* 1999;48:1524-1531
- 1148 Van Lenten J, Hama Y, de Beer C. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effects of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758-2767
- 1149 Feingold R, Memon A, Moser H. PON activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis*, 1998;139:307-315
- 1150 Van Lenten J, Hama Y, de Beer C. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effects of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758-2767
- 1151 EHRENWALD e, Chisolm m, Fox L. Intact ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1994;93:1493-1501
- 1152 Lamb J, Leake S. Acidic pH enables ceruloplasmin to catalyze the modification of low density lipoprotein. *FABS Lett*, 1994;338:122-126

-
- 1153 Chisolm M, Hazen L, Fox L, Cathcart K. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem*,1999;274:25959-25962
- 1154 Manttari M, Manninen V, Huttunen K. Serum ferritin and ceruloplasmin as coronary risk factors. *Eur Heart J*,1994;15:1599-1603
- 1155 Jiang C, Bruce C, Mar J. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest*,1999;103:907-914
- 1156 Johnson J, Bamberger J, Latta A, Rapp E. The bidirectional flux of cholesterol between cells and lipoproteins. Effects of phospholipid depletion of high density lipoprotein. *J Biol Chem*,1986;261:5766-5776
- 1157 Hoffman S, Benditt P. Plasma clearance kinetics of the amyloid-related high density lipoprotein apoprotein, serum amyloid protein (apoSAA), in the mouse. Evidence for rapid apoSAA clearance. *J Clin Invest*, 1983; 71:926-934
- 1158 Kisilevsky R, Subrahmanyam L. Serum amyloid A changes high density lipoproteins cellular affinity. A clue to serum amyloid A principal function. *Lab Invest*, 1992;66:778-785
- 1159 Rosenberg E, Silkensen J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995;27:633-645
- 1160 Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T. Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1998;18:665-672
- 1161 Moulson L, Millis J. Clusterin (ApoJ) regulates vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *J Cell Physiol*, 1999;180:355-364
- 1162 Frothingham C. The relationship between acute infectious diseases and arterial lesions. *Arch Intern Med*. 1911;8:153-162
- 1163 Ross R. Atherosclerosis:an inflammatory disease. *N Engl J Med*.1999;340:115-126
- 1164 Shah K.Plaque disruption and thrombosis:potential role of inflammation and infection.*Cardiol Clin*.1999;17:271-281
- 1165 Nicholson C, Hajjar P. Herpes virus in atherosclerosis and thrombosis:etiologic agents or ubiquitous bystanders. *Arterioscler Thrombo Vasc Biology*.1998;18:339-348
- 1166 Kuvin T, Kimmelstiel D. Infectious causes of atherosclerosis. *Am Heart J*. 1999;137:216-226
- 1167 Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*,1997;96:4095-4103.
- 1168 Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet*,1997;350:430-436
- 1169 Kol A, Bourcier T, Lichtman H. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*. 1999;103:571-577
- 1170 Kopp B, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol*,1999;11:13-18
- 1171 Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann C. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *The New England J of Medicine*,2002;347:185-192
- 1172 Siscovick S, Schwartz M, Corey L. Chlamydia pneumoniae, HSV type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults:the cardiovascular health study. *Circulation*, 2000;102:2335-2340
- 1173 Ridker M, Kundsinn B, Stampfer J. Prospective study of C pneumoniae IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. *Circulation*,1999;99:1161-1164
- 1174 Ridker M, Hennekens H, Buring E. Baseline IgG antibody titers to C pneumoniae, H. pilory, herpes simplex virus, and cytomegalovirus and the risk of cardiovascular disease in women. *Ann Intern Med*.1999;131:573-577
- 1175 Nieto J, Folsom R, Sorlie D. C pneumoniae infection and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 1999;150:149-156
- 1176 Grabczewska Z, Nartwicz E, Kubica J, Rose D. Endothelial function parameters in patients with unstable angina and infection with Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae. *European Journal of Internal Medicine*, 2006;17:339-342
- 1177 Pussinen J, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna S. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1433-9.
- 1178 Pussinen P, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna A. Systemic markers of periodontitis and inflammation in combination predict incident CVD events.*Atherosclerosis (Supplements)*, 2007;8:69
- 1179 Cercek B, Shak PK, Noc M, Zahger D. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2003;361(9360):809-13

- 1180 O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, Muhlestein JB. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2003;290:1459-66
- 1181 Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Parisi AF. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1637-45
- 1182 Cannon C, Braunwald E, McCabe C, Grayston J. Antibiotic Treatment of *Chlamydia pneumoniae* after Acute Coronary Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 2005;352:1646-1654
- 1183 Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M. Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation*, 2001;103:351
- 1184 Roivainen M, Viik-Kajander M, Palosuo T, Toivanen P. Infections, Inflammation, and the risk of coronary heart disease. *Circulation*, 2000;101:252
- 1185 Zhu J, Quyyumi A, Norman E, Csako G. Cytomegalovirus in the pathogenesis of atherosclerosis: the role of inflammation, as reflected by elevated C-reactive protein levels. *JACC*, 1999;34:1738-1743
- 1186 Zhu J, Quyyumi A, Norman J. Effect of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am J Cardiol*, 2000;85:140-146
- 1187 Prasad A, Zhu J, Halcox J, Waclawiw M. Predisposition to atherosclerosis by infections-role of endothelial dysfunction. *Circulation*, 2002;106:184
- 1188 Zhu J, Shearer M, Norman E, Pinto A. Host response to cytomegalovirus infection as a determinant of susceptibility to coronary artery disease: Gender-based differences in inflammation and type of immune response. *Circulation*, 2000;102:2491-2496
- 1189 Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann C. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis. *Circulation*, 2001;103:1064
- 1190 Wong Y-K, Gallagher J, Ward E. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Heart*, 1991;81:231-238
- 1191 Sturfelt G, Eskilsson J, Nived O, Truedsson L. Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus: a study of 75 patients from a defined population. *Medicine*, 1992;71:216-223
- 1192 Manzi S, Meilahn N, Rairie E, Conte G. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham study. *Am J Epidemiol*, 1997;145:408-415
- 1193 Bruce I, Gladman D, Urowitz M. Detection and modification of risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus: A quality improvement study. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 1998;16:435-440
- 1194 Bruce I, Urowitz M, Gladman D. Natural history of hypercholesterolemia in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatology*, 1999;26:2137-2143
- 1195 Ilowite N. Premature atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2000;27 Suppl 58:15-19
- 1196 Ilowite N. Hyperlipidemia and the rheumatic diseases. *Current Opinion in Rheumatology*, 1996;8:455-458
- 1197 Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC. Interferon- α promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood*. 2007;110:2907-15.
- 1198 Lahita G, Rivkin E, Cavanagh I, Romano P. Low levels of total cholesterol, high-density lipoprotein, and apolipoprotein A1 in association with anticardiolipin antibodies with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:1566-1574
- 1199 Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*, 1990;336:177-178
- 1200 McNeil P, Simpson J, Chesterman N, Krilis A. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that induces a lipid binding inhibitor of coagulation: Beta2-glycoprotein I (apo H). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;87:4120-4124
- 1201 Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker C. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*, 1990;335:1544-1547
- 1202 hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T. Involvement of β 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol*, 1997;107:569-573
- 1203 George J, Harats D, Gilburd B, Afek A. Immunolocalization of β 2-glycoprotein I to human atherosclerotic plaques. Potential implications for lesions progression. *Circulation*, 1999;99:2227-2230
- 1204 Amengual O, Atsumi T, Khamashta A, Koike T. Specificity of ELISA for antibody to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1996;35:1239-1243
- 1205 George J, Afek A, Gilburd B, Blank M. Induction of early atherosclerosis in LDL-receptor-deficient mice immunized with beta2-glycoprotein I. *Circulation*, 1998;98:1108-1115

-
- 1206 Afek A, George J, Shoenfeld Y, Gilburd B. Enhancement of atherosclerosis in beta-2-glycoprotein I-immunized apolipoprotein E-deficient mice. *Pathobiology*,1999;67:19-25
- 1207 Kobayashi T, Stang E, Fang S, de Moerloose P. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*,1998;392:193-194
- 1208 Kobaiashy T, Beuchat H, Lindsay M, Frias S. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biology*,1999;1:113-118
- 1209 Amengual O, Atsuni T, Khamasha A, Tinaones F. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol*,1997;36:964-968
- 1210 Cuadrado J, Tinahones F, Camps T, de Ramon E. Antiphospholipid, anti beta2 glycoprotein-I and OxLDL antibodies in antiphospholipid syndrome. *QJM*,1998;91:619-626
- 1211 Romero I, Atsumi T, Tinahones J, Gómez-Zumaquero M. Autoantibodies against malondialdehyde-modified lipoprotein(a) in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*,1999;42:2606-2611
- 1212 Vaarala O, Alftan G, Jauhainen M, Leirisalo-Repo M. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 1993;341:923-925
- 1213 Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher P. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*,1996;98:800-814
- 1214 Horkko S, Olee T, Mo L, Branch W. Anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid antibody syndrome recognize epitopes in both beta2-glycoprotein 1 and oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, 2001;103:941
- 1215 George J, Blank M, Hojnik E, Bar-Meir E. Oxidised low-density lipoprotein (Ox-LDL) but not LDL aggravates the manifestations of experimental antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol*,1997;108:227-233
- 1216 Vaarala O, Puurunen M, Lukka G, Alftan M. Affinity-purified cardiolipin-binding antibodies show heterogeneity in their binding to oxidized low-density lipoprotein. *Clin Exp Immunol*, 1996;104:269-274
- 1217 Steinberg D. LDL oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*,1997;272:20963-20966
- 1218 Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidant in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*,1992;13:241-290
- 1219 Nagy L, Tontonoz P, Alvarez G, Chen H. OxLDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*,1998;93:229-240
- 1220 Rajavashisth B, Andalibi A, Territo C. Induction of endothelial cell expression of GM-CSF by Modified LDL. *Nature*,1990;344:254-257
- 1221 Cushing D, Berliner A, Valente J. Minimally modified LDL induces MCP-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,1990;97:5134-5138
- 1222 Frostegard J, Wu R, Haegerstrand A. Mononuclear leukocytes exposed to OxLDL secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. *Atherosclerosis*,1993;103:213-219
- 1223 Frostegard J, Wu R, Giscombe R. Induction of T cell activation by OxLDL. *Arteriosclerosis and Thrombosis*,1992;12:461-467
- 1224 Stemme S, Faber B, Holm J. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize OxLDL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:3893-3897
- 1225 Zurgil N, Levy Y, Deutsch M. Reactivity of peripheral blood lymphocytes to OxLDL: a novel system to estimate atherosclerosis employing the cellscan. *Clin Cardiol*,1999;22:526-532
- 1226 Virella G, Virella I, Leman B. Anti-OxLDL antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res*,1993;23:95-101
- 1227 Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G. Induction of T cell activation by oxidized LDL. *Arteriosclerosis and Thrombosis*,1992;12:461-467
- 1228 Caspar-Bauguil S, Tkaczuk J, Haure J, Durand M. Mildly OxLDL decrease early production of IL-2 and NF-kB binding to DNA in activated T-lymphocytes. *Biochem J*,1999;337:269-274
- 1229 Frostegard J, Ulfgren K, Nyberg P, Swedenborg J. Secretion of proinflammatory Th1 cytokines in advanced human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*,1999;145:33-43
- 1230 Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A. OxLDL induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci USA*,1990;87:904-908
- 1231 Quinn T, Parthasarathy S, Fong L, Steinberg D. OxLDL: a potential role in recruitment and retention of monocytes/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*,1987;84:2995-2998
- 1232 McMurray F, Partasarathy S, Steinberg D. OxLDL is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest*,1993;92:1004-1008
- 1233 Zhu W, Roma P, Pellegatta F, Catapano L. OxLDL induce the expression of HSP70 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm*,1994;200:389-394
- 1234 Frostegard J, Huang H, Ronnelid J, Schafer-Elinder L. PAF and OxLDL induce immune activation by a common mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc Biol*,1997;17:963-968

-
- 1235 Watson D, Navab M, Hama Y, Sevanian A. Effect of platelet activating factor acetylhydrolase on the formation and action of minimally OxLDL. *J Clin Invest*,1995;95:774-782
- 1236 Huang H, Schafer-Elinder L, Wu R. Lysophosphatidylcholine induces proinflammatory cytokines by a PAF-receptor dependent mechanism. *Clin Exp Immunol*,1999;116:326-331
- 1237 Itabe H, Yamamoto H, Suzuki M. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. *J Biol Chem*,1996;271:33208-33217
- 1238 Horkko S, Bird A, Miller E. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of OxLDL. *J Clin Invest*,1999;103:117-128
- 1239 Dichtl W, Nilsson L, Gonçalves I. VLDL activates nuclear factor-kB in endothelial cells. *Circ Res*. 1999; 84:1085-1094
- 1240 Mackness I, Mackness B, Durrington N. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:319-324
- 1241 Navarro M, Cervera R, Font J, Reverter C. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases:prevalence and clinical significance. *Lupus*,1997;6:521-526
- 1242 Li S, Liu F, Lei Y. Characterization of anti-endothelial cell antibodies in the patients with systemic lupus erythematosus:a potential marker for disease activity.*Clin Immunol and Immunopath*,1996;79:211-216
- 1243 Hill B, Phipps L, Milford-Ward A, Greaves M. Further characterization of anti-endothelial cell antibodies in LED by controlled immunoblotting. *Br J Rheum*,1996;35:1231-1238
- 1244 Frostegard J, Wu R, Haegerstrand C, Lemme C. Antibodies to endothelial cells in borderline hypertension. *Circulation*, 1998;98:1092-1098
- 1245 Yoshio T, Masuyama J, Mimori A, Takeda A. Endothelin-1 release from cultured endothelial cells induced by sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*,1995;54:361-365
- 1246 Meroni PL, Youinou P. Endothelial cell antibodies. In:Peter B, Shoenfeld Y editors. *Autoantibodies*.Amsterdam:Elsevier,1996;245-252
- 1247 Cines B, Pollak S, Buck A, Loscalzo J.Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*,1998;91:3527-3561
- 1248 Vazici A, Behrendt M, Cooper D, Goodfield M. The identification of endothelial cell autoantigens. *J Autoimmun*,2000;15:41-49
- 1249 Hill B, Phipps L, Hughes P, Greaves M. Anti endothelial cell antibodies in primary antiphospholipid syndrome and SLE. Patterns of reactivity with membrane antigens on microvascular and umbilical venous cell membranes. *Br J Haematol*,1998;103:416-421
- 1250 Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara B. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III:beta 2 glycoprotein 1 mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clin Exp Rheumatol*,1995;13:179-185
- 1251 Shibata S, Harpel C, Gharavi A, Rand J. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antitrombin III-trombin complexes. *Blood*,1994;83:2532-2540
- 1252 Renaudineau Y, Révélen R, Bordron A, Mottier D.Two populations of endothelial cell antibodies cross react with heparin. *Lupus*,1998;7:86-94
- 1253 Chan M, Frampton G, Staines A, Hobby P. Different mechanisms by which anti-DNA MoAbs bind to human endothelial cells and glomerular mesangial cells. *Clin Exp Immunol*,1992;88:68-74
- 1254 Mayet J, Csernok E, Szymkowiak C, Gross L. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in WG.*Blood*,1993;82:1221-1229
- 1255 Del Papa N, Guidali L, Buccellati C, Khamashta A. Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Human polyclonal and monoclonal anti-beta2-glycoprotein I antibodies react in vitro with endothelial cells through adherent beta2-glycoprotein and induce endothelial activation. *Arthritis Rheum*,1997;40:551-561
- 1256 Wu R, Svenungsson E, Gunnarsson I, Haegerstrand-Gillis. Antibodies to adult human endothelial cell cross react with OxLDL and B2-glycoprotein I. *Clin Exp Immunol*,1999;115:561-566
- 1257 Lehr A, Seemuller J, Hubner C, Menger D. OxLDL induced leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet-activating factor. *Arterioscler Thrombos*,1993;13:1013-1017
- 1258 Wu R, Lemme C, de Faire U, Frostgard J. Antibodies to platelet activating factor in early cardiovascular disease. *J Internal Med*, 1999;246:389-397
- 1259 Hightower E. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell*,1991;66:191-197
- 1260 Pockley G, de Faire U, Lemme C, Kiessling R. HSP60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension*,2000;36:303-307

-
- 1261 Del Papa N, Tincani A, Balestrieri G, Radice A. Anti-endothelial cell IgG antibodies from patients with WG bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. *Arthritis Rheum*,1996;39:758-766
- 1262 Carvalho D, Savage S, Black M, Pearson D. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderm patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. *J Clin Invest*,1996;97:111-119
- 1263 Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C. The binding of some antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest*,1998;101:2029-2035
- 1264 Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*,1986;55:1151-1191
- 1265 Ang D, Liberek K, Skowrya D, Zylicz M. Biological role and regulation of the universally conserved heat-shock proteins. *J Biol Chem*,1991;266:4233-4236
- 1266 Li G, Li L, Liu Y, Mak J. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-KDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1991;88:1681-1685
- 1267 Williams R, Thomas J, Fina M, German Z. Human Heat Shock Protein Protects Murine Cells from Injury during Metabolic Stress.*J. Clin. Invest.* 1993;92:503-508
- 1268 Benjamin I, Kroger B, Williams S. Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1990;87:6263-6267
- 1269 Plumier J, Ross B, Currie R, Angelidis C. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J. Clin. Invest.*,1995;95:1854-1860
- 1270 Garry F, Ulug T, Bose R. Stress protein induction occurs in eukaryotic cells following infection by diverse viruses in vitro. *Virology*,1983;129:319-332
- 1271 Delcayre C, Sammuel L, Marotte F,Best-Belpomme M.Synthesis of stress proteins in rat cardiac myocytes 2-4 days after imposition of hemodynamic overload. *J. Clin Invest*,1988;82:460-468
- 1272 Donati A, Slosman O, Polla S. Oxidative injury and heat shock response. *Biochem Pharmacol*,1990;40:2571-2577
- 1273 Hutter M, Sievers R, Barbosa V, Wolfe C. Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation*,1994; 89:355-360
- 1274 Fincato G, Polentarutti N, Sica A,Mantovani A. Expression of a heat-inducible gene of the hsp70 family in human myelomonocytic cells:regulation by bacterial products and cytokines. *Blood*,1991;77:579-586
- 1275 Mosser D, Caron A, Bourget L, Denis-Larose C. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 1997;Sept:5317-5327
- 1276 Creagh E, Carmody R, Cotter T. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and independent apoptosis in Jurkat T cells. *Experimental Cell Research*,2000;257:58-66
- 1277 Amberger A, Maczek C, Jurgens G, Michaelis D, Schett G. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and HSP60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins.*Cell Stress Chaperones*,1997;2:94-103
- 1278 Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease?*Immunol Today*, 1995;16:27-33
- 1279 Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscl Thromb*,1992;12:789-799
- 1280 Xu Q, Kleindienst R, Schett G, Waitz W. Regression of arteriosclerotic lesions induced by immunization with heat shock protein 65-containing material in normocholesterolemic, but not hypercholesterolemic, rabbits. *Atherosclerosis*,1996;123:145-155
- 1281 Metzler B, Mayr M, Dietrich H, Singh M. Inhibition of arteriosclerosis by T-cell depletion in normocholesterolemic rabbits immunized with heat shock protein65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 1999;19:1905-1911
- 1282 Xu Q, Willeit J, Marosi M. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*,1993;341:255-259
- 1283 Zhu J, Quyyumi A, Rott D, Csako G. Antibodies to human heat-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease.*Circulation*, 2001;103:1071
- 1284 Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer A. AgII induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thrombo Vasc Biol.* 1999;19:1623-1629
- 1285 Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kB activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*, 1997;95:1532-1541

- 1286 Tummala E, Chen L, Sundell L. AgII induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*, 1999;100:1223-1229
- 1287 Schmidt M, Yan D, Wautier L. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ RES*. 1999;84:489-497
- 1288 Baynes W, Thorpe R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999;48:1-9
- 1289 Kelly S, Steinberger J, Kaiser R, Olson P. Oxidative stress and adverse adipokine profile characterize the metabolic syndrome in children. *J Cardiometab Syndr*. 2006;1:248-52.
- 1290 Hotamisligil S, Arner P, Caro F, Atkinson L. Increase adipose tissue expression of TNF-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 1995;95: 2409-2415
- 1291 Purohit A, Ghilchik W, Duncan L, Wang Y. Aromatase activity and IL-6 production by normal and malignant breast tissue. *J Clin Endocrinol*. 1995;9:2111-2119
- 1292 Yudkin S, Stehouwer D, Emeis J. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1999;19:972-978
- 1293 Thorand B, Baumert J, Chambless L, Meisinger C. Elevated markers of endothelial dysfunction predict type 2 diabetes mellitus in middle-aged men and women from the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(2):398-405.
- 1294 Moldoveanu E, Tanaseanu C, Tanaseanu S, Kosaka T. Plasma markers of endothelial dysfunction in type 2 diabetics. *European Journal of Internal Medicine*, 2006;17:38-42
- 1295 Thorand B, Baumert J, Kolb H, Meisinger C. Sex differences in the prediction of type 2 diabetes by inflammatory markers: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Diabetes Care*. 2007;30:854-60.
- 1296 Ziboh, A. Nutritional modulation of inflammation by polyunsaturated fatty acids/eicosanoids. In: Gershwin M, German J, Keen C, editors. *Nutrition and Immunology: Principles and Practice*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2000. p.257-170
- 1297 Smith W, Borgeat P, Fitzpatrick F. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. In: Vance J Editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Amsterdam: Elsevier, 1991;297-323
- 1298 Habenicht J, Salbach P, Goerig M, Zeh W. The LDL receptor pathway delivers arachidonic acid for eicosanoid formation in cells stimulated by platelet-derived growth factor. *Nature*, 1990;345:634-636
- 1299 Habenicht J, Salbach P, Goerig M, Zeh W. The LDL receptor pathway delivers arachidonic acid for eicosanoid formation in cells stimulated by platelet-derived growth factor. *Nature*, 1990;345:634-636
- 1300 Urban S, Ziesenis S, Werder M, Hauser H. Scavenger receptors BI transfers major lipoprotein associated phospholipids into the cells. *J Biol Chem*, 2000;M004031200
- 1301 Chilton H, Fonteh N, Surette E, Triggiani M. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta*, 1996;1:1-15
- 1302 Chilton H, Murphy C. Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil. *J Biol Chem*, 1996;261:7771-7777
- 1303 Vasta V, Meacci E, Romoti E, Farnararo M. A role for phospholipase D activation in the lipid signalling cascade generated by bradykinin and thrombin in C2C12 myoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1391:280-286
- 1304 Shinoda J, Kozawa O, Suzuki A, Watanabe-Tomita Y. Mechanism of angiotensin II induced arachidonic acid metabolite release in aortic smooth muscle cells: involvement of phospholipase D. *Eur J Endo* 1997;136:207-212
- 1305 Jacobs S, Douglas G. AngII type 2 receptor subtype mediates phospholipase A2-dependent signaling in rabbit proximal tubular epithelial cells. *Hypertension*, 1996;28:663-668
- 1306 Periwal B, Farooq A, Bhargava L, Bhatla N. Effect of hormones and antihormones on phospholipase A2 activity in human endometrial stromal cells. *Prostaglandins*. 1996;51:191-201
- 1307 Renard P, Raes M. The proinflammatory transcription factor NF-kappaB: a potential target for novel therapeutic strategies. *Cell Biology and Toxicology*. 1999;15:341-344
- 1308 Tanaka Y, Amano F, Kishi H, Nishijima M. Degradation of arachidonyl phospholipids catalyzed by two phospholipases A2 and phospholipase C in a lipopolysaccharide-treated macrophage cell line RAW264.7. *Arch Biochem Biophys*. 1989;272:210-218
- 1309 Simopoulos P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*, 1999;70:560S-569S
- 1310 Simopoulos P. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 1999;60:421-429

-
- 1311 Woods K, Thien C, Abramson J. Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*,2000;38:CD001283
- 1312 McCarthy M, Kenny D. Dietary fish oil and rheumatic diseases. *Sem Arthritis Rheumatism*,1992;21:368-375
- 1313 Caughey E, Mantzioris E, Gibson A, Cleland A. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr*,1996;63:116-122
- 1314 Endres S, Ghorbani R, Kelley E, Georgilis K. The effect of dietary supplementation with n-3 PUFA on the synthesis of IL-1 and TNF alpha by mononuclear cells. *New England J Med*,1989;320:265-271
- 1315 Kremer M, Lawrence A, Jubiz W, DiGiacomo R. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis and Rheumatism*,1990;33:810-820
- 1316 Hughes D, Pinder A. n-3 Polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am J Clin Nutr*,2000;71:357S-360S
- 1317 Hughes A, Southon S, Pinder C. n-3 PUFA modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *J Nutr*,1996;126:603-610
- 1318 Hughes A, Pinder C, Piper Z, Johnson T. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *Am J Clin Nutr*,1996;63:267-272
- 1319 Crawford A. Fatty-acid ratios in free-living and domestic animals. Possible implications for atheroma. *Lancet*,1968;1(7556):1329-1333
- 1320 Simopoulos P. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*,1999;60:421-429
- 1321 Kremer J, Lawrence D, Jubiz W, DiGiacomo R. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*,1990;33:810-820
- 1322 Clark W, Parbtani A, Huff M, Spanner E. Flaxseed: A potential treatment for lupus nephritis. *Kidney International*,1995;48:475-480
- 1323 Hall A, Parbtani A, Clark W, Spanner E. Abrogation of MRL/Ipr Lupus Nephritis by Dietary Flaxseed. *American Journal of Kidney Diseases*,1993;22:326-332
- 1324 Padley F, Gunstone F, Harwood J. Occurrence and characteristics of oils and fats. In: Gunstone F, et al, editors. *The Lipid Handbook*,2nd ed. London:Chapman Hull;1986.p.47-223
- 1325 Kremer M, Lawrence A, Jubiz W, DiGiacomo R. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis and Rheumatism*,1990;33:810-820
- 1326 Linos A, Kaklamani G, Kaklamani E, Koumantaki Y. Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables? *Am J Clin Nutr*,1999;70:1077-1082
- 1327 Kobashigawa J, Katznelson S, Laks H, Johnson J. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med*,1995;333:621-627
- 1328 Zhang L, Casey J. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*,1996;65:241-269
- 1329 Goldstein L, Brown S. regulation of the mevalonate pathway. *Nature*,1990;343:425-430
- 1330 Edwards A, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem*,1999;68:157-185
- 1331 Liao J. Isoprenoids as mediators of the biological effects of the statins. *J. Clin. Invest.* 2002;110:285-288
- 1332 Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V. Statin induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL-ApoA-I. *J Clin Invest*, 2001;107:1423-1432
- 1333 Dichtl W, Dulak J, Frick M, Alber H. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2003;23:58-63
- 1334 Yoshida M, Sawada T, Ishii H, Gerszten R. HMG-CoA inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:1165
- 1335 Diomedede L, Albani D, Sottocorno M, Donati M. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2001;21:1327
- 1336 Sparrow P, Burton C, Hernandez M, Mundt S. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:115-121

- 1337 Joukhadar C, Klein N, Prinz M, Schrolnberger C. Similar effects of atorvastatin, simvastatin and pravastatin on thrombogenic and inflammatory parameters in patients with hypercholesterolemia. *Thromb Haemost*,2000;85:47-51
- 1338 Furchgott F. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA*,1996;276:1186-1188
- 1339 Vita A, Treasure B, Nabel G. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*,1990;81:491-497
- 1340 Otsuji S, Nakajima O, Waku S. Attenuation of acetylcholine-induced vasoconstriction by L-arginine is related to the progression of atherosclerosis. *Am Heart J*,1995;129:1094-1100
- 1341 Kugiyama K, Dóí H, Motoyama T. Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation*,1998;97:2519-2526
- 1342 Dóí H, Kugiyama K, Ohgushi M. Membrane active lipids in remnant lipoproteins cause impairment of endothelium-dependent vasorelaxation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,1999;19:1918-1924
- 1343 Schlaich P, John S, Langenfeld W. Does lipoprotein(a) impair endothelial function? *J Am Cardiol*,1998;31:359-365
- 1344 Anderson J, Meredith T, Charbonneau F. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation*,1996;93:1647-1650
- 1345 Toikka O, Ahotupa M, Viikari A. Constantly low HDL-cholesterol concentration relates to endothelial dysfunction and increased in vivo LDL-oxidation in healthy young men. *Atherosclerosis*,1999;147:133-138
- 1346 Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress-Effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation*,2000;101:1002-1006
- 1347 Egashira K, Hirooka Y, Kai H. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*,1994;89:2519-2524
- 1348 Treasure B, Klein L, Weintraub S. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *New Engl J Med*,1995;332:481-487
- 1349 Anderson J, Meredith T, Yeung C. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelial-dependent coronary vasomotion. *New Engl J Med*,1995;332:488-493
- 1350 Gould L, Martucci P, Goldberg I. Short term cholesterol lowering decreases size and severity of perfusion abnormalities by positron emission tomography after dipyridamole in patients with coronary artery disease: A potential noninvasive marker of healthing coronary endothelium. *Circulation*,1994;89:1530-1538
- 1351 Williams K, Sukhova K, Herrington M. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol*,1998;31:684-691
- 1352 Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Lião K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CÔA reductase inhibitors. *Circulation*, 1998;97:1129-1135
- 1353 Endres M, Laufs U, Huang H. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998;95:8880-8885
- 1354 Lehtimäki T, Paiva H, Laakso J, Janatuinen T. Improvement of bvascular reactivity during pravastatin treatment is affected by circulating nitric oxide inhibitor (ADMA) levels in young adults. *Atherosclerosis*,2000;151:208-(abstract)
- 1355 Sivestre S, Levy I. Angiogenesis therapy in ischemic disease. *Arch Mal Coeur*, 2002;95:189-196
- 1356 Takahashi T, Kalka C, Masuda H. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*,1999;5:434-438
- 1357 Kocher A, Schuster D, Szabolcs J. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*,2001;7:430-436
- 1358 Bategay EJ. Angiogenesis. mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med*. 1995; 73: 333-346
- 1359 O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 1994; 145: 883-894
- 1360 Lee RT, Libby P. The instable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 1859-1867
- 1361 McCarthy MJ, Loftus IM, Thompson MM, Jones L, London NJ, Bell PR, Naylor AR. Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg*. 1999; 30: 261-268. [
- 1362 George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J*. 2004;25:1003-8

-
- 1363 Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 2001;103:2885-2890
- 1364 Llevadot J, Murasawa S. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow derived endothelial progenitor cells. *J. Clin Invest*, 2001;108:399-405
- 1365 Walter H, Rittig K, Bahlmann H. Statin accelerates reendothelialization: A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002;105:3017-3024
- 1366 Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004-1010
- 1367 Llevadot J, Murasawa S. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow derived endothelial progenitor cells. *J. Clin Invest*, 2001;108:399-405
- 1368 Dimmeler S, Aicher A, Vasa M. HMG-CoA reductase inhibitors increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001;108:391-397
- 1369 Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, Sugiura S. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *Faseb J*, 2001;15:2530-2532
- 1370 Vincent L, Soria C, Mirshahi F. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in vivo models. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002;22:623-629
- 1371 Park J, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res*, 2002;91:143-150
- 1372 Weis M, Heeschen C, Glassford J, Cooke P. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*, 2002;105:739-745
- 1373 Williams K, Sukhova K, Herrington M. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol*, 1998;31:684-691
- 1374 Wilson H, Herrmann J, Lerman O. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Circulation*, 2002;105:415-418
- 1375 Rosenson S, Tangney C. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA*, 1998;279:1643-1650
- 1376 Lopez S, Peiretti F, Bonardo B, Juhan-Vogue I. Effect of atorvastatin and fluvastatin on the expression of PAI-1 in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2000;152:359-366
- 1377 Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Tho proteins. *Circ Res*, 1998;83:683-690
- 1378 Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H. Statin prevents tissue factor expression in an endothelial cells: role of rho/rho-kinase and Akt pathways. *Circulation*, 2002;105:1756-1759
- 1379 Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17:265-272
- 1380 Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, Rossi F. Atorvastatin and Thrombogenicity of the Carotid Atherosclerotic Plaque: the ATROCAP study. *Thromb Haemost*, 2002;88:41-47
- 1381 Maltese A, Defendini R, Green A, Sheridan M. Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mevinolin, a competitive inhibitor of 3-HMGC_oA reductase. *J Clin Invest*, 1985;76:1748-54
- 1382 Girgert R, Vogt Y, Becke D, Bruchelt G. Growth inhibition of neuroblastoma cells by lovastatin and L-ascorbic acid is based on different mechanisms. *Cancer Lett*, 1999;137:167-172
- 1383 Jani P, Specht S, Stemmler N. Metastasis of B16F10 mouse melanoma inhibited by lovastatin an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Invasion Metastasis*, 1993;13:314-324
- 1384 Rubins B, Greatens T, Kratzke A, Tan T. Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998;157:1616-1622
- 1385 Sumi S, Beauchamp D, Townsend M, Pour M. Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of RAS mutation. *Pancreas*, 1994;9:657-661
- 1386 Van Vliet K, Nègre-Aminou P, Van Thiel F, Bolhuis A. Action of lovastatin, simvastatin, and pravastatin on sterol synthesis and their antiproliferative effect in cultured myoblasts from human striated muscle. *Biochem Pharmacol*, 1996;52:1387-1392
- 1387 Vitol S, Angelin B, Juliusson J. Simvastatin impairs mitogen-induced proliferation of malignant B-lymphocytes from humans-In vitro and in vivo studies. *Lipids*, 1997;32:255-262

-
- 1388 Newman A, Clutterbuck D, DeLord C, Powles L. The sensitivity of leukemic bone marrow to simvastatin is lost at remission: A potential purging agent for autologous bone marrow transplantation. *J Invest Med*,1995;43:269-274
- 1389 Newman A, Clutterbuck D, Powles L, Catovsky D. A comparison of the effect of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors simvastatin, lovastatin and pravastatin on leukaemic and normal bone marrow progenitors. *Leuk Lymphoma*,1997;24:533-537
- 1390 Jakobisiak M, Bruno S, Skierski S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA*,1991;88:3628-3632
- 1391 Addeo R, Altucci L, Battista T. Stimulation of human breast cancer MCF-7 cells with estrogen prevents cell cycle arrest by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*,1996;220:864-870
- 1392 Gray-Bablin J, Rao S, Keyomarsi K. Lovastatin induction of cyclin-dependent kinase inhibitors in human breast cells occurs in a cell cycle-independent fashion. *Cancer Research*,1997;57:604-609
- 1393 Agarwal B, Rao V, Bhendwal. Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology*,1999;117:838-847
- 1394 Tasuta M, Lishi H, Baba M. Suppression by pravastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation, of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Cancer*,1998;77:581-587
- 1395 Jakobisiak M, Bruno S, Skierski S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA*,1991;88:3628-3632
- 1396 Hancock F, Magee L, Childs E, Marshall J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*,1989;57:1167-1177
- 1397 Casey J, Solski A, Der J, Buss E. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA*,1989;86:8323-8327
- 1398 Terada Y, Inoshita S, Nakashima O. Lovastatin inhibits mesangial cell proliferation via p27kip1. *J Am Soc Nephrol*,1998;9:2235-2243
- 1399 Hengst L, Reed I. Translational control of p27kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*,1996;271:1861-1864
- 1400 Hirai A, Nakamura S, Noguchi Y. Geranylgeranylated rho small GTPase are essential for the degradation of p27kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem* 1997;271:13-16
- 1401 Ghosh M, Mott E, Ghosh N. Lovastatin induces apoptosis by inhibiting mitotic and post-mitotic events in cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Acta Mol Cell Res*,1997;1359:13-24
- 1402 Laufs U, Marra D, Node K, Liao J. HMG-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by prevention Rho GTPase induced down regulation of P27kip1. *J Biol Chem*, 1999;274:21926-21931
- 1403 Feleszko W, Balkowiec E, Sieberth E, Marczak M. Lovastatin and tumour necrosis factor- α exhibit potentiated antitumor effects against H α -ras-transformed murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*,1999;81:560-567
- 1404 Vrtovecnik F, Essig M, Iimura O, Friedlander G. Effect of lipid-lowering strategies on tubular cell biology. *Kidney International*, 1999;56:S92-S96
- 1405 Stark W, Blaskovich A, Johnson A. Inhibiting geranylgeranylation blocks growth and promotes apoptosis in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,1998;275:L55-L63
- 1406 Tan A, Levrey H, Dahm C. Lovastatin induces fibroblasts apoptosis in vitro and in vivo-A possibility therapy for fibroproliferative disorders. *Am J Respir Crit Care Med*,1999;159:220-227
- 1407 Agarwal B, Halmos B, Moss F. Lovastatin sensitizes colon cancer HT-29 cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Proc Am Assoc Cancer Res*,1998;39:68
- 1408 Marcelli M, Cunningham R, Haidaeher J. Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res*,1998;58:76-83
- 1409 Guijarro C, Blanco-Colio L, Ortego M, Alonso C. 3HMG CoA reductase inhibitors, induce apoptosis of vascular smooth cells in culture. *Circulation Research*, 1998; 83:490-500
- 1410 Ishikawa S, Kawasumi M. Simvastatin inhibits the cellular signaling and proliferative action of arginine vasopressin in cultured rat glomerular mesangial cells. *Endocrinology*,1995;136:1954-1961
- 1411 Xu Q, McGuire F, Blaskovich A. Lovastatin inhibits the stimulation of MAPK by insulin in HIRcB fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*,1996;326-337
- 1412 Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*,2001;103:993-999

-
- 1413 Laufs U, Marra D, Node K, Liao K. HMG-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down regulation of p27(Kip1). *Biol Chem*,1999;274:21926-21931
- 1414 Downs R, Clearfield M, Weiss S. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels – Results of AFCAPS/TexCAPS.*JAMA*,1998;279:1615-1622
- 1415 Jani P, Specht S, Stemmler N. Metastasis of B16F10 mouse melanoma inhibited by lovastatin an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Invasion Metastasis*, 1993;13:314-324
- 1416 Feleszko W, Zagozdzon R, Golab J, Jakobisiak M. Potentiated antitumour effects of cisplatin and lovastatin against Mm816 melanoma in mice. *Eur J Cancer*,1998;34:406-411
- 1417 Agarwal B, Rao V, Bhendwal. Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology*,1999;117:838-847
- 1418 Pedersen R, Wilhelmsen L, Faergeman O. Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol*,2000;86:257-262
- 1419 Mundy G, Garrett R, Harris S. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*,1999;286:1946-1949
- 1420 Sugiyama M, Kodama T, Konish K, Abe K. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells.*Biochem Biophys Res Commun*,2000;271:688-692
- 1421 Fisher E, Rogers J, Halasy M. Alendronate mechanism of action:geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*,1999;96:133-138
- 1422 Bergstrom D, Bostedor G, Masarachia J, Reszka A. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys*,2000;373:231-241
- 1423 Meier R, Schlienger G, Kraenzlin E, Schlegel B. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures.*JAMA*,2000;283:3205-3210
- 1424 Wang S, Solomon H, Mogun H, Avorn J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients.*JAMA*,2000;283:3211-3216
- 1425 Edwards C, Hart D, Spector T. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women. *The Lancet*,2000;355:2218-2219
- 1426 LaCroix Z, Cauley A, Pettinger M, Hsia J. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med*. 2003;139(2):97-104
- 1427 Rejnmark L, Buus H, Vestergaard P, Heickendorff L. Effects of simvastatin on bone turnover and BMD: a 1-year randomized controlled trial in postmenopausal osteopenic women. *J Bone Miner Res*. 2004; 19(5):737-44.
- 1428 Braatvedt D, Bagg W, Gamble G, Davidson J. The effect of atorvastatin on markers of bone turnover in patients with type 2 diabetes. *Bone*. 2004;35(3):766-70.
- 1429 Liappis P, Kan L, Rochester G. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clin Infect Dis*,2001;33:1352-1357
- 1430 Almog Y. Statins, Inflammation and sepsis. *CHEST*,2003;124:740-743
- 1431 Pliquett RU, Cornish G, Peuler H, Zucker H. Simvastatin normalizes autonomic neural control in experimental heart failure. *Circulation*, 2003;107:2493-2498
- 1432 Pliquett U, Cornish G, Zucker H. Statin therapy restores sympathovagal balance in experimental heart failure. *J Appl Physiol*, 2003;95:700-704
- 1433 Horwich T, MacLellan R, Fonarow G. A terapêutica com estatinas está associada a uma melhoria da sobrevivência na insuficiência cardíaca isquêmica e não isquêmica. *J Amer Coll Cardiol*, 2004;1:717-724
- 1434 Kluff C, Maat M, Leuvens J, Loon B. Statins and C-reactive protein. *The Lancet*,1999 ;353 :1274
- 1435 Munford R. Statins and the acute-phase response, *New England Journal of Medicine*,2001;344:2016-2018
- 1436 Ridker P, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation*,1998;98:839-844
- 1437 Ridker P, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F. Long-term effects of Pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation*,1999;100:230-235
- 1438 Ridker P, Rifai N, Clearfield M, Downs J. Measurement of c-reactive protein for the targeting of statin in the primary prevention of acute coronary events. *The New England Journal of Medicine*, 2001;344:1959-1965
- 1439 Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy S. Effect of HMG CoA reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation*,2001;103:1933-1935

- 1440 Albert M, Danielson E, Rifai N, Ridker P. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels:the pravastatin inflammation /CRP evaluation(PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*, 2001;286:64-70
- 1441 Kinlay S, Schwartz G, Olsson A, Rifai N. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation*, 2003;108:1560-1566
- 1442 Beattie M, Shlipak M, Liu H, Browner W. Proteína C-reactiva e isquemia em utilizadores e não utilizadores de beta-bloqueantes e estatinas; dados do estudo Heart and Soul. *Circulation*, 2003;107:245-250
- 1443 Ridker M, Cannon P, Morrow D, Rifai N. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Eng J Med*, 2005; 352(1):20-8
- 1444 Chan A, Bhatt D, Chew D, Reginelli J. Relation of inflammation and benefit of statins after percutaneous coronary interventions. *Circulation*, 2003;107:1750-1756
- 1445 Kodama Y, Kitta Y, Nakamura T, Takano H. A atorvastatina aumenta a Tirosina Cinase 1 semelhante a FMS soluvel no plasma a e diminui o VEGF e P1GF em associação à melhoria da função ventricular no EAM. *J Am Coll Cardiol*, 2006; 48:43-50
- 1446 Musial J, Undas A, Gajewski P. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *International Journal of Cardiology*,2001;77:247-253
- 1447 Pasceri V, Chang J, Willerson J, Yeh E. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, 2001;103:2531
- 1448 Kibayashi E, Urakaze M, Kobashi C, Kishida M. Inhibitory effect of pitavastatin (NK-104) on the C-reactive-protein-induced interleukin-8 production in human aortic endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*. 2005;108:515-21.
- 1449 Kwak B, Mach F. Statins inhibit leukocyte recruitment-new evidence for their anti-inflammatory properties. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001;21:1256
- 1450 Yoshida M, Sawada T. HMG-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*,2001;21:1165-1171
- 1451 Bernot D, Benoliel M, Peiretti F. Effect of atorvastatin on adhesive phenotype of human endothelial cells activated by tumor necrosis factor alpha. *J Cardiovascular Pharmacol*, 2003;41:316-324
- 1452 Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*,2001;7:687-692
- 1453 Kallen J, Welzenbach K, Ramage P, Geyl D. Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. *J. Mol. Biol.*,1999;292:1-9
- 1454 Weber C, Erl W, Weber K, Weber P. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients. *J Am Coll Cardiol*,1997;30:1212-1217
- 1455 Patti G, Chello M, Pasceri V, Colonna D. A protecção de lesão miocárdica relacionada com o procedimento pela atorvastatina está associada a valores mais baixos de moléculas de adesão após intervenção coronária percutânea. *JAm Coll Cardiol*, 2006;48:1560-1566
- 1456 Park Y, Guijarro C, Kim Y, Massy Z. Lovastatin reduces glomerular macrophage influx and expression of monocytes chemoattractant protein-1 mRNA in nephrotic rats. *American Journal of Kidney Diseases*, 1998;31:190-194
- 1457 Walter H, Rittig K, Bahlmann H. Statin therapy accelerates reendothelialization:A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*,2002;105:3017-3024
- 1458 Schimdt A, Goepfert C, Feitsma K, Buddecke E. Lovastatin stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*,2002;164:57-64
- 1459 Wojciak-Stothard B, Williams L, Ridley J. Monocyte adhesion and spreading an human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J Cell Biol*,1999;145:1293-1307
- 1460 Sadeghi M, Collinge M, Pardi R. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol*,2000;165:2712-2718
- 1461 Kothe H, Dalhoff K, Rupp J, Muller A. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors modify the inflammatory response of human macrophages and endothelial cells infected with chlamydia pneumoniae. *Circulation*, 2000;101:1760
- 1462 Ijeda U, Shimada K. Statins and monocytes. *The Lancet*,1999;353:2070

-
- 1463 Hrboticky N, Draude G, Hapfelmeier G, Lorenz R. Lovastatin decreases the receptor-mediated degradation of acetylated and oxidized LDLs in human blood monocytes during the early stage of differentiation into macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,1999;19:1267-1275
- 1464 Rosenson R, Tangney C, Casey L. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *The Lancet*,1999;353:983-984
- 1465 Brull D, Sanders J, Rumley A, Gordon O. Statin therapy and the acute inflammatory response after coronary artery bypass grafting. *The American Journal of Cardiology*,2001;88:431-433
- 1466 Chello M, Patti G, Candura D, Mastrobuoni S. Effects of atorvastatin on systemic inflammatory response after coronary bypass surgery. *Crit Care Med*, 2006;34(3):660-7
- 1467 Marz W, Winkler K, Nauck M, Bohm B. Effects of Statins on C-reactive protein and IL-6 (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study). *Am J Cardiol*,2003;92:305-308
- 1468 Wiklund O, Mattsson-Hulten L, Hurt-Camejo E, Oscarsson J. Effects of simvastatin and atorvastatin on inflammation markers in plasma. *Journal of Internal Medicine*,2002;251:338-347
- 1469 Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Febbo C. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia-effects of statin therapy. *Circulation*, 2002;106:399
- 1470 Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic S. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expression matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation*, 2001;103:276
- 1471 Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill C. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*, 2001;103:993
- 1472 Corsini A, Pazzucconi F, Arnaboldi L. Direct effects of statins on the vascular wall. *J Cardiovascular Pharmacol*,1998;31:773-778
- 1473 Buemi M, Allegra A, Senatore M. Pró-apoptotic effect of fluvastatin on human smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1999;370:201-203
- 1474 Koh K, Son W, Ahn J, Jin D. Comparative effects of diet and statin on NO bioactivity and matrix metalloproteinases in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,2002;22:e19-e23
- 1475 Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah P, Yano J. O tratamento com pravastatina aumenta o conteúdo de colágeno e reduz o conteúdo lipídico, a inflamação, as metaloproteinases e a morte celular nas placas carotídeas humanas. *Circulation*, 2001;103:926-933
- 1476 Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Zucchelli M. Suppression of the functionally coupled COX2 /PGES as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation*, 2003;107:1479-1485
- 1477 White D, Simes J, Anderson E. Pravastatin therapy and the risk of stroke. *N Eng J Med*,2000;343:317-326
- 1478 Byington P, Davis R, Plehn F. Reduction of stroke events with pravastatin: the Prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project. *Circulation*, 2001;103:387-392
- 1479 Di Napoli M. HMG-CoA reductase inhibitors: a promising approach to stroke prevention. *Neurology*,2000;55:1066-1067-
- 1480 Di Napoli M, Papa F. Inflammation, Statins, and Outcome after ischemic stroke. *Stroke*,2001;32:2446-2447
- 1481 Youssef S, Stuve O, Patarroyo C. The HMG-CoA reductase inhibitors, promotes a TH2 bias and reverse paralysis in central nervous autoimmune disease. *Nature*,2002;420:78-84
- 1482 Weitz Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V. Statins selectively inhibit leukocyte antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*,2001;7:687-692
- 1483 Romano M, Diomedea L, Sironi M. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest*,2000;80:1095-1100
- 1484 Kallen J, Welzenbach K, Ramage P. Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. *J Mol Biol*,1999;292:1-9
- 1485 Youssef S, Stuve O, Patarroyo C. The HMG-CoA reductase inhibitors, promotes a TH2 bias and reverse paralysis in central nervous autoimmune disease. *Nature*,2002;420:78-84
- 1486 Pahan K, Sheikh G, Namboodiri M. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest*,1997;100:2671-2679
- 1487 Stanislaw R, Pahan K, Singh I. Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neurosci Lett*,1999;269:71-74
- 1488 Youssef S, Stuve O, Patarroyo C. The HMG-CoA reductase inhibitors, promotes a TH2 bias and reverse paralysis in central nervous autoimmune disease. *Nature*,2002;420:78-84
- 1489 Kwak B, Mulhaupt F, Myit F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*,2000;6:1399-1402

- 1490 Kwak B, Mulhaupt F, Veillard N, Pelli G. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN-gamma induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Schweiz Med Wochenschr*,2001;131:41-46
- 1491 Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*,2000;12:1399-1402
- 1492 Anderson W, Ellenberg H, Leventhal M. Revised estimate of the prevalence of multiple sclerosis in the United States. *Ann Neurol*,1992;31:333-336
- 1493 Stuve O, Youssef S, Steinman L, Zamvil S. Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Current Opinion in Neurology*,2003;16:393-401
- 1494 Shishehbor H, Brennan L, Aviles J, Penn S. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*, 2003;108:426-431
- 1495 Wassman S, Laufs U, Muller K, Konkol C. Cellular antioxidant effects in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*.2002;22:300
- 1496 Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T. Statins modulate ox-LDL-mediated adhesion molecule expression in human coronary endothelial cells:Role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Therap*,2002;302:601-605
- 1497 Ruotolo G., Ericsson C., Tettamanti C., et al. Treatment effects on serum lipoproteins lipids, apolipoproteins and low density lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial (BECAIT). *Journal of the American College of Cardiology*. 1998; 32, 1648-165
- 1498 Frick M., Syvanne M., Nieminen M., et al. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary surgery in men with low levels of HDL cholesterol. *Circulation*. 1997, 96: 2137-2143
- 1499 Chinetti G., Griglio S., Antonucci M. et al. Activation of Proliferator-activated Receptors alpha and Beta Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998 273. 25573-25580
- 1500 Devchand P., Keller H., Peters J., et al. The PPAR alpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*. 1996,384: 39-43
- 1501 Delerive P., Bosscher K., Besnard S., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-KB and AP-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274: 32048-32054
- 1502 Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F. PPAR activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells, by inhibiting the Activator Protein-1 signaling pathway. *Circulation Recherche*, 1999; 85:394-402
- 1503 Jones D, Ding X, Daynes R. Nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor alpha, is expressed in murine lymphocytes. *J. Biol. Chem.* .2002;277:6838-6845
- 1504 Willson M, Brown J, Sternbach D, Henke R. The PPARs:from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*,2000;43:527-550
- 1505 Ferry G, Bruneau V, Beauverger P, Goussard M. Binding of prostaglandins to human PPARgamma :tool assessment and new natural ligands. *Eur J Pharmacol*. 2001;417:77-89
- 1506 Willson M, Brown J, Sternbach D, Henke R. The PPARs:from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*,2000;43:527-550
- 1507 Lehmann M, Moore B, Smith-Oliver A, Wilkinson O. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferators activated receptor gamma. *J Biol Chem*,1995;270:12953-12956
- 1508 Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptors:nuclear control of metabolism. *Endocr Ver*,1999;20:649-688
- 1509 Chinetti G, Fruchart C, Staels B. PPARs:nuclear receptors at the crossroads between metabolism and inflammation.
- 1510 Yang Y, Wang H, Chen T, Hodge R. Activation of human T lymphocytes is inhibited by PPARgamma agonists :PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem*,2000;275:4541-4544
- 1511 Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M. Negative regulation of human fibrinogen gene expression by PPARalpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem*,2001;276:33471-33477
- 1512 Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles E. PPARgamma inhibits TGFbeta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J Biol Chem*,2001;276:45888-45894
- 1513 Staels B, Koenig W, Habib A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*,1998;393:790-793
- 1514 Delerive P, Fruchart C, Staels B. PPAR in inflammation control. *J Endocrinol*,2001;169:453-459

-
- 1515 Welch J, Ricote M, Akiyama T, Gonzalez F. PPAR γ and PPAR δ negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN- γ target genes in macrophages. PNAS online, 2003;100:6712-6717
- 1516 Fernandez-Real J, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. Endocrine Reviews, 2003;24:278-301
- 1517 Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F. Expression of the PPAR α gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. J Biol Chem, 1996;271:1764-1769.
- 1518 Kersten S, Seydoux J, Peters M, Gonzalez J. PPAR α mediates the adaptive response to fasting. J Clin Invest, 1999;103:1489-1498
- 1519 Guardiola-Diaz M, Rehnmark S, Usuda N, Albrechtsen T. Rat PPAR and brown adipose tissue function during cold acclimatization. J Biol Chem, 1999;274:23368-23377
- 1520 Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B. Regulation of the PPAR α gene by glucocorticoids. J Biol Chem, 1994;269:24527-24530
- 1521 Vidal-Puig J, Considine V, Jimenez-Linan M, Werman A. PPAR gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest, 1997;99:2416-2422
- 1522 Huang T, Welch S, Ricote M, Binder J. IL-4 dependent production of PPAR γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. Nature, 1999;400:378-382
- 1523 Skoczynska A, Dobosz T, Poreba R, Turczyn B. The dependence of serum interleukin-6 level on PPAR- α polymorphism in men with coronary atherosclerosis. European Journal of Internal Medicine, 2005;16:501-506
- 1524 Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Shoonians K. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. Circulation, 1998;98:2088-2093
- 1525 Staels B, Vu-Dac N, Kosykh A, Saladin R. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase: a potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. J Clin Invest, 1995;95:705-712
- 1526 Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J. Mode of action of PPAR as hypolipidemic drugs: suppression of apolipoprotein C-III. J Biol Chem, 1995;270:13470-13475
- 1527 Way M, Harrington W, Brown K, Gottschalk K. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that PPAR γ activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. Endocrinology, 2001;142:1269-1277
- 1528 Kemnitz W, Elson F, Roecker B, Baum T. Pioglitazone increases insulin sensitivity, reduces blood glucose, insulin, and lipid levels, and lowers blood pressure, in obese, insulin-resistant rhesus monkeys. Diabetes, 1994;43:204-211
- 1529 Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Berghe W. PPAR α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. The Journal of Biological Chemistry, 1999;274:32048-32054
- 1530 Delerive P, Fruchart C, Staels B. PPAR in inflammation control. J Endocrinol. 2001;453-459
- 1531 Pasceri V, Chang J, Willerson T, Yeh T. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. Circulation, 2001;103:2531-2534
- 1532 Marx N, Mach F, Sauty A, Leung H. PPAR γ activators inhibit INF- γ -induced expression of the cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. J Immunol, 2000;164:6503-6508
- 1533 Han H, Quehenberger O. Ligands for PPAR inhibit monocyte CCR2 expression stimulated by plasma lipoproteins. Trends Cardiovascular Med, 2000;10:209-216
- 1534 Marx N, Sukhova K, Collins T, Libby P. PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cell: Circulation, 1999;99:3125-3131.
- 1535 Jackson M, Parhami F, Xi P, Berliner A. PPAR activators target endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology, 1999;19:2094-2104
- 1536 Pasceri V, Wu H, Willerson J, Yeh E. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by PPAR γ activators. Circulation, 2000;101:235
- 1537 Jones C, Ding X, Daynes A. Nuclear receptor PPAR α is expressed in resting murine lymphocytes: the PPAR α in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. J Biol Chem, 2002;277:6838-6845
- 1538 Wang P, Anderson O, Chen S, Paulsson. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF- κ B in CD4 cells by PPAR γ ligands. Int Immunopharmacol. 2001;1:803-812
- 1539 Yang X, Wang L, Chen T, Hodge D. Activation of human T lymphocytes is inhibited by PPAR γ agonists. J Biol Chem, 2000;275:4541-4544

- 1540 Ricote M, Huang T, Welch S, Glass K. The PPAR gamma, as a regulator of monocyte/macrophage-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol*,1999;66:733-739
- 1541 Azuma Y, Shinohara M, Wang L, Ohura K. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283:344-346
- 1542 Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*,1998;393:790-793
- 1543 Neve P, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation*,2001;103:207-212
- 1544 Marx N, Mackman N, Schonbeck U, Yilmaz N. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation*, 2001;103:213-219
- 1545 Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M. Levels of TNFalpha in serum of patients with hyperlipoproteinemia IIB before and after micronized fenofibrate therapy. *Pol Arch Med Wewn*,1998;99:308-313
- 1546 Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia Iib. *Int J Clin Pharmacol Ther*,1998;36:345-349
- 1547 Delerive P, Gervois P, Fruchart C, Staels B. Induction of Ikb α expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of PPAR-alpha activators. *J Biol Chem*,2000;275:36703-36707
- 1548 Kleemann R, Gervois P, Verschuren L, Staels B. Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkB-C/EBP- β complex formation. *Blood*, 2003;101:545-551
- 1549 Haffner S, Greenberg A, Weston W, Chen H. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 2002; 106:679
- 1550 Satoh N, Ogawa Y, Usui T, Tagami T. Antiatherogenic effect of pioglitazone in type 2 diabetic patients irrespective of the responsiveness to its antidiabetic effect. *Diabetes*,2003;26:2493-2499
- 1551 Sidhu J, Cowan D, Kashi J. Os efeitos da rosiglitazona um agonista do PPARgamma nos marcadores da activação das células endoteliais na PCR e nos valores do fibrinogénio em doentes não diabéticos com DC. *Journal of the American College of Cardiology*,2003;42:1757-63
- 1552 Varo N, Vicent D, Libby P, Nuzzo R. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation*, 2003;107:2664-2669
- 1553 Marx N, Imhof A, Froehlich J, Siam L. Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation*,2003;107:1954-1957
- 1554 Couturier C, Brouillet A, Couriaud C, Koumanov K. IL-1beta induces type II-secreted phospholipase A(2) gene in vascular smooth muscle cells by a nuclear factor kappaB and PPAR mediated process. *J Biol Chem*. 1999;274:23085-23093
- 1555 Neuzil J, Upston M, Witting K, Scott F. Secretory phospholipase A2 and lipoprotein lipase enhance 15-lipoxygenase-induced enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in LDL. *Biochemistry*,1998;37:9203-9210
- 1556 Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F. PPAR activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res*,1999;85:394-402
- 1557 Devchand R, Keller H, Peters M, Vazquez M. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*,1996;384:39-43
- 1558 Colville-Nash P, Qureshi S, Willis D, Willoughby D. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by PPAR agonists:Correlation with induction of heme oxygenase 1. *The Journal of Immunology*,1998;161:978-984
- 1559 Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra I. Activation of PPAR alpha and gamma, induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*,1998;273:25573-25580
- 1560 Augstein P, Dunger A, Heinke P, Wachlin G. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by troglitazone is associated with modulation of ICAM-1 expression on pancreatic islet cells and IFN-gamma expression in splenic T cells. *Biochem Biophys Res Commun*.2003;304:378-384
- 1561 Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P. Macrophages in human atheroma contain PPAR gamma: differentiation-dependent PPARgamma expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol*,1998;153:17-23
- 1562 Goetze S, Kintscher U, Kim S, Meehan P. PPARgamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol*,2001;38:909-921

-
- 1563 Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra P. Activation of PPAR alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*,1998;273:25573-25580
- 1564 Patel L, Pass I, Coxon P, Downes P. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol*,2001;11:764-768
- 1565 Munro E, Patel E, Chan P, Betteridge L. Growth inhibition of human vascular smooth muscle cells by fenofibrato:a possible therapy for restenosis. *Cardiovascular*,1994;28:615-620
- 1566 Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles D. PPARgamma inhibits TGFbeta induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J Biol Chem*,2001;276:45888-45894
- 1567 Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N. Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254:757-763
- 1568 Ikeda Y, Sugawara A, Taniyama Y, Uruno A. Suppression of rat thromboxane synthase gene transcription by PPARgamma in macrophages via an interaction with NRF2. *J Biol Chem* ,2000;275:33142-33150
- 1569 Sugawara A, Takeuchi K, Uruno, Ikeda Y. Differential effects among Thiazolidinediones on the transcription thromboxane receptor and AgII type 1 receptor genes. *Hypertension research*, 2001;3:
- 1570 Neve B, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation*, 2001;103:207
- 1571 Hourton D, Delerive P, Stankova J, Staels B. Oxidized low-density lipoprotein and peroxisome-proliferator activated receptor alpha down-regulate platelet activating factor receptor expression in human macrophages. *Biochem J*.2001;354:225-232
- 1572 Kato K, Yamada D, Midorikawa S, Sato W. Improvement by the insulin-sensitizing agent, troglitazone, of abnormal fibrinolysis in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*,2000;49:662-665
- 1573 Marx N, Bourcier T, Sukhova K, Libby P. PPARgamma activation in human endothelial cells increases PAI-1 expression :PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*,1999;19:546-551
- 1574 Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M. Negative regulation of human fibrinogen gene expression by PPARalpha agonists via inhibition of CCAAT Box/Enhancer-binding protein Beta. *J Biol Chem*,2001;276:33471-33477
- 1575 Sidhu J, Cowan D, Kashi J. Os efeitos da rosiglitazone um agonista do PPARgama nos marcadores da activação das células endoteliais na PCR e nos valores do fibrinogénio em doentes não diabéticos com DC. *Journaal of the American College of Cardiology (Edição Portuguesa)*,2004;4:347-360
- 1576 Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation and fibrosis. *Hypertension*. 2001; 38(pt 2): 581–587
- 1577 Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, et al. The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes*. 1999; 48: 1448–1453
- 1578 Diep Q, Mabrouk M, Cohm J, Endemann D. Structure, Endothelial Function, Cell Growth, and Inflammation in Blood Vessels of Angiotensin II–Infused Rats Role of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- γ *Circulation*. 2002;105:2296
- 1579 Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000; 97: 10990–10995.
- 1580 Demetri G , Fletcher C, Mueller E, Sarraf P.,Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 3951–3956.
- 1581 Sugiura T., Wada A., Moryama T. Probuocol supresses ICAM-1 expression in rat mesangial cells: posible role of IL-1. *Kidney International-supplement*,1999; 71: S167-170
- 1582 Sugiura T, Wada E, Yamauchi A, Horio M, Imai E, Hori M.Probuocol inhibits intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured rat mesangial cells. *Nephrology*, 1998; 4: 75-80
- 1583 Zapolska-Downar D., Zapolski-Downar A., Markiewski M., et al. Selective inhibition by probuocol of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2001; 155: 123-130
- 1584 Li LX., Chen JX., Liao DF., Yu L.Probuocol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by reducing P-selectin synthesis in vitro. *Endothelium*, 1998; 6: 1-8.
- 1585 Fruebis J., Gonzalez V., Silvestre M.,et al.Effect of probuocol treatment on gene expresión of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17(7):1289-1302

-
- 1586 Van de Vijver LP, Kardinaal F. Oxidation of LDL and extent of peripheral atherosclerosis. *Free Radical Research*, 1999;31:129-39
- 1587 Konukoglu D, Serin O. A study on the carotid artery intima-media thickness and its association with lipid peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 1998;277:91-98
- 1588 Harris M, Armstrong D. Premature peripheral vascular disease: clinical profile and abnormal lipid peroxidation. *Cardiovascular Surgery*, 1998;6:188-193
- 1589 Suzuwa M, Ayaori M. Effect of supplementation with vit E on LDL oxidizability and prevention of atherosclerosis. *Biofactors*, 1998;7:51-54.
- 1590 Salonen T, Nyyssonen K. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation*, 1997;95:840-845
- 1591 Walter M, Jacob R, Jeffers B, Ghadanfar M. Os valores séricos de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico predizem eventos cardiovasculares na doença coronária estável. Análise longitudinal do estudo PREVENT. *J Am Coll Cardiol*, 2004;44:1996-02
- 1592 Filipe L. Lipoproteínas e radicais livres na aterosclerose. 1º Congresso Nacional sobre Radicais Livres de Oxigénio, 1991.
- 1593 Ribeiro H, Mendonça C. O stresse oxidativo produzido pelo enfarte agudo do miocárdio e a sua repercussão sobre a peroxidação lipídica. Influência da terapêutica trombolítica. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 1995;14:919-922
- 1594 Silva M, Filipe M. Efeito anti-oxidante de fármacos usados em terapêutica cardiovascular. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 1998;17:495-503
- 1595 Laires J, Bicho M. Treino aeróbico moderado ou de força não melhora selectivamente parâmetros de equilíbrio redox em mulheres idosas. *Ver-Port-Med-Desp*, 1998;16:71-76
- 1596 Filipe M, Fernandes C. A cetanserina como antioxidante. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 1993;12:657-661
- 1597 Mira L, Manso F. Álcool e radicais livres de oxigénio. *Acta-Med-Port*, 1993;6:193-198
- 1598 Laires J, Neto B. Estudo de alguns oligoelementos e índices de stresse oxidativo eritrocitário no esforço. *Ver-Port-Med-Desp*, 1994;12:129-132
- 1599 Sutton-Tyrrel K, Wolfson K, Thompson T, Kelsey F. Measurement variability in duplex scan assessment of carotid atherosclerosis. *Stroke*, 1992;23:215-20
- 1600 Vieira, O., Laranjinha, J. Madeira, V. and Almeida, L., Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *J. Lipid Res.*, 1996;37: 2715-2721
- 1601 Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. and Ferro-Luzzi, A., A fluorescent-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.*, 1995; 18: (1) 29-36
- 1602 Salonen J, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*, 1992;86:803-811
- 1603 Sempos C, Looker A, Gillum R, Makuc D. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 1994;330:1119-1124
- 1604 Campbell S, George D, Robb S, Spooner R. The prevalence of haemochromatosis gene mutations in the West of Scotland and their relation to ischaemic heart disease. *Heart* 2003;89:1023-1026
- 1605 Ellervik C, Tybjærg-Hansen A, Grande P, Appleyard M. Hereditary Hemochromatosis and Risk of Ischemic Heart Disease. A Prospective Study and a Case-Control Study. *Circulation*. 2005;112:185-193
- 1606 Pang JH, Jiang MJ, Chen YL, Wang W. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J. Clin. Investigations*, 1996;2204-2212
- 1607 Dabbagh AJ, Shwaery GT, Keaney JF Jr. Effect of iron overload and iron deficiency on atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(11):2638-45.
- 1608 Turbino-Ribeiro SM, Silva ME, Chianca DA Jr, De Paula H. Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr*. 2003;133(1):15-20.
- 1609 Wolff B, Völzke H, Lüdemann J, Robinson D. Association Between High Serum Ferritin Levels and Carotid Atherosclerosis in the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Stroke*. 2004;35:453.
- 1610 Kartikasari A, Georgiou N, Visseren F, Kats-Renaud H. Intracellular Labile Iron Modulates Adhesion of Human Monocytes to Human Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24:2257
- 1611 Panichi V, Taccola D, Rizza GM, Consani C. Ceruloplasmin and acute phase protein levels are associated with cardiovascular disease in chronic dialysis patients. *J Nephrol.*, 2004;17(5):715-20
- 1612 Memişoğulları R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.*, 2004;18(4):193-7.
- 1613 Lee KU. Oxidative stress markers in Korean subjects with insulin resistance syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 2001 Dec;54 Suppl 2:S29-33.

-
- 1614 Trungtrongchitr R, Pongpaew P, Phonrat B, Supawan V. The effect of cigarette smoking on ceruloplasmin and C3 complement: risk of cardiovascular disease (atherosclerosis). *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2002;20(1):23-8.
- 1615 Vlad M, Uza G, Zirbo M, Olteanu D. Free radicals, ceruloplasmin, and copper concentration in serum and aortic tissue in experimental atherosclerosis. *Nutrition.* 1995;11(5 Suppl):588-91.
- 1616 Lamb DJ, Reeves GL, Taylor A, Ferns GA. Dietary copper supplementation reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 1999;146(1):33-43.
- 1617 Göçmen AY, Sahin E, Semiz E, Gümüşlü S. Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease? *Can J Cardiol.* 2008;24(3):209-12.
- 1618 Devaraj S;Adams-Huet B;Fuller C;Jialal I. Dose-Response Comparison of RRR- α -Tocopherol and All-Racemic α -Tocopherol on LDL Oxidation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1997;17:2273-2279.
- 1619 Matsumoto T, Takashima H, Ohira N, tarutani Y. Plasma levels of OxLDL is an independent determinant of coronary macrovasomotor and microvasomotor responses induced by bradykinin. *JACC,* 2004;44:451-457
- 1620 Braun S, Ndrepepa G, von Beckerath N, Mehilli J. Lack of association between circulating levels of plasma oxidized LDL and clinical outcome after coronary stenting. *American Heart Journal,* 2005;150:550-556
- 1621 Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology,*2000;20:2243
- 1622 Benagiano M, D'Elisio M, Amedei A, Azzuri A. Human 60-KDa shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques. *J. Immunol.,* 2005;174:6509-17
- 1623 Pearson T, Mensah G, Alexander R, Anderson J. Markers of inflammation and cardiovascular disease. *Circulation,* 2003;107:499
- 1624 Myers G, Rifai N, Tracy R, Roberts W. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. Application to Clinical and Public Health Practice: Report From the Laboratory Science Discussion Group. *Circulation.* 2004;110:e545-e549.
- 1625 Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen J, Grande P. Genetically elevated CRP and ischemic vascular disease. *NEJM,* 2008;359:1897-1908
- 1626 Engström G, Stavenow L, Hedblad B, Lind P. Inflammation-Sensitive Plasma Proteins, Diabetes, and Mortality and Incidence of Myocardial Infarction and Stroke. *Diabetes* 52:442-447, 2003
- 1627 Engström G, Hedblad B, Janzon L, Lindgärde F. Long-term change in cholesterol in relation to inflammation-sensitive plasma proteins: a longitudinal study. *Ann Epidemiol.* 2007;17:57-63.
- 1628 Engström G, Hedblad B, Stavenow L, Jonsson S. Incidence of Obesity-Associated Cardiovascular Disease Is Related to Inflammation-Sensitive Plasma Proteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004;24:1498.
- 1629 Talmud P, Martin S, Steiner G, Flavell D. Progression of Atherosclerosis Is Associated With Variation in the α 1-Antitrypsin Gene. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003;23:644.
- 1630 Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1194–1199
- 1631 Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Shimada K. Increased levels of monocyte-related cytokines in patients with unstable angina. *Atherosclerosis.* 2002; 161: 403–408.
- 1632 Blankenberg S, Luc G, Ducimetière P, Arveiler D. Interleukin-18 and the Risk of Coronary Heart Disease in European Men - The Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Circulation.* 2003;108:2453
- 1633 Hung J, McQuillan B, Chapman C, Thompson P. Elevated Interleukin-18 Levels Are Associated With the Metabolic Syndrome Independent of Obesity and Insulin Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2005;25:1268
- 1634 Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2003;91(2):133-6.
- 1635 Gangemi S, Basile G, Merendino RA, Minciullo PL. Increased circulating Interleukin-18 levels in centenarians with no signs of vascular disease: another paradox of longevity? *Exp Gerontol.* 2003; 38(6):669-72.
- 1636 Link A, Ayadhi T, Bohm M, Nickening G. Rapid immunomodulation by rosuvastatin in patients with acute coronary syndrome. *European Heart Journal,* 2006;27(24):2945-2955
- 1637 Stokes K, Clanton E, Clements K, Granger D. Role of Interferon- γ in Hypercholesterolemia-Induced Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion. *Circulation.* 2003;107:2140

- 1638 Stokes Y, Gurwara S, Granger N. -cell derived interferon-gamma contributes to arteriolar dysfunction during acute hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(9):1998-2004.
- 1639 Blann AD, Belgore FM, Constans J, Conri C. Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of fluvastatin or fenofibrate. *Am J Cardiol.* 2001;87(10):1160-3.
- 1640 Tanigawa T, Iso H, Yamagishi K, Muraki I. Association of lymphocyte sub-population with clustered features of metabolic syndrome in middle-aged Japanese men. *Atherosclerosis*, 2004; 173:295-300
- 1641 Dworacka M, Winiarska H, Borowska M, Abramczyk M. Pro-atherogenic alterations in T-lymphocyte subpopulations related to acute hyperglycaemia in type 2 diabetic patients. *Circ. J.*, 2007; 71:962-7
- 1642 Han SF, Liu P, Zhang W, Bu L. The opposite-direction modulation of CD4+CD25+ Tregs and T helper 1 cells in acute coronary syndromes. *Clin Immunol.*, 2007;124:90-7
- 1643 Nowik M, Nowacki P, Grabarek J, Drechsler H. Can we talk about CD4+CD28- lymphocytes as a risk factor for ischemic stroke? *Eur Neurol.*,2007;58:26-33
- 1644 Ducluoux D, Challier B, Sas P, Tiberghien P. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.*, 2003;14:767-772
- 1645 Coll B, Parra S, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Montero M. The role of immunity and inflammation in the progression of atherosclerosis in patients with HIV infection. *Stroke*, 2007;38:2477-84
- 1646 Tanigawa T, Kitamura A, Yamagashi K, Sakurai S. Relationships of differential leucocyte and lymphocyte subpopulations with carotid atherosclerosis in elderly men. *J Clin Immunol.*,2003;23:469-76
- 1647 Dyugovskaya L, Lavie P, Hirsh M, Lavie L. Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnea. *Eur Respir J.*, 2005;25:820-828
- 1648 Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Lymphocyte activation as a possible measure of atherosclerotic risk in patients with sleep apnea. *Ann N Y Acad Sci.*, 2005;1501:340-50
- 1649 Taaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlessman S. The Costimulatory Activity of the CD26 Antigen Requires DPPIV enzymatic activity. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 1993;90:4586-4590
- 1650 Michel M, Fliers E, Noorden C. DPPIV inhibitors in diabetes: more than inhibition of glucagon-like peptide 1 metabolism? *Naunyn-Schmieleberg's Archives of Pharmacology*, 2008;3771:205-207
- 1651 Hosono M, de Boer J, van der Wal C, van der Loos M. Increased expression of Tcell activation markers (CD25, CD26, CD40L and CD69) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 2003;168:73-80
- 1652 Steffens S, Burger, F, Pelli, G, Dean Y. Short-term treatment with Anti-CD3 antibody, reduces development and progression of atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2006;114:1977-1984
- 1653 Morris JC, Waldmann TA. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann Rheum Dis.* 2000 Nov;59 Suppl 1:i109-14.
- 1654 van der Wal C, Piek J, de Boer J, Koch T. Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart*, 1998;80:14-8
- 1655 Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A. Role of Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Experimental Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2007;27:893
- 1656 Nilsson J. Regulating Protective Immunity in Atherosclerosis. *Circulation Research.* 2005;96:395
- 1657 Gotsman I, Gupta R, Lichtman A. The Influence of the Regulatory T Lymphocytes on Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2007;27:2493
- 1658 Diamantopoulos EJ, Andreadis EA, Vassilopoulos CV, Vlachonikolis IG. Association of specific HLA phenotypes with left ventricular mass and carotid intima-media thickness in hypertensives. *Am J Hypertens.* 2001;14:632-6
- 1659 Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Kühl U, Schultheiss HP. Endothelial dysfunction of peripheral arteries in patients with immunohistologically confirmed myocardial inflammation correlates with endothelial expression of human leukocyte antigens and adhesion molecules in myocardial biopsies. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(3):515-20
- 1660 Boyle J. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005;3(1):63-8
- 1661 Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Gómez-Hernández A. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke.* 2004;35(2):458-63. Epub 2004 Jan 22.
- 1662 Aoshiba K, Tamaoki J, Nagai A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(6):L1392-401.
- 1663 Haouzi D, Lekehal M, Tinel M, Vadrot N. Prolonged, but not acute, glutathione depletion promotes Fas-mediated mitochondrial permeability transition and apoptosis in mice. *Hepatology.* 2001;33(5):1181-8.

-
- 1664 Dennett NS, Barcia RN, McLeod JD. Age associated decline in CD25 and CD28 expression correlate with an increased susceptibility to CD95 mediated apoptosis in T cells. *Exp Gerontol.* 2002;37(2-3):271-83.
- 1665 Schindowski K, Leutner S, Müller WE, Eckert A. Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging.* 2000;21(5):661-70.
- 1666 Rasool H, Yuen H, Yusoff K, Wong R. Dose dependent of plasma tocotrienol levels and its effect on arterial compliance, plasma total antioxidant status, and lipid profile in healthy humans supplemented with tocotrienol rich vitamin E. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2006;52:473-8
- 1667 Aldámiz-Echevarriá L, Dalmau J, Prieto A, Andrade F. A randomized single-blind trial of the effects of vitamins C and E in familial hypercholesterolemia. *An Pediatr.* 2006;65(2):101-7
- 1668 Mensink RP, van Houwelingen AC, Kromhout D, Hornstra G. A vitamin E concentrate rich in tocotrienols had no effect on serum lipids, lipoproteins, or platelet function in men with mildly elevated serum lipid concentrations. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(2):213-9
- 1669 Ble-Castillo JL, Carmona-Díaz E, Méndez JD, Larios-Medina FJ. Effect of alpha-tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetics. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(6):290-5.
- 1670 Rezaian R, Taheri M, Mozaffari E, Mosleh A. The salutary effects of antioxidant vitamins on the plasma lipids of healthy middle aged-to-elderly individuals: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J med liban.* 2002;50(1-2):10-3
- 1671 Leonard SW, Joss JD, Mustacich DJ, Blatt DH. Effects of vitamin E on cholesterol levels of hypercholesterolemic patients receiving statins. *Am J Health Syst Pharm.* 2007;64(21):2257-66
- 1672 Cloarec J, Perdriset M, Lamberdiere A, Colas-Belcour F. Alpha-tocopherol: effect on plasma lipoproteins in hypercholesterolemic patients. *Isr J Med Sci.* 1987; 23(8):869-72
- 1673 Khajehdehi P. Effect of vitamins on the lipid profile of patients on regular hemodialysis. *Scand J Urol Nephrol.* 2000, 34(1):62-6
- 1674 Singh U, Otvos J, Dasgupta A, de lemos A. High-dose alpha-tocopherol therapy does not affect HDL subfractions in patients with coronary artery disease on statin therapy. *Clin Chem.* 2007;53(3):525-28
- 1675 Miller R, Appel J, Levander A, Levine M. The effect of antioxidant vitamin supplementation on traditional cardiovascular risk factors. *J Cardiovasc Risk.* 1997;4(1):19-24
- 1676 Leonhardt T. Effect of vitamin E on serum cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic patients treated with diet and clofibrate. *Am J Clin Nutr.* 1978;31(1):100-5
- 1677 Aldred S, Sozzi T, Mudway I, Grant MM. Alpha tocopherol supplementation elevates plasma apolipoprotein A1 isoforms in normal healthy subjects. *Proteomics.* 2006;6(5):1695-703.
- 1678 Farvid MS, Siassi F, Jalali M, Hosseini M. The impact of vitamin and/or mineral supplementation on lipid profiles in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004;65(1):21-8.
- 1679 Rainwater L, Mahaney C, VandeBerg L, Wang L. Vitamin E dietary supplementation significantly affects multiple risk factors for cardiovascular disease in baboons. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(3):597-603
- 1680 Castilla P, Echarri R, Dávalos A, Cerrato F. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(1):252-62.
- 1681 Min LQ, Dang LY, Ma WY. Clinical study on effect and therapeutical mechanism of composite Salvia injection on acute cerebral infarction. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2002;22(5):353-5
- 1682 Jenner L, Jacques F, Seman J, Schaefer J. Ascorbic acid supplementation does not lower plasma lipoprotein(a) concentrations. *Atherosclerosis.* 2000;151(2):541-4.
- 1683 Bostom AG, Hume AL, Eaton CB, Laurino JP. The effect of high-dose ascorbate supplementation on plasma lipoprotein(a) levels in patients with premature coronary heart disease. *Pharmacotherapy.* 1995;15(4):458-64.
- 1684 Muñoz JA, Garcia C, Quilez JL, Andugar MA. Effect of vitamin C on lipoproteins in healthy adults. *Ann Med Interne (Paris).* 1994;145(1):13-9.
- 1685 Rondanelli M, Opizzi A, Andreoni L. Effect of treatment with food supplement in women with iron deficiency: double blind, randomized, placebo-controlled trial. *Minerva Med.* 2006;97:385-390
- 1686 Logacheva IV, Leshchinskiĭ LA, Odnopozov II, Chernysheva NG. Therapeutic plasmapheresis and alpha-tocopherol in patients with coronary heart disease. *Klin Med (Mosk).* 1998;76(10):29-32
- 1687 Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. Antioxidant supplementation with or without B-group vitamins after acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30(2):108-14.
- 1688 Kaikkonen J, Nyssönen K, Tomasi A, Iannone A. Antioxidative efficacy of parallel and combined supplementation with coenzyme Q10 and d-alpha-tocopherol in mildly hypercholesterolemic subjects: a randomized placebo-controlled clinical study. *Free Radic Res.* 2000;33(3):329-40.

- 1689 Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J. Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *JAMA*. 2001;285(9):1178-82.
- 1690 Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Morrow JD, Roberts LJ 2nd. Supplementation with vitamin E but not with vitamin C lowers lipid peroxidation in vivo in mildly hypercholesterolemic men. *Free Radic Res*. 2001;35(6):967-78.
- 1691 Tousoulis D, Antoniades C, Vassiliadou C, Toutouza M. Effects of combined administration of low dose atorvastatin and vitamin E on inflammatory markers and endothelial function in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2005;7(7):1126-32. Epub 2005 Jul 27.
- 1692 Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(10):1329-41.
- 1693 Hagobian TA, Jacobs KA, Subudhi AW, Fattor JA. Cytokine responses at high altitude: effects of exercise and antioxidants at 4300 m. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(2):276-85.
- 1694 Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(6):1203-8. Epub 2007 Dec 23.
- 1695 Marzatico F, Gaetani P, Tartara F, Bertorelli L. Antioxidant status and alpha1-antiproteinase activity in subarachnoid hemorrhage patients. *Life Sci*. 1998;63(10):821-6.
- 1696 Himmelfarb J, Phinney S, Ikizler TA, Kane J. Gamma-tocopherol and docosahexaenoic acid decrease inflammation in dialysis patients. *J Ren Nutr*. 2007;17(5):296-304.
- 1697 Fischer CP, Hiscock NJ, Penkowa M, Basu S. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J Physiol*. 2004;558(Pt 2):633-45. Epub 2004 May 28.
- 1698 Pallat G, Schouten G, de Waart G, Fonk C. Effect of 50 and 100 mg of vit E supplements on cellular immune function in noninstitutionalized elderly person. *Am J Clin Nutr*. 1999;69:1273-81
- 1699 Malmberq J, Lenkei R, Petersson M, Ohlum T. A short term dietary supplementation of high doses of vit E increases T helper 1 cytokine production in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:1772-8.
- 1700 Jeng KC, Yang CS, Siu WY, Tsai YS. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 1996;64(6):960-5.
- 1701 Meydani SN, Barklund MP, Liu S, Meydani M, Miller RA. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr*. 1990;52(3):557-63.
- 1702 Zhu M, Wesley IV, Nannapaneni R, Cox M. The role of dietary vitamin E in experimental *Listeria monocytogenes* infections in turkeys. *Poult Sci*. 2003 Oct;82(10):1559-64.
- 1703 Abdukalykova ST, Zhao X, Ruiz-Feria CA. Arginine and vitamin E modulate the subpopulations of T lymphocytes in broiler chickens. *Poult Sci*. 2008 Jan;87(1):50-5.
- 1704 Moriguchi S. The role of vitamin E in T-cell differentiation and the decrease of cellular immunity with aging. *Biofactors*. 1998;7(1-2):77-86.
- 1705 Ahmed T, Marko M, Wu D, Chung H. Vitamin E supplementation reverses the age-associated decrease in effective immune synapse formation in CD4+ T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1031:412-4.
- 1706 Hall JA, Tooley KA, Gradin JL, Jewell DE. Effects of dietary n-6 and n-3 fatty acids and vitamin E on the immune response of healthy geriatric dogs. *Am J Vet Res*. 2003 Jun;64(6):762-72.
- 1707 Hanson MG, Ozenci V, Carlsten MC, Glimelius BL. A short-term dietary supplementation with high doses of vitamin E increases NK cell cytolytic activity in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 Jul;56(7):973-84. Epub 2006 Dec 2.
- 1708 Tomasetti M, Neuzil J. Vitamin E analogues and immune response in cancer treatment. *Vitam Horm*. 2007;76:463-91.
- 1709 Spada C, Treitinger A, Reis M, Masokawa IY. An evaluation of antiretroviral therapy associated with alpha-tocopherol supplementation in HIV-infected patients. *Clin Chem Lab Med*. 2002 May;40(5):456-9.
- 1710 Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *JAMA*. 1997 May 7;277(17):1380-6.
- 1711 Ferns GA, Forster LA, Williams JC, Tull SP. Effect of vitamin E supplementation on circulating cell adhesion molecules pre- and post-coronary angioplasty. *Ann Clin Biochem*. 2000;37 (Pt 5):649-54.
- 1712 Tahir M, Foley B, Pate G, Crean P. Impact of vitamin E and C supplementation on serum adhesion molecules in chronic degenerative aortic stenosis: a randomized controlled trial. *Am Heart J*. 2005;150(2):302-6.
- 1713 Desideri G, Croce G, Marinucci MC, Masci PG. Prolonged, low dose alpha-tocopherol therapy counteracts intercellular cell adhesion molecule-1 activation. *Clin Chim Acta*. 2002;320(1-2):5-9.

-
- 1714 Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Soluble adhesion molecules, endothelial function and vitamin E in type 1 diabetes. *Coron Artery Dis.* 2001;12(1):69-75.
- 1715 Frostegård J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 ;87(3):904-8.
- 1716 Fortun A, Khalil A, Gagné D, Douziech N. Monocytes influence the fate of T cells challenged with oxidised low density lipoproteins towards apoptosis or MHC-restricted proliferation. *Atherosclerosis.* 2001;156(1):11-21.
- 1717 Huang YH, Rönnelid J, Frostegård J. Oxidized LDL induces enhanced antibody formation and MHC class II-dependent IFN-gamma production in lymphocytes from healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(10):1577-83.
- 1718 Schindowski K, Leutner S, Kressmann S, Eckert A. Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by Ginkgo biloba extract (EGb761). *J Neural Transm.* 2001;108(8-9):969-78.
- 1719 Mosca L, Marcellini S, Perluigi M, Mastroiacovo P. Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(7):1305-14.
- 1720 Yu W, Sanders BG, Kline K. RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res.* 2003;63(10):2483-91.
- 1721 Israel K, Yu W, Sanders BG, Kline K. Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis. *Nutr Cancer.* 2000;36(1):90-100.
- 1722 Gu X, Song X, Dong Y, Cai H. Vitamin E succinate induces ceramide-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 15;14(6):1840-8.
- 1723 Yu W, Shun MC, Anderson K, Chen H. alpha-TEA inhibits survival and enhances death pathways in cisplatin sensitive and resistant human ovarian cancer cells. *Apoptosis.* 2006;11(10):1813-23.
- 1724 Zheng ZJ, Sharrett AR, Chambless LE, Rosamond WD. Associations of ankle-brachial index with clinical coronary heart disease, stroke and preclinical carotid and popliteal atherosclerosis: The ARIC Study. *Atherosclerosis.* 1997;131:115-125
- 1725 Tsai A, Folsom A, Rosamond W, Jones D. Ankle-Brachial Index and 7-Year ischemic stroke incidence. The ARIC study. *Stroke.* 2001;32:1721
- 1726 Wild S, Byrne C, Smith F, Lee A. Low Ankle-Brachial Pressure Index predicts increased risk of cardiovascular disease independent of the metabolic syndrome and conventional cardiovascular risk factors in the Edinburgh Artery Study. *Diabetes Care.* 2006;29:637-642.
- 1727 Murabito JM, Evans JC, Larson MG, Nieto K. The ankle-brachial index in the elderly and risk of stroke, coronary disease, and death: the Framingham Study. *Arch Intern Med.* 2003;163(16):1939-42.
- 1728 Koji Y, Tomiyama H, Ichihashi H, Nagae T. Comparison of ankle-brachial pressure index and pulse wave velocity as markers of the presence of coronary artery disease in subjects with a high risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2004;94(7):868-72.
- 1729 Papamichael CM, Lekakis JP, Stamatelopoulos KS, Papaioannou TG. Ankle-brachial index as a predictor of the extent of coronary atherosclerosis and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2000 Sep 15;86(6):615-8
- 1730 Doobay AV, Anand SS. The Sensitivity and Specificity of the Ankle-Brachial Index to Predict Future Cardiovascular Outcomes. A Systematic Review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1463
- 1731 Resnick H, Lindsay R, McDermott M, Devereux R. Relationship of High and Low Ankle Brachial Index to All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality. The Strong Heart Study. *Circulation.* 2004;109:733-739
- in duplex scan assessment of carotid atherosclerosis. *Stroke.* 1992;23:215-220
- 1732 Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med.* 1998;128(4):262-9
- 1733 Bots ML, Grobbee DE. Intima media thickness as a surrogate marker for generalised atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2002;16(4):341-51
- 1734 Mathiesen E, MD; Bønaa K, MD, PhD; Joakimsen O. Echolucent Plaques Are Associated With High Risk of Ischemic Cerebrovascular Events in Carotid Stenosis. *Circulation.* 2001;103:2171
- 1735 Nolting PR, de Groot E, Zwinderman AH, Buirma RJ. Regression of carotid and femoral artery intima-media thickness in familial hypercholesterolemia: treatment with simvastatin. *Arch Intern Med.* 2003;163(15):1837-41
- 1736 Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet.* 2001;357(9256):577-81
- 1737 Mathiesen E, Bønaa K, Joakimsen O. Echolucent Plaques Are Associated With High Risk of Ischemic Cerebrovascular Events in Carotid Stenosis. *Circulation* 2001;103:2171

- 1738 Gronholdt ML. B-mode ultrasound and spiral CT for the assessment of carotid atherosclerosis. *Neuroimaging Clin N Am*. 2002;12:421-35
- 1739 Grobbee DE, Bots ML. Atherosclerotic disease regression with statins: studies using vascular markers. *Int J Cardiol*. 2004;96(3):447-59
- 1740 Hulthe J, Wikstrand J, Emanuelsson H, Wiklund O. Atherosclerotic changes in the carotid artery bulb as measured by B-mode ultrasound are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Stroke*. 1997;28:1189-1194
- 1741 Ludwig M, von Petzinger-Kruthoff A, von Buquoy M, Stumpe KO. Intima media thickness of the carotid arteries: early pointer to arteriosclerosis and therapeutic endpoint. *Ultraschall Med*. 2003;24(3):162-74
- 1742 Ludwig M, von Petzinger-Kruthoff A, von Buquoy M, Stumpe KO. Intima media thickness of the carotid arteries: early pointer to arteriosclerosis and therapeutic endpoint. *Ultraschall Med*. 2003;24(3):162-74
- 1743 Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis*. 2004;18:346-9.
- 1744 Ghayour-Mobarhan M, Lamb J, Taylor A, Vaidya N. Effect of statin therapy on serum trace element status in dyslipidaemic subjects. *J Trace Elem Med Biol*. 2005;19(1):61-7.
- 1745 Sparks DL, Petanceska S, Sabbagh M, Connor D. Cholesterol, copper and Aβ in controls, MCI, AD and the AD cholesterol-lowering treatment trial (ADCLT). *Curr Alzheimer Res*. 2005;2(5):527-39.
- 1746 Sardo MA, Campo S, Bonaiuto M, Bonaiuto A. Antioxidant effect of atorvastatin is independent of PON1 gene T(-107)C, Q192R and L55M polymorphisms in hypercholesterolaemic patients. *Curr Med Res Opin*. 2005;21(5):777-84.
- 1747 Human JA, Ubbink JB, Jerling JJ, Delport R. The effect of Simvastatin on the plasma antioxidant concentrations in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Chim Acta*. 1997;263(1):67-77.
- 1748 Shin MJ, Chung N, Lee JH, Jang Y. Effects of simvastatin on plasma antioxidant status and vitamins in hypercholesterolemic patients. *Int J Cardiol*. 2007 May 31;118(2):173-7. Epub 2006 Sep 26.
- 1749 Stoll LL, McCormick ML, Denning GM, Weintraub NL. Antioxidant effects of statins. *Drugs Today (Barc)*. 2004;40(12):975-90.
- 1750 Muacević-Katanec D, Bradamante V, Poljicanin T, Reiner Z. Clinical study on the effect of simvastatin on paraoxonase activity. *Arzneimittelforschung*. 2007;57(10):647-53.
- 1751 Tomás M, Sentí M, García-Faria F, Vila J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(9):2113-9.
- 1752 Ruiz MC, Moreno JM, Ruiz N, Vargas F. Effect of statin treatment on oxidative stress and renal function in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2006 Oct;38(8):2431-3.
- 1753 Molcányiová A, Stancáková A, Javorský M, Tkáč I. Beneficial effect of simvastatin treatment on LDL oxidation and antioxidant protection is more pronounced in combined hyperlipidemia than in hypercholesterolemia. *Pharmacol Res*. 2006 Sep;54(3):203-7. Epub 2006 May 4.
- 1754 Diepeveen SH, Verhoeven GW, Van Der Palen J, Dikkeschei LD. Effects of atorvastatin and vitamin E on lipoproteins and oxidative stress in dialysis patients: a randomised-controlled trial. *J Intern Med*. 2005;257(5):438-45.
- 1755 Rosenson S, Wolff D, Tangney C. Statins reduce oxLDL levels, but do not alter soluble intercellular cell-adhesion molecule-1 and vascular cell-adhesion molecule-1 levels in subjects with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004;106(2):215-7
- 1756 Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*. 2003;108(4):426-31. Epub 2003 Jul 14.
- 1757 Manuel-Y-Keenoy B, Van Campenhout C, Vertommen J, De Leeuw I. Effects of Atorvastatin on LDL sub-fractions and peroxidation in type 1 diabetic patients: a randomised double-blind placebo-controlled study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003;19(6):478-86.
- 1758 van der Harst P, Asselbergs FW, Hillege HL, Bakker SJ. Effect of withdrawal of pravastatin therapy on C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*. 2007;100(10):1548-51.
- 1759 González M, Ruiz Ros JA, Pérez-Paredes M, Lozano ML. [Effect of the early administration of pravastatin on C-reactive protein and interleukin-6 levels in the acute phase of myocardial infarction with ST segment elevation]. *Rev Esp Cardiol*. 2004 Oct;57(10):916-23.
- 1760 Zhao SP, Wu J, Tan LM, Hu ZP. [Effects of atorvastatin on plasma hypersensitive C-reactive protein and interleukin-6 in patients with acute cerebral infarction]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005;85(40):2841-5.
- 1761 Yang J, Li XP, Zhao SP, Li J. The effect of different doses of fluvastatin on inflammatory markers in the early phase of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2006;368(1-2):183-7. Epub 2006 Feb 10.

-
- 1762 Ray KK, Cannon CP, Cairns R, Morrow DA. Relationship between uncontrolled risk factors and C-reactive protein levels in patients receiving standard or intensive statin therapy for acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(8):1417-24.
- 1763 Singh U, Devaraj S, Jialal I, Siegel D. Comparison effect of atorvastatin (10 versus 80 mg) on biomarkers of inflammation and oxidative stress in subjects with metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 2008;102(3):321-5. Epub 2008 May 28
- 1764 Meredith KG, Horne BD, Pearson RR, Maycock CA. Comparison of effects of high (80 mg) versus low (20 mg) dose of simvastatin on C-reactive protein and lipoproteins in patients with angiographic evidence of coronary arterial narrowing. *Am J Cardiol.* 2007;99(2):149-53. Epub 2006 Nov 16.
- 1765 Hernandez TL, Capell WH, Wolfe P, Gerard LA. Time course of C-reactive protein reduction with simvastatin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2006;98(12):1656-9. Epub 2006 Oct 25.
- 1766 Doncheva NI, Nikolov KV, Vassileva DP. Lipid-modifying and pleiotropic effects of gemfibrozil, simvastatin and pravastatin in patients with dyslipidemia. *Folia Med (Plovdiv).* 2006;48(3-4):56-61.
- 1767 Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2004;177(1):161-6.
- 1768 Luo Y, Jiang D, Wen D, Yang J. Changes in serum interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome and their responses to simvastatin. *Heart Vessels.* 2004;19(6):257-62.
- 1769 Devaraj S, Chan E, Jialal I. Direct demonstration of an antiinflammatory effect of simvastatin in subjects with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4489-96. Epub 2006 Sep 12
- 1770 Marketou ME, Zacharis EA, Nikitovic D, Ganotakis ES. Early effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress and proinflammatory cytokines in hyperlipidemic subjects. *Angiology.* 2006;57(2):211-8.
- 1771 Mozaffarian D, Minami E, Letterer RA, Lawler RL. The effects of atorvastatin (10 mg) on systemic inflammation in heart failure. *Am J Cardiol.* 2005;96(12):1699-704. Epub 2005 Oct 28.
- 1772 Erikstrup C, Ullum H, Pedersen BK. Short-term simvastatin treatment has no effect on plasma cytokine response in a human in vivo model of low-grade inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2006 Apr;144(1):94-100.
- 1773 Waehre T, Damås JK, Gullestad L, Holm AM. Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(9):1460-7.
- 1774 Jialal I, Miguelino E, Griffen SC, Devaraj S. Cocomitant reduction of LDLcholesterol and biomarkers of inflammation with low dose simvastatin therapy in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8):3136-40. Epub 2007 May 22
- 1775 Ito T, Ikeda U, Yamamoto K, Shimada K. Regulation of interleukin-8 expression by HMG-CoA reductase inhibitors in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2002;165(1):51-5
- 1776 Ostadal P, Alan D, Hajek P, Horak D. The effect of early treatment by cerivastatin on the serum level of C-reactive protein, interleukin-6, and interleukin-8 in the patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2003;246(1-2):45-50.
- 1777 Park KW, Hwang KK, Cho HJ, Hur J. Simvastatin enhances endothelial differentiation of peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic patients and induces pro-angiogenic cytokine IL-8 secretion from monocytes. *Clin Chim Acta.* 2008;388(1-2):156-66. Epub 2007 Nov 4.
- 1778 Leu HB, Chen JW, Wu TC, Ding YA. Effects of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on serum levels of interleukin-18 and matrix metalloproteinase-9 in patients with hypercholesterolemia. *Clin Cardiol.* 2005;28(9):423-8.
- 1779 Takahashi HK, Weitz-Schmidt G, Iwagaki H, Yoshino T. Hypothesis: the antitumor activities of statins may be mediated by IL-18. *J Leukoc Biol.* 2006;80(2):215-6. Epub 2006 May 30.
- 1780 Crisby M. Modulation of the inflammatory process by statins. *Timely Top Med Cardiovasc Dis.* 2005; 9:E3.
- 1781 Takahashi HK, Mori S, Iwagaki H, Yoshino T. Simvastatin induces interleukin-18 production in human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol.* 2005;116(3):211-6.
- 1782 Liu W, Li WM, Gao C, Sun NL. Effects of atorvastatin on the Th1/Th2 polarization of ongoing experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *J Autoimmun.* 2005;25(4):258-63. Epub 2005 Oct 19.
- 1783 Tang Q, Huang J, Qian H, Chen L. Antiarrhythmic effect of atorvastatin on autoimmune myocarditis is mediated by improving myocardial repolarization. *Life Sci.* 2007;80(7):601-8. Epub 2006 Dec 15.
- 1784 Li WM, Liu W, Gao C, Zhou BG. Immunoregulatory effects of atorvastatin on experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(3):274-80.

- 1785 Kohno H, Sakai T, Saito S, Okano K. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with atorvastatin and lovastatin. *Exp Eye Res.* 2007;84(3):569-76. Epub 2007 Jan 17.
- 1786 Gegg ME, Harry R, Hankey D, Zambarakji H. Suppression of autoimmune retinal disease by lovastatin does not require Th2 cytokine induction. *J Immunol.* 2005;174(4):2327-35.
- 1787 Aprahamian T, Bonegio R, Rizzo J, Perlman H. Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model. *J Immunol.* 2006 1;177(5):3028-34.
- 1788 Cheng X, Liao YH, Zhang J, Li B, Ge H. Effects of Atorvastatin on Th polarization in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2005;7(7):1099-104.
- 1789 Samson KT, Minoguchi K, Tanaka A, Oda N. Inhibitory effects of fluvastatin on cytokine and chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with allergic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(4):475-82.
- 1790 Alber HF, Frick M, Suessenbacher A, Doerler J. Effect of atorvastatin on circulating proinflammatory T-lymphocyte subsets and soluble CD40 ligand in patients with stable coronary artery disease--a randomized, placebo-controlled study. *Am Heart J.* 2006;151(1):139.
- 1791 Gullu S, Emral R, Bastemir M, Parkes AB. In vivo and in vitro effects of statins on lymphocytes in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(1):41-8.
- 1792 Barlage S, Hauser IA, Elbracht R, Abletshauser C. Monitoring of peripheral blood cytotoxic T-cells under fluvastatin treatment in renal transplant recipients. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2005;19(3-4):159-68.
- 1793 Kuipers HF, Biesta PJ, Groothuis TA, Neefjes JJ. Statins affect cell-surface expression of major histocompatibility complex class II molecules by disrupting cholesterol-containing microdomains. *Hum Immunol.* 2005;66(6):653-65.
- 1794 Kanda H, Yokota K, Kohno C, Sawada T. Effects of low-dosage simvastatin on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. *Mod Rheumatol.* 2007;17(5):364-8. Epub 2007 Oct 19.
- 1795 Alber F, Frick M, Suessenbacher A, Doerler J. Effect of atorvastatin on circulating proinflammatory T-lymphocyte subsets and soluble CD40 ligand in patients with stable coronary artery disease-a randomized placebo-controlled study. *Am Heart J.* 2006;151:139
- 1796 Nawawi H, Osman S, Yusoff K, Khalid A. Reduction in serum levels of adhesion molecules, IL-6 and CRP following short-term dose atorvastatin treatment in patients with non-familial hypercholesterolemia. *Horm Metab Res.* 2003;35(8):479-85
- 1797 Tousoulis D, Antoniades C, Bosinakou E, Kotsopoulou M. Effects of atorvastatin on reactive hyperemia and inflammatory process in patients with congestive heart failure. *Atherosclerosis.* 2005;178(2):359-63
- 1798 Patti G, Chello M, Pasceri V, Collona D. Protection from procedural myocardial injury by atorvastatin is associated with lower levels of adhesion molecules after percutaneous coronary intervention: results from the ARMYDA-CAMs substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(8):1560-6. Epub 2006 Sep 26.
- 1799 Luo Y, Xie M, Liu X. Effect of atorvastatin on the nuclear factor-kappaB and soluble inter-cellular adhesion molecules-1 patients with acute coronary syndrome. *Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004; 29(1):84-6
- 1800 Hoque C, Lamarche B, Tremblay J, Bergeron J. Differential effect of atorvastatin and fenofibrate on plasma oxidized low-density lipoprotein, inflammation markers, and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2008;57(3):380-6
- 1801 Seliefloth I, Tonstad S, Hiermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2002;162(1):179-85
- 1802 Mulder J, van Haelst L, Wobbes H, Gans O. The effect of aggressive versus conventional lipid-lowering therapy on markers of inflammatory and oxidative stress. *Cardiovasc Drugs Thera.* 2007;21(2):91-7. Epub 2007 Mar 7
- 1803 Ayalasmayajula SP, Dole K, He YL, Ligueros-Saylan M. Evaluation of the potential for steady-state pharmacokinetic interaction between vildagliptin and simvastatin in healthy subjects. *Curr Med Res Opin.* 2007 Dec;23(12):2913-20.
- 1804 Cherfan P, Tompa A, Wikby A, Löfgren S. Effects of simvastatin on human T cells in vivo. *Atherosclerosis.* 2007 Jul;193(1):186-92.
- 1805 Türk U, Alioğlu E, Tengiz I, Ercan E. Statin use is associated with decreased CD-40 ligand expression on T lymphocytes of coronary atheroma plaque in patients with stable coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2008 Apr;8(2):99-103.

-
- 1806 Blank N, Schiller M, Krienke S, Busse F. Atorvastatin inhibits T cell activation through 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase without decreasing cholesterol synthesis. *J Immunol.* 2007 15;179(6):3613-21.
- 1807 Fehr T, Kahlert C, Fierz W, Joller-Jemelka HI. Statin-induced immunomodulatory effects on human T cells in vivo. *Atherosclerosis.* 2004;175(1):83-90.
- 1808 Li WM, Liu W, Gao C, Zhou BG. Immunoregulatory effects of atorvastatin on experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(3):274-80.
- 1809 Youssef S, Stüve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature.* 2002;420(6911):78-84.
- 1810 Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Lorz C. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors decrease Fas ligand expression and cytotoxicity in activated human T lymphocytes. *Circulation.* 2003;108(12):1506-13. Epub 2003 Sep 2.
- 1811 Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C. Increased soluble Fas plasma levels in subjects at high cardiovascular risk: Atorvastatin on Inflammatory Markers (AIM) study, a substudy of ACTFAST. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(1):168-74. Epub 2006 Oct 19.
- 1812 Sellner J, Greeve I, Findling O, Grandgirard D. Atorvastatin does not alter serum levels of sCD95 and sCD95L in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2008 May;152(2):280-4. Epub 2008 Mar 12.
- 1813 Sarabayrouse G, Synaeve C, Leveque K, Favre G. Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. *Neoplasia.* 2007;9(12):1078-1090
- 1814 Abud-Mendoza C, de la Fuente H, Cuevas-Orta E, Baranda L. Therapy with statins in patients with refractory rheumatic diseases: a preliminary study. *Lupus.* 2003;12(8):607-11.
- 1815 Kröger K, Lindemann M, Kreuzfelder E, Bröcker M. Effect of atorvastatin and clopidogrel on cellular immune function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Mar;68(3):251-5
- 1816 Aberg F, Appelkvist EL, Bröijersén A, Eriksson M. Gemfibrozil-induced decrease in serum ubiquinone and alpha- and gamma-tocopherol levels in men with combined hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest.* 1998;28(3):235-42.
- 1817 Arca M, Natoli S, Micheletta F, Riggi S. Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(5):698-705. Epub 2006 Dec 16
- 1818 Hoffman R, Brook GJ, Aviram M. Hypolipidemic drugs reduce lipoprotein susceptibility to undergo lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis.* 1992;93(1-2):105-13.
- 1819 Yoshida H, Ishikawa T, Ayaori M, Shige H. Beneficial effect of gemfibrozil on the chemical composition and oxidative susceptibility of low density lipoprotein: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis.* 1998;139(1):179-87.
- 1820 Badiou S, Merle De Boever C, Dupuy AM, Baillat V. Fenofibrate improves the atherogenic lipid profile and enhances LDL resistance to oxidation in HIV-positive adults. *Atherosclerosis.* 2004 ; 172(2):273-9.
- 1821 Stalenhoef AF, de Graaf J, Wittekoek ME, Bredie SJ. The effect of concentrated n-3 fatty acids versus gemfibrozil on plasma lipoproteins, low density lipoprotein heterogeneity and oxidizability in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 2000;153(1):129-38.
- 1822 Broncel M, Cieślak D, Koter-Michalak M, Duchnowicz P. The anti-inflammatory and antioxidants effects of micronized fenofibrate in patients with visceral obesity and dyslipidemia. *Pol Merkur Lekarski.* 2006;20(119):547-50.
- 1823 Tkác I, Molcányiová A, Javorský M, Kozárová M. Fenofibrate treatment reduces circulating conjugated diene level and increases glutathione peroxidase activity. *Pharmacol Res.* 2006;53(3):261-4. Epub 2006 Jan 18.
- 1824 Kim CJ. Effects of fenofibrate on C-reactive protein levels in hypertriglyceridemic patients. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47(6):758-63.
- 1825 Muhlestein JB, May HT, Jensen JR, Horne BD. The reduction of inflammatory biomarkers by statin, fibrate, and combination therapy among diabetic patients with mixed dyslipidemia: the DIACOR (Diabetes and Combined Lipid Therapy Regimen) study. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(2):396-401. Epub 2006 May 24
- 1826 Undas A, Celinska-Löwenhoff M, Domagala TB, Iwaniec T. Early antithrombotic and anti-inflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia. *Thromb Haemost.* 2005;94(1):193-9.
- 1827 Wang TD, Chen WJ, Lin JW, Cheng CC. Efficacy of fenofibrate and simvastatin on endothelial function and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia: relations with baseline lipid profiles. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):315-23.

- 1828 Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, Lindeman J. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood*. 2004;103(11):4188-94. Epub 2004 Feb 19.
- 1829 Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B. Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood*. 2003;101(2):545-51. Epub 2002 Aug 29.
- 1830 Haim M, Benderly M, Tanne D, Matas Z. C-reactive protein, bezafibrate, and recurrent coronary events in patients with chronic coronary heart disease. *Am Heart J*. 2007;154(6):1095-101. Epub 2007 Sep 27.
- 1831 Ikwaki K, Noma K, Tohyama J, Kido T. Effects of bezafibrate on lipoprotein subclasses and inflammatory markers in patients with hypertriglyceridemia--a nuclear magnetic resonance study. *Int J Cardiol*. 2005;101(3):441-7.
- 1832 Okopień B, Kowalski J, Krysiak R, Łabuzek K. Monocyte suppressing action of fenofibrate. *Pharmacol Rep*. 2005;57(3):367-72.
- 1833 Jonkers IJ, Mohrschladt MF, Westendorp RG, van der Laarse A. Severe hypertriglyceridemia with insulin resistance is associated with systemic inflammation: reversal with bezafibrate therapy in a randomized controlled trial. *Am J Med*. 2002;112(4):275-80.
- 1834 Potaczek DP, Undas A, Celinska-Lowenhoff M. Interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism and effects of fenofibrate and simvastatin on inflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17(1):35-8.
- 1835 Ryoo S, Won M, Kim DU, Kim L. PPARalpha activation abolishes LDL-stimulated IL-8 production via AP-1 deactivation in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(2):329-34.
- 1836 Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1998;36(6):345-9.
- 1837 Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, Butterfield CE. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan;105(3):985-90. Epub 2008 Jan 16.
- 1838 Blann AD, Belgore FM, Constans J, Conri C. Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of fluvastatin or fenofibrate. *Am J Cardiol*. 2001 May 15;87(10):1160-3.
- 1839 Kowalski J, Okopien B, Madej A, Zielinski M. Effects of fenofibrate and simvastatin on plasma sICAM-1 and MCP-1 concentrations in patients with hyperlipoproteinemia. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2003 Jun;41(6):241-7.
- 1840 Kovács I, Toldy E, Abel T, Tarján J. The effect of ciprofibrate on flow-mediated dilation and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia. *Endothelium*. 2005;12(4):179-83.
- 1841 Kagawa H, Nomura S, Nagahama M, Ozaki Y. Effect of bezafibrate on soluble adhesion molecules and platelet activation markers in patients with connective tissue diseases and secondary hyperlipidemia. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001 Apr;7(2):153-7.
- 1842 Xu J, Racke MK, Drew PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist fenofibrate regulates IL-12 family cytokine expression in the CNS: relevance to multiple sclerosis. *J Neurochem*. 2007 Dec;103(5):1801-10.
- 1843 Lovett-Racke AE, Hussain RZ, Northrop S, Choy J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5790-8.
- 1844 Tharappel JC, Nalca A, Owens AB, Ghabrial L. Cell proliferation and apoptosis are altered in mice deficient in the NF-kappaB p50 subunit after treatment with the peroxisome proliferator ciprofibrate. *Toxicol Sci*. 2003 Oct;75(2):300-8. Epub 2003 Jul 25.
- 1845 Cindoruk M, Kerem M, Karakan T, Salman B. Peroxisome proliferators-activated alpha agonist treatment ameliorates hepatic damage in rats with obstructive jaundice: an experimental study. *BMC Gastroenterol*. 2007 Nov 28;7:44.
- 1846 Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T, Umemoto M. Clofibrinic acid, a PPARalpha ligand, inhibits growth of human ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2007;6(4):1379-1386
- 1847 Luci S, Giemsa B, Hause G, Kluge H. Clofibrate treatment in pigs: effects on parameters critical with respect to peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis in rodents. *BMC Pharmacol*. 2007 Apr 16;7:6.