

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**POLIMORFISMOS MOLECULARES NOS GENES DE ICAM-1 E PECAM-1,
EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA CORONARIANA ARTERIAL.**

Andréa Wieck

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre, março de 2007

Aos meus pais, ao Felipe, pessoas que amo demais.

E aos amigos que sempre estiveram do meu lado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a meus pais, que sempre me incentivaram e me apoiaram nas decisões que tomei, principalmente na de ser bióloga. Agradeço a eles também, pois, certa vez, quando questionei meu pai a respeito do fato de ele ter sido tão duro comigo em certos momentos de minha criação ele me respondeu: “agi assim contigo porque quando tu eras criança e te perguntei o que tu querias ser quando crescesse, tu me respondeu que queria ser cientista, então tive que ser rígido contigo e cobrar certas coisas”. Certamente tô chegando um pouquinho perto de ser cientista e, pai, muito obrigada por ter me tornado tão perfeccionista e exigente com uma série de coisas! Mãe, obrigada por me agüentar tão mal-humorada e intolerante, me dar colo e ouvir chorar tantas vezes.

Outro agradecimento deveras importante é ao meu orientador, José Artur Bogo Chies, por ter confiado em mim quando me aceitou como orientada para o mestrado. Por ter me agüentado insuportável e loira durante tanto tempo, com choros, TPMs e loucuras. Mas principalmente por ter me ensinado uma série de coisas muito importantes, principalmente a ser independente e pensar de modo científico.

Gostaria de agradecer também à Prof. Mara Helena Hutz, por ter cedido o banco de amostras e por ter se disposto a me ajudar sempre que necessitei. Assim como a Jana Jaeger, que me passou o banco de dados e sempre estava pronta para me ajudar no que eu precisasse.

Agradeço aos colegas do laboratório de imunogenética, por transformarem o laboratório num lugar divertidíssimo e bom de estar. Alguns agradecimentos especiais: a Mel, Pedro, Lari, Flá, Tiago Dalberto por sempre tirarem clivagens, PCRs e etc.

À Déia Vargas, minha querida co-orientadora, para quem eu corria em todos os momentos, seja de géis estrambólicos, problemas com inglês tosco, discussões a respeito de projetos, choros de cunho profissional até para assuntos étlicos e festivos!!

À Pri Viana e à Raquel Rinke, pelos auxílios com géis de acrilamida, auxílios em assuntos de doutorado, amorosos, étlicos e festivos (sim... festas memoráveis, congressos espetaculares!!) e simplesmente por estarem sempre do meu lado quando precisei! Vocês são muito importantes para mim, e se não fosse vocês talvez eu estivesse mais louca!!!

Um agradecimento em conjunto à Lari, Pri, Raquel e Déia por me fazerem rir e ver que as coisas iam ficar bem quando eu tinha meus surtos psicóticos de que nada ia funcionar, nada ia dar certo e eu ia morrer encalhada e pobre (apesar de às vezes eu ainda achar que a parte do pobre é verdade!). Meninas, vocês são demais!!!

Também ao Bruno Paiva, por ter me ensinado muita coisa.

À Tatiana Gonzalez, pelas indiadas, congressos e pela fundação da Pathetical Hypotesis.

Ao Gu (Gustavo Fioravanti) pelos cafés, cinemas, gargalhadas, corridas, passeios com a Kaya, discussões científicas e não científicas (sim eu sou insuportável), conselhos e muito ombro quando eu precisei.

Agradeço à minha amiga, irmã, companheira, parceria de todas as horas, Paula Rohr. Por ter me agüentado por... huummm...acho q já são 4 anos. Por ter partilhado dos meus melhores e piores momentos (incluindo muitas TPMs) e por mesmo assim continuar do meu lado e gostando de mim (eu acho!)!!! Por sempre estar disposta a me ensinar coisas que eu não sabia.

À minha outra irmã, amiga, colega, parceria Cristine Trinca. Ela me aturou menos do que a Paula, mas com certeza não foi "menos pior"! Obrigado por passar por alguns dos meus piores e melhores momentos e ainda assim continuar acreditando em mim e me amando!!

À minha outra irmãzinha Fernanda Pedone, por sempre estar comigo (mesmo lá da Austrália!!), me dar colo, ombro, gargalhadas e momentos muito maravilhosos! Pelas praias junto com a Cris, pelos abdominais na cama, conversas de piranha, champanhes ao sol e momentos insanos mesmo estando sóbrias!

Ao Ernie Bruno Ernestoham Fred Trincado, por me dar sábios conselhos me ajudar a sacudir a poeira e me fazer levantar quando tudo me empurrava para baixo.

Ao meu melhor amigo, namorado, amor, homem da minha vida e com certeza a pessoa que me conhece mais e melhor do que ninguém, Felipe Klein Ricachenevsky. Tu foste a melhor surpresa que me aconteceu. Obrigado por todos os conselhos, de todos os tipos. Obrigado por me ouvir e por estar comigo nos meus melhores e piores momentos. Obrigado por passar comigo por esse final de mestrado, com certeza essa dissertação é um pouquinho

tua também. E obrigada por me levar para a terra do nunca e me fazer viver os melhores momentos da minha vida. Amo-te.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao Daniel Garcia dos Santos. Por ter feito parte da minha vida durante tanto tempo e ter me ensinado muita coisa. Parte de mim é do jeito que é por causa dele. Obrigado pelas discussões científicas, pelo amor, carinho, idéias e pela Kaya. Cheguei até aqui por que tu me ajudaste por muito tempo e acreditou em mim.

Obrigada

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
Capítulo 1. INTRODUÇÃO	
1.1 Doença Aterogênica Coronária.....	10
1.2 A Doença Aterogênica Coronariana como um problema endotelial.	14
1.3 Doença Aterogênica Coronariana e Inflamação.....	17
1.4 Doença Aterogênica Coronariana e Moléculas de Adesão.....	19
1.4.1 Polimorfismo em Moléculas de Adesão e Doença Aterogênica Coronariana.....	23
1.4.1.1 Polimorfismos no gene de ICAM-I.....	23
1.4.1.2 Polimorfismos no gene de PECAM-I.....	25
Capítulo 2. ICAM-I AND PECAM-I POLYMORPHISMS IN INDIVIDUALS WITH CORONARY ARTERY DISEASE	29
Capítulo 3. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	
3.1 Resultados e Discussão.....	54
3.1.1 PECAM I 373C/G.....	54
3.1.2 PECAM-I 53G/A.....	57
3.1.3 ICAM-I 1548A/G.....	58
3.2 CONCLUSÃO.....	60
Capítulo 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

CAD: *Coronary Artery Disease*.

CD31: PECAM-I.

CD54: ICAM-I.

DAOP: Doença Arterial Oclusiva Periférica.

ICAM-I: *Intercellular Adhesion Molecule - I* – Molécula de Adesão Intercelular – I.

IL-1: Interleucina 1.

IL-6: Interleucina 6.

LFA-1: *Function-Associated Antigen-1*- Antígeno do Linfócito. MAC 1: *Macrophage Antigen 1* – Antígeno de Macrófago 1.

MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1* – Proteína quimioatraente de monócito 1.

PECAM-I: *Platelet and Cellular Adhesion Molecule I* – Molécula de Adesão Plaquetária e Celular I.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismos de um único nucleotídeo.

SSRE: *Shear Stress Response Elements* - Elementos de Resposta ao Estresse Laminar

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa.

UTR: *Untranslated Region* – Região não traduzida.

VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule* – Molécula de Adesão Celular Vascular.

RESUMO

POLIMORFISMOS MOLECULARES NOS GENES DE ICAM-1 E PECAM-1 EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA CORONARIANA ARTERIAL.

Wieck, A; Vargas AE; Hutz M & Chies, JAB

Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

Déia_carolina2004@yahoo.com.br

Palavras-chave: PECAM-1, ICAM-1, DAC.

As doenças cardiovasculares são responsáveis por um grande número de mortes no mundo, sendo a doença coronariana arterial (*coronary artery disease*, CAD) responsável por aproximadamente 7 milhões de mortes por ano. Durante o desenvolvimento e progressão da lesão há a expressão de citocinas e moléculas do sistema imune que sinalizam para que ocorra um aumento da permeabilidade subendotelial, migração leucocitária e adesão celular. Dentre as diversas moléculas expressas durante a progressão da lesão estão as moléculas de adesão celular do tipo 1 ICAM -1 e moléculas de adesão plaquetária do tipo 1 PECAM – 1. A molécula PECAM-1 (ou CD31) é um membro da família das imunoglobulinas e é constitutivamente expressa pelas células endoteliais, plaquetas e leucócitos circulantes. Está envolvida na integridade endotelial e extravasamento celular, possuindo papel importante na adesão e migração leucocitárias. A molécula ICAM-1 (ou CD54) também é um membro da superfamília das imunoglobulinas e é expressa constitutivamente por diversas células do organismo. O presente trabalho tem como objetivo analisar as freqüências alélicas e genotípicas de três polimorfismos em genes que codificam moléculas de adesão – dois no gene de PECAM-1 e um no gene de ICAM-1 em uma amostra de pacientes com doença coronariana arterial, com o intuito de identificar possíveis associações destas variantes e o desenvolvimento da mesma; bem como relacionar o genótipo de cada paciente com seu quadro clínico. A população é composta por euro-descendentes com faixa etária variando entre 31 e 84 anos, e 62.5% dos indivíduos são do sexo masculino. A análise é feita por PCR-RFLP. Foram obtidas as seguintes freqüências genotípicas e alélicas: PECAM-I 373C/G – CG: 0.63; CC: 0.21; GG: 0.16 e C: 0.523; G: 0.477 – PECAM-I 53G/A – GG: 0.844; AG: 0.130; AA: 0.026 e A: 0.091; G: 0.909 - ICAM-I 1548A/G – AA: 0.482; AG: 0.352; GG: 0.168 e A: 0.656; G: 0.344. As análises estatísticas demonstraram uma associação do genótipo CC do polimorfismo PECAM-I 373C/G a um aumento no risco de desenvolvimento de DAC ($p<0.001$). Para os demais polimorfismos não foi encontrada associação.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO



1.1 DOENÇA ATEROGÊNICA CORONARIANA

As doenças cardiovasculares são responsáveis por um grande número de mortes no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, desde 1990, mais pessoas morreram de doenças cardiovasculares do que de qualquer outra causa individual no mundo (World Health Organization, 2002). Esta doença é responsável por uma redução de 10% na sobrevivência dos indivíduos em países subdesenvolvidos (World Health Organization, 2002). A frequência de doenças cardiovasculares decresce a cada ano nos países desenvolvidos, mas aumenta nos países em desenvolvimento, e isso se deve, em parte, ao aumento da longevidade, da urbanização e a modificações no estilo de vida (World Health Organization, 2002 14).

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde, em 2002, 16,7 milhões de pessoas morreram devido a algum tipo de doença cardiovascular (doenças cardíacas hipertensivas, inflamatórias, reumáticas, coronarianas e infarto). Dessas doenças, o infarto é responsável por aproximadamente 6 milhões de mortes por ano, no mundo, e as doenças arteriais coronarianas são responsáveis por mais de 7 milhões de mortes por ano no mundo.

No Brasil, um relatório também da Organização Mundial de Saúde do ano de 2002 relatou que algumas doenças cardiovasculares estão na lista das 10 maiores causas de morte em todas as idades. Dentre as doenças cardiovasculares, a doença cardíaca isquêmica destaca-se sendo responsável por 11% das mortes; a doença hipertensiva cardíaca figura no oitavo lugar, sendo responsável por 3% das mortes e as doenças inflamatórias cardíacas no décimo lugar causando 2% das mortes (World Health Organization).

No Rio Grande do Sul, dados do Ministério da Saúde indicam que cardiopatias em geral são responsáveis por 5,6% das mortes anuais; dessas cardiopatias, as doenças isquêmicas são responsáveis por 3,13% das mortes e a aterosclerose por 0,25%. Para Porto Alegre, o Ministério da Saúde relata que as cardiopatias em geral são responsáveis por 4,54% das mortes, onde as doenças isquêmicas causam 3,03% das mortes e a aterosclerose 0,14% (SIM).

Mais de 300 fatores de risco têm sido associados à Doença Arterial Coronariana (DAC) e ao Infarto. Os fatores de risco podem ser divididos em fatores modificáveis e não modificáveis. Fatores de risco não modificáveis são aqueles que não podem ser controlados, como idade avançada, história familiar de doenças cardiovasculares, gênero e etnia. Os fatores de risco ditos modificáveis, ao contrário, são aqueles que podem ser prevenidos, tratados e controlados. Os principais fatores de risco modificáveis são: hipertensão, níveis anormais de lipídios sanguíneos, tabagismo, sedentarismo, obesidade, dietas não saudáveis e Diabetes Mellitus. Nos países em desenvolvimento, considerados de baixa mortalidade devido a cardiopatias, onde se enquadra o Brasil, os fatores de risco modificáveis prevalentes são hipertensão e tabagismo (World Health Organization, 2002 3).

A DAC é uma doença complexa e multifatorial. Fatores genéticos e condições ambientais são componentes etiológicos inter-relacionados nessa doença. Como citado anteriormente, existem diversos fatores ambientais que influenciam a suscetibilidade e gênese da doença. Fatores genéticos estão sendo estudados e muitos descobertos recentemente estão envolvidos na gênese da doença. Alguns desses fatores interagem com os fatores ambientais. Muitos estudos têm demonstrado a importância de variantes genéticas como fatores de suscetibilidade para aterosclerose: polimorfismos em genes que codificam proteínas

envolvidas na regulação do metabolismo de lipídios, proteólise, ou até mesmo no controle da ativação neurohormonal têm sido associados a um aumento no risco de desenvolvimento de aterosclerose (Lamblin *et al.* 2001; Latkovskis *et al.* 2004). Diferenças individuais nos fatores de risco à doença aterogênica coronariana parecem refletir as interações entre a genética do indivíduo e o ambiente, já que esses chamados genes de suscetibilidade atuam como modificadores em resposta a fatores exógenos (Zerba *et al.* 1993; Nanni *et al.* 2006). Como resultado, uma mutação pode ter um efeito modesto (ou nenhum efeito) em indivíduos com poucos estímulos ambientais adversos, mas um grande efeito naqueles expostos a muitos estímulos ambientais adversos. Por outro lado, fatores ambientais podem favorecer a expressão desses genes de suscetibilidade (Nanni *et al.* 2006). Tais diferenças também podem estar relacionadas ao sexo e à idade do paciente, características que possuem um conjunto específico de genes ativos que pode estar relacionado a um aumento no risco de desenvolvimento da DAC (Friedlander *et al.* 1997).

O melhor entendimento das interações entre genes e ambiente, em relação ao desenvolvimento de DAC poderá levar à compreensão de por que os fatores de risco clássicos (como tabagismo, sedentarismo e dieta) ainda são imprecisos para determinar riscos individuais. Os fatores genéticos podem influenciar não apenas funções fisiológicas em um determinado momento, mas também as taxas de alterações destes fatores fisiológicos ao longo de um período de tempo, o que, por sua vez, pode influenciar no desenvolvimento da doença. Os problemas de se relacionar à genética a doenças complexas é que mutações raras com grandes efeitos podem ser desastrosas para o indivíduo, mas possuem pequeno impacto populacional, enquanto variantes polimórficas comuns com pequenos efeitos resultam em

doenças comuns e possuem um grande impacto populacional (Evans *et al.* 2003). Assim, é interessante tanto a análise dos haplótipos referentes a polimorfismos existentes em um único gene e que aumentam o risco de desenvolvimento da doença quanto à análise de polimorfismos em diversos genes potencialmente associados a esta doença (Hirschhorn *et al.* 2002). A identificação de marcadores genéticos para a predisposição e desenvolvimento de DAC pode melhorar o entendimento da patofisiologia da doença bem como pode levar ao desenvolvimento de agentes terapêuticos a serem utilizados na prevenção e tratamento desta condição (Hauser *et al.* 2004). Além disso, a combinação de diferentes variantes polimórficas pode fazer com que seja possível definir grupos de pacientes de acordo com sua suscetibilidade aos diferentes processos relacionados à aterogênese, permitindo uma melhor estimativa do risco de desenvolvimento dos mesmos (Lamblin *et al.* 2001).

De forma bastante sucinta, a DAC é caracterizada por uma obstrução progressiva das artérias coronárias que tem por consequência diferentes graus de má oxigenação do miocárdio. Ela manifesta-se habitualmente pela angina do peito e infarto do miocárdio. A causa mais comum de DAC é a aterosclerose. De forma mais sucinta ainda, a aterosclerose é caracterizada pelo depósito de gorduras sob a forma de colesterol, além de cálcio e fibrina na camada interna das artérias (<http://prevencao.cardiol.br/dicionario/default.asp>). A seguir apresentaremos alguns aspectos importantes da patofisiologia da DAC.

1.2 - A DOENÇA ATEROGÊNICA CORONARIANA COMO UM PROBLEMA ENDOTELIAL

O endotélio do vaso funciona harmonicamente com o sangue e com o tecido conjuntivo da camada subendotelial e as células musculares lisas que delimitam a íntima vasal.

A agressão do endotélio por agentes nocivos de quaisquer espécies implica distúrbio do endotélio e dos outros componentes da íntima seguido de reações complexas entre todos estes elementos. A lesão é reparada integralmente ou deixa cicatrizes que, posteriormente, poderão conturbar a funcionalidade do vaso.

A Doença Aterogênica Coronariana envolve o acúmulo de placas de gordura nas paredes do endotélio, nas artérias do organismo. O processo inicial da DAC é dito aterosclerose (Fig 1). A aterosclerose agride essencialmente a camada íntima da artéria e tem como lesão característica a placa aterosclerótica, uma placa esbranquiçada e fibrosa que interfere na luz do vaso (Fig 2). Essa placa é coberta por fibras e consiste em várias camadas de células achatadas embebidas numa matriz extracelular de tecido conjuntivo denso ao lado de lamínulas de material amorfo, proteoglicanos, fibras colágenas e células musculares lisas. No interior da "placa", abaixo da capa fibrosa, há um acúmulo de "células espumosas", íntegras ou não, e de tecido conjuntivo (Fig 2). As "células espumosas" são derivadas dos macrófagos que englobaram gotículas de gordura, principalmente sob a forma de colesterol livre e esterificado. Este colesterol é derivado do sangue e não produzido localmente. No centro da placa fibrosa há uma área de tecido necrótico, fragmentos celulares, cristais de

colesterol extracelular e de cálcio (fig 3) (SBACV-RJ - Sociedade Brasileira de Cirurgia Vascular).

A patogênese das doenças vasculares reflete uma interação complexa de vários mecanismos, como a progressão das placas, a ruptura das mesmas, assim como o remodelamento da matriz extracelular ou até mesmo trombose (Lamblin *et al.* 2001). Apesar de já serem conhecidos muitos fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento da doença aterogênica coronariana, componentes herdados também já são reconhecidos há certo tempo. Os exemplos mais recentes são os genes de lipoproteína e apolipoproteína E e suas variantes (Friedlander *et al.* 1997; Evans *et al.* 2003).

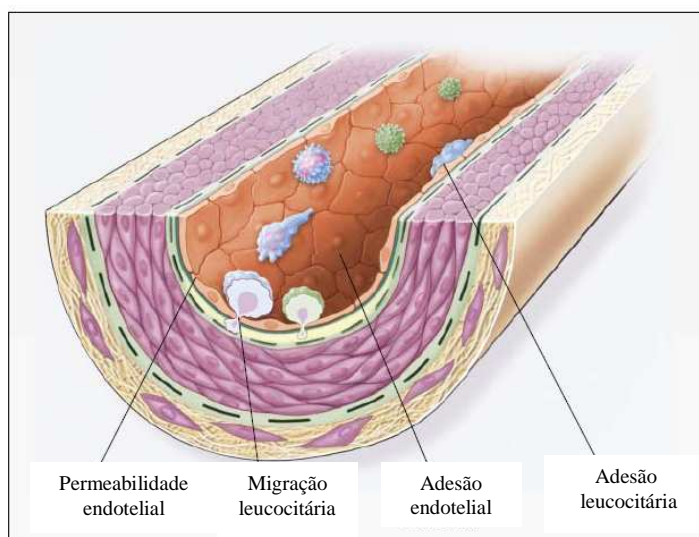


Figura 1: Modificações endoteliais que antecedem a formação da placa aterosclerótica. Tais modificações incluem a expressão de moléculas inflamatórias, aumento da permeabilidade do endotélio, bem como migração e adesão leucocitária. (Modificada a partir de Ross *et al*, 1999).

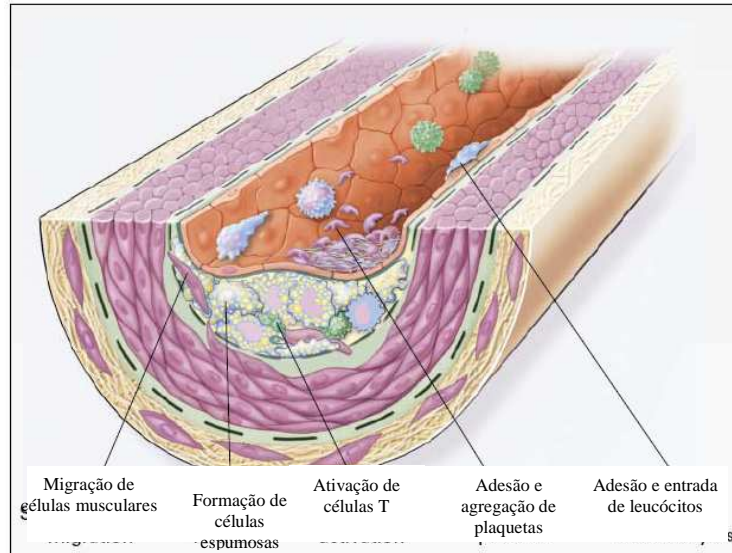


Figura 2: Formação da placa aterosclerótica. Nesse momento há agregação de lipídios, células espumas, células musculares, linfócitos T e plaquetas. (Modificada a partir de Ross *et al*, 1999.)

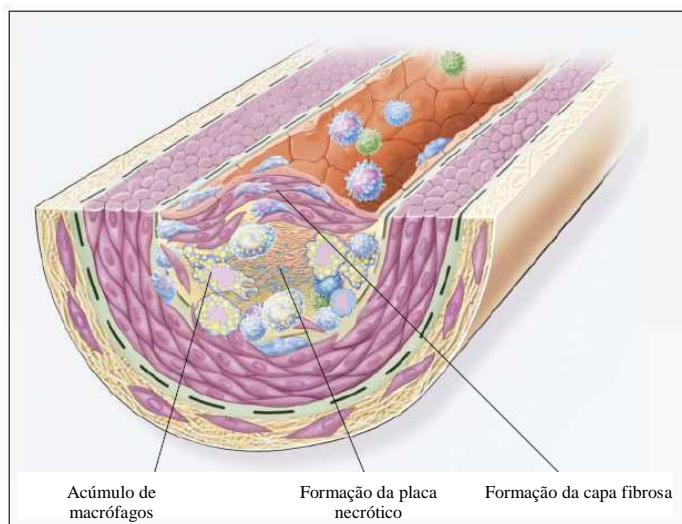


Figura 3: Representação de uma lesão aterosclerótica já em estado avançado, possuindo núcleo necrótico e capa fibrosa que cobre a placa. (Modificada a partir de Ross *et al*, 1999.).

1.3 DOENÇA ATEROGÊNICA CORONARIANA E INFLAMAÇÃO

A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica da parede do vaso. Esse conceito surgiu na metade dos anos 80, quando começou a se observar um número considerável de sinais inflamatórios e células do sistema imune nos locais de lesões ateroscleróticas (revisado por Sheikini & Hansson, 2004). Além dos fatores de risco tradicionais, estresse oxidativo e a inflamação são agora considerados como importantes no desenvolvimento de DAC (Kotur-Stevuljevi *et al.* 2007).

Os processos inflamatórios e a oxidação lipídica são eventos cooperantes amplamente envolvidos no desenvolvimento da doença aterosclerótica, principalmente durante os estágios iniciais, quando há o recrutamento e migração transendotelial de células inflamatórias (Price *et al.* 1999; Blankenberg *et al.* 2003; Kutuk *et al.* 2003). Acredita-se que a oxidação lipídica e a simultânea liberação de mediadores inflamatórios derivados de macrófagos potencializem a progressão da lesão (Kotur-Stevuljevi *et al.* 2007). Já é sabido que o estresse oxidativo aumenta a produção de Interleucina 6 (IL-6) o que apóia a idéia de interação entre estresse oxidativo e inflamação, ambos os processos trabalhando juntos durante o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Khaw *et al.* 1995). Ainda na direção de uma grande importância da inflamação na aterosclerose, estudos demonstram, também, que a liberação de mediadores inflamatórios no miocárdio infartado induz um aumento da permeabilidade vascular causando um extravasamento de plaquetas e proteínas oriundas do plasma na área infartada (Frangogiannis, 2006). Além disso, é sugerido que variantes genéticas de fatores envolvidos em rotas inflamatórias podem afetar a suscetibilidade à doença (Latkovskis *et al.* 2004). A aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo progressivo de lipídios e de células como

macrófagos e linfócitos, bem como de proteínas da matriz extracelular na parede dos vasos (Fig 2) (Ross *et al.* 1999, Lamblin *et al.* 2001). Acredita-se que um estresse laminar hemodinâmico seja responsável por ativar determinados genes codificantes de moléculas caracteristicamente inflamatórias (Elrayess *et al.* 2003). Assim, anormalidades do fluxo sanguíneo e o excesso de lipídios circulantes sob a forma de colesterol gerariam um estresse na parede do vaso o que desencadearia a expressão de quimiocinas e estímulos inflamatórios localmente, direcionando as células do sistema imune a migrarem para a região da lesão (Lip & Blann, 2004). As células inflamatórias são tidas como chave em vários processos da aterosclerose, tais como progressão e ruptura da placa (Ross *et al.* 1999, Lamblin *et al.* 2001). Evidências sugerem uma forte ligação entre aterogênese e trombogênese (Lip & Blann, 2004). A adesão de células circulantes à superfície da artéria está entre os primeiros eventos detectáveis durante a aterogênese (Fig 1) (Listì *et al.* 2004). O recrutamento e extravasamento dos leucócitos são mediados por moléculas de adesão celular e citocinas, que são expressas pelo endotélio e pelos leucócitos circulantes em resposta a diversos estímulos inflamatórios (Blankenberg *et al.* 2003; Springer *et al.* 1990). As moléculas de adesão são expressas na superfície das células e medeiam a adesão das mesmas a outras células ou à matriz extracelular. Deste modo, tais proteínas desempenham um papel crucial na interface de atuação da célula e seu ambiente. Alterações na expressão de tais moléculas podem, portanto, estar envolvidas com alterações do risco de desenvolvimento da doença, interferindo no desenvolvimento clínico da mesma.

Além disso, apesar dos mecanismos de resposta inflamatória vascular à aterogênese não serem ainda bem conhecidos e continuarem sendo objetivo de muitos estudos, é sabido que diversas citocinas pró-inflamatórias estão implicadas nesse processo, apesar de pouco

conhecer-se sobre as funções específicas das citocinas pró e antiinflamatórias neste processo (Turner *et al.* 1997; Lamblin *et al.* 2001). Estudos demonstram que níveis elevados de marcadores inflamatórios, tais como Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1 (IL-1), proteína C reativa e moléculas de adesão, podem ser utilizados como marcadores de risco para futuro desenvolvimento de DAC (revisado por Libby *et al.* 2002). Assim, alterações na expressão de tais moléculas podem estar ligadas ao risco de desenvolvimento de DAC. Deste modo, processos inflamatórios não só potencialmente promovem o início e desenvolvimento do ateroma, como também contribuem decisivamente para as complicações trombóticas.

1.4 MOLÉCULAS DE ADESÃO E DOENÇA ATEROGÊNICA CORONARIANA

Moléculas de adesão celular são proteínas de superfície envolvidas na modulação da comunicação intercelular entre uma grande variedade de tipos celulares (Kacimi *et al.* 1998). Existem quatro principais famílias de moléculas de adesão: moléculas do tipo imunoglobulina, do tipo integrina, do tipo selectina e as moléculas do tipo caderinas, todas participam de processos vitais como embriogênese, diferenciação e crescimento celular. Elas também desempenham papel ativo no processo inflamatório além de estarem envolvidas no desenvolvimento de doenças coronarianas arteriais (Mulvihill *et al.* 2002). A expressão de moléculas de adesão por células do miocárdio é regulada positivamente por estados inflamatórios como isquemia e miocardite. Uma expressão elevada de moléculas de adesão promove infiltração leucocitária no tecido; esses leucócitos infiltrados liberam citocinas que

vão ativar ainda mais a expressão das moléculas de adesão que vão então promover a transmigração leucocitária (Kacimi *et al.* 1998). As moléculas intracelulares de adesão (ICAMs), as moléculas de adesão vascular (VCAMs), as moléculas de adesão celular endotelial plaquetária (PECAMs) e as integrinas são responsáveis pelo forte ancoramento de leucócitos às paredes do vaso (Blankenberg *et al.* 2003). As selectinas, localizadas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, possibilitam que os leucócitos sofram adesão e rolem ao longo do lúmen do vaso. (Ross *et al.* 1999). Por serem moléculas características de resposta inflamatória, as moléculas de adesão têm papel importante no mecanismo de desenvolvimento da aterosclerose.

A molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1 ou CD31) é um membro da família das imunoglobulinas e é expressa em leucócitos, plaquetas e células endoteliais (Elrayess *et al.* 2005). A molécula PECAM-1 está envolvida na manutenção da integridade endotelial e no extravasamento de células do compartimento sangüíneo para a luz de veias, artérias e tecidos adjacentes (Behar *et al.* 1996; Blankenberg *et al.* 2003; Listì *et al.* 2004). A PECAM-1 possui um papel importante na adesão de leucócitos por modular a afinidade por integrinas na sua migração transendotelial (Elrayess *et al.* 2005). Acredita-se que a PECAM-1 possui importante papel no desenvolvimento da doença aterogênica coronariana devido ao nível aumentado da forma solúvel da molécula encontrado em indivíduos com infarto do miocárdio (Listì *et al.* 2004). Além do seu envolvimento nos mecanismos de adesão vascular, existem crescentes evidências de que ela também esteja envolvida na transdução de sinais que suprimem a apoptose via inibição da liberação do citocromo C pela mitocôndria após exposição a estímulos citotóxicos (Newman *et al.* 2003; Elrayess *et al.* 2005).

A Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1 ou CD54) é outro membro da superfamília das imunoglobulinas que é ativado por citocinas e que se liga a integrinas de leucócitos do tipo $\beta 2$ e ao antígeno de macrófago 1 (MAC1) (Springer *et al.* 1994 apud Gaetani *et al.* 2002; McGlinchey *et al.* 2004). Esta molécula de adesão pertence a uma subfamília que contém mais quatro membros (ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4, ICAM-5), que são receptores glicoprotéicos de membrana que contêm um número variável de domínios extracelulares do tipo imunoglobulina e que participam dos mecanismos de adesão. Esta molécula é expressa constitutivamente por diversas células do organismo em um nível basal e sua expressão pode ser regulada positivamente por citocinas pró-inflamatórias secretadas por leucócitos e células endoteliais. As formas solúveis surgem a partir da clivagem dos sítios transmembrana dessas moléculas e o nível sérico das formas solúveis varia entre homens e mulheres adultos, provavelmente devido à ação de hormônios esteróides (Blankenberg *et al.* 2003; Ponthieux *et al.* 2003). A interação de ICAM-1 com as integrinas dos leucócitos circulantes possui importante papel no tráfico leucocitário e no início de respostas imunes antígeno-específicas. Embora ICAM-1 seja constitutivamente expressa por algumas células do organismo, sua expressão é prontamente induzida por estímulos inflamatórios (Kacimi *et al.* 1998). Foi reportado um aumento no nível de ICAM-1 solúvel em indivíduos com doença oclusiva arterial periférica, doença arterial coronariana e aterosclerose da carótida (Gaetani *et al.* 2002). Estudos utilizando homens e mulheres saudáveis (ou assintomáticos) demonstraram que o nível sérico elevado de ICAM-1 solúvel é um fator de risco para futuros problemas cardiovasculares (Hwang *et al.* 1997; Mulvihill *et al.* 2002).

Em humanos, observou-se a expressão de moléculas de adesão (ICAM, VCAM e PECAM) nas placas ateroscleróticas (Davies *et al.* 1993, DeGraba *et al.* 1998). Modelos

animais de aterogênese demonstraram que os sinais inflamatórios progridem paralelamente ao acúmulo de lipídios no endotélio da parede vascular. Normalmente, no endotélio saudável não ocorre adesão de leucócitos, mas logo no início da dieta aterogênica, placas de células endoteliais dos vasos passam a expressar moléculas de adesão que irão mediar a ligação de leucócitos a estes locais (Libby *et al.* 2002). O papel crítico das moléculas de adesão no processo aterogênico é demonstrado em trabalhos que utilizam camundongos deficientes em moléculas de adesão, onde estes desenvolvem menos placas ateroscleróticas que camundongos do tipo selvagem (Nageh *et al.* 1997). Em particular, moléculas de ICAM-1 ligam monócitos e linfócitos T às placas de gordura formadas no início da aterogênese (ateroma inicial) (Libby *et al.* 2002). Concomitantemente, a expressão da Molécula de Adesão Vascular (VCAM-1) é aumentada nesses ateromas iniciais (Li *et al.* 1993). A molécula de adesão vascular e celular é uma molécula de adesão do tipo imunoglobulina que é expressa em endotélios ativados estando envolvida nos mecanismos de rolamento e adesão ao endotélio. Apesar de ser estruturalmente semelhante à ICAM-1 e a outras moléculas de adesão, VCAM-1 possui um mecanismo de regulação único. Sua expressão não é constitutiva, sendo ativada rapidamente sob condições pró-ateroscleróticas. Estudos realizados com camundongos geneticamente modificados para expressar moléculas de VCAM-1 defectivas demonstraram que os mesmos apresentaram uma interrupção na progressão da lesão aterosclerótica (Cybulsky *et al.* 2001). Acredita-se que, a partir do momento em que ocorre o acúmulo de lipídios nas paredes das artérias há uma redução do fluxo sanguíneo naquela região (Topper *et al.* 1996 apud Libby *et al.* 2002). Essa redução geraria um estresse que poderia reduzir, ou inibir a produção de moléculas com função antiinflamatória como, por exemplo, óxido nítrico endotelial. O óxido nítrico endotelial é um vasodilatador endógeno que também tem como função limitar a

expressão de VCAM-1 (De Caterina *et al.* 1995 apud Libby *et al.* 2002). Além de reduzir a produção de moléculas protetivas, o reduzido fluxo sanguíneo pode aumentar a expressão de moléculas de adesão celular (por exemplo, de ICAM-1). Uma vez aderidos à parede arterial, os leucócitos perpetuam a resposta inflamatória, ativando uma série de outros fatores como MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), interferon-gama e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que resultam na formação de uma densa matriz extracelular característica das lesões ateroscleróticas mais avançadas.

1.4.1 POLIMORFISMOS EM MOLÉCULAS DE ADESÃO E DOENÇA ATEROGÊNICA CORONARIANA

Diversos polimorfismos nos genes que codificam moléculas de adesão têm sido descritos, e alguns contribuem para a variabilidade relacionada ao risco e desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a doença aterogênica coronariana (Andreotti *et al.* 2002; Blankenberg *et al.* 2003; Listì *et al.* 2004).

1.4.1.1 POLIMORFISMOS NO GENE DE ICAM-1

A ICAM-1 possui cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina. Vora *et al.* (1994) encontraram três polimorfismos com alteração de um único nucleotídeo (SNPs - *single nucleotide polymorphism*, polimorfismos de um único nucleotídeo) nos éxons do gene de ICAM-1: o primeiro – G241R – é uma substituição de um G -> A no códon 241 do éxon 4 o

que resulta na troca de uma glicina por uma arginina no domínio tipo imunoglobulina 3. Outro – 1548A/G (também conhecido como K469E) – é uma substituição A -> G na posição 1548, códon 469, do éxon 6, que leva à troca de uma lisina por uma glutamina no domínio do tipo imunoglobulina 5; e existe ainda uma substituição silenciosa de A-G na posição 1281 (McGlinchey *et al.* 2004). A tabela 1 apresenta as frequências dos alelos A e G do polimorfismo 1548A/G em diferentes populações humanas. Iwao *et al.* (2001) descreveram outros polimorfismos no gene de ICAM-1, o primeiro é uma substituição de G -> A na posição 1838 da região não codificante 3'UTR; o segundo é uma substituição G -> A na posição 1715 que causa uma mudança de aminoácido, de alanina para treonina no códon 496 (A496T), o qual se localiza no domínio transmembrana de ICAM-1 (McGlinchey *et al.* 2004). Apesar do domínio do tipo imunoglobulina 1 ser o ponto de ligação com o antígeno do linfócito LFA-1 (*function-associated antigen-1*) e do terceiro domínio do tipo imunoglobulina mediar a ligação com MAC-1 o estudo do polimorfismo 1548A/G (ou K469E) é importante, pois os domínios 3 a 5 afetam a acessibilidade ao domínio 1 durante ligação com LFA-1 (Staunton *et al.* 1988 apud McGlinchey *et al.* 2004 e Diamond *et al.*, 1990). Além disso, o domínio 5 de ICAM-1 tem sido sugerido como epítipo imunodominante da molécula (Molgg *et al.* 1991 apud McGlinchey *et al.* 2004). O polimorfismo 1548A/G de ICAM-1 tem sido estudado também em diabetes melitus (Nejentsev *et al.* 2000 apud McGlinchey *et al.* 2004), esclerose múltipla (Mycko *et al.* 1998 apud McGlinchey *et al.* 2004) e derrame (Pola *et al.* 2003).

1.4.1.2 POLIMORFISMOS NO GENE DE PECAM-1

Vários polimorfismos em diferentes regiões do gene de PECAM-1 já foram identificados e muitos deles têm sido associados à doença aterogênica coronariana (Elrayess *et al.* 2005). Alguns SNPs têm sido descritos para PECAM-1 em domínios funcionalmente importantes (Behar *et al.* 1996). São exemplos os polimorfismos 373C/G (ou 125L/V) no éxon 3, 1688G/A (ou 563S/N) no éxon 8 e 670R/G no éxon 12 que estão em forte desequilíbrio de ligação. A tabela 1 apresenta as frequências alélicas do polimorfismo 373C/G em diferentes populações humanas. Foi demonstrado que o alelo G do polimorfismo 373C/G está associado a um aumento no risco de desenvolvimento de doença aterogênica coronariana, enquanto o alelo C está associado a um aumento no risco de infarto do miocárdio (Andreotti *et al.* 2002, Listì *et al.* 2004 Elrayess *et al.* 2005). Estudos realizados em culturas de células endoteliais de cordão umbilical humano demonstraram que, quando submetidas a estresse laminar, havia uma regulação positiva transiente de vários genes, inclusive do gene que codifica o fator de crescimento derivado de plaquetas β e do gene de ICAM-1. Estes estudos identificaram elementos de resposta ao estresse laminar (SSRE - *shear stress response elements*) nos promotores desses genes. No gene de PECAM-1 foram encontrados três desses sítios na região promotora e na região 5'UTR sugerindo que a expressão desta molécula de adesão possa ser regulada por estresse laminar. Estudos recentes identificaram um novo polimorfismo no gene de PECAM-1 localizado em um desses SSREs, na região 5'UTR. Segundo o estudo o polimorfismo 53G/A geraria uma disrupção do SSRE resultando numa ausência de resposta ao estresse laminar e, conseqüentemente, redução na expressão de PECAM-1. Desse modo, o alelo A alteraria a afinidade de ligação da SSRE aos elementos sinalizadores de estresse

laminar, resultando numa resposta reduzida a esse estresse e na expressão de PECAM-1 (Elrayess *et al.* 2003).

A tabela 2 apresenta referências de trabalhos que encontraram associação entre doenças e os polimorfismos de interesse neste trabalho.

Tabela 1: Frequências alélicas dos polimorfismos de interesse em diferentes populações humanas.

SNP	Frequência alélica		Referência
PECAM-I (53G/A)	Alelo G	Alelo A	*
PECAM-I (373C/G)	Alelo C	Alelo G	
Índios Asiáticos	0.664	0.336	Fang L et al 2005;
Euro descendentes	0.530	0.470	Listi F et al 2004
Reino Unido	0.510	0.490	R. A. Gbadegesin et al 2002
ICAM-I (1548A/G)	Alelo E (A)	Alelo K (G)	
Euro-descendentes	0.45	0.55	E. Gaetani et al 2002
Coreanos	0.28	0.72	Lee E B et al 2003
Japoneses	0.61	0.39	Yamashita et al 2005
Roma	0.45	0.55	Gaetani et al 2002
Finlandeses	0.49	0.51	Nejentsev et al 2000

* Não há na literatura descrição de frequências alélicas deste polimorfismo em população de indivíduos não acometidos por DAC.

Tabela 2: Associação de outras doenças com os polimorfismos de interesse nesse trabalho.

Polimorfismo	Doença/alelo associado		Referência
PECAM-I 53G/A	Alelo G	Alelo A	*
PECAM-I 373C/G	Alelo C	Alelo G CAD	Fang L et al 2005; Wei et al 2004; Song FC et al 2003
		Malária Cerebral	Kikuchi et al ; 2001.
ICAM-I 469^A/G	Alelo A	Alelo G	Nejentsev S et al 2003
	Esclerose Múltipla	Retinopatia Diabética	Kamiuchi K et al 2002
	Alzheimer		Pola R et al 2003
	Doença Inflamatória Intestinal		Mutsuzawa et al 2003

* Não há estudos na literatura associando qualquer dos alelos a alguma doença.

Com base nas informações apresentadas, foram escolhidos para estudo os polimorfismos 1548A/G do gene de ICAM-I; 373C/G e 53G/A do gene de PECAM-I devido ao envolvimento de moléculas de adesão em processos inflamatórios e na DAC, como relatado anteriormente. A seguir, serão apresentados os dados de frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos citados, em indivíduos com DAC, da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Capítulo 2



ICAM-I AND PECAM-I POLYMORPHISMS IN INDIVIDUALS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

**ICAM-I AND PECAM-I POLYMORPHISMS IN INDIVIDUALS WITH
CORONARY ARTERY DISEASE.**

Wieck A¹, Vargas AS¹, Hutz M¹ & Chies JAB¹.

**¹- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brasil.**

Address to which correspondence should be sent:

Dr: Jose Artur Bogo Chies

Departamento de Genética

Instituto de Biociências

UFRGS

Caixa Postal: 15053

Cep: 91501-970

Porto Alegre RS, Brazil.

Telephone: 55-51-3308-6740

e-mail: jabchies@terra.com.br

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are responsible for a large number of deaths in the world, with coronary artery disease (CAD) being responsible for approximately 7 million deaths per year. During arterial damage, injury development and progression of the lesion, several cytokines as well as other proteins are produced by the immune system, leading to increased subendothelial permeability, cellular adhesion and leukocyte migration. Among those proteins are the intercellular adhesion molecule-type I (ICAM-I, or CD54) and the platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM –I, or CD31). These molecules are constitutively expressed by different cell types, and are involved in endothelial integrity and cell migration, as well as immune-mediated and inflammatory processes. The main objective of the present work was to determine the genotypic and allelic frequencies of three polymorphic variants in those adhesion molecule genes in Euro-descendant patients with CAD from Porto Alegre/RS, Brazil. We also intended to investigate whether such polymorphisms are associated with the development of CAD, and to analyze the relationship between the genotypes and clinical features. Analysis stratifying the patients group in CAD+ (individuals who have a level of artery obstruction equal or higher than 60%) and CAD- (individuals who have less than 60% of the artery blocked) were also performed. Genotyping was performed by PCR-RFLP followed by electrophoresis. A significant higher frequency of CC PECAM-I 373C/G genotype was observed in CAD patients as compared to non affected individuals, suggesting an association between this genotype and CAD susceptibility. The genotypic and allelic frequencies of PECAM-I 53G/A and ICAM-I 1548A/G polymorphism did not differ statistically between CAD patients and non affected individuals.

Financial support: Fapergs, CNPq, CAPES

Key Words: PECAM-I, ICAM-I, polymorphism, Coronary Artery Disease.

Abbreviations:

CAD, Coronary Artery Disease

CAD+, patients with 60% of artery obstruction or more

CAD- patients with less than 60% of artery obstruction.

ICAM-I or CD54, Intercellular Adhesion Molecule-type I

PECAM-I or CD31, Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1

SSRE, Shear Stress Response Element

UTR, Untranslated Region

PCR, Polymerase Chain Reaction

RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism

Bp, Base pair

INTRODUCTION:

Cardiovascular diseases are responsible for a large number of deaths in the world, being coronary artery disease (CAD) responsible for approximately 7 million deaths per year. According to the World Health Organization report from 2002, 271,828 people died due to some kind of cardiovascular disease (ischaemic, inflammatory or hypertensive heart diseases) during that year in Brazil. In Rio Grande do Sul, the southern most state of Brazil, CAD accounts for nearly 5.6% of total deaths, while in Porto Alegre, the state capital, this number is 4.5% (24).

Coronary artery disease is a complex disorder that has genetic and environmental influences. It is characterized by the progressive obstruction of the coronary artery, which impairs myocardium oxygenation in varying degrees. Usually, CAD is manifested as angina and stroke, and it is commonly caused by atherosclerosis.

Atherosclerosis is characterized by the accumulation of calcium, cholesterol and fibrin in the artery walls. Such cholesterol accumulation, along with other circulating fats, leads to a laminar stress in the artery wall, which in turn results in impaired blood flow leading to the establishment of a small lesion. All these events trigger the recruitment of different cells of the immune system, which migrate to the site of injury in order to repair the lesion. This repair process includes the transmigration of immune cells to the sub endothelial space, originating an atherosclerotic plaque, which is responsible for obstructing the artery. In some cases, this plaque can be disrupted and lead to thrombosis events.

During the development of CAD, a large number of different immune system cells are recruited. Different genes are also activated, leading to the production of several proteins and cytokines that lead to increased subendothelial permeability, leukocyte migration and cellular

adhesion. Among those proteins are the intercellular adhesion molecule-type I (ICAM-I, or CD54) and the platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM –I, or CD31). Several works have showed the importance of different genetic variants in various genes as susceptibility factors to CAD development. Polymorphisms in genes involved in fat metabolism, thrombosis, proteolysis and even neurohormonal control have been associated with a high risk to CAD development (14; 15). The identification of genetic markers of predisposition and development of CAD could lead to a better understanding of the pathophysiology of the disease, which in turn could lead to the development of therapeutic agents/strategies to prevent and/or treat this disorder (11).

As leukocyte adhesion to the artery walls is an important step in CAD development we target our analysis in two adhesion molecules (PECAM-I and ICAM-I).The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a member of the immunoglobulin family expressed by leucocytes and endothelial cells (5). It is involved in endothelial integrity and in cellular transmigration from the blood flow to the subendothelial space of arteries and veins, and there to adjacent tissues (3; 16; 2). PECAM-I has an important role in cellular adhesion, as it modulates the endothelial cell affinity for another class of adhesion molecules, the integrins (5). High levels of soluble PECAM-I have been found in patients with myocardial infarction (23; 6; reviewed in 5). In the present work, we have analyzed 2 polymorphisms in the PECAM-I gene: PECAM-I 53 G/A and PECAM-I 373 G/C. PECAM-I 53 G/A is a G to A substitution in a Shear Stress Response Element (SSRE), located at the 3'UTR region of the gene. The variant allele A leads to a disruption in this SSRE, causing the defective of PECAM-I gene activation during shear stress stimuli. (7). PECAM-I 373 G/C is a C to G

substitution in exon 3 at codon 125 altering a leucine to a valine. Exon 3 codes for the first immunoglobulin domain of PECAM I. (7; 6; 5, 16)

The intercellular adhesion molecule-type I is also a member of the immunoglobulin family, this molecule is activated by cytokines and is constitutively expressed by different cells in the organism (14; 27 *apud* 9). ICAM-I can be positively regulated by pro-inflammatory cytokines secreted by endothelial cells and leucocytes (3; 20). High levels of soluble ICAM-I have been reported in individuals with occlusive arterial disease, CAD and atherosclerosis (9). Those elevated levels have been considered as a risk factor for future cardiovascular problems (12; 18). The polymorphisms analyzed in the present work was ICAM-I -1548 A/G, an A to G substitution in the 1548 position of codon 469 in exon 6, which leads to a glutamine to lysine substitution in the protein. Exon 6 codes for the fifth immunoglobulin domain of ICAM-I. (17).

Considering that the establishment of an atherosclerotic plaque seems to involve leukocyte adhesion and migration we wonder if variations on leukocyte surface adhesion molecules could interfere on CAD development.

The main objective of the present work was to determine genotypic and allelic frequencies of three polymorphisms in adhesion molecule genes in patients with CAD from Porto Alegre/RS, Brazil. We also intend to investigate whether such polymorphisms are associated with the development of CAD, as well as analyze the relationship between the genotypes found and clinical features of the patients.

METHODS & RESULTS

PATIENTS AND CONTROLS

We investigated CAD patients from Hospital de Clínicas de Porto Alegre who underwent coronary angiography to confirm the disease. A DNA bank of patients was previously established (22). This DNA bank is constituted by Euro-descendants individuals, as ascertained by morphological characteristics, living in Porto Alegre (the capital of the southernmost state of Brazil) whose age ranges from 31 to 84 years (mean=60, 2 years, SD=± 11, 08). The demographic and clinical data are presented in table 1 according to the number of genotyped samples for each polymorphism.

Healthy control individuals are Euro-descendants individuals from Porto Alegre and Campo Bom from a previously established DNA bank. Their ages ranged from 40 to 83 years (mean = 56.6 years, SD = ±10.33). None of them was affected by cardiopathies neither had any family history of such disorders. Their demographic data are presented in table 1.

GENOTYPING

PECAM I

PECAM-I 53 G/A and PECAM-I 373 C/G genotyping were performed by PCR-RFLP using specific primers as previously described (6; 8). PCR samples were prepared to a final volume of 25 µl as follows: 1 µl of DNA (0.2–0.5 µg); 2.5 µl of 10X PCR buffer [200 mM Tris–HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]; 1 µl of 50 mM MgCl₂; 1 µl of 3 mM dNTP mix; 1 µl of 10 pmol primer mix; and 1U of Taq DNA polymerase (CenBiot, UFRGS). PECAM-I 53 G/A PCR reactions underwent 1 cycle at 96°C for 1 min, 40 cycles at 96°C, 1 min for denaturation,

60°C , 1 min for annealing, 72 °C, 1 min for extension and a final cycle at 72°C, 5 min for final extension. The resulting 317 bp fragment was digested with 5U of the enzyme *Bsa* I for 4hr at 50°C, producing 115 bp and 202bp fragments (wild type allele), or a single non-digested 317 bp fragment (variant allele). The fragments were visualized by electrophoresis on 3% agarose gel stained with ethidium bromide. Figure 1 shows the fragments resulting from a typical enzyme digestion reaction.

PECAM-I 373 C/G cycling conditions were described by Wenzel (2005). The resulting 504bp fragment was digested with 10U of the enzyme *Pvu* II overnight at 37°C, resulting in 434 bp and 70 bp fragments (variant allele) or a single undigested 504bp fragment (wild type allele). The fragments were visualized by electrophoresis on 6% acrylamide gel stained with silver nitrate (Fig 2).

ICAM I 1548A/G

ICAM I A/G genotyping was also performed by PCR-RFLP. The PCR was performed using primers previously described by McGlinchey (17). PCR samples were prepared to a final volume of 25 µl as follows: 1 µl of DNA (0.2–0.5 µg); 2.5 µl of 10X PCR buffer [200 mM Tris–HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]; 1 µl of 50 mM MgCl₂; 1 µl of 3 mM dNTP mix; 1 µl of 10 pmol primer mix; and 1U of Taq DNA polymerase (CenBiot, UFRGS). The PCR reactions mixtures underwent 1 cycle at 96°C for 1 min, 30 cycles at 96°C, 20 seconds for denaturation, 64°C , 50 seconds for annealing and 72 °C, 1 min for extension. The resulting 223 pb fragment was digested with 5U of the enzyme *BstU* I for 4hr at 60°C, producing 136pb and 87pb fragments, or a single non- digested 223 pb fragment (A allele). The fragments were

visualized in a 3% agarose gel stained with ethidium bromide. Figure 3 shows an individual sample submitted to restriction enzyme cleavage agarose gel.

RESULTS

Clinical features and demographic parameters of both patients and control groups are presented on Table 1. Table 2 shows the allelic and genotypic frequencies for the polymorphic systems studied.

The statistical analysis show that the differences in genotypic frequencies between the patients and control groups are significant for the PECAM-I 373C/G polymorphism ($p < 0.001$). Thus it is possible to observe a higher frequency of the CC genotype in the patients group. The residual analysis showed that the difference in genotypic frequency of CC genotype among patients and controls is statistically significant ($p < 0.001$) supporting the hypothesis that the CC genotype is the risk genotype. Subsequent to the residual analysis, a logistic regression analysis was carried out. This analysis demonstrated that the association found between the CC genotype and CAD risk was statistically significant ($p = 0.023$). With the logistic regression result was also possible to obtain the odds ratio for this genotype that is 1.694 with a confidence interval of 1.075-2.668. Subsequently, we made another logistic regression, except that we grouped the GG and CG genotypes in one category comparing against the CC genotype between patients and control groups. This analysis resulted in a higher odds ratio ($p = 0.014$; OR=3.125 and CI=1.262 – 7.736). Therefore, we can formulate the hypothesis that the carriers of the CC genotype have a higher risk of CAD development.

We then stratified the patient group in CAD+ (individuals who have a level of artery obstruction equal or higher than 60%) and CAD- (individuals who have less than 60% of the artery blocked). The comparison between the genotypic frequencies of these two groups did

not reach statistical significance. Comparing the CAD+ and CAD- genotypic frequencies with the control group separately we also did not find statistical significance among them. These results suggest that the C allele is involved with the susceptibility to disease, but not with the gravity of it.

The initial statistical analysis of genotypic frequencies of PECAM-I 53G/A polymorphism showed that the differences between patients and controls are statistically significant ($p=0.022$). The residual analysis carried out among the genotypic frequencies of patients and controls demonstrated that the AG genotype is the prevalent genotype ($p=0.007$), and also that its frequency is increased among the patients. Subsequently, we made a logistic regression analysis with genotypic data and the results did not shown an association between the AG genotype and CAD development. Stratifying the patients group in CAD+ and CAD- and comparing the genotypic frequencies between them, and with the control group, we were also unable to establish a correlation between genotypes and disease. These results suggest that there is no association between PECAM 53G/A polymorphism with CAD development, or risk.

The ICAM-I 1548A/G polymorphism differences between patient and control groups were not statistically significant. The logistic regression analysis shows that there is no association between ICAM-I 1548A/G genotypes and an alteration in the risk of CAD development. The analysis stratifying the patients in CAD+ and CAD- also did not show statistic significance among the differences in the genotypic frequencies of both groups and in the groups and controls. This result suggests that this polymorphism is not associated with CAD.

DISCUSSION & CONCLUSIONS

The present work analyzed three polymorphisms in adhesion molecule genes in individuals affected by CAD, aiming to a better comprehension of the role of these molecules and the development and susceptibility to disease.

It is well established that in early stages of CAD there is a significant involvement of adhesion molecules in the inflammatory processes that lead to atherosclerotic plaque development. These molecules are present at the surface of both leukocytes and endothelial cells. Adhesion molecules are responsible for both leukocyte adhesion to the endothelium and transendothelial migration of leukocytes to adjacent tissues.

The PECAM-I 373C/G polymorphism is a SNP located at exon 3 of the gene that leads to an amino acid changes (a leucine to a valine change). This region codifies the first immunoglobulin domain of the molecule. The immunoglobulin domains are responsible for the linkage between the endothelium and the leukocytes that migrate to the lesion. It is possible that such an amino acid substitution alters the molecule characteristics and affinity for endothelium antigens, resulting in altered adhesion of leukocytes to the endothelium. According to our results, PECAM-I 373C/G genotypic frequencies are statistically significant different between patients and control individuals ($p < 0.001$). Concerning the result of the residual analysis it is possible to observe that the CC genotype was more prevalent in the patients group, when compared to the control group, reaching a frequency of 0.21 in the patients (CC: 0.046 in control group/ $p = 0.023$). Considering these results, we approach the CC genotype as the risk genotype. This way, the CC genotype could be responsible for a normal level of leukocyte adhesion to the endothelium and the GG genotype responsible for a reduced adhesion. So the GG genotype could have a protective character, potentially reducing

the risk of CAD development. As the odds ratio of CC genotype was 3.125 we can also infer that the carriers of this genotype have a higher risk to develop CAD.

Previous studies indicated an association between the PECAM-I 373C/G polymorphism and CAD in different human populations (10; 25; 6; 27; 8; reviewed at 5). However, the genotype frequently associated to CAD was the GG genotype and only a few studies using Myocardial Infarction patients suggested disease association with the allele C (23; 6; reviewed at 5). Considering the existence of such controversial data, a hypothesis was formulated where each allelic variant has a different function, so the G allele is thought to be responsible for an increased transendothelial migration, resulting in a higher risk of CAD; and the C allele would be responsible for modulation of platelet activation, increasing the risk of myocardial infarction (5). Nevertheless, in our study, the CC genotype was not highly prevalent between patients that suffer from myocardial infarction (data not shown). So far, it is not possible to affirm that the associations between the G allele and CAD, and the C allele and myocardial infarction are due to distinct effects from each allele in the development and susceptibility to these diseases.

Stratifying the patients group in CAD+ and CAD-, comparing them between each other and with the control group, no association was observed concerning PECAM-I 373C/G alleles or genotypes and the disease. There is no prevalent genotype in CAD+ or CAD- groups. Thus, although the CC genotype can be associated to CAD susceptibility, this genotype do not seems to be related to the disease gravity. As some studies related that there is altered PECAM-I serum level in CAD patients it is also possible to infer that this polymorphism is associated with the early inflammatory process that leads to CAD development, but not with late events and development of the atherosclerotic plaque. Interestingly, some studies report the

expression of adhesion molecules in the atherosclerotic plaque, a situation independent of any association between plaque formation and development and adhesion molecule polymorphisms. It should be pointed out that the relation among polymorphic variants in adhesion molecule genes and their serum level, protein molecular shape and function remains unclear. Our data corroborate the lack of association between adhesion molecules polymorphisms and atherosclerotic plaque development and progression since we did not find statistical associations among the variants and disease gravity in the CAD+ and CAD- analyses.

The PECAM-I 53G/A polymorphism was recently described by Elrayess et al 2003. As suggested by the authors, the A allele is a protective allele, due to a defective activation of the gene, as compared as those mediated by the G allele, in a situation of endothelial stress. Thus, according to this study, individuals that have the A allele seem to be protected and had less progression of the disease compared with individuals homozygous for the G allele (7). As it concerns to a modification in a SSRE, Elrayess et al also suggest that this polymorphism is not important in early events of CAD, since the higher shear stress occurs when there is a relatively large stenosis, what happens in late atherosclerotic events. Our results indicated a significant higher frequency of the AG genotype in patients group ($p = 0.007$). However, the logistic regression result was not statistically significant, suggesting that PECAM-I 53 G/A polymorphism is not associated with CAD risk or development. When we stratified the patients group in CAD+ and CAD- no statistically significant association between genotypes and disease gravity or risk were found, so we were not able to confirm the PECAM-I 53G/A involvement in gravity or susceptibility to disease.

The statistical analysis demonstrated that there is no statistical significance in the genotypic frequencies differences between patients and control groups, concerning the ICAM-1 1548A/G polymorphism. The logistic regression analysis also shows no statistical association between genotypes and CAD risk. Stratifying the patients in CAD+ and CAD- and performing the proper statistical analysis, we also do not find statistical association between genotypes and disease gravity. This way, we can conclude that this polymorphism is not associated neither to the susceptibility nor to gravity of the disease.

Considering the presented data we can suggest that the adhesion molecules ICAM-1 and PECAM-1 are involved in the early steps of CAD development. Some studies correlate high levels of these adhesion molecules and CAD development risk (12; 9; 18; 16; 5; 8). Works using animal models demonstrated that ICAM-1 and PECAM-1 adhesion molecules expression in atherosclerotic plaques is an ubiquitous phenomenon, suggesting an important role for these molecules in the atherosclerotic process (21; 26; 4). Others studies, with transgenic animals defective in PECAM-1 showed that these animals have a thinner atherosclerotic plaque than the wild type animals (19; 13). Although the adhesion molecules involvement in CAD susceptibility is clear, as well as its importance in atherosclerotic plaque formation, we are not able to affirm that a given polymorphic variant is associated to the degree of artery obstruction. Also, it is not known how the expression, serum level and different variants of these molecules determine CAD susceptibility, development and plaque formation.

The existence of controversial data on the literature can be explained by the different ethnical/genetical backgrounds of the analyzed populations and by the interference of environmental factors. Environmental factors such as smoking habit, diabetes, sedentarism, as

well as other factors such as age and gender, alter the risk of CAD development. Thus, individuals presenting risk genotypes and also exposed to environmental factors that increase CAD risk have an even higher risk of CAD development. It is also important to point out the possibility of interactions between different polymorphic variants that could increase/reduce the risk of CAD development. Finally, an increase in the sample size, as well as a complete evaluation of the clinical features of the patients will allow us to obtain more data in order to determine the real involvement of adhesion molecules in CAD development.

REFERENCES

[1] Andreotti F, Porto I, Crea F & Maseri A (2002) Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart* 87: 107–112.

[2] Behar E, Nelson J, Chao NJ, Debra D ,Hiraki P.H.D., Shalini Krishnaswamy M.D. et al. (1796) Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine* 334, 286.

[3] Blankenberg S, Barbaux S & Tiret L (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170 171–203

[4] Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D et al (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis *J Pathol* 171:223–9.

[5] Elrayess MA & Talmud PJ (2005) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) & coronary heart disease. *Indian J Med Res* 121: 77-79.

[6] Elrayess MA, Webb KE, Bellingan GJ, Whittall RA, Kabir J, Hawe E, *et al* (2004) R643G polymorphism in PECAM- 1 influences transendothelial migration of monocytes and is associated with progression of CHD and CHD events. *Atherosclerosis* 177: 127-35.

[7] Elrayess MA, Webb KE, Flavell DM, Syvañne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäñniemi YA, Pasternack A, Jukema JW, Kastelein JJP, Zwinderman AH & Humphries SE (2003) A novel functional polymorphism in the PECAM-1 gene (53G_/A) is associated with progression of atherosclerosis in the LOCAT and REGRESS studies. *Atherosclerosis* 168:131-138

[8] Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK , Sethi S, Koh TH & Chatterjee S (2005) Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res* 121: 92-99

[9] Gaetani E, Flex A, Pola R, Papaleo P, De Martini D, Pola E, Aloï F, Flore R, Serricchio M, Gasbarrini A & Pola P (2002) The K469E polymorphism of the ICAM-1 gene is a risk factor for peripheral arterial occlusive disease. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 13:483–488

[10] Gardemann A, Knapp A, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W (2000) No evidence for the CD31 C/G gene polymorphism as an independent risk factor of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 83: 629.

[11] Hauser ER, Crossman DC, Granger CB, Haines JL, Jones CJH, Mooser V, McAdam B, Winkelmann BR, Wiseman AH, Muhlestein JB, Bartel AG, Dennis CA, Dowdy E, Estabrooks S, Eggleston K, Francis S, Roche K, Clevenger PW, Huang L, Pedersen B, Shah S, Schmidt S, Haynes C, West S, Asper D, Booze M, Sharma S, Sundseth S, Middleton L, Roses

AD, Hauser MA, Vance JM, Pericak-Vance MA & Kraus WE (2004) A Genomewide Scan for Early-Onset Coronary Artery Disease in 438 Families: The GENECARD Study. *Am. J. Hum. Genet.* 75:436–447.

[12] Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR et al (1997) Circulating adhesion molecules VCAM1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. *Circulation* 96: 4217–25.

[13] Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, Hashimoto H, Kuwabara K, Ohtsuki T & Hori M (2002) Involvement of ICAM-I in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis* 160(2):305:10.

[14] Lamblin N, Bauters C & Helbecque N (2001) Gene polymorphisms of pro- (or anti-) inflammatory cytokines and vascular disease. *European Heart Journal* 22: 2217–2220.

[15] Latkovskis G, Licis NU & Kalnins (2004) C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *European Journal of Immunogenetics* 31: 207–213.

[16] Listì F, Candore G, Lio D, Cavallone L, Colonna-Romano G, Caruso M, Hoffmann E, & Caruso C (2004) Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily. *European Journal of Immunogenetics* 31: 175–178.

[17] McGlinchey PG, Spence MS, Patterson CC, Allen AR, Murphy G, Belton C & McKeown PP (2004) The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene K469E polymorphism is not associated with ischaemic heart disease: an investigation using family-based tests of association. *European Journal of Immunogenetics* 31: 201–206.

[18] Mulvihill NT, Foley JB, Crean P & Walsh M (2002) Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *European Heart Journal* 23: 1569–1574.

[19] Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC & Beaudet AT (1997) Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1517–1520.

[20] Ponthieux A, Herbeth B, Drosch S, Lambert D, Visvikis S (2003) Age - and Sex-related Reference Values for Serum Adhesion Molecule Concentrations in Healthy Individuals: Intercellular Adhesion Molecule-1 and E-, P-, and LSelectin. *Clinical Chemistry* 49, (10)

[21] Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP & Johnson-Tidey RR (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140(3):665-73.

[22] Rios DLS, Vargas AF, Torres MR, Zago AJ, Callegari-jacques & Hutz MH (2003) Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. *Clinical Genetics* 63, 380-385.

[23] Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T (2001) Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 947: 259-69.

[24] SIM – Serviço de Informação sobre Mortalidade. 2004. Ministério da Saúde, DATASUS. (www.datasus.gov.br).

[25] Song FC, Chen AH, Tang XM, Zhang WX, Qian XX, Li JQ, *et al* (2003) Association of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism with coronary heart disease. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23: 156-8.

[26] Van der Wal AC, Das PK, Tigges AG & Becker (1992) AE Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 141(6):1427-33.

[27] Wei H, Fang L, Chowdhury SH, Gong N, Xiong Z, Song J, *et al* (2004) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with severe coronary artery stenosis in Chinese Singaporean. *Clin Biochem* 37: 1091-7.

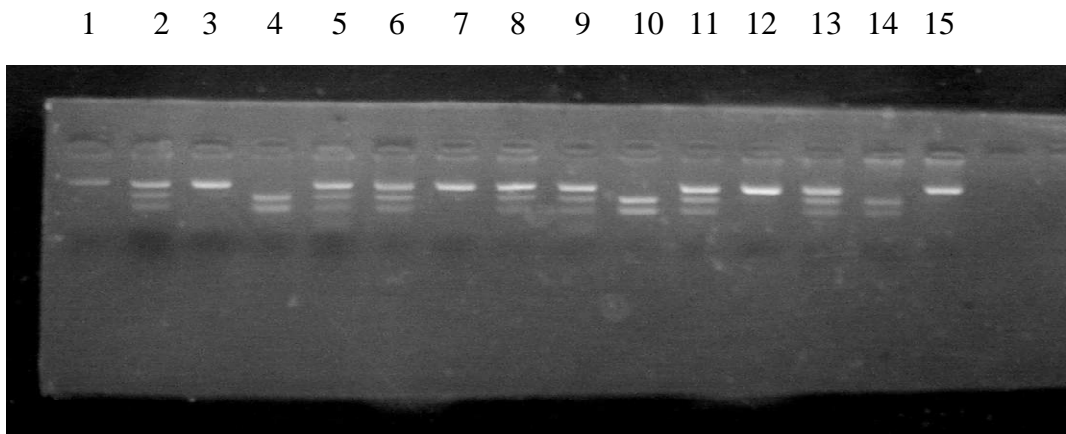


Fig 1: agarose gel 3% stained with ethidium bromide of a *Bsa* I enzyme digestion reaction of PECAM-I 53G/A polymorphism. 1,15: PCR reaction; 2, 5, 6, 8, 9, 11, 13: AG individual; 3, 7, 12: AA individual; 4, 10, 14: GG individual.

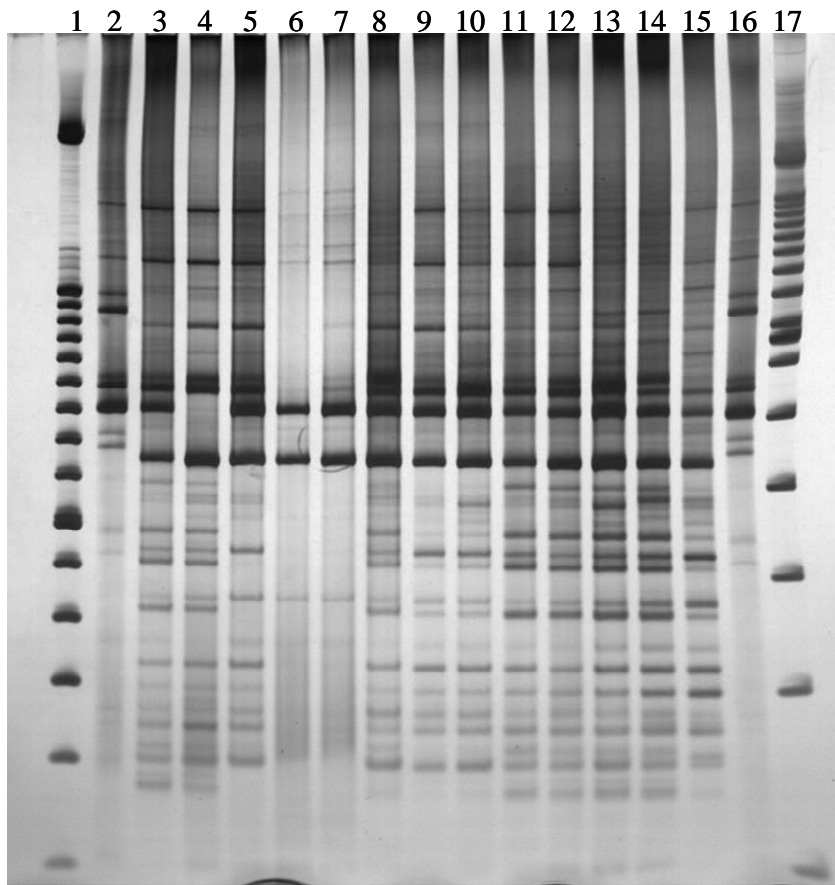


Fig 2: acrylamide gel 6% stained with silver nitrate of a Pvu II enzyme digestion reaction of PECAM-I 373C/G polymorphism. 1: 50bp ladder; 2, 16: PCR reaction; 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15: CG individual; 4: GG individual; 17: 100bp ladder. No homozygous CC was obtained in this reaction.

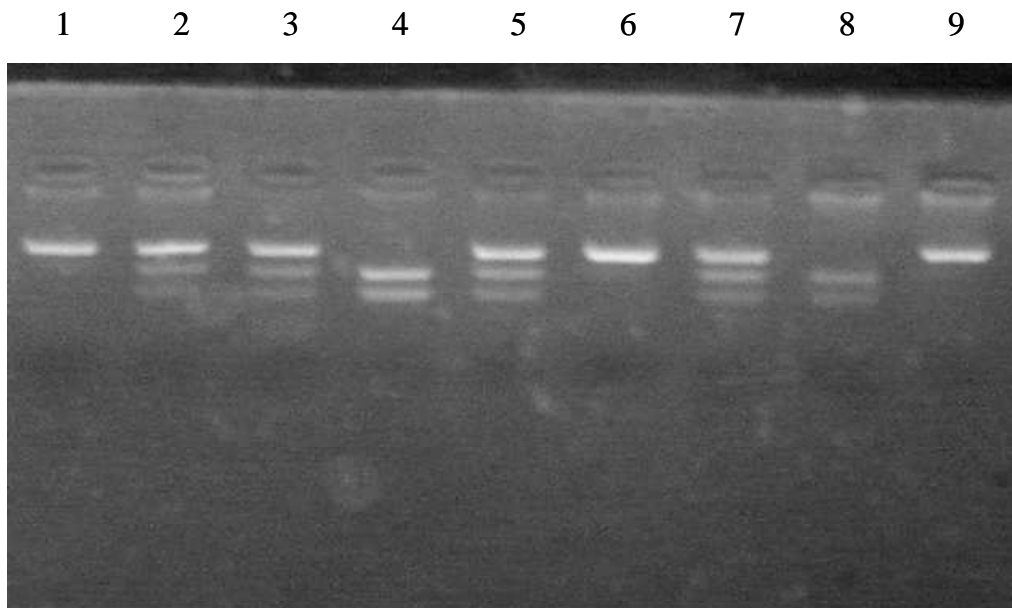


Fig 3: agarose gel 3% stained with ethidium bromide of a *BstU* I enzyme digestion reaction of ICAM-I 1548A/G polymorphism. 1, 9: PCR reaction; 2, 3, 5, 7: AG individual; 6: GG individual and 4: AA individual.

Table 1. Demographic data of patients and healthy controls for the polymorphic system analysed.

	PECAM I.53 G/A		PECAM I.373 C/G		ICAM I-1548 A/G	
	Healthy Controls (n=208)	Patients (n=231)	Healthy Controls (n=152)	Patients (n=221)	Healthy Controls (n=197)	Patients (n=250)
Age [year(Mean±SD)]	40-83 (56.6±10.33)	35-84(59.9±11.08) ^f	40-81 (56.65±10.41)	36-84 (60.67±10.9) ^f	40-83(56.06±11.14)	35-84(60.02±11.17) ^f
Male gender	89/204 ^d	127/221 ^{dj}	65/137 ^d	119/206 ^{dg}	89/192 ^d	138/234 ^{dg}
Diabetes mellitus	-	39/221 ^d	-	36/206 ^d	-	40/234 ^d
Smoking	52/198 ^d	126/221 ^{de}	34/133 ^d	115/206 ^{de}	49/186 ^d	128/234 ^{de}
Hypertension	35/104 ^d	144/221 ^{de}	20/65 ^d	133/206 ^{de}	34/192 ^d	151/234 ^{di}
Sedentarism	63/202 ^d	144/221 ^{de}	36/136 ^d	136/206 ^{de}	62/190 ^d	154/234 ^{de}
Family history	42/100 ^d	120/221 ^{de}	25/65 ^d	109/206 ^{de}	38/91 ^d	130/234 ^{dh}
BMI (mean ± SD) ^a	28.18±5.24	28.08±4.74 ^f	27.87±5.39	28.10±4.84 ^f	27.74±4.75	28±4.67 ^f
Weight (mean ± SD)	73.33±15.24	76.08±14.57 ^f	73.09±16.09	76.13±14.94 ^f	72.98±14.35	75.95±14.44 ^f
Height (mean ± SD)	1.62±0.09	1.64±0.09 ^f	1.63±0.095	1.64±0.09 ^f	1.62±0.09	1.64±0.09 ^f
Catherism	-	24/231 ^d	-	12/221 ^d	-	41/250 ^d
Myocardial Infarction	-	57/195 ^d	-	59/186 ^d	-	63/203 ^d
Chest pain (Angina)	-	166/195 ^d	-	156/186 ^d	-	173/203 ^d
CAD ⁺ ^b	-	76/209 ^d	-	55/186 ^d	-	68/212 ^d
CAD ⁻ ^c	-	133/209 ^d	-	131/186 ^d	-	144/212 ^d

^aBody mass index (kg/m²).

^bPatients with 60% of artery obstruction or more.

^cPatients with less than 60% of artery obstruction.

^dTotal number of individuals with information about the characteristic.

^ep<0,000.

^fp=1,000.

^gp=0,478.

^hp=0,061.

ⁱp=0,765.

^jp=0,008

Tabela 2. Genotypic and allelic frequencies for the polymorphic systems studied.

Polymorphism		Cases [freq (n)]	Healthy control [freq(n)]	
PECAM I 373 C/G	Genotype	C/C	0.210 (46)*	0.046 (7)
		C/G	0.630 (139)	0.697 (106)
		G/G	0.160 (36)	0.257 (39)
	Allele	C	0.523*	0.395
		G	0.477	0.605
Total		221	152	
Polymorphism		Cases [freq (n)]	Healthy control [freq(n)]	
PECAM I 53 G/A	Genotype	G/G	0.844 (195)	0.920 (191)
		G/A	0.130 (30)**	0.050 (10)
		A/A	0.026 (6)	0.030 (7)
	Allele	G	0.909	0.940
		A	0.091	0.060
Total		231	208	
Polymorphism		Cases [freq (n)]	Healthy control [freq(n)]	
ICAM I A/G	Genotype	G/G	0.168 (42)	0.140 (28)
		G/A	0.352 (88)	0.340 (67)
		A/A	0.480 (120)	0.520 (102)
	Allele	G	0.344	0.310
		A	0.656	0.690
Total		250	197	

*p<0.001 compared to controls

**p=0.007 compared to controls

Capítulo 3



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

3.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou 3 polimorfismos em moléculas de adesão em indivíduos com Doença Arterial Coronariana com o intuito de compreender o papel deste tipo de moléculas no desenvolvimento e suscetibilidade à doença. As amostras de indivíduos acometidos por DAC e indivíduos não acometidos provêm de indivíduos descendentes de europeus. Indivíduos que, através do exame das características morfológicas (Azevêdo *et al.* 1980) pudessem ser classificados como miscigenados foram excluídos do presente trabalho.

A tabela 2 do artigo apresenta as frequências alélicas e genóticas dos diferentes sistemas polimórficos analisados em indivíduos afetados e não afetados por DAC.

3.1.1. PECAM I 373C/G

Nos estágios iniciais de desenvolvimento de DAC, há um grande envolvimento das moléculas de adesão. Durante essa fase há o recrutamento de células inflamatórias da circulação para o local inicial da lesão no endotélio do vaso, bem como a migração transendotelial das mesmas. A adesão e migração transendotelial dessas células é mediada pelas moléculas de adesão, que são expressas tanto pelo leucócito como pelo endotélio. A molécula de PECAM-I desenvolve papel importante no extravasamento dos leucócitos da circulação sanguínea para os tecidos adjacentes.

As análises estatísticas realizadas demonstram que a diferença entre as frequências genóticas referentes ao polimorfismo PECAM-I 373C/G do grupo de indivíduos afetados por DAC e do grupo de indivíduos não afetados é estatisticamente significativa ($p < 0.001$).

Dessa forma, observa-se que o genótipo CC está mais representado entre os indivíduos afetados por DAC quando comparados aos indivíduos não afetados. A análise de resíduos feita posteriormente demonstrou que a diferença no número de indivíduos CC no grupo de acometidos por DAC é significativamente maior do que no grupo dos não acometidos ($p < 0.001$), apoiando a hipótese de que o genótipo CC seja um genótipo de risco. O resultado da regressão logística feita com o programa SPSS demonstrou haver associação estatisticamente significativa entre o genótipo CC e suscetibilidade à doença ($p = 0.023$). A regressão ainda mostrou que o risco relativo de indivíduos com genótipo CC é de 1.694, com intervalo de confiança de 1.075-2.668. Posteriormente, foi feito agrupamento dos genótipos CG e GG e realizada regressão logística fazendo a comparação com o genótipo CC. Os resultados concordaram com os da primeira regressão e demonstraram um risco relativo ainda maior ($p = 0.014$; $RR = 3.125$ e $IC = 1.262 - 7.736$). De acordo com estudos publicados anteriormente, o polimorfismo PECAM –I 373C/G é um SNP localizado no éxon 3 do gene de PECAM e que leva à substituição de aminoácidos (troca de uma leucina por uma valina). Esse polimorfismo está localizado em uma região que codifica o primeiro domínio tipo imunoglobulina desta molécula de adesão. Esses domínios se ligam aos antígenos expressos pelo endotélio, mediando a adesão dos leucócitos ao mesmo. É possível que esta troca de aminoácidos leve a uma modificação nas características do domínio tipo imunoglobulina, modificando também a capacidade de ligação da molécula ao antígeno expresso no endotélio e, conseqüentemente, a ligação do leucócito ao endotélio. Como resultado desta alteração teríamos uma modificação na afinidade da molécula pelo antígeno o que afetaria a adesão celular e a migração transendotelial. Como o genótipo CC (genótipo selvagem) foi apontado pelas análises como sendo o genótipo de risco, é possível que o alelo G seja responsável por

uma modificação na adesão leucócito-endotélio, podendo possuir um caráter protetor. É possível formular a hipótese o genótipo CC seria responsável por uma adesão normal (elevada) e o genótipo GG por uma adesão reduzida.

Estratificando a amostra de pacientes em indivíduos com obstrução do vaso maior ou igual a 60% (DAC +) e indivíduos com obstrução menor do que 60% (DAC-) e comparando as frequências alélicas e genotípicas, não se observou diferença estatisticamente significativa entre elas. Esse resultado indica que, possivelmente, o polimorfismo esteja associado à suscetibilidade à doença e não à gravidade da mesma. É possível que o polimorfismo esteja envolvido nos processos inflamatórios que precedem o desenvolvimento de DAC e não na formação e determinação da espessura da placa aterosclerótica *per se*.

Estudos anteriores já haviam demonstrado associação do polimorfismo PECAM-I 373C/G e DAC em diferentes populações humanas. (Gardemann *et al.* 2000; Song *et al.* 2003; Elrayess *et al.* 2004; Wei *et al.* 2004; Fang *et al.* 2005; revisados em Elrayess *et al.* 2005). Entretanto o genótipo associado a DAC nestes trabalhos foi o genótipo GG, assim como o alelo G aparecia como o alelo de risco. Estudo realizado com pacientes com infarto do miocárdio provenientes da Sicília não encontrou associação do polimorfismo PECAM-I 373C/G com a doença (Listì *et al.* 2004), não havendo diferenças (fossem genotípicas ou alélicas) entre pacientes e controles. Entretanto, outros estudos envolvendo indivíduos acometidos por Infarto do Miocárdio encontraram associação com o alelo C (Sasaoka *et al.* 2001; Elrayess *et al.* 2004; revisados em Elrayess *et al.* 2005). Como diversos estudos publicados anteriormente encontraram dados controversos, foi formulada uma hipótese na qual os alelos teriam funções diferentes. Uma das variantes seria responsável por uma alteração na migração transendotelial de monócitos mediada por PECAM-I, aumentando

assim o risco de DAC e a outra variante seria responsável por modular a ativação plaquetária, aumentando o risco de infarto do miocárdio (Elrayess *et al* 2005). Dos nossos pacientes, 31 % (59 indivíduos) sofreram infarto agudo do miocárdio, entretanto, o genótipo CC não foi prevalente nesses indivíduos (CC: 0.24; CG:0.63 e GG: 0.13). Ainda assim, não é possível afirmar com certeza que a associação do alelo G com aterosclerose e do alelo C com infarto do miocárdio se deva realmente a efeitos distintos de cada alelo no desenvolvimento e suscetibilidade da doença.

3.1.2. PECAM-I 53 G/A

As análises estatísticas realizadas comparando as frequências genótípicas e alélicas entre indivíduos afetados e não afetados por DAC demonstrou existir diferença significativa entre os 2 grupos analisados quanto às frequências genótípicas ($p=0.022$). A análise dos resíduos da tabela obtida no SPSS demonstrou que há mais indivíduos do genótipo AG no grupo de indivíduos acometidos por DAC quando comparado ao grupo de indivíduos não acometidos ($p=0.007$). Entretanto análise por regressão logística não foi significativa, não havendo aumento do risco devido ao genótipo. Nenhuma das comparações feitas com o grupo DAC+ e DAC- apresentou dados estatisticamente significantes. Hipoteticamente, o alelo A seria considerado um alelo protetor, já que a presença do alelo faz com que o gene PECAM-I não seja ativado diante de uma situação de estresse no endotélio do vaso. Entretanto, nossos dados não nos permitem inferir a respeito do potencial envolvimento do polimorfismo com a gravidade ou suscetibilidade a doença.

O polimorfismo PECAM-I 53G/A foi recentemente descrito por Elrayess *et al.* em 2003, em um estudo completo sobre os resultados funcionais desse polimorfismo. Justamente por esse motivo, ainda não existem muitos estudos populacionais que tenham avaliado as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo, sendo este o segundo do tipo. O outro estudo desse gênero é o mesmo que descreve o polimorfismo. De acordo com Elrayess *et al.* (2003), os estudos com indivíduos provenientes da Holanda e Finlândia demonstram que os portadores do alelo A apresentavam uma progressão significativamente menor da lesão aterosclerótica. A frequência do alelo A no presente estudo, assim como ocorreu no estudo de Elrayess *et al.*, foi baixa, portanto o envolvimento deste alelo no desenvolvimento da doença parece não ser tão determinante.

3.1.3. ICAM-I

As análises iniciais demonstraram que as diferenças genóticas e alélicas entre o grupo de indivíduos afetados por DAC e o grupo dos não afetados não são estatisticamente significativas, não havendo um genótipo prevalente em qualquer dos grupos. A regressão logística realizada com esses demonstrou que nenhum dos genótipos influencia de forma estatisticamente significativa o risco de desenvolvimento de CAD. O resultado da análise feita agrupando-se os genótipos e cruzando-os apóia o resultado anterior, não sendo estatisticamente significativo. Estratificando o grupo dos indivíduos afetados por DAC em DAC+ e DAC- e comparando-os com os controles não se obtém nenhum resultado significativo, demonstrando que o polimorfismo não está relacionado à gravidade da doença. A análise comparando DAC+ e DAC- também não foi significativa, corroborando a hipótese

de que o polimorfismo não está associado à gravidade da doença. Dessa forma acredita-se que o polimorfismo ICAM-I 1548A/G não está envolvido com a suscetibilidade à doença ou com a gravidade da mesma. No entanto, Gaetanni *et al.* descreveram uma associação entre o polimorfismo ICAM-I 1548A/G e doença arterial oclusiva periférica (DAOP), sendo os primeiros a encontrarem uma associação entre uma desordem relacionada à aterosclerose e um polimorfismo de ICAM-I. Os autores observaram uma frequência maior do genótipo GG assim como do alelo G nos indivíduos acometidos por DAOP. A análise feita demonstrou que os portadores do genótipo GG possuíam um risco 3.5 vezes maior de desenvolver DAOP. Entretanto, é interessante salientar que este estudo analisou 75 indivíduos acometidos por DAOP e 227 controles. Apesar de já haver sido encontrada associação do nível sérico elevado de ICAM-I e um aumento na suscetibilidade a doenças cardiovasculares, é possível que esse nível elevado seja devido a outros fatores imunológicos, como infecções e outras condições relacionadas à inflamação. Estudos anteriores demonstraram que o nível sérico da molécula pode ser utilizado como marcador de risco para futuro desenvolvimento de DAC, bem como que o nível sérico de ICAM-I também está elevado tanto em doenças cardíacas já estabelecidas quanto em síndromes cardíacas agudas (Shyu *et al.* 1996; Blankenberg *et al.* 2001; O'malley *et al.* 2001). É importante salientar que ainda não se sabe ao certo qual a relação do polimorfismo estudado com o estabelecimento do nível sérico, funções protéicas ou até mesmo conformação molecular da proteína. Sabe-se que as moléculas de adesão possuem papel importante nas condições inflamatórias das respostas imunes, mas ainda não se sabe ao certo qual a função das mesmas no desenvolvimento de DAC. Entretanto, dados controversos estão presentes na literatura, onde alguns estudos também não encontraram associação deste polimorfismo, e de outros em moléculas de adesão, com o risco de desenvolvimento de DAC,

uma doença já considerada como processo inflamatório crônico (Peter *et al.* 1997). Estudos realizados com indivíduos aparentemente saudáveis demonstraram que o nível sérico elevado da molécula de ICAM-I é um marcador de risco para futuros processos ateroscleróticos em indivíduos expostos a fatores de risco, mesmo controlando-se níveis de lipídios e idade (Ridker *et al.* 1998; Ridker *et al.* 2000; Mulvihill 2002). Esses dados sugerem o potencial envolvimento da molécula em estágios extremamente iniciais da doença. Existem outros polimorfismos no gene de ICAM-I que também seriam alvos interessantes para análise em DAC. Assim como o gene de PECAM-I, ICAM-I também possui SSREs (*Shear Stress Response Elements* - elementos de resposta ao estresse laminar; Elrayess *et al.* 2003), sendo interessante à procura por polimorfismos que possam influenciar a expressão do gene diante de situações de estresse endotelial nesses SSRESs. O aumento do tamanho amostral deve ser considerado para uma melhor percepção do real papel destas moléculas de adesão (e de suas variantes) no processo de desenvolvimento de DAC. Dessa forma, mais estudos envolvendo esse polimorfismo são interessantes de serem realizados no futuro.

3.2. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem hipotetizar que as moléculas de adesão estejam relacionadas aos processos extremamente iniciais da DAC. Apesar de estar claro o envolvimento dessas moléculas na suscetibilidade à DAC, bem como sua importância para a formação da placa aterosclerótica, ainda não se sabe ao certo o quanto sua expressão, nível sérico e diferentes variantes destas moléculas determinam à suscetibilidade a doença. Existem estudos que encontraram níveis elevados de moléculas de adesão nas placas ateroscleróticas e

foram capazes de relacionar esses níveis com o risco e suscetibilidade à DAC (Hwang *et al.* 1997; Gaetani *et al.* 2002; Mulvihill 2002; Listì *et al.* 2004; Elrayess *et al.* 2005; Fang *et al.* 2005). Estudos com animais experimentais e análises em humanos vêm demonstrando que a expressão de moléculas de adesão em placas ateroscleróticas é um fenômeno ubíquo, sugerindo um papel importante destas moléculas no processo aterosclerótico. (Poston *et al.* 1992; Van der Wal *et al.* 1992; Davies *et al.* 1993). Além disso, estudos com animais transgênicos, deficientes para essas moléculas, demonstraram que os mesmos apresentam uma placa aterosclerótica mais fina do que animais do tipo selvagem (Nageh *et al.* 1997; Kitagawa *et al.* 2002). Entretanto, ainda não é clara a relação entre as diversas variantes de moléculas de adesão, seus níveis séricos e o desenvolvimento de DAC, pois muitos dados da literatura são controversos. Fatores que podem estar contribuindo para os diferentes resultados nos estudos existentes são, por exemplo, o *background*, étnico das populações humanas analisadas e fatores ambientais. É bastante conhecido que fatores externos como, dietas lipídicas, tabagismo, sedentarismo e outros fatores como idade e sexo influenciam fortemente não só o desenvolvimento como a gravidade da doença. O fumo e a falta de exercícios são grandes agravantes da doença, aumentando consideravelmente o risco de desenvolvimento da mesma. Assim, indivíduos que sejam portadores de genótipos de risco, como, por exemplo, PECAM-1 373CC, e ainda estejam expostos a fatores ambientais que aumentam o risco de DAC seriam muito mais suscetíveis. Também não podemos descartar a interação entre genótipos de diferentes polimorfismos, que se somariam e aumentariam ainda mais o risco e suscetibilidade à doença. É importante salientar que, muitas vezes, associações podem não ser identificadas devido ao tamanho da amostra. Estratificações das populações de estudo também podem levar a uma redução do tamanho amostral interferindo nos resultados.

Capítulo 4



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreotti F, Porto I, Crea F & Maseri A (2002) Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart* 87: 107–112.
- Azevêdo ES (1980) Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. *Ann. Hum. Genet. Lond.* 44:55-60.
- Behar E, Nelson J, Chao NJ, Debra D ,Hiraki P.H.D., Shalini Krishnaswamy M.D. et al. (1996) Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine* 334, 286.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C *et al.* Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease (2001) *Circulation* 104: 1336–42.
- Blankenberg S, Barbaux S & Tiret L (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170 191–203
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H et al (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.*107:1255–1262.
- Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D et al (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 171:223–9.

De Caterina R, Libby P, Peng HB et al (1995) Nitric oxide decreases cytokine induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 96:60–68.

DeGraba TJ, Siren AL, Penix L, McCarron RM, Hargraves R, Sood S et al (1998) Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* 29:1405–10.

Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML & Springer TA (1990) ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *Journal of Cell Biology* 111, 3129.

Elrayess MA, Webb KE, Flavell DM, Syva`nne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesa`niemi YA, Pasternack A, Jukema JW, Kastelein JJP, Zwinderman AH & Humphries SE (2003) A novel functional polymorphism in the PECAM-1 gene (53G_/A) is associated with progression of atherosclerosis in the LOCAT and REGRESS studies. *Atherosclerosis* 168:131-138

Elrayess MA, Webb KE, Bellingan GJ, Whittall RA, Kabir J, Hawe E, *et al* (2004) R643G polymorphism in PECAM- 1 influences transendothelial migration of monocytes and is associated with progression of CHD and CHD events *Atherosclerosis* 177 : 127-35.

Elrayess MA & Talmud PJ (2005) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) & coronary heart disease. *Indian J Med Res* 121: 77-79.

Evans GA, van Baal CM, McCarron P, deLange M, Thorkild IA; Soerensen de Geus EJC, Kyvik K, Pedersen NL, Spector TD, Andrew T, Patterson C, Whitfield JB, Zhu G, Martin NG, Kaprio J & Boomsma DI (2003) The Genetics of Coronary Heart Disease: The Contribution of Twin Studies. *Twin Research* 6 (5): 432- 441.

Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK , Sethi S, Koh TH & Chatterjee S (2005) Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res* 121: 92-99

Frangiannis NG (2006) Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts *Curr Med Chem* 13(16):1877-93.

Friedlander Y, Austin MA, Newman B, Edwards K, Mayer-Davis EJ & King MC (1997) Heritability of Longitudinal Changes in Coronary-Heart-Disease Risk Factors in Women Twins. *Am J Hum Genet* 60:1502–1512.

Gaetani E, Flex A, Pola R, Papaleo P, De Martini D, Pola E, Aloï F, Flore R, Serricchio M, Gasbarrini A & Pola P (2002) The K469E polymorphism of the ICAM-1 gene is a risk

factor for peripheral arterial occlusive disease. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 13:483–488

Gardemann A, Knapp A, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W (2000) No evidence for the CD31 C/G gene polymorphism as an independent risk factor of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 83: 629.

Gbadegesin RA, Watson CJ, Cotton SA, Brenchley PEC & Webb NJA (2002) A PCR-RFLP typing method for adhesion molecule gene polymorphisms and allele frequencies in a normal UK population Short Communication. *European Journal of Immunogenetics* 29, 109–111.

Hauser ER, Crossman DC, Granger CB, Haines JL, Jones CJH, Mooser V, McAdam B, Winkelmann BR, Wiseman AH, Muhlestein JB, Bartel AG, Dennis CA, Dowdy E, Estabrooks S, Eggleston K, Francis S, Roche K, Clevenger PW, Huang L, Pedersen B, Shah S, Schmidt S, Haynes C, West S, Asper D, Booze M, Sharma S, Sundseth S, Middleton L, Roses AD, Hauser MA, Vance JM, Pericak-Vance MA & Kraus WE (2004) A Genomewide Scan for Early-Onset Coronary Artery Disease in 438 Families: The GENECARD Study. *Am. J. Hum. Genet.* 75:436–447.

Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E & Hirschhorn K A (2002) Comprehensive review of genetic association studies. *Genetics in Medicine* 2: 45–61.

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR et al (1997) Circulating adhesion molecules VCAM1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. *Circulation* 96: 4219–25.

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gottojr AM et al (1997) Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 96:4219–25.

Iwao M, Morisaki H, Matsunaga H & Morisaki T (2001) Two novel polymorphisms g.1715G>A (A496T) and g.1838G>A (3'UTR), and the g.1548G>A (E469K) variant in the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) gene: distribution in the Japanese and European American populations. *Human Mutation* 17: 355.

Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F & Log CS (1998) Response to Acute Hypoxia Expression and Regulation of Adhesion Molecules in Cardiac Cells by Cytokines *Circ. Res.* 82;576-586

Kamiuchi K, Hasegawa G, Obayashi H, Kitamura A, Ishii M, Yano M, Kanatsuna T, Yoshikawa T and Nakamura N (2002) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 19: 371–376.

Khaw KT, Woodhouse P (1995) Interrelation of vitamin C, infection, haemostatic factors and cardiovascular disease. *BMJ* 310:1559-63.

Kikuchi M, Loareesuwan S, Ubalee R, Tasanor O, Suzuki F, Wattanagoon Y, Na-Bangchang K, Kimura A, Aikawa M, Hirayama K. (2001) Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais. *Parasitol Int.* Nov;50(4):235-9.

Kotur-Stevuljevi J, Memon L, Stefanovi A, Spasi S, Spasojevi.-Kalimanovska v, Bogavac-Stanojevi N, Kalimanovska- Ostri D, Jeli-Ivanovi Z, Zuni G (2007) Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin. Biochem.* 40(3-4):181-7.

Kutuk O, Basaga H (2003) Inflammation meets oxidation: NF- κ B as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 9(12):549-57.

Lamblin N, Bauters C & Helbecque N (2001) Gene polymorphisms of pro- (or anti-) inflammatory cytokines and vascular disease. *European Heart Journal* 22: 2219–2220.

Latkovskis G, Licis NU & Kalnins (2004) C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *European Journal of Immunogenetics* 31: 207–213.

- Lee EB, Kim JY, Kim EH, Nam JH, Park KS, Song YW (2004) Intercellular adhesion molecule-1 polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 64: 473–477.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr et al (1993) An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule in rabbit endothelium. *Arterioscler Thromb* 13: 197–204.
- Libby P, MD, Ridker PM, MD & Maseri A MD (2002) Inflammation and Atherosclerosis *Circulation* 105:1135-1143.
- Lip GYH & Blann AD (2004) Thrombogenesis, atherogenesis and angiogenesis in vascular disease: a new “vascular triad”. *Ann Med* 36:119-125.
- Listì F, Candore G, Lio D, Cavallone L, Colonna-Romano G, Caruso M, Hoffmann E, & Caruso C (2004) Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily. *European Journal of Immunogenetics* 31: 175–178.
- McGlinchey PG, Spence MS, Patterson CC, Allen AR, Murphy G, Belton C & McKeown PP (2004) The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene K469E polymorphism is not associated with ischaemic heart disease: an investigation using family-based tests of association. *European Journal of Immunogenetics* 31: 201–206.

Molgg M, Schwaeble W, Johnson JP & Dierich MP (1991) Generation of recombinant, carbohydrate-free intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-1 fragments in *Escherichia coli* and mapping of epitopes recognized by anti- ICAM-1 monoclonal antibodies. *Immunological Letters* 28: 237.

Mulvihill NT, Foley JB, Crean P & Walsh M (2002) Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *European Heart Journal* 23: 1569–1574.

Mycko MP, Kwinkowski M, Tronczynska E, Szymanska B & Selmaj KW (1998) Multiple sclerosis: the increased frequency of the ICAM-1 exon 6 gene point mutation genetic type K469. *Annals of Neurology* 44: 70.

Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC & Beaudet AT (1997) Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1517–1520.

Nanni L, Romualdi C, Maseri A & Lanfranchi G (2006) Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* article in press.

Nejentsev S, Laine AP, Simell O, Ilonen J (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) K469E polymorphism: no association with type 1 diabetes among Finns. *Tissue Antigens* 55: 568–570.

Newman PJ & Newman DK (2003) Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 :953-64.

O'Malley T, Ludlam CA, Riemersma RA, Fox KA. Early increase in levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): potential risk factor for the acute coronary Syndrome (2001) *Eur Heart J* 22: 1226–34.

Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, et al. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:505–12.

Pola R, MD, PhD, Flex A MD, Gaetani E MD; Flore R, MD; Serricchio M, MD, Pola P, MD. (2003) Synergistic Effect of -174 G/C Polymorphism of the Interleukin-6 Gene Promoter and 469 E/K Polymorphism of the Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene in Italian Patients With History of Ischemic Stroke. *Stroke* 881-885.

Ponthieux A, Herbeth B, Drosch S, Lambert D, Visvikis S (2003) Age - and Sex-related Reference Values for Serum Adhesion Molecule Concentrations in Healthy Individuals: Intercellular Adhesion Molecule-1 and E-, P-, and LSelectin. *Clinical Chemistry* 49, (9)

Price DT, Loscalzo J (1999) Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 107:85–97.

Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J (1998) Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule-1 and risk of future myocardial infarction in apparently men. *Lancet* 351: 88–92.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000) C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342: 836–43.

Ross R (1999) Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl JMed* 340: 115–126.

Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T (2001) Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 947: 259-69.

SBACV-RJ - Sociedade Brasileira de Cirurgia Vascular; Duque FLV Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco. Artigo de atualização. Santa Casa da Misericórdia - Hospital Central - Rio de Janeiro.

Sheikini Y & hansson GK (2004) Chemokines and atherosclerosis *Ann Med* 36:98-118.

Shyu KG, Chang H, Lin CC *et al.* Circulating ICAM-1 and E-selectin in patients with acute coronary syndrome (1996) *Chest* 109: 1627–30.

SIM – Serviço de Informação sobre Mortalidade. 2004. Ministério da Saúde, DATASUS. (www.datasus.gov.br)

Song FC, Chen AH, Tang XM, Zhang WX, Qian XX, Li JQ, *et al.* Association of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism with coronary heart disease. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003; 23: 156-8.

Springer TA (1990). Adhesion molecules of the immune system. *Nature* 346: 425–34.

Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301–314.

Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML & Springer TA (1988) Primary structure of ICAM demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52: 925.

- Topper JN, Cai J, Falb D (1996) Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase- 2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10417–10422.
- Turner D, Grant SCD, Yonan N (1997) Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 64:776 –779.
- Vora DK, Rosenbloom CL, Beaudet AL & Cottingham RW (1994) Polymorphisms and linkage analysis for ICAM-1 and the selectin gene cluster. *Genomics* 21: 473.
- Wenzel K, Ernst M, Rohde K, Baumann G & Speer A (1996) DNA polymorphisms in adhesion molecule genes — a new risk factor for early atherosclerosis. *Human Genetics* 97: 15.
- Wei H, Fang L, Chowdhury SH, Gong N, Xiong Z, Song J, *et a* (2004) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with severe coronary artery stenosis in Chinese Singaporean. *Clin Biochem* 37 : 1091-7.
- World Health Organization (2002) Deaths from coronary heart disease. The Atlas for Heart Disease and Stroke 14:49. (www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/).

World Health Organization (2002) Risk Factors. The Atlas for Heart Disease and Stroke 3:25.

(www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/).

Yamashita M, Yoshida S, Kennedy S, Ohara N, Motoyama S and Maruo T (2005) Association Study of Endometriosis and Intercellular Adhesion Molecule-1 (*ICAM-1*) Gene Polymorphisms in a Japanese Population. *J Soc Gynecol Investig* Vol. 12, No. 4, May.

Zerba KE, Sing CF (1993) The role of genome type-environment interaction and time in understanding the impact of genetic polymorphism on lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 4:152–162.



ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA A DETERMINAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS NA DOENÇA CARDIOVASCULAR ISQUÊMICA ATEROSCLERÓTICA

Diante da minha doença e reconhecendo a necessidade de avaliar as possíveis causas genéticas da mesma, voluntariamente, eu consinto em ser entrevistado por um médico e em doar uma quantidade 10 (dez) ml de sangue, a ser obtida no período em que estiver sendo submetido ao exame cineangiocoronariográfico no Laboratório de Hemodinâmica do HCPA.

Eu estou ciente de que não serei submetido a qualquer desconforto adicional pela participação nesse estudo, já que a coleta de sangue será realizada durante o procedimento de cateterismo cardíaco diagnóstico.

Os meus benefícios são a possibilidade de avaliação científica das causas da minha doença cardiovascular e a construção de conhecimento que auxilie na prevenção e no tratamento da mesma.

Meus direitos de não fornecer informações a pessoas não-médicas e de receber sigilo pelos profissionais serão respeitados.

Os resultados do presente estudo estarão a minha disposição tão logo forem obtidos.

Finalmente, eu permito que meu nome seja registrado para possíveis seguimentos no futuro.

Porto Alegre, / / .

Assinatura do Paciente

ANEXO 2

FICHA DO PACIENTE

IDENTIFICAÇÃO

Prontuário:

Nome:

Cor: Branco Mulato Negro

Idade: Profissão:

Sexo: Masculino Feminino se feminino: Climatério

DADOS:

Data:

Lesões anatômicas:

Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) Prévio:

Cirurgia de revascularização Angioplastia o Stent:

Angina: Classe Funcional (1-4):

Hipercolesterolemia Prévia

COL: mg/dl TRI: mg/dl HDL: mg/dl

LDL: mg/dl

Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) prévia

Diabete Mérito (DM) Não Insulino Dependente (NID)

Insulino Dependente (ID)

Glicemia: mg/dl

Peso: Altura:

Sedentarismo

Tabagismo Maços/anos

História familiar de infarto ou angina: pai mãe irmão

Número de irmãos:

ANEXO 3

FICHA DOS CONTROLES

IDENTIFICAÇÃO

Prontuário:

Nome:

Cor: Branco Mulato Negro

Idade: Profissão:

Sexo: Masculino Feminino se feminino: Climatério

Profissão

DADOS:

1. História prévia de doença cardiovascular isquêmica (AVC, IAM, ANGINA, CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE):

2. Níveis lipídicos:

COL: mg/dl TRI: mg/dl HDL: mg/dl

LDL: mg/dl

3. Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) prévia

4. Diabete Mérito (DM) Não Insulino Dependente (NID) Insulino Dependente (ID)

Glicemia: mg/dl

5. Peso: Altura:

6. Tabagismo : ex-fumante: nunca fumou: fuma atualmente:

Maços/dia: Anos como fumante:

Se ex-fumante, há quanto tempo abstêmio:

7. História familiar de infarto ou angina: pai idade: mãe idade: irmãos idade:

8. Medicações em uso: