



Factores de risco cardiovascular na infância de doença com expressão clínica na idade adulta

António Guerra

Serviço de Pediatria. Faculdade de Medicina do Porto. Serviço de Pediatria. Unidade Autónoma de Gestão da Mulher e da Criança. Hospital de São João. Porto

Resumo

Existe já evidência científica associando o estado de nutrição ao nascer a um conjunto de patologias expressando-se ao longo da vida, em idades variáveis, como é o caso da obesidade, da hipertensão, de dislipidemias e da diabetes de tipo II.

O reconhecimento da ocorrência de lesões vasculares muito precoces sublinha a necessidade de uma intervenção preventiva logo desde a vida fetal e primeira infância.

Embora se tenham registado evoluções importantes no conhecimento dos mecanismos etiopatogénicos que explicam quer a programação fetal de doenças do adulto, quer a origem pediátrica da patologia aterosclerótica, não existe um consenso alargado sobre o tema nas suas múltiplas vertentes, havendo ainda muitos mecanismos fisiopatológicos por esclarecer.

A evolução da genética molecular nos últimos anos tem permitido um avanço notável no conhecimento da etiopatogenia e progressão destas patologias.

Tendo em conta a impossibilidade de, num breve artigo de revisão, abordar todos os aspectos genéticos, ambientais e bioquímicos envolvidos, optámos pela selecção das áreas que consideramos mais relevantes, sem a pretensão de esgotar um tema de uma enorme dimensão e complexidade.

Palavras-chave: factores de risco cardiovascular, polimorfismos genéticos, infância.

Acta Pediatr Port 2008;39(1):23-9

Cardiovascular risk factors in infancy with clinical impact in adulthood

Abstract

There is increasing scientific evidence linking birth weight to several pathologies expressed at different ages, as it is the case of obesity, hypertension, dislipidemias and type II diabetes. These pathologies are associated with very early vas-

cular lesions which emphasise the importance of prevention since foetal life and infancy.

Knowledge of etiopathogenic mechanisms explaining either foetal programming of adult diseases, either paediatric origin of atherosclerosis are dramatically increasing. However, a consensus on these issues is not yet achieved and many fisiopathological mechanisms remain to be known. Molecular genetic evolution during recent years has allowed to a relevant understanding of etiopathogeny and progression of these diseases.

Considering that it is not possible in a brief revision article, to focus with detail genetics, environmental and biochemical involved variables, we selected some of the most relevant factors without any pretension of exhausting such an enormous and complex theme.

Key words: cardiovascular risk factors, genetic polymorphisms, infancy.

Acta Pediatr Port 2008;39(1):23-9

Introdução

Desde há vários anos que vem surgindo evidência na literatura de que alguma patologia do adulto, nomeadamente patologia crónica degenerativa, tem a sua origem na vida fetal.

Na realidade, a quantidade e qualidade dos dados epidemiológicos conhecidos sugerem a existência de uma associação entre factores pré-natais e doença cardiovascular, diabetes e outras patologias crónicas na idade adulta. Deve-se a David Barker a ampla divulgação a partir do início da década de 90, de que a doença coronária pode ter origem na vida fetal¹.

Todavia muitos outros factores, quer genéticos quer ambientais, poderão levar ao desenvolvimento de patologia cardiovascular logo desde os primeiros anos de vida, mas com habitual expressão clínica apenas na idade adulta. Os dois mais relevantes exemplos deste lento processo evolutivo são a ate-

Recebido: 30.04.2007

Aceite: 07.02.2008

Correspondência:

António Guerra
Serviço de Pediatria.
Unidade Autónoma de Gestão da Mulher e da Criança
Hospital de São João
Alameda Prof. Hernâni Monteiro – 4202-451 Porto
ajmonicaguerra@hotmail.com

rosclerose e a hipertensão que merecerão por isso a nossa particular atenção nesta revisão que não tem contudo a pretensão de esgotar um tema de uma enorme dimensão e complexidade.

Hipertensão e aterosclerose: interacção entre factores genéticos e ambientais

A hipertensão essencial é uma doença poligénica, frequente e complexa, resultante da interacção de múltiplos genes entre si e com factores ambientais, tais como os hábitos alimentares, nomeadamente o suprimento em sal e a obesidade².

De igual modo, a predisposição genética para a doença aterosclerótica envolve múltiplos genes, dos quais apenas se conhece o papel de uma minoria. Menos conhecido é ainda o modo como ocorre a interacção gene-gene e a interacção gene-ambiente.

Nalgumas famílias a doença é maioritariamente explicada por um único gene major (doença monogénica), de que é excelente exemplo a hipercolesterolemia familiar.

Múltiplos factores genéticos têm sido identificados como determinantes do risco de doença aterosclerótica e hipertensão, neles se incluindo os que condicionam valores elevados de lipoproteína (a) [Lp(a)] e de homocisteína, bem como o polimorfismo de inserção/delecção (I/D) do enzima conversor da angiotensina (ECA) e o polimorfismo M235T do gene do angiotensinogénio (AGT). Estimam-se que mais de 400 genes possam estar envolvidos na regulação de processos tais como a função endotelial, a coagulação, a inflamação e o metabolismo dos aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono³. Destes processos, o metabolismo das lipoproteínas é provavelmente o que melhor se conhece estando identificados muitos genes nele envolvidos, alguns dos quais fortemente relacionados com a aterosclerose ou com a doença cardiovascular⁴.

Esta multiplicidade de factores ilustra a complexidade da relação genética entre a aterosclerose e hipertensão, bem como a dificuldade em identificar por um lado os factores genéticos de risco e por outro lado estabelecer valores preditivos de risco de fenótipos intermédios de doença.

a) Factores genéticos

É amplamente reconhecido que a história familiar de doença cardiovascular está associada na criança a um risco aumentado de desenvolvimento de doença e das suas sequelas clínicas futuras. Estudos em gémeos revelaram um risco de doença mais idêntico nos monozigóticos comparativamente aos dizigóticos e estudos com crianças adoptadas demonstraram que o risco está mais dependente de factores genéticos do que de factores ambientais. Contudo, os mecanismos pelos quais uma história familiar de doença cardiovascular aumenta o risco de doença são ainda em grande parte desconhecidos.

a.1) O gene do receptor das LDL

Mutações no gene dos receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) conduzem a hipercolesterolemia familiar (HF), uma das mais frequentes dislipidemias primárias, com uma incidência de 1/500 nas sociedades ocidentais, sendo

uma das mais frequentes doenças hereditárias autossómicas dominantes⁵. Devido à diminuição do número de receptores activos das LDL nas células hepáticas nas situações de heterozigotia, ou à ausência completa dos referidos receptores nas formas homozigóticas, a fracção de colesterol plasmático das LDL está elevada logo desde o nascimento. Os níveis marcadamente elevados de colesterol das LDL plasmático predis põem à aterosclerose prematura. O diagnóstico de HF é confirmado pela mutação do gene do receptor das LDL. Estão actualmente identificadas mais de 800 mutações do gene, todas conduzindo a HF⁶.

a.2) O gene da LPL

A lipase da lipoproteína (LPL) é uma enzima chave no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides, tais como os quilomicrons e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) plasmáticas. A redução da actividade da LPL resulta numa elevação dos níveis de triglicérides, reconhecido factor de risco de doença cardiovascular. A elevação dos triglicérides é evidente logo desde os primeiros meses de vida. A doença é resultante da mutação quer do gene da LPL, quer do gene da Apo CII. Estão já descritas mais de 200 mutações do gene da LPL^{7,8}.

a.3) O polimorfismo genético da apolipoproteína E

A apolipoproteína E (ApoE) é uma proteína de ligação através da qual as lipoproteínas ricas em triglicérides, tais com os quilomicrons remanescentes, as VLDL e as VLDL remanescentes são captadas pelos receptores ApoB-E a nível das células hepáticas. Variantes do gene que codifica esta proteína de ligação originam três isoformas de ApoE (E2, E3 e E4), que conferem diferentes capacidades de fixação desta proteína ao receptor das LDL.

O polimorfismo da ApoE influencia não apenas os níveis de colesterol total e das LDL, como a própria estabilidade relativa dos valores referentes aqueles parâmetros durante o crescimento⁹⁻¹¹, bem como a própria agregação dos factores de risco cardiovascular com prevalências superiores nos grupos ApoE3 (E3/3) e ApoE4 (fenótipos genéticos E4/4 e E3/4), independentemente do estado de nutrição¹².

Os indivíduos portadores do alelo 4 mostram um perfil lipídico mais aterogénico com valores superiores de colesterol total e do colesterol das LDL, bem como valores inferiores de colesterol das HDL¹⁰⁻¹³. De igual modo a resposta do perfil lipídico à intervenção dietética parece também dependente do polimorfismo genético da ApoE embora os resultados da investigação não sejam consensuais^{14,15}. No entanto a influência do polimorfismo genético da ApoE na resposta à dieta é apontada como um claro exemplo de interacção gene/ambiente na área da aterosclerose. A presença de uma alta prevalência de variantes alélicas de risco de genes candidatos da aterosclerose, reforçam assim a importância das recomendações dietéticas referentes ao suprimento em nutrientes mais aterogénicos.

a.4) O polimorfismo dos principais genes do sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem um papel central na regulação da tensão arterial e na homeostasia do sódio, sendo

os genes envolvidos na actividade desta cascata enzimática potenciais genes candidatos para a hipertensão essencial e para algumas manifestações clínicas associadas.

Diversos polimorfismos genéticos tais como os referentes aos genes da enzima conversor da angiotensina (ECA) (polimorfismo de inserção/delecção), do angiotensinogénio (M235T) e dos receptores 1 da angiotensina II (A1166C) têm sido amplamente investigados com resultados nem sempre consensuais^{16,17}.

Um dos principais papéis do ECA é a produção de angiotensina II (Ang II), um potente vasoconstrictor que, tal como outros factores, activa a oxidase da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida [NAD(P)H] nas células musculares lisas vasculares¹⁸ e nas células endoteliais (EC)¹⁹.

Diversas meta-análises avaliaram a relação do polimorfismo *I/D* do gene do ECA e do polimorfismo M235T do gene do AGT com a hipertensão essencial e a patologia cardiovascular²⁰⁻²². O polimorfismo *I/D* do gene do ECA não parece associado à hipertensão²¹, mas os indivíduos homocigóticos para o alelo de delecção parecem ter um risco aumentado de complicações macro e microvasculares¹⁷. Contudo o alelo T codificador do angiotensinogénio parece ser um marcador de hipertensão, pelo menos nos indivíduos caucasianos e asiáticos^{20,22}.

A actividade do ECA está também associada ao polimorfismo do gene, registando-se valores superiores nos portadores homocigóticos do alelo D^{23,24}, enquanto a actividade do AGT parece ser superior nos portadores homocigóticos do alelo T do polimorfismo M235T do gene²⁵, ainda que os resultados não sejam consistentes.

A relação entre a hipertensão sal-sensível e o polimorfismo do gene do ECA tem também sido investigada parecendo haver uma associação entre os genótipos *II* ou *DI* e uma maior prevalência de sensibilidade ao sal²⁶.

Hipertensos sensíveis ao sal tendem a ter baixos valores de renina²⁶. Nós próprios registámos valores de renina plasmática significativamente inferiores em lactentes de 12 meses portadores do alelo I (homo e heterocigóticos) da haptoglobina²⁷.

Outro aspecto do maior interesse e actualidade é a observação em estudos recentes da associação entre o polimorfismo dos genes do SRA particularmente o de *I/D* do ECA e a obesidade, sugerindo-se que estes genes possam ser genes candidatos *minor* implicados no processo de adipogénese e na regulação do metabolismo do tecido gordo²⁸.

Os obesos registam valores mais elevados das actividades do ECA e do AGT, sugerindo-se que a obesidade ao condicionar esses valores proporcione uma via potencial pela qual a obesidade conduz à elevação da tensão arterial²⁹. Parecem apontar neste sentido os resultados verificados num estudo recente e numa população mediterrânica em que se observa uma relação significativa entre sobrepeso, gordura abdominal e ganho ponderal e a presença do genótipo DD do ECA³⁰, facto que também observámos num grupo de obesos³¹.

a.5) O polimorfismo do gene da sub-unidade p22^{phox} do sistema NADPH oxidase

O sistema das oxidases da nicotinamida adenina dinucleótido / nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

[NAD(P)H] vasculares é essencial na resposta fisiológica das células vasculares, no tocante ao crescimento, migração e modificação da matriz extra-celular. No entanto, tem também sido associado à hipertensão e a outras patologias relacionadas com a falta de controlo dos processos de crescimento e inflamação como ocorre com a aterosclerose.

O aumento da produção de radical superóxido (O₂⁻) em modelos de doença vascular em experimentação animal contribui para o stress oxidante, para a disfunção endotelial e para a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). De igual modo, nas células vasculares em humanos, incluindo as células musculares lisas, as células endoteliais e os fibroblastos da adventícia, o sistema da oxidase da NAD(P)H é uma fonte importante de produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), nomeadamente de O₂⁻ e associa-se a disfunção endotelial e a factores de risco clínicos^{32,33}.

O sistema oxidase da NAD(P)H originalmente identificado como um sistema de defesa contra micro-organismos nos fagócitos, inclui pelo menos seis péptidos componentes: o citocromo b558 composto pelo gp91^{phox} e pelo p22^{phox}, 3 componentes citosólicos (p67^{phox}, p47^{phox} e p40^{phox}) e o rac, uma pequena proteína G^{34,35}.

Estudos por *polymerase chain reaction (restriction fragment length polymorphism) (PCR - RFLP)* e sequenciação do DNA revelaram que a proteína do p22^{phox}, (o RNAm e as variantes alélicas 242C/T) se expressa em todos os componentes celulares (com ou sem actividade fagocítica) da parede dos vasos humanos (células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e fibroblastos)³⁴ e é aceite pelos investigadores como uma molécula chave na patogenia da aterosclerose e doença coronária.

A produção de superóxido, quer basal quer estimulada pelo NAD(P)H, varia marcadamente entre doentes, mas a presença do alelo 242T do polimorfismo C242T do gene da sub-unidade p22^{phox} está associada a uma significativa redução da actividade da oxidase do NAD(P)H, independente de outros factores de risco de aterosclerose³⁶. Todavia, não são consensuais os estudos relativamente ao risco aterogénico condicionado pelo polimorfismo do gene do p22^{phox}³⁷.

Alterações no sistema renina-angiotensina resultando num aumento da produção de Ang II parecem ser o mecanismo primário da evolução das alterações do estado redox e do desenvolvimento da hipertensão e da doença cardiovascular³⁸. O aumento da actividade e expressão da oxidase da NAD(P)H na parede vascular induzidos pela Ang II parece ser a chave da redução da biodisponibilidade do NO endotelial na hipertensão e na aterosclerose^{39,40}.

a.6) O polimorfismo do gene da redutase do metileno-te-trahidrofolato

A redutase do metileno-tetrahydrofolato (MTHFR) catalisa a redução do metileno-tetrahydrofolato em metiltetrahydrofolato, cofactor para a metilação da homocisteína (HCy) em metionina. A deficiência em MTHFR, doença autossómica recessiva, conduz à elevação sérica de HCy, que em níveis elevados é tóxica para o endotélio vascular, levando à sua disfunção e contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose⁴¹.

Um estudo recente permite concluir que a hiperhomocisteinemia induzida em experimentação animal reduz a síntese de NO, sendo esse o mecanismo que leva à diminuição da biodisponibilidade de NO e não a sua inactivação pelo stress oxidante, ainda que estes resultados não sejam consensuais⁴².

Outro mecanismo pelo qual níveis elevados de HCy conduzem a lesões ateroscleróticas, prendem-se com a inibição da actividade da lisil oxidase nas células endoteliais, o que conduz a alterações das propriedades elásticas da parede vascular⁴³.

A mutação C677T (Ala->Val) do gene da MTHFR parece associada a uma menor actividade enzimática condicionando assim concentrações plasmáticas mais elevadas de HCy e do seu precursor S-adenosilhomocisteína, que têm sido identificadas em múltiplos estudos, como um factor de risco de doença cardiovascular⁴⁴, não sendo todavia consensuais os resultados observados⁴⁵.

b) Factores ambientais: a alimentação

A aterosclerose é uma doença multifactorial com clara influência de factores ambientais, para além da já referida indiscutível base genética. O processo aterosclerótico é assim a resultante de uma interacção entre factores ambientais e genéticos específicos de cada indivíduo, estando a prevenção naturalmente limitada à intervenção sobre os factores ambientais.

Todavia apenas se conhece um limitado número de factores genéticos comprovadamente associados a factores de risco ambientais da aterosclerose, tais como os hábitos alimentares, a falta de exercício e o tabagismo.

b.1) O aleitamento materno

Os principais factores pós-natais precoces são sobretudo alimentares, nomeadamente o regime lácteo dos primeiros meses de vida. E neste aspecto é particularmente relevante a prática do aleitamento materno parecendo a duração da sua utilização associar-se a um efeito protector relativamente a patologia futura.

Podemos assim admitir como possível que o fenómeno de programação não se limite à vida intra-uterina e possa também ocorrer nos primeiros meses de vida. Tal é na realidade sugerido pelo efeito protector a longo prazo do aleitamento materno, relativamente à massa corporal (menor prevalência de sobrepeso/obesidade nos alimentados ao peito)⁴⁶⁻⁴⁹ e à tensão arterial^{50,51}.

Outros estudos têm também observado um efeito protector do aleitamento materno relativamente a uma menor prevalência de diabetes tipo 2⁵² bem como a um perfil lipídico menos aterogénico^{53,54}.

b.2) Os hábitos alimentares

Não se esgota naturalmente no tipo de aleitamento do lactente a influência dos factores dietéticos sobre os factores de risco de doença cardiovascular. Com o crescimento e com o estabelecimento de novos hábitos alimentares e de outros factores ambientais, é mesmo possível que se atenuem o efeito protector a médio e longo prazo do leite materno. Nesse sentido, é ainda referido que publicações selectivas de pequenos estu-

dos poderão ter exagerado os potenciais efeitos benéficos do aleitamento materno a longo prazo sobre a tensão arterial⁵⁵. Os resultados referentes a estudos mais amplos sugerem que o regime lácteo dos primeiros meses de vida parece ter na realidade efeitos mais modestos sobre a tensão arterial com menor impacto a longo prazo em termos de saúde pública⁵⁵. Têm aliás sido esses os resultados que temos verificado nos nossos estudos prospectivos⁵⁶.

De qualquer modo, os hábitos alimentares e nomeadamente o suprimento em ácidos gordos saturados representam o principal factor ambiental condicionante quer dos valores do perfil lipídico sérico relativo ao colesterol total e fracções⁵⁷, quer do próprio perfil de ácidos gordos dos fosfolípidos plasmáticos⁵⁸, mostrando que aparentemente entre nós, não parece observar-se a manutenção de hábitos alimentares característicos da denominada dieta mediterrânica^{59,60}.

Aterosclerose: doença pediátrica

A aterosclerose é hoje consensualmente reconhecida como uma doença com origem na idade pediátrica como acima se referiu, embora as expressões clínicas da doença cardio-cérebro-vascular se manifestem apenas na idade adulta^{61,62}. Tal reconhecimento assenta fundamentalmente em resultados de vários estudos prospectivos que permitiram registar a estabilidade relativa e a agregação intra-individual e familiar de factores de risco cardiovascular, bem como a significativa correlação entre as alterações ocorridas na parede vascular e os mesmos factores de risco, logo desde os primeiros anos de vida.

a) Estabilidade relativa de factores de risco

Estudos longitudinais relativos à prevalência de factores de risco de patologia aterosclerótica têm permitido a avaliação do comportamento desses factores ao longo do crescimento relativamente à sua progressão nos canais de percentis⁶¹. Tais trabalhos demonstram que os principais factores de risco de patologia cardiovascular, tais como a obesidade, um perfil lipídico plasmático adverso e valores elevados de tensão arterial, evidenciam uma clara estabilidade relativa desde os primeiros anos de vida^{57,63-66}.

b) Agregação intra-individual e familiar de factores de risco cardiovascular

Tem sido também objectivo dos estudos longitudinais, a avaliação na mesma criança de uma eventual associação entre dois ou mais factores de risco, bem como uma agregação entre os factores de risco observados na criança e nos seus progenitores.

Os resultados observados são praticamente consensuais, registando-se na literatura uma tendência, crescente com a idade, relativa à agregação intra-individual dos principais factores de risco de patologia cardiovascular, bem como uma elevada correlação entre os factores de risco registados nas crianças e nos progenitores⁶⁷. Estes resultados, justificam-se pela partilha de uma base genética e de factores ambientais, particularmente os alimentares, comuns entre as crianças e os progenitores.

c) Associação entre factores de risco e alterações vasculares

Autópsias realizadas em crianças a partir dos dois anos e em indivíduos jovens falecidos por acidentes traumáticos revelam a existência de lesões ateroscleróticas (estrias lipídicas e placas fibróticas) na aorta e nas coronárias, numa extensão crescente com a idade⁶⁸. Regista-se nesses estudos uma forte correlação entre factores de risco de patologia cardiovascular e a extensão das lesões arteriais. Os principais factores de risco associados às referidas lesões são o excesso de peso/obesidade, a tensão arterial elevada para a idade e um perfil lipídico adverso (colesterol total e das LDL e triglicéridos totais superiores ao percentil 95 e colesterol das HDL inferior ao percentil 5)^{68,69}. A reconhecida estabilidade relativa dos referidos factores de risco ao longo da idade pediátrica e até à idade adulta e o início da agressão vascular logo desde os primeiros tempos de vida ajudam a perceber o estabelecimento e desenvolvimento das lesões vasculares e justificam o reconhecimento da aterosclerose como doença de raízes pediátricas cuja prevenção deve iniciar-se logo desde a vida fetal e nascimento.

Conclusões

A aterosclerose e a hipertensão, patologias cardiovasculares habitualmente com expressão clínica na idade adulta, resultam de processos complexos dependentes da interação entre factores genéticos e ambientais, com início logo desde os primeiros tempos de vida. A oxidação das LDL e a formação de estrias lipídicas, base do desenvolvimento do processo aterosclerótico, podem em determinadas condições iniciar-se mesmo na vida fetal.

Os principais factores de risco de doença cardiovascular são as dislipidemias, com particular destaque para a hipercolesterolemia, bem como a hipertensão e outras situações geradoras de radicais livres de oxigénio conducentes a stress oxidante que desencadeiam uma cascata de eventos que lesam a parede vascular.

As características somáticas e os principais factores de risco de patologia cardiovascular mostram uma evidente tendência à estabilidade relativa desde a idade pediátrica até à idade adulta.

Os factores ambientais com influência sobre a evolução da aterosclerose e hipertensão estão praticamente limitados na infância aos factores alimentares. Entre eles, tem sido particularmente estudada a influência do aleitamento materno exclusivo nos primeiros meses de vida, surgindo já suficiente evidência acumulada que aponta para um efeito benéfico, mesmo a longo prazo, do aleitamento materno sobre a patologia cardiovascular.

A prevenção dos factores de risco de doença cardiovascular deve iniciar-se muito precocemente, preferencialmente desde a vida fetal e primeira infância.

Referências

1. Barker DJP, ed. Fetal and infant origins of adult disease. London: BMJ Books, 1992.

2. Kuznetsova T, Staessen JA, Brand E, Cwynar M, Stolarz K, Thijs L *et al.*. Sodium excretion as a modulator of genetic associations with cardiovascular phenotypes in the European Project on Genes in Hypertension. 2006;24:235-42.
3. Funke H, Assmann G. Strategies for the assessment of genetic coronary artery disease risk. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:285-91.
4. Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJP. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol* 2001;80:161-72.
5. Muller PY, Miserez AR. Large heterogeneity of mutations in the gene encoding the low-density lipoprotein receptor in subjects with familial hypercholesterolaemia. *Atheroscler Suppl* 2004;5:1-5.
6. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol* 2004;160:407-20.
7. Evans D, Wend T, Ahle S, Guerra A, Beisiegel U. Compound heterozygosity for a new (S259G) and a previously described (G188E) mutation in lipoprotein lipase (LpL) as a cause of chylomicronemia. *Human mutation* 1998;12:217-8.
8. Wung SF, Kulkarni MV, Pullinger CR, Malloy MJ, Kane JP, Aouizerat BE. The lipoprotein lipase gene in combined hyperlipidemia: evidence of a protective allele depletion. *Lipids Health Dis* 2006;5:19-27.
9. Srinivasan SR, Ehnholm C, Elkasabany A, Berenson G. Influence of apolipoprotein E polymorphism on serum lipids and lipoprotein changes from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1999;143:435-43.
10. Guerra A, Rego C, Castro EMB, Seixas S, Rocha J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on cardiovascular risk factors in obese children. *Ann Nutr Metab* 2003;47:49-54.
11. Guerra A, Rego C, Castro EMB, Seixas S, Rocha J. Association between apolipoprotein E phenotype and lipid profile and adiposity in Portuguese children. *Atherosclerosis* 2000;151:153.
12. Srinivasan SR, Ehnholm C, Elkasabany A, Berenson GS. Apolipoprotein E polymorphism modulates the association between obesity and dyslipidemias during young adulthood: The Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 2001;50:696-702.
13. Medina-Urrutia AX, Cardoso-Saldana GC, Zamora-Gonzalez J, Liria YK, Posadas-Romero C. Apolipoprotein E polymorphism is related to plasma lipids and apolipoproteins in Mexican adolescents. *Hum Biol* 2004;76:605-14.
14. Weggemans RM, Zock PL, Ordovas JM, Pedro-Botet J, Katan MB. Apolipoprotein E genotype and the response of serum cholesterol to dietary fat, cholesterol and cafestol. *Atherosclerosis* 2001;154:547-55.
15. Tammi A, Ronnema T, Miettinen TA, Gylling H, Rask-Nissila L, Viikari J *et al.* Effects of gender, apolipoprotein E phenotype and cholesterol-lowering by plant stanol esters in children: the STRIP study. Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project. *Acta Paediatr* 2002;91:1155-62.
16. Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, Akoglu E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med* 2003;35:545-9.
17. Sekuri C, Cam FS, Ercan E, Tengiz I, Sagcan A, Eser E *et al.* Renin-angiotensin system gene polymorphisms and premature coronary heart disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2005;6:38-42.
18. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.
19. Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular Characterization and Localization of the NAD(P)H Oxidase Components gp91-phox and p22-phox in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1903-11.

20. Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Hypertension* 2003;23:1269-75.
21. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:484-92.
22. Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion / deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol* 2005;6:1-11.
23. Bloem LJ, Manatunga AK, Pratt JH. Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity. *Hypertension* 1996;27:62-6.
24. Coelho C, Breitenfeld L, Guerra A, Rego C, Castro EMB, Monteiro C *et al*. Genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) and its relationship with haptoglobin phenotypes and biochemical markers of cardiovascular pathology in adolescents. *Am J Hypertension* 2000;13:105A-6A.
25. Miller JA, Scholey JW. The impact of renin-angiotensin system polymorphisms on physiological and pathophysiological processes in humans. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:101-6.
26. Poch E, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de La Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension* 2001;38:1204-9.
27. Guerra A, Monteiro C, Breitenfeld L, Jardim H, Rego C, Silva D *et al*. Genetic and environmental factors regulating blood pressure in childhood: prospective study from 0 to 3 years. *J Hum Hypertens* 1997;11:233-8.
28. Riera-Fortuny C, Real JT, Chaves FJ, Morales-Suarez-Varela M, Martinez-Triguero ML, Morillas-Arino C *et al*. The relation between obesity, abdominal fat deposit and the angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and its association with coronary heart disease. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2005;29:78-84.
29. Cooper R, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D *et al*. ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens* 1997;11:107-11.
30. Strazzullo P, Iacone R, Iacoviello L, Russo O, Barba G, Russo P *et al*. Genetic variation in the renin-angiotensin system and abdominal adiposity in men: the Olivetti Prospective Heart Study. *Ann Intern Med* 2003;138:17-23.
31. Guerra A, Rego C, Guimarães N, Coelho C, Rodrigues P, Castro BEM *et al*. Polimorfismo I/D do gene da enzima conversor da angiotensina e obesidade em idade pediátrica. Comunicação na Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hipertensão. Carvoeiro, 2005.
32. Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest* 2005;35:305-14.
33. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 2004;264:85-97.
34. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Przybylowski P *et al*. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:333-9.
35. Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004;90:491-3.
36. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R *et al*. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:1744-7.
37. Zafari AM, Davidoff MN, Austin H, Valppu L, Cotsonis G, Lassegue B *et al*. The A640G and C242T p22(phox) polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:675-80.
38. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 1999;34:539-45.
39. Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:845-51.
40. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Schulz E, Oelze M *et al*. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002;90:e58-65.
41. Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, Singer DE, Nathan DM, Rifai N *et al*. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2001;24:1403-10.
42. Boger RH. Acute hyperhomocysteinemia decreases NO bioavailability in healthy adults. *Atherosclerosis* 2005;179:419-20.
43. Raposo B, Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2004;177:1-8.
44. Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2001;74:723-9.
45. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG; MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2023-31.
46. Toschke AM, Vignerova J, Lhotska L, Osancova K, Koletzko B, Von Kries R. Overweight and obesity in 6- to 14-year-old Czech children in 1991: protective effect of breast-feeding. *J Pediatr* 2002;141:764-9.
47. Rego C, Tomada I, Silva D, Pereira J, Aguiar A, Guerra A. Breast-feeding, body fat distribution and cardiovascular risk factors in obese children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:554.
48. Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G, Plagemann A. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005;162:397-403.
49. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics* 2005;115:1367-77.
50. Martin RM, Gunnell D, Smith D. Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005;161:15-26.
51. Martin RM, Ness AR, Gunnell D, Emmett P, Smith GD for the ALSPAC Study Team. Does breast-feeding in infancy lower blood pressure in childhood? The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Circulation* 2004;109:1259-66.
52. Pettitt DJ, Knowler WC. Long-term effects of the intrauterine environment, birth weight, and breast-feeding in Pima Indians. *Diabetes Care* 1998;21(Suppl 2):B138-41.
53. Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics* 2002;110:597-608.
54. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Breast milk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow up of a prospective, randomized study. *Obstet Gynecol Surv* 2005;60:19-21.

55. Owen CG, Whincup PH, Gilg JA, Cook DG. Effect of breast feeding in infancy on blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003;327:1189-95.
56. Guerra A, Rego C, Vasconcelos C, Silva D, Aguiar A. Breastfeeding and nutritional status, blood pressure and lipid profile during infancy and childhood. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39(Suppl 1):S101-2.
57. Guerra A, Rego C, Castro EMB, Rodrigues P, Silva D, Lourenço S *et al.* Estudo prospectivo referente aos principais factores de risco de patologia cardiovascular desde a infância e até à adolescência. *Acta Paediatr Port* 1997;28:297-306.
58. Svahn JC, Feldl F, Raiha NC, Koletzko B, Axelsson IE. Fatty acid content of plasma lipid fractions, blood lipids, and apolipoproteins in children fed milk products containing different quantity and quality of fat. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:152-61.
59. Guerra A, Feldl F, Koletzko B. Fatty acid composition of plasma lipids in healthy Portuguese children: is the Mediterranean diet disappearing? *Ann Nutr Metab* 2001;45:78-81.
60. Ribeiro M, Balcão V, Rocha G, Moutinho C, Casal S, Oliveira B *et al.* Fatty acid composition of human milk in a Portuguese urban population: prospective study from 7 days to 16 weeks of lactation. *Pediatric Research* 2005;58:382.
61. Berenson GS, Wattigney WA, Bao W, Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B. Rationale to study the early natural history of heart disease: The Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci* 1995;310(Suppl 1):S22-8.
62. Palinski W, Napoli C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J* 2002;16:1348-60.
63. Adams C, Burke V, Beilin LJ. Cholesterol tracking from childhood to adult mid-life in children from the Busselton study. *Acta Paediatr* 2005;94:275-80.
64. Kivimaki M, Lawlor DA, Smith GD, Keltikangas-Jarvinen L, Elovainio M, Vahtera J *et al.* Early socioeconomic position and blood pressure in childhood and adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Hypertension* 2006;47:39-44.
65. Deshmukh-Taskar P, Nicklas TA, Morales M, Zakeri I, Berenson GS. Tracking of overweight status from childhood to young adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:48-57.
66. Nicklas TA, von Duvillard SP, Berenson GS. Tracking of serum lipids and lipoproteins from childhood to dyslipidemia in adults: the Bogalusa Heart Study. *Int J Sports Med* 2002;23 (Suppl 1): S39-43.
67. Bao W, Srinivasan SR, Wattigney WA, Berenson GS. The relation of parental cardiovascular disease to risk factors in children and young adults. the Bogalusa Heart Study. *Circulation* 1995;91:365-71.
68. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med* 1998;338:1650-6.
69. Strong JP, Malcom GT, Newman WP 3rd, Oalman MC. Early lesions of atherosclerosis in childhood and youth: natural history and risk factors. *J Am Coll Nutr* 1992;11(Suppl):51S-4S.