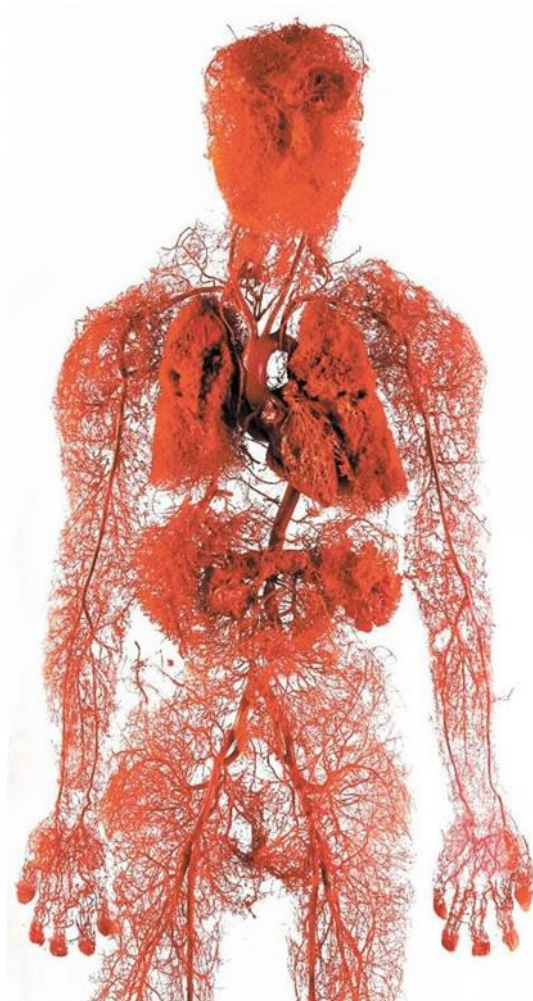




UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

“Doenças cardiovasculares: Metabolitos do citocromo P450 da
via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular”



José Miguel da Mota Fernandes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

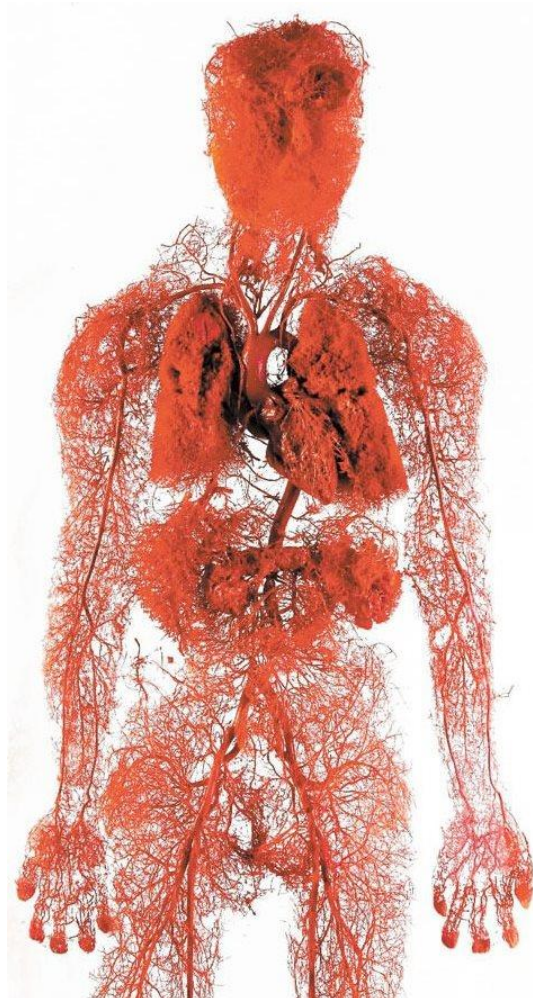
Dissertação orientada por: Doutora Vera Linda Ribeiro Marques

Faro, 2013



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

“Doenças cardiovasculares: Metabolitos do citocromo P450 da
via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular”



José Miguel da Mota Fernandes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Dissertação orientada por: Doutora Vera Linda Ribeiro Marques

Faro, 2013



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

“Doenças cardiovasculares: Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular”

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

José Miguel Fernandes

Copyright © José Miguel Fernandes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de administrar a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Vera Ribeiro Marques pela sua orientação nesta monografia.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, por todo o apoio fornecido ao longo destes anos de curso.

Agradeço aos meus colegas que me acompanharam ao lado destes anos, pela amizade, apoio, conselhos e seu espírito académico.

Agradeço a todo o pessoal da Farmácia Comunitária e Hospitalar e do Centro de Medicina e Reabilitação do Sul onde estagiei e onde fui bem acolhido por todos.

Agradeço à Lucinda Teixeira da Farmácia Hospitalar onde estagiei, pelo seu apoio, ajuda, amizade e aconselhamento nesta fase difícil do meu estágio.

Um especial agradecimento à Marta Inês, pelo apoio, aconselhamento e ter estado sempre ao meu lado quer nos momentos de alegria ou nos momentos mais difíceis.

E, por fim, um importante agradecimento ao Governo de Portugal, pela Bolsa de Estudo oferecida que, ao longo destes anos, permitiu-me realizar e concluir o Curso de Ciências Farmacêuticas.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

Abreviaturas

6-,15-,20-HEDE - Ácido 20-hidroxi-eucosa-6(Z),15(Z)-dienóico

6-,15-,20-HEDGE - 20-hidroxi-eucosa-6(Z),15(Z)-dienoil glicina

17-ODYA - Ácido 17-octadecínóico

A

AA - Ácido araquidónico

AASK - *“African Study of Kidney Disease”*

AMP cíclico - Monofosfato cíclico de adenosina

ARA - Antagonistas dos recetores da angiotensina II

ARIC - *“The Atherosclerosis Risk In Communities”*

ATP - Trifosfato de adenosina

AUDA - 12-(3-adamantan-1-il-ureido) dodecanóide

AVC - Acidente vascular cerebral

B

BH₄ - Treta-hidrobiopterina

BK_{Ca} - Canal de potássio dependente de cálcio de larga condutância

C

CDU - 1-ciclohexil-3-dodecil-urea

CO - Monóxido de carbono

COX - Enzima cicloxigenase

cPLA₂ - Fosfolipase A₂ citosólica

CrMP - Mesoporfirina de crómio

CYP - Enzimas da família dos citocromos P450

D

DAC - Doença arterial coronária

DAP - Doença arterial periférica

DDBB - Ácido dibromododec-11-enóico



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

DCU - *N,N'*-diciclohexilurea

DCV - Doenças cardiovasculares

DDMS - *N*-metilsulfunil-12,12-dibromododec-11-enamida

DGLA - Ácido dihomo- γ -linolénico

DHET - Ácido dihidroeicosatrienóico

E

EAM - Enfarte agudo do miocárdio

ECA - Enzima conversora de angiotensina

EDHF - Fator de hiperpolarização dependente do endotélio

EDRF - Fator de relaxamento dependente do endotélio

EET - Ácido epoxieicosatrienoico

EGFR - Fator de crescimento epidérmico

E_m - Potencial de membrana

eNOS - Enzima óxido nítrico sintase endotelial

EPA - Ácido eicosapentanóico

F

FAD - Dinucleótido de adenina e flavina

G

Gas - Subunidade alfa da enzima da proteína G

GMPC - Monofosfato cíclico de guanosina

GTP - Trifosfato de guanosina

GDP β S - 5'-[β -tio]difosfato de guanosina

GDP γ S - 5'-O-tiotrifosfato de guanosina

H

HET016 - *N*-hidroxi-*N'*-(4-butil-2-metilfenil)formamidina

HETE - Ácido hidroxieicosatrienoico

HO - Enzima heme oxigenase

HSP90 - Proteína chaperona HSP90 (do inglês, *heat shock protein 90*)



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

I

IECA - Inibidor da enzima conversora da angiotensina

iNOS - Óxido nítrico sintase indutível

IK_{Ca} - Canal de potássio dependente de cálcio

IKK - I κ B cinase

iPLA₂ - Fosfolipase A₂ cálcio-independente

K

K_{ATP} - Canal de potássio dependente de ATP

K_{Ca} - Canal de potássio dependente de cálcio

K_{IR} - Canal de potássio retificador (do inglês, *inward rectifier*)

K_V - Canal de potássio dependente de voltagem de intermedia condutância

L

LDL - Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *low-density lipoprotein*)

LOX - Enzima lipoxigenase

LURIC - “*Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health*”

M

MAO - Enzima monoamino oxidase

MAPK - Proteína cinase ativada por mitogénios (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*)

ARNm - Ácido Ribonucleico mensageiro

MDC-CVA - “*Malmö Diet and Cancer cardiovascular arm*”

N

NADPH - Fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

nNOS - Enzima óxido nítrico sintase neuronal

NO - Óxido nítrico

NOS - Enzima óxido nítrico sintase



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

O

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR - *Odds ratio*

P

PC - Fosfatidilcolina

PE - Fosfatidiletanolamina

PGG₂ - Prostaglandina G₂

PGH₂ - Prostaglandina H₂

PGI₂ - Prostaciclina I₂

PKA - Proteína cinase A

PLA₂ - Fosfolipase A₂

R

ROS - Espécies reativas de oxigénio

S

SCA - Síndrome Coronária Aguda

sEH - Enzima epóxido hidrólase solúvel

sGC - Enzima guanilato ciclase solúvel

SK_{Ca} - Canal de potássio dependente de cálcio de baixa condutância

SNP - Polimorfismo de um só nucleótido (do inglês, *single-nucleotide polymorphism*)

sPLA₂ - Fosfolipase A₂ secretora

SOD - Enzima superóxido dismutase

T

TRP - Canal receptor de potencial transitório

TRPV4 - Canal receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 4

TRPC - Canal receptor de potencial transitório canónico

TS011 - *N*-(3-cloro-4-morfolina-4-il)fenil-*N*'-hidroximidofórmamida

TP - Receptor de tromboxanos



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

Índice

1. Resumo	1
2. Abstract	2
3. Introdução.....	3
4. As doenças cardiovasculares	4
5. A fisiologia e patologia do endotélio vascular.....	4
5.1. Estrutura dos vasos sanguíneos.....	4
5.2. O endotélio vascular	6
5.3. Regulação do tónus vascular.....	8
5.4. Fatores de contração dependentes do endotélio.....	10
5.4.1 EDCF derivados do AA	10
5.4.2 Espécies reativas de oxigénio (ROS)	10
5.4.3 Endotelina.....	11
5.4.4 Angiotensina II.....	11
5.1. Fatores de relaxamento dependentes do endotélio.....	12
5.1.1 Prostaciclina	12
5.1.2 Óxido nítrico (NO).....	13
5.1.3 Fator hiperpolarizante dependente do endotélio	14
5.2. Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).....	15
5.3. Disfunção endotelial	16
5.3.1 Desacoplamento da eNOS.....	17
5.4. Os canais de potássio	17
5.4.1 Os subtipos de canais de potássio	18
5.4.2 Canais de potássio dependente de voltagem (K _V).....	19
5.4.3 Canais de potássio dependentes de cálcio (K _{Ca})	19
5.4.1 Canais de potássio retificadores (<i>inward rectifier</i> , K _{IR}).....	20
5.4.2 Canais de potássio dependentes do ATP (K _{ATP})	20
6. O metabolismo do ácido araquidónico vascular	21
6.1. Os Eicosanóides	22
6.2. Fosfolipases A ₂	22
6.3. Via da Ciclooxygenase	23



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

6.4.	Via da Lipoxigenase	24
6.5.	Via dos Citocromos P450 monooxigenases.....	27
6.5.1	CYP Epoxigenases	27
6.5.2	CYP Hidroxilases.....	29
7.	Metabolismo dos eicosanóides derivados do CYP.....	29
7.1.	Incorporação nos fosfolípidos membranares	30
7.2.	Metabolismo pela sEH.....	31
7.3.	Reações de β -oxidação e de alongação.....	31
7.4.	Outras vias metabólicas secundárias.....	32
8.	Os Citocromos P450	32
9.	Expressão dos Citocromos P450 no tecido cardiovascular	33
9.1.	Família CYP1	34
9.2.	Família CYP2	35
9.3.	Família CYP3	35
9.4.	Família CYP4	36
9.5.	Regulação dos enzimas CYP450	36
9.5.1	Regulação da atividade.....	36
9.5.2	Regulação da expressão	37
10.	Ação biológica dos metabolitos do citocromo P450 do AA	38
10.1.	Os EETs.....	38
10.2.	Função dos EETs.....	38
10.3.	Os EETs como fator hiperpolarizante dependente do endotélio	39
10.4.	Mecanismo da transferência de um fator	40
10.5.	Mecanismo de transferência da hiperpolarização	42
10.6.	Mecanismos celulares e moleculares da ação dos EETs.....	43
10.6.1	Os EETs como ligandos do recetor acoplado à proteína G.....	44
10.6.2	Ação dos EETs sobre os canais de recetores de potencial transitório (TRP)45	
10.6.3	Efeito dos EETs sobre os canais TRP e recetor acoplado a proteína G	47
10.6.4	Ação dos EETs sobre o recetor de tromboxanos.....	48
10.6.5	Ação dos EETs nos canais de potássio dependentes do ATP	48
10.6.6	Ação dos EETs sobre a heme-oxigenase e monóxido de carbono	50
10.7.	20-HETE	50



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

10.8.	Mecanismo pró-hipertensivo.....	51
10.9.	Ação do 20-HETE nas células endoteliais – Via da eNOS.....	52
10.10.	Ação do 20-HETE sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	53
11.	Ação dos enzimas do metabolismo do AA na fisiologia e fisiopatologia cardiovascular.....	53
12.	Suscetibilidade ao risco cardiovascular.....	54
12.1.	Polimorfismos nos <i>CYP450</i> da via do ácido araquidónico.....	55
12.1.1	Polimorfismos no gene <i>CYP1A1</i>	55
12.1.2	Polimorfismos no gene <i>CYP1A2</i>	56
12.1.3	Polimorfismos no gene <i>CYP1B1</i>	56
12.2.	Polimorfismos na subfamília <i>CYP2C</i>	57
12.3.	Polimorfismos no gene <i>CYP2J2</i>	58
12.4.	Polimorfismos na subfamília <i>CYP4A</i>	61
12.4.1	Polimorfismos no gene <i>CYP4A11</i>	62
12.4.2	Polimorfismos no gene <i>CYP4F2</i>	63
12.5.	Polimorfismos na sEH.....	64
13.	Potenciais alvos terapêuticos.....	68
13.1.	Inibidores da sEH e seus efeitos cardiovasculares.....	69
13.2.	Inibidores do 20-HETE.....	70
14.	Conclusão.....	71
15.	Bibliografia.....	73



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

Índice de Figuras

Figura 1. Histologia de um vaso sanguíneo.....	5
Figura 2. Regulação do tónus vascular nas células endoteliais pelos diversos fatores de relaxação.....	9
Figura 3. Fatores de relaxamento produzidos pelo endotélio vascular.....	12
Figura 4. Mecanismo de sinalização nas células do músculo liso vascular em resposta à ativação (esquerda) e inibição (direita) do canal de potássio.	18
Figura 5. Vias de metabolização do ácido araquidónico	26
Figura 6. Conversão do AA nos respetivos regioisómeros EET pelos CYP epoxigenases.	28
Figura 7. As vias metabólicas dos EETs.	30
Figura 8. Proposta de mecanismo para a transferência de EETs.....	41
Figura 9. Proposta de mecanismo de transferência da hiperpolarização pelos EETs.....	43
Figura 10. Proposta de mecanismo de ação dos EETs sobre os canais TRPV4 nas células do músculo liso.....	46
Figura 11. Proposta de mecanismo de ativação dos canais K_{ATP} nas células do músculo liso pelos EETs.	49
Figura 12. Concentração plasmática de 14,15-DHET entre indivíduos com a variante G-50T (MT) e de referência (WT).....	59
Figura 13. Identificação dos diversos SNPs no gene humano da sEH, <i>EPHX2</i>	65
Figura 14. Efeito da vasodilatação no polimorfismo <i>EPHX2</i> K55R na resposta a bradicinina.	66
Figura 15. Efeito da vasodilatação no polimorfismo <i>EPHX2</i> R287Q na resposta a bradicinina.	67



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

Índice de Quadros

Quadro 1. Ações do endotélio e as substâncias envolvidas.....	7
Quadro 2. Enzimas CYP envolvidos no metabolismo de EETs e HETEs.	27
Quadro 3. Expressão de CYPs no sistema cardiovascular.	33
Quadro 4. Polimorfismos genéticos na via metabólica CYP do AA.....	55
Quadro 5. Associação entre os polimorfismos da subfamília CYP2C e as DCV.	57
Quadro 6. Associação entre os polimorfismos no CYP2J2 e as DCV.	58
Quadro 7. Associação entre os polimorfismos no <i>CYP4A11</i> e as DCV.....	62



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

1. Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) continuam a ser a principal causa de morte e são responsáveis por quase 30% de todas as causas de mortalidade nos países desenvolvidos.

Os citocromos P450 (CYP) epoxigenases metabolizam o ácido araquidônico em eicosanóides biologicamente ativos, os EET. Muitos membros de diversas famílias de enzimas CYP foram identificados no coração, endotélio e do músculo liso dos vasos sanguíneos. Os efeitos cardiovasculares dos EET incluem a vasodilatação, tendo estes revelado possuir efeitos anti-hipertensivos e, conseqüentemente, evidentes efeitos de proteção cardiovasculares. Com esta informação, tem sido estabelecida uma associação entre a expressão e atividade CYP e as DCV, como hipertensão, doença arterial coronária, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral.

Os EET são posteriormente metabolizados pela epóxido hidrolase solúvel (sEH) nos biologicamente menos ativos ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs), sendo assim os inibidores da sEH anti-hipertensivos. Portanto, a sEH provavelmente poderá se tornar um importante alvo terapêutico para as DCV.

Por outro lado, os CYP ω -hidroxilases como o CYP4A11 e CYP4F2 metabolizam o ácido araquidônico em ácido 20-hidroxieicosatetraenóico (20-HETE), que possui ambos os efeitos vasoconstritores e natriuréticos. Os polimorfismos genéticos que causam menor atividade destas enzimas estão geralmente associados com maior risco de hipertensão.

Esta monografia tem como objetivo analisar o papel dos metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico na fisiologia cardiovascular, nomeadamente, ao nível do tónus vascular, bem como de que forma a alteração genética dos enzimas CYP envolvidos pode levar a condições fisiopatológicas.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares, Citocromo P450, Ácido araquidônico, Epóxido hidrolase solúvel, Polimorfismos genéticos



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

2. Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) remain the leading cause of death and account for nearly 30% of all the causes of mortality in the developed countries.

Cytochrome P450 (CYP) epoxygenases metabolize arachidonic acid to biologically active eicosanoids, EETs. Many members of CYP enzyme families have been identified in the heart, endothelium and smooth muscle of blood vessels. The cardiovascular effects of CYP epoxygenases and EETs include vasodilation, presenting anti-hypertensive effects and, therefore, marked cardiovascular protective effects. With this information, an association between CYP expression and activity and CVD, such as hypertension, coronary artery disease, myocardial infarction, heart failure, and stroke, has been established.

EETs are further metabolized by soluble epoxide hydrolase (sEH) to the less biologically active dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs). Importantly, soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitors are anti-hypertensive. Therefore, sEH will likely become an important therapeutic target for cardiovascular diseases.

On the other hand, CYP ω -hydroxylases such as CYP4A11 and CYP4F2 metabolize arachidonic acid to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) which has both vasoconstricting and natriuretic effects. Genetic polymorphisms causing lower activity of these enzymes are generally associated with higher risk of hypertension.

This dissertation aims to highlight the role of CYP metabolites of arachidonic acid pathway in cardiovascular physiology, particularly, at the level of vascular tone, as well as the way genetic alteration of the CYP enzymes involved may lead to pathophysiological conditions.

Keywords: Cardiovascular disease, Cytochrome P450, Arachidonic acid, Soluble epoxide hydrolase, Genetic polymorphism



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

3. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) contribuem com 30% das causas de mortalidade nos países desenvolvidos. Em Portugal o mesmo valor verifica-se (Portal da saúde). Na última década, a atenção à suscetibilidade genética para as DCV tem aumentado de forma a perceber a fisiopatologia destas doenças. Desde então, muitas variantes genéticas tem sido associadas as diferentes DCV. Atualmente, o conhecimento sobre o papel dos enzimas do citocromo P450 na fisiopatologia das DCV tem aumentado, podendo os polimorfismos genéticos dos CYP ser considerados um dos maiores determinantes na suscetibilidade individual às DCV (Zordoky & El-Kadi, 2010).

Os enzimas CYP tem um papel importante na homeostasia do sistema cardiovascular, metabolizando diversos substratos endógenos tais como o colesterol, androgénios, estrogénios, e metabolitos do ácido araquidónico (AA), que interferem com várias funções cardiovasculares (Elbekai & El-Kadi, 2006). Muitos estudos têm mostrado a importância dos metabolitos do citocromo P450 da via do AA na regulação da função cardiovascular. É sabido, há muito tempo, que a via do AA está relacionada com a produção de autacóides no organismo, os eicosanóides. O AA e os seus metabolitos eicosanóides desempenham um papel importante na regulação cardíaca, bioenergética, função contráctil e sinalizadora de vias bioquímicas.

Os enzimas CYP estão envolvidos no metabolismo do AA e na formação de metabolitos cardiotoxicos e cardioprotetores (Zordoky & El-Kadi, 2008). O ácido 20-hidroxi-eicosatrienoico (20-HETE), um dos metabolitos da atividade CYP hidroxilase, mostrou ter várias funções cardiovasculares. Por outro lado, os ácidos epoxieicosatrienoico (EET), produzidos pelos CYP epoxigenase, mostraram ser cardioprotetores em vários modelos de DCV (Roman, 2002; Elbekai & El-Kadi, 2006). A alteração da expressão destes enzimas e a consequente alteração dos níveis de EET e 20-HETE foram observados em diversas patologias cardiovasculares (Zordoky & El-Kadi, 2008). Polimorfismos genéticos que afetam o metabolismo do AA pela ação dos CYP estão potencialmente implicados na patogénese de diversas DCV (Capdevila, Falck, Imig, 2007; Cai, 2009).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

4. As doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) representam um grupo de alterações patológicas no coração e vasos sanguíneos, e abrange uma grande diversidade de doenças como a doença cardíaca coronária, a doença cerebrovascular, a hipertensão arterial, a doença arterial periférica (DAP), a doença cardíaca reumática, a doença cardíaca congénita, a insuficiência cardíaca, a trombose venosa profunda e a embolia pulmonar (Pinto, 2007).

As DCV são a principal causa de morte a nível mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 17,3 milhões de pessoas morreram em 2008 vítimas de DCV, representando 30% de todas as causas de morte, de entre as quais destacam-se o enfarte agudo do miocárdio (EAM) com 7,3 milhões e o acidente vascular cerebral (AVC) com 6,2 milhões (Pinto, 2007).

A OMS considera que as DCV assumam já características epidémicas, para a qual a globalização, a urbanização e o envelhecimento tem contribuído., deixando de ser uma doença específica dos idosos nos países desenvolvidos, mas sendo agora também uma doença de mulheres, de jovens adultos e de crianças. Pelo estado corrente, estima-se que em 2030 as DCV venham a causar 23,3 milhões de mortes a nível mundial. Em Portugal, estas patologias foram responsáveis por 34% dos óbitos, em 2005 (Pinto, 2007).

5. A fisiologia e patologia do endotélio vascular

5.1. Estrutura dos vasos sanguíneos

O sistema vascular é constituído por uma complexa rede de vasos sanguíneos que liga o coração a diversos tecidos e órgãos a fim de manter a homeostasia em resposta a variações fisiológicas e patológicas. As paredes dos vasos sanguíneos, com a exceção



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

dos capilares e vénulas, são constituídas por três camadas distintas: a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia (Seeley, Stephens, Tate, 2003).

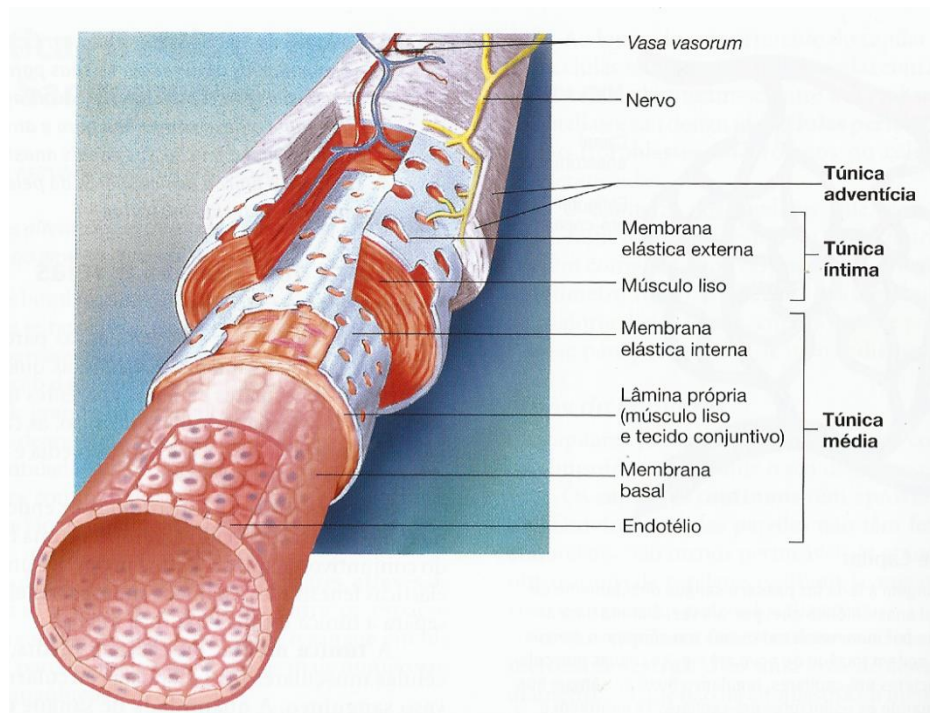


Figura 1. Histologia de um vaso sanguíneo.

A túnica íntima é constituída por endotélio, uma membrana basal, lâmina própria e membrana elástica interna que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e separa o lúmen dos vasos sanguíneos da túnica média.

A túnica média é constituída por células musculares lisas que circulam ao redor do vaso sanguíneo. É a camada mais espessa que regula o fluxo sanguíneo pela contração e relaxamento do músculo liso da túnica média. A túnica média também possui quantidades variáveis de fibras elásticas e de colagénio, consoante o tipo de vaso. Em algumas artérias, a face externa da túnica média possui uma membrana elástica que separa a túnica média da adventícia.

A túnica adventícia é constituída por tecido conjuntivo denso, próximo da túnica média, e laxo, que se funde com o tecido conjuntivo envolvente do vaso sanguíneo. É a



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

camada mais externa da parede vascular e a sua espessura varia consoante o tipo de localização. Ao contrário das outras camadas, nas artérias e veias de diâmetro superior a 1 mm, os nutrientes não podem difundir-se do lúmen do vaso para a camada mais externa. Assim, a túnica adventícia e túnica média possuem uma rede capilar de pequenos vasos chamados *vasa vasorum* que penetram no vaso a partir do exterior e, assim, permitir o aporte de nutrientes a camada externa do vaso (Seeley, Stephens, Tate, 2003).

5.2. O endotélio vascular

O endotélio vascular constitui um revestimento interno de epitélio pavimentoso simples em todos os vasos sanguíneos, que é contínuo com o endocárdio do coração. O endotélio funciona como uma barreira semipermeável e regula a transferência de moléculas pequenas e grandes. Mais do que uma barreira protetora, o endotélio possui propriedades anticoagulantes e produz uma série de autacóides que regulam o tónus vascular e a homeostasia. As células endoteliais são dinâmicas e possuem funções metabólicas e de síntese. Elas exercem ações autócrinas, parácrinas e endócrinas e influência sobre as células do músculo liso, plaquetas e leucócitos periféricos (Batlouni, 2001).

As células endoteliais são responsáveis pela síntese e libertação de vários fatores quando ativadas por agonistas que estimulam os recetores acoplados a proteína G, levando ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . De entre os agonistas destacam-se: os neurotransmissores acetilcolina, noradrenalina, ATP e substância P; as hormonas catecolaminas, vasopressina, angiotensina II e insulina; os autacóides bradicina, histamina, ADP, endotelina; e os produtos da coagulação sanguínea como a serotonina e a trombina. Para além dos estímulos químicos, os estímulos físicos tem um papel importante, o *shear stress*, ou o stresse de cisalhamento, o qual corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce sobre as células endoteliais, estimulando-as a sintetizar e libertar mediadores vasodilatadores (Matlung, Bakker, VanBavel, 2009) e a inibir a secreção de endotelina, um potente vasoconstritor (Cohen & Vanhoutte, 1995).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

As células endoteliais têm o papel de manter a fluidez do sangue e regular o calibre dos vasos sanguíneos, consoante as alterações hemodinâmicas e humorais locais. Elas dispõem de uma interface não trombogénica e regulam a trombogénese, a trombólise, a adesão plaquetária, o tónus vascular e o fluxo sanguíneo. Sendo o endotélio indispensável para a homeostasia corporal, a sua disfunção ou lesão está envolvida em diversas patologias, que incluem a aterosclerose, a hipertensão, a hipertensão pulmonar, sepsis e síndromes inflamatórias (Pinto, 2007). O Quadro 1 resume as funções biológicas relativas a ação vasomotora (Batlouni, 2001).

Quadro 1. Ações do endotélio e as substâncias envolvidas.

	Substâncias
Síntese de vasodilatadores e antiplaquetários	<ul style="list-style-type: none">• Fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF)• Fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF)• Prostaciclina (PGI₂)• Prostaciclinas• Bradicinina
Síntese de vasoconstritores e ativadores da agregação plaquetária ou fatores de contração derivados do endotélio (EDCF)	<ul style="list-style-type: none">• Endotelinas• Endoperóxidos• Leucotrienos• Angiotensina II• Espécies reativas de oxigénio (ROS)
Recetor-modulador de vasodilatadores, agregantes plaquetares e coagulantes	<ul style="list-style-type: none">• Acetilcolina• Serotonina• Trombina• Nucleótidos de adenosina• Vasopressina• Ácido araquidónico
Metabolismo e inativação	<ul style="list-style-type: none">• Catecolaminas e Serotonina (MAO)• Produtos plaquetários• Angiotensina II (angiotensinases A e C)



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

5.3.Regulação do tónus vascular

A regulação do tónus vascular é realizada pelas células endoteliais que produzem numerosas substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. No que se refere aos vasoconstritores libertados pelo endotélio destacam-se os derivados do AA, o anião superóxido, endotelina 1 e a angiotensina II. Já na vasodilatação, o endotélio relaxa a musculatura lisa vascular através de três mediadores principais: o óxido nítrico, a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), Figura 2 (Féléto, Köhler, Vanhoutte, 2010).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

5.4.Fatores de contração dependentes do endotélio

O endotélio sintetiza substâncias vasoconstritoras, designadas de fatores de contração dependentes do endotélio que incluem as endotelinas, a PGH_2 e tromboxano A_2 , anião superóxido e angiotensina II.

5.4.1 EDCF derivados do AA

O AA é oxidado pela ação da cicloxigenase (COX) em endoperóxidos que posteriormente darão origem às prostaglandinas E_2 (PGE_2), $F_{2\alpha}$ (PGF_2) e ao tromboxano A_2 (TXA_2). O TXA_2 é produzido a partir da PGH_2 como substrato da tromboxano sintase, um enzima pertencente a superfamília dos citocromo P450, o CYP5A1. Entre os seus efeitos fisiológicos na agregação plaquetária e amplificação da resposta a outros agentes agregantes, o TXA_2 é um potente vasoconstritor do músculo liso vascular. Já a PGF_2 é sintetizada, não só a partir da PGH_2 pela 9,11-endoperóxido redutase, mas também a partir da PGD_2 e PGE_2 pela PGD_2 11-cetoreductase e PGE_2 9-cetoreductase citosólicas, respetivamente. A PGF_2 produzida nas células endoteliais é um potente vasoconstritor (Félétou, 2011).

5.4.2 Espécies reativas de oxigénio (ROS)

Em condições de inflamação, a atividade da COX aumenta, principalmente a COX-2 que é induzida pelo processo. Isto leva que o endotélio produza grandes quantidades de ROS como o anião superóxido (O_2^-) e o radical hidroxilo ($HO\cdot$) que, por sua vez, diminuem a biodisponibilidade do NO endotelial e o seu efeito vasodilatador, além do efeito vasoconstritor do O_2^- .



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

5.4.3 Endotelina

A endotelina é um vasoconstritor potente das células do músculo liso produzido pelas células endoteliais quando submetidas a diferentes fatores, entre os quais fatores físicos, como a hipoxia, tensão e stresse de cisalhamento, e estímulos químicos, como a trombina, adrenalina, vasopressina e angiotensina II, o que permite controlar o tónus vascular basal sujeito a diferentes condições (Batlouni, 2001).

A endotelina é uma família de péptidos de 21 aminoácidos constituída por três isoformas no ser humano: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). Os seus efeitos biológicos provêm da interação com os recetores acoplados à proteína G, situados nas células do músculo liso, o recetor A da endotelina (ET_A), e nas células endoteliais, o recetor B da endotelina (ET_B) que também pode ser encontrado nas células do músculo liso. A ET-1 atua preferencialmente nos recetores ET_A causando vasoconstrição. Paradoxalmente, a ação da ET-1 no recetor ET_B induz a produção de NO e PGI₂, o que explica a vasodilatação que ocorre antes da vasoconstrição (Batlouni, 2001).

5.4.4 Angiotensina II

A angiotensina II é o principal peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina-aldosterona e é derivado da glicoproteína circulante, angiotensinogénio. O sistema é ativado quando o fluxo sanguíneo nos rins baixa e o rim segrega a renina para o sangue. A renina quebra a terminação amino da angiotensinogénio formando a angiotensina I que, posteriormente, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) é convertida em angiotensina II. A angiotensina II provoca a constrição das arteríolas pré-capilares pela ativação dos recetores AT₁ nas células do músculo liso vascular. Para além disto, a angiotensina II induz as glândulas suprarrenais a produzir aldosterona que exerce ação renal, no aumentando da reabsorção de sódio e, conseqüentemente, aumento do volume sanguíneo e a pressão arterial. Portanto, a angiotensina II aumenta a resistência vascular periférica por efeito direto e indireto sobre os vasos sanguíneos (Hardman, Limbird, Gilman, 2001).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controle do tónus vascular

5.1. Fatores de relaxamento dependentes do endotélio

O endotélio liberta localmente, de forma controlada, substâncias que induzem a vasodilatação e a vasoconstrição, regulando o tónus vasomotor, o recrutamento e atividade de células inflamatórias e regulação da trombogênese. Os fatores relaxantes são os metabolitos da COX, prostaciclina (PGI_2), fator relaxante dependente do endotélio (EDRF) identificado como sendo o óxido nítrico (NO) e EDHFs, Figura 3.

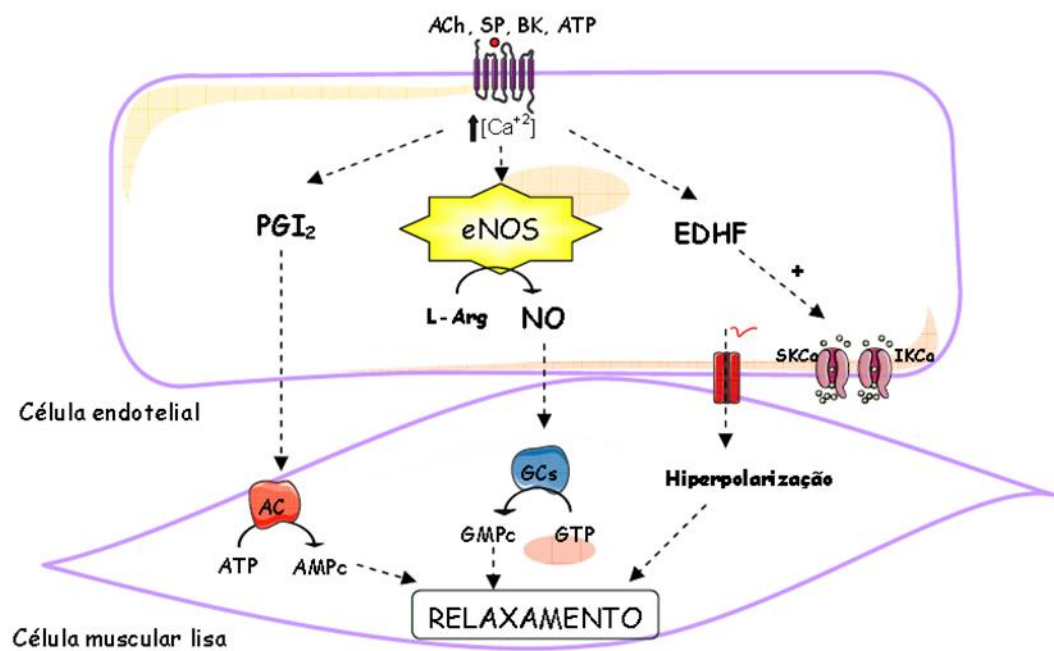


Figura 3. Fatores de relaxamento produzidos pelo endotélio vascular.

5.1.1 Prostaciclina

A prostaciclina, ou PGI_2 , é uma substância instável formado pela prostaciclina sintase, um dos enzimas da superfamília citocromo P450, o CYP8A1. A síntese da PGI_2 é iniciada pela libertação do AA nos fosfolípidos membranares pela enzima fosfolipase A_2 . O AA livre é, então, alvo da enzima cicloxigenase, no qual o AA é oxidado a PGG_2 e, posteriormente, é reduzido a PGH_2 , ainda pela cicloxigenase. Por fim, a prostaciclina sintase converte a PGH_2 a PGI_2 (Félétou, 2011).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

A prostaciclina sintase é altamente expressa nas células endoteliais e, é também expressa nas células do músculo liso vascular, coração, rins e outros tipos de células e tecidos. A prostaciclina é um potente inibidor da agregação e adesão plaquetária na superfície das células endoteliais e um vasodilatador derivado do endotélio.

A PGI₂ é o principal ligando do recetor da prostaciclina (IP) acoplado à proteína G na membrana das células do músculo liso. A estimulação do recetor IP ativa a via do cAMP-PKA que inibe a contração muscular.

Por outro lado, a ação vasodilatadora da PGI₂ é frequentemente associada à concomitante hiperpolarização das células do músculo liso, envolvendo a abertura dos canais K_{ATP}, K_V, K_{IR} e BK_{Ca}. A ativação dos canais de K⁺ pela estimulação do recetor IP é dependente da via do cAMP, ou é independente pela ação direta da proteína Gas na ativação do canal de K⁺. O mecanismo de hiperpolarização no processo de relaxamento pode ser muito significativo em alguns tecidos (Félétou, 2011).

5.1.2 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um radical solúvel gasoso de curta ação, produzido constitutivamente pelas células endoteliais através da enzima óxido nítrico sintase (eNOS). Esta enzima catalisa a síntese de NO e L-citrulina a partir da L-arginina. Tem uma ação somente nas células próximas devido ao seu tempo de semivida de apenas alguns segundos (Pinto, 2007).

Após a síntese do NO, este difunde-se do endotélio para o músculo liso vascular, e estimula o enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) que, por sua vez, aumenta a concentração de GMPc citosólica. O GMPc ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG) que, entre outras funções desfosforila a cadeia leve da miosina, o que torna-a inativa e provoca o relaxamento. Por outro lado, o GMPc pode ativar os canais de K⁺, o que causa a hiperpolarização da membrana e relaxamento vascular (Batlouni, 2001; Félétou, 2011).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

5.1.3 Fator hiperpolarizante dependente do endotélio

O fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF) era originalmente definido como um fator, distinto do NO e PGI₂, gerado e libertado pelas células endoteliais em resposta a estímulos físicos ou químicos, que difundia sobre as células musculares lisas vasculares, hiperpolarizando a membrana das células e induzir relaxação. Esta hiperpolarização é devida à abertura dos canais de potássio (cálcio dependentes de larga condutância, BK_{Ca}, e cálcio dependentes de pequena condutância, SK_{Ca}) uma vez que é inibida pelo aumento da concentração extracelular de K e por bloqueadores dos canais de K (Cohen & Vanhoutte, 1995).

O uso de inibidores da NOS ou COX não bloqueiam a hiperpolarização. A atividade do NO difere do EDHF, enquanto a dilatação dependente do endotélio pelo NO é maior nas grandes artérias, o efeito do EDHF é maior nas pequenas artérias e arteríolas (Nishikawa, Stepp, Chilian, 1999).

A hiperpolarização gerada nas células endoteliais parece ser transferida para as células do músculo liso através das junções mio-endoteliais. Além do mais, a baixa concentração de K⁺ intercelular, entre as células endoteliais e as células do músculo liso, pode levar a ativação da bomba de sódio e potássio (Na⁺/K⁺ ATPase) e dos canais de potássio retificadores (K_{IR}) e assim contribuir para a hiperpolarização. A hiperpolarização gerada vai impedir a ativação dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem, levando a uma diminuição da concentração intracelular de Ca²⁺ livre e relaxamento vascular (Busse et al., 2002).

Inúmeras substâncias foram propostas como mediadores da atividade EDHF, tais como, os EET, o ião potássio, o peptídeo natriurético tipo C, peróxido de hidrogénio, ácidos trihidroxieicosatrienoicos e anandamida. Contudo, há evidência de que os EET e EDHF tenham propriedades idênticas. Como o EDHF, os EET são mais potentes no relaxamento de pequena artérias coronárias do que as grandes artérias (Campbell et al. 1996; Oltman et al. 1998).

As respostas mediadas pelo EDHF podem fornecer uma ação vasodilatadora na hipertensão e podem compensar, por algum tempo, a disfunção endotelial devido à síntese ou biodisponibilidade do NO estar comprometida. A redução da



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

hiperpolarização dependente do endotélio também pode contribuir para disfunção arterial em animais e doenças cardiovasculares em humanos (Félétou, Köhler, Vanhoutte, 2010).

No que se refere aos metabolitos do metabolismo do AA, os eicosanóides produzidos pelas vias da lipoxigenase e CYP monoxigenases aparentam atuar como EDRF. Estas vias são complexas e envolvem muitos metabolitos com diversos efeitos sobre o tónus vascular. A vasodilatação produzida pelos eicosanóides derivados da LOX e CYP têm como mecanismo a ativação dos canais de potássio, BK_{Ca} e SK_{Ca} , levando à hiperpolarização e conseqüentemente relaxação. Devido a capacidade destes eicosanóides hiperpolarizarem e relaxarem o músculo liso, as suas atividades vasodilatadoras foram referidas às respostas mediadas pelo EDHF em vários domínios vasculares (Félétou, Köhler, Vanhoutte, 2010).

5.2. Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

A óxido nítrico sintase (NOS) é um enzima que possui como grupo prostético um grupo heme e cuja sequência de aminoácidos apresenta homologia com a CYP redutase. Até ao momento, três isoformas do enzima foram caracterizados: a NOS neural (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), dependentes de cálcio, e a NOS indutível (iNOS), independente de cálcio. As três NOS podem estar presentes nas paredes vasculares. A nNOS pode também ser detetada nas células endoteliais e do músculo liso. A NOS usa como substrato a L-arginina, e é dependente de cofatores como o Tetra-hidrobiopterina (BH_4), fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADPH), oxigénio molecular, dinucleótido de adenina e flavina (FAD), mononucleótido e flavina (FMN) e, por fim, o cálcio (Ca^{2+}) para as isoformas constitutivas (Cai & Harrison, 2000; Félétou, 2011).

A expressão da iNOS foi demonstrada em todas as células nucleadas do sistema cardiovascular (células endoteliais e do músculo liso, fibroblastos, leucócitos e mastócitos). A eNOS também é expressa nos miócitos cardíacos e plaquetas. O NO é rapidamente difundido pelos tecidos e possui uma semivida curta na circulação pois é rapidamente inativado pela oxihemoglobina. Por esta razão, a produção de NO pelo



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

endotélio é constitutiva e modulada por diversos estímulos químicos (acetilcolina, bradicinina, substância P, insulina e outras) e físicos (força ou stress de cisalhamento).

A perda da biodisponibilidade do NO devido a menor produção pelo endotélio e a sua neutralização por parte do anião superóxido resultante do aumento do stresse oxidativo, leva ao estabelecimento da disfunção endotelial por falta dos efeitos mediados do NO (Félétou, 2011).

5.3. Disfunção endotelial

A disfunção endotelial é definida pela alteração funcional das células endoteliais, que inclui a alteração das propriedades anticoagulantes e anti-inflamatórias, modulação do crescimento vascular comprometido e desregulação do remodelamento vascular. Contudo, a disfunção endotelial é referida na literatura como a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio em consequência da menor bioatividade do NO nas paredes dos vasos sanguíneos. A disfunção endotelial tem um papel importante na patogenia da hipertensão e na circulação coronária humana tendo um impacto adverso em eventos cardiovasculares a longo termo (Cai & Harrison, 2000). Embora a etiologia deste processo não seja clara, sabe-se que o stresse oxidativo é um fator desencadeante.

A diminuição da biodisponibilidade do NO pode ter várias causas, desde a diminuição da expressão da eNOS, a falta de substrato ou cofatores da eNOS, alterações na sinalização celular que levam a que a eNOS não seja ativada, ou pela degradação do NO por ROS. A relaxação produzida pelo NO é inativada na presença de O_2^- , uma vez que, a reação entre o NO e o O_2^- ocorre muito rapidamente. Por outro lado, o relaxamento é reestabelecido pelo enzima superóxido dismutase (SOD) que converte o O_2^- em oxigénio molecular e em peróxido de oxigénio, contudo, a velocidade da reação é três vezes inferior à da reação entre o NO e O_2^- , desta forma, em condições fisiológicas normais os antioxidantes endógenos minimizam esta interação e mantêm o equilíbrio frágil entre o NO e o O_2^- (Cai & Harrison, 2000).

Muitos estudos têm mostrado a associação entre o aumento da degradação do NO pelas ROS com a diminuição da relaxação vascular dependente do endotélio em



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

diversas doenças como a hipertensão, insuficiência cardíaca e diabetes em animais e humanos (Cai & Harrison, 2000).

5.3.1 Desacoplamento da eNOS

Na falta de L-arginina ou BH₄, a eNOS produz ROS (H₂O₂ e O₂⁻ respetivamente) que corresponde ao chamado desacoplamento da eNOS. O desacoplamento da eNOS no endotélio pode levar ao stresse oxidativo e a disfunção endotelial. Três mecanismos podem estar na origem deste fenómeno: a diminuição da síntese de NO, que leva a que as ROS reajam com outros compostos celulares em vez com o NO, o início da síntese do anião superóxido (O₂⁻) pela eNOS, levando ao stresse oxidativo, ou o desacoplamento parcial da eNOS que leva a formação de O₂⁻ e NO. A reação entre estes produtos da eNOS dá origem ao peroxinitrito, um potente agente oxidante, contribuindo para o aumento do stresse oxidativo (Cai & Harrison, 2000).

5.4.Os canais de potássio

Os canais de potássio são importantes reguladores no potencial de membrana (E_m), na contratilidade muscular e no controlo do tónus vascular. Eles exibem uma elevada diversidade funcional e molecular, e influenciam o comportamento elétrico de cada tipo de tecido. Por esta razão, existe uma grande diversidade de atividade elétrica no tecido muscular liso. Os vasodilatadores dependentes do endotélio como o NO, PGI₂ e EDHF ativam os canais de potássio na membrana celular (Baranowska et al. 2007).

Em condições fisiológicas, o E_m do K⁺ é inferior ao do músculo liso. Consequentemente, o aumento da permeabilidade da membrana para o K⁺ resulta num efluxo que reduz o E_m da célula o que provoca hiperpolarização. Esta diminuição do E_m leva ao encerramento dos canais de cálcio dependentes de voltagem na membrana celular, diminuindo a entrada de cálcio, e ao relaxamento do músculo liso vascular, ou seja, à vasodilatação. Por outro lado, a inibição dos canais de potássio reduz o efluxo de



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

K^+ , aumenta o E_m , ativa os canais de cálcio, o que leva a despolarização e, consequentemente, à vasoconstrição, Figura 4 (Nelson & Quayle, 1995; Sobey, 2001).

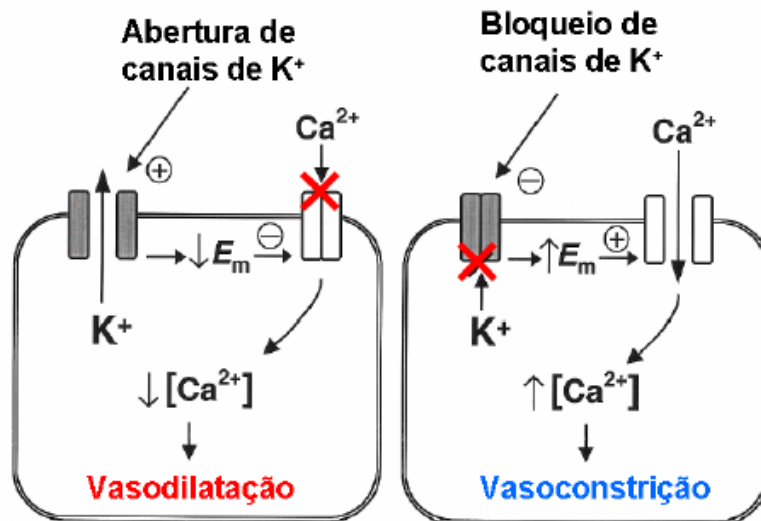


Figura 4. Mecanismo de sinalização nas células do músculo liso vascular em resposta à ativação (esquerda) e inibição (direita) do canal de potássio.

5.4.1 Os subtipos de canais de potássio

Atualmente, quatro tipos distintos de canais de potássio foram identificados nas células endoteliais e do músculo liso vascular: canais de potássio dependentes de voltagem (K_V); canais de potássio dependentes de cálcio, que inclui os de baixa (SK_{Ca}), intermedia (IK_{Ca}) e alta condutância (BK_{Ca}); canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e; canais de potássio retificadores (*inward rectifier*, K_{IR}) (Baranowska et al. 2007).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

5.4.2 Canais de potássio dependente de voltagem (K_V)

Os canais de potássio dependentes de voltagem (K_V) provocam um efluxo de potássio em resposta a uma despolarização da membrana, resultando na repolarização e retorno ao E_m de repouso. Assim, os K_V funcionam para limitar a despolarização de membrana e manter o tónus vascular de repouso, ou seja, regulando a despolarização e a vasoconstrição (Sobey, 2001).

Os canais K_V podem também participar em ambos mecanismos de ação de vasodilatadores e vasoconstritores. Os vasodilatadores que agem via AMPc ativam estes canais, ao passo que, os vasoconstritores encerram-nos através de mecanismo que aumentam a concentração intracelular de Ca^{2+} e ativação da proteína cinase C (PKC).

Os canais K_V podem ser inibidos de forma seletiva pela 4-aminopiridina. Esta inibição pode ser usada para distinguir estes canais dos canais K_{Ca} que também são ativados pela despolarização. Outros inibidores como os iões de céσιο e glibenclamida também inibem os canais K_V (Nelson & Quayle, 1995).

5.4.3 Canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca})

Os canais K_{Ca} têm um papel fundamental no controlo do tónus vascular. Os canais de potássio dependentes de cálcio de larga condutância (BK_{Ca}) são abundantes nas células do músculo liso vascular. Estes canais foram assim definidos pelo fato da sua ativação ocorrer pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e pela despolarização da membrana, contribuindo para a manutenção do E_m nos vasos sanguíneos (Nelson & Quayle, 1995).

Foi proposto que a despolarização induzida pelo aumento da pressão intravascular ou pela ação de vasoconstritores, bem como o aumento intracelular da concentração de Ca^{2+} ativa os canais de K_{Ca} , resultando no aumento do efluxo de K^+ que contraria a despolarização e vasoconstrição (Nelson & Quayle, 1995).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

Os canais BK_{Ca} podem ser inibidos pela iberiotoxina ou por inibidores não seletivos como a caribdotoxina e o tetraetilamónio. Contudo, não são afetados pela glibenclamida ou pela apamina. As células endoteliais também contêm os canais IK_{Ca} e SK_{Ca} ao qual são inibidos pela caribdotoxina e apamina, respetivamente (Williams et al. 2010).

5.4.1 Canais de potássio retificadores (*inward rectifier*, K_{IR})

Os canais de K_{IR} são abundantes no músculo liso de vasos de pequeno calibre em arteríolas mesentéricas e artérias coronárias e cerebrais. Estes canais são ativados pela hiperpolarização da membrana celular, ao contrário dos canais K_V e K_{Ca} que são ativados pela despolarização da membrana, contudo, a atividade destes canais depende também da despolarização e da concentração extracelular de K^+ , ou seja, à medida que a concentração extracelular de K^+ varia, o canal permite o influxo de K^+ durante a hiperpolarização (Sobey, 2001).

Embora a exata função destes canais não esteja elucidada, pensa-se que a ativação dos canais K_{IR} ocorre em resposta a aumentos moderados na concentração extracelular de K^+ que, paradoxalmente, causa hiperpolarização vascular e vasodilatação através do efluxo de K^+ pelos canais K_{IR} , visto que a vasodilatação é inibida pelo bário, um inibidor específico dos canais K_{IR} , causando despolarização vascular e constrição. Conclui-se, assim, que os canais K_{IR} em condições basais estejam ativos e que contribuem para a regulação do E_m de repouso e do tónus de repouso do músculo liso vascular de vasos de pequeno calibre, visto que o inibidor específico, bário, provoca vasoconstrição coronária e cerebral (Sobey, 2001).

5.4.2 Canais de potássio dependentes do ATP (K_{ATP})

Os canais de potássio dependentes do ATP (K_{ATP}) foram descritos inicialmente no músculo cardíaco e, posteriormente, nas células do músculo liso em vários leitos vasculares. Estes canais têm um papel fundamental na regulação do E_m de repouso e na manutenção do tónus em determinados leitos vasculares como no caso do coronário. Na



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

maioria das células do músculo liso vascular os canais K_{ATP} estão encerrados em condições fisiológicas ou na ausência de ativadores do canal. Ao contrário dos canais K_{IR} , no músculo liso, que respondem a libertação de K^+ pelas células vizinhas, os canais K_{ATP} respondem a alterações metabólicas da célula assim como aos vasodilatadores endógenos (Sobey, 2001).

Estes canais não são dependentes de voltagem no músculo liso vascular e a sua atividade é inibida pelo ATP e aumentada pelo ADP intracelular. O bloqueio dos canais K_{ATP} demonstrou tanto em estudos *in vivo* como *in vitro* levar à vasoconstrição e à despolarização da membrana no músculo liso vascular. O aumento dos níveis de AMPc nas células do músculo liso, pelos vasodilatadores que ativam o enzima adenil ciclase, causa a estimulação da PKA que ativa os canais K_{ATP} , levando, assim, a hiperpolarização da membrana celular (Sobey, 2001).

6. O metabolismo do ácido araquidónico vascular

As células endoteliais metabolizam o AA pelas vias da cicloxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) e citocromo P450 (CYP). As vias da LOX e CYP produzem metabolitos que causam hiperpolarização, vasodilatação, e contribuem para a regulação do tónus vascular. As ações dos metabolitos da LOX e CYP diferem nas artérias, sendo que enquanto os metabolitos da LOX medeiam respostas dependente do endotélio nas artérias cerebrais e mesentéricas, os metabolitos do CYP funcionam como mediadores endoteliais em artérias coronárias e renais no Homem e em muitas outras espécies.

O AA é o precursor comum das prostaglandinas e é libertado pelos fosfolípidos da membrana celular. No coração, o metabolismo do AA é determinado pelas células do miocárdio, endoteliais e do músculo liso vascular. Nas células do miocárdio o AA está esterificado, na posição sn-2, em plasmalógenos de colina e etanolamina da membrana celular (Jenkins, 2009).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

A fosfolipase A₂ (PLA₂) é uma das principais fosfolipases na síntese de prostanóides que atua nos fosfolípidos membranares, fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC) ou plasmalógenos (Félétou, 2011).

6.1. Os Eicosanóides

Os eicosanóides são uma família de moléculas biológicas que são produzidos em todas as células do organismo. Possuem uma ação local e seu tempo de vida média é curto, entre segundos a poucos minutos (Quintas, Freire, Halpern, 2008). São derivados dos ácidos gordos com 20 átomos de carbono e três, quatro ou cinco insaturações: o Ácido Araquidônico (AA; 20:4 ω 6); Dihomo- γ -linolénico (DGLA; 20:3 ω 6) e ácido eicosapentanóico (EPA; 20:5 ω 3), que se encontram esterificados nos fosfoglicéridos das membranas celulares. Na biossíntese de prostaglandinas, o DGLA é o precursor próximo da série 1, o AA da série 2 e, por fim, o EPA é o substrato para a série 3 (Gomes & Oliveira, 2010).

A biossíntese dos precursores dos eicosanóides, no Homem, é dependente dos ácidos gordos essenciais ω -3 e ω -6, e uma vez que o organismo não consegue sintetiza-los é preciso obtê-los na alimentação. O ácido α -linolénico, um ácido gordo ω -3, é substrato para os eicosanóides ω -3, originando o EPA e, posteriormente, o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6 ω 3). Por outro lado, o ácido linoleico, um ácido gordo ω -6, é utilizado na síntese do DGLA e AA. Os ácidos gordos precursores dos eicosanóides podem ser obtidos diretamente pela dieta. O AA está presente nas carnes e gordura animal ao passo que o EPA encontra-se na gordura de peixes, principalmente no salmão (Gomes & Oliveira, 2010).

6.2. Fosfolipases A₂

Nos mamíferos, a fosfolipase A₂ é uma superfamília de enzimas constituída por quinze grupos e diversos subgrupos, caracterizadas pelas suas capacidades específicas de hidrolisar as ligações éster sn-2 de fosfolípidos. Existem cinco principais tipos de



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

PLA₂: a PLA₂ secretada (sPLA₂), a PLA₂ citosólica (cPLA₂), a PLA₂ cálcio-independente (iPLA₂), o fator de ativação plaquetária acetil-hidrolase e a PLA₂ lisosomal (Félétou, 2011).

Apesar de a sPLA₂, cPLA₂ e iPLA₂ poderem gerar AA, foi mostrado que a cPLA_{2α} era a única enzima PLA₂ com uma seletividade significativa para os fosfolípidos que continham AA. A cPLA₂ catalisa a hidrólise da ligação sn-2 dos glicerofosfolípidos, produzindo AA e lisofosfolípidos (Kudo & Murakami, 2002). Em muitas células e tecidos a cPLA_{2α} é expressa ubíqua e constitutivamente, sendo essencial para a iniciação do metabolismo do AA. A translocação e ativação da enzima é ativada por concentrações submicromolares de cálcio e por fosforilação. No citosol das células do miocárdio, a atividade PLA₂ é principalmente feita pela iPLA₂. Apesar da cPLA_{2α} contribuir pouco para a atividade PLA₂ miocárdial, foi demonstrado que o seu défice leva ao aparecimento de hipertrofia cardíaca em ratos (Félétou, 2011).

No citoplasma, o AA não esterificado é usado como substrato em reações de oxidação, Figura 5. O metabolismo do AA é mediado por três importantes sistemas enzimáticos: as ciclooxigenases, as lipooxigenases e os citocromos P450 monooxigenases (Jenkins, 2009).

6.3.Via da Ciclooxigenase

As prostaglandinas H sintases, ou geralmente chamadas de ciclooxigenases, são as principais enzimas na biossíntese das prostaglandinas. A ciclooxigenase (COX) sendo um enzima bifuncional converte o AA em prostaglandina G₂ (PGG₂) por atividade peroxidativa e, posteriormente, catalisa a redução de PGG₂ em prostaglandina H₂ (PGH₂). Até ao momento duas ciclooxigenases foram caracterizadas (COX-1 e COX-2) e ambas possuem um alto nível de homologia, cerca de 65%. Contudo, a sua atividade e expressão são reguladas diferencialmente. Recentemente, uma variante do gene da COX-1, denominada de COX-3, foi descoberta e os mecanismos de regulação da sua transcrição no coração são semelhantes aos da COX-1 (Félétou, 2011).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controle do tônus vascular

Ambas as COXs são expressas nas células endoteliais e do músculo liso vascular de vasos sanguíneos saudáveis. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, mas nas células endoteliais a sua expressão pode ser aumentada pelo stresse de cisalhamento sobre as células. Por outro lado, a COX-2 é induzida pela inflamação e a sua expressão é aumentada pelas citocinas nas células endoteliais. A expressão da COX-2 é também constitutiva em diversos órgãos e tipos de células, incluindo as células endoteliais onde é regulada positivamente pelo stresse de cisalhamento (Félétou, 2011).

No ser humano, enquanto a COX-2 contribui predominantemente para a produção sistêmica de prostaciclina, a COX-1 endotelial é a maior fonte de prostaglandinas, tanto em vasos sanguíneos saudáveis ou patológicos (Félétou, Michel, 2011).

Contudo, nesta via, os enzimas do citocromo P450 têm um papel importante no metabolismo de tromboxanos e prostaciclina, pelos enzimas tromboxano sintase (CYP5A1) e prostaciclina sintase (CYP8A1), respetivamente (Zordoky & El-Kadi, 2010). As vias COX e LOX têm sido profundamente estudadas e os seus produtos eicosanóides já mostraram ter um papel importante em vários processos biológicos tais como a inflamação, proliferação celular e sinalização intracelular.

6.4.Via da Lipoxigenase

Numa outra via importante, temos as lipoxigenases que metabolizam o AA em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoicos (5-HPETEs) e ácidos dihidroieicosatrienóicos (DHETs), que posteriormente, são convertidos a hidroxieicosatetraenoico (HETEs), leucotrienos ou lipoxinas (Elbekai & El-Kadi, 2006).

As lipoxigenases são uma família de dioxigenases que não contêm ferro seu grupo heme e que catalisam a hidroxidação estereo-específica de ácidos gordos polinsaturados. Atualmente, seis genes funcionais da lipoxigenase foram caracterizados: a 5-lipoxigenase, a 12-lipoxigenase plaquetária, a 12(R)-lipoxigenase, a 15-lipoxigenase tipo I, a 15-lipoxigenase tipo II e a lipoxigenase-3 epidérmica (Félétou, 2011).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

A 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX são as três isoformas mais expressas no endotélio. A 12-LOX e a 15-LOX produzem metabolitos que causam dilatação, enquanto a 5-LOX produz leucotrienos com ação vasoconstritora. Enquanto o 12-(S)-HETE, metabolito da 12-LOX, produz vasodilatação pela ativação dos canais BK_{Ca} , deste modo hiperpolarizando as células do músculo liso vascular, o HEETA e THETA, metabolitos da 15-LOX, abrem os canais SK_{Ca} (Félétou, 2011).



Doenças cardiovasculares:

Metabólitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

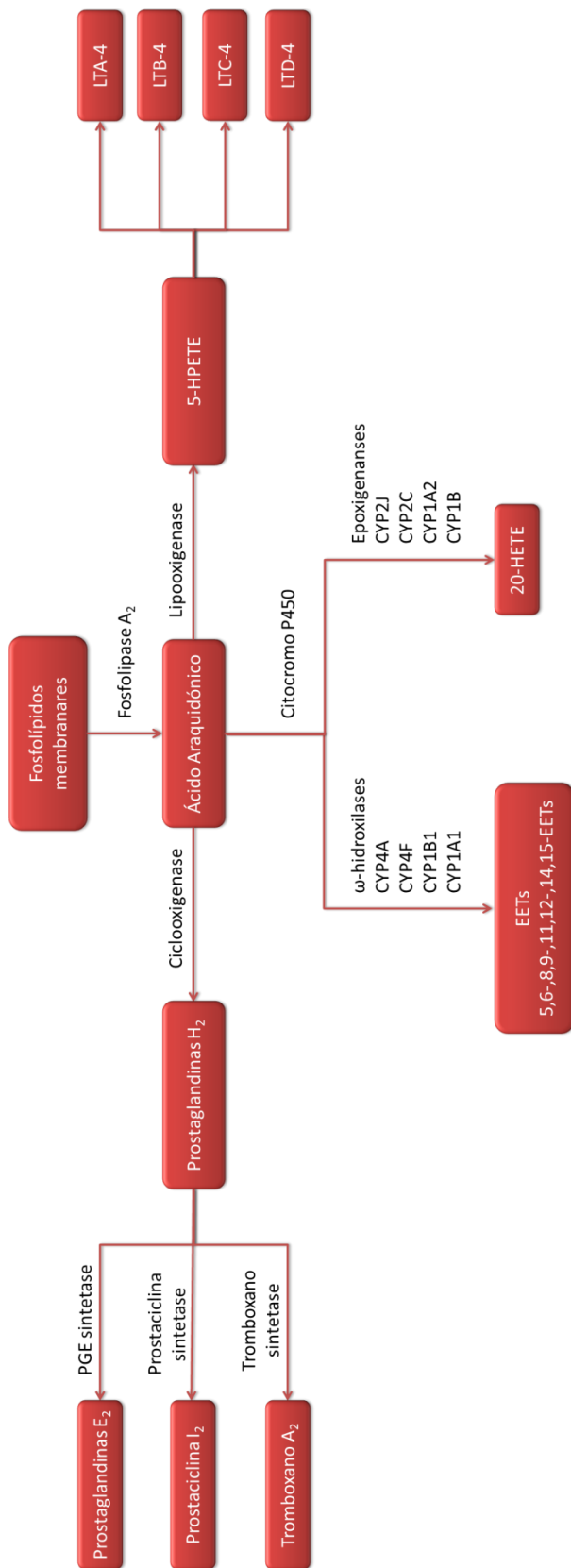


Figura 5. Vias de metabolização do ácido araquidônico



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

6.5. Via dos Citocromos P450 monooxigenases

A terceira via da metabolização do AA, a menos estudada, começou a despertar o seu interesse nos últimos anos. O metabolismo do AA é catalisado pelas famílias CYP no fígado, rim, pulmão, coração e restante sistema cardiovascular. Nesta via, a metabolização do AA pelos enzimas do citocromo P450 produz dois tipos de eicosanóides: os ácidos epoxieicosatrienoico (EET) pelos CYP epoxigenases e os ácidos hidroxieicosatrienoico (HETE) pelos CYP hidroxilases (Roman, 2002). O quadro 2 mostra as várias isoformas CYP envolvidas no metabolismo de EET e HETE.

Quadro 2. Enzimas CYP envolvidos no metabolismo de EETs e HETEs.

Reacção	CYP
Síntese de EETs	CYP1A1, CYP1B1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2B4, CYP2B5, CYP2B6, CYP2B19, CYP2C1, CYP2C2, CYP2C4, CYP2C7, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C11, CYP2C12, CYP2C19, CYP2C23, CYP2C23, CYP2C24, CYP2C29, CYP2C38, CYP2C39, CYP2C40, CYP2D18, CYP2J2, CYP2J3, CYP2J6, CYP2J10, CYP4A2 e CYP4A3
Síntese de HETEs	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, CYP2J3, CYP2J9, CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3, CYP4A4, CYP4A6, CYP4A7, CYP4A8, CYP4A10, CYP4A11, CYP4A12, CYP4F2 e CYP4F12

6.5.1 CYP Epoxigenases

Os enzimas CYP epoxigenases, localizados no reticulo endoplasmático, metabolizam o AA em EETs, adicionando um grupo epóxido nas insaturações do AA, esta reacção leva a formação de quatro regioisómeros EET, 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET, Figura 6 (Spector & Norris, 2007).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

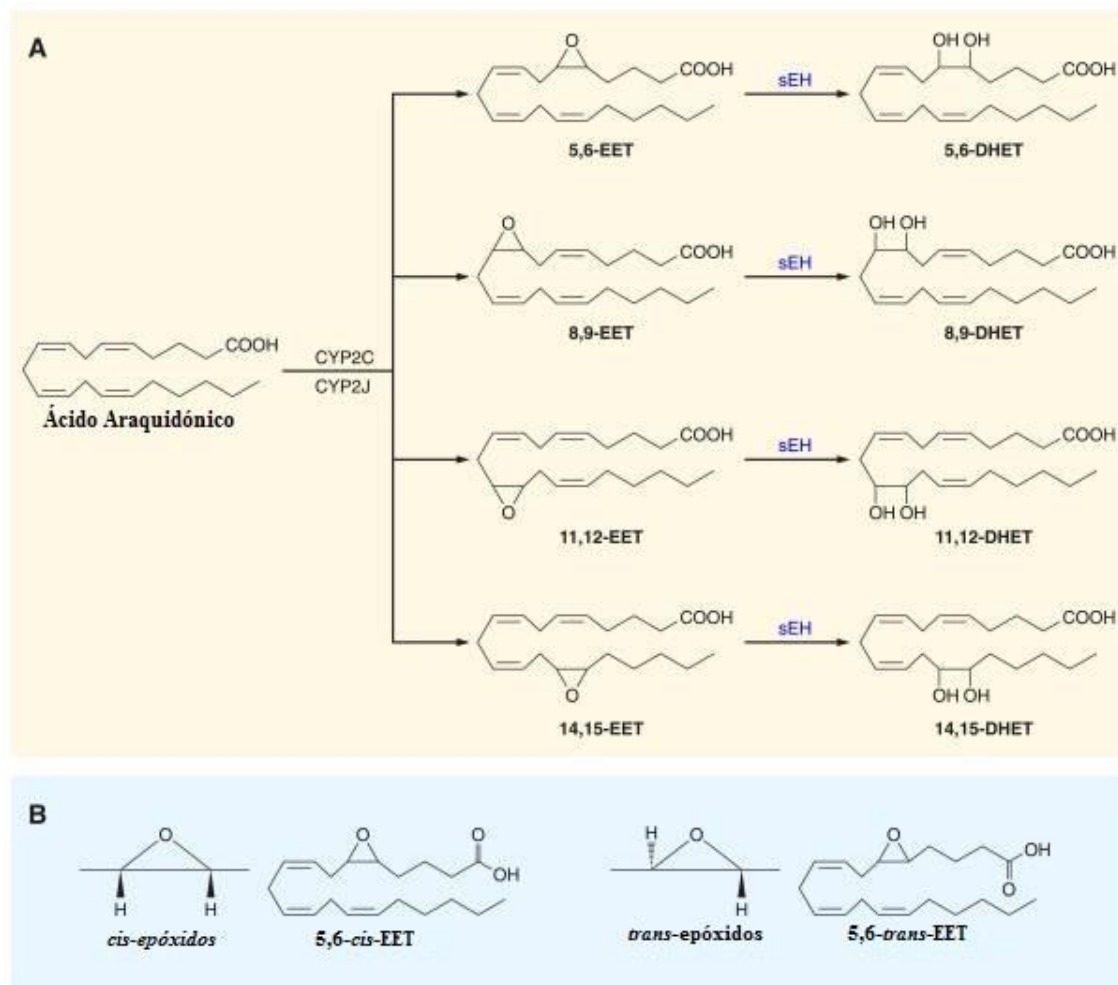


Figura 6. Conversão do AA nos respetivos regioisómeros EET pelos CYP epoxigenases.

Diversos enzimas das famílias CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E e CYP2J mostraram capacidade de metabolizar o AA em EET em vários tecidos e espécies (Roman, 2002). Contudo, só dois CYP epoxigenases foram clonados a partir do endotélio, sendo nas células endoteliais humanas o CYP2C8/9 e CYP2J2. Especificamente, o CYP2C8 produz os 14,15- e 11,12-EET numa razão de 1,25:1. O CYP2C9 produz os 14,15-, 11,12- e 8,9-EET, maioritariamente o 14,15-EET. Contudo, o CYP2J2 produz os 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET com a mesma eficiência (Campbell & Fleming, 2010).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

6.5.2 CYP Hidroxilases

A formação de 20-HETE do metabolismo do AA pelos CYPs é principalmente realizada pelas subfamílias CYP4A e CYP4F (Kroetz & Xu, 2005). Existem quatro isoformas CYP4A (CYP4A1, CYP 4A2, CYP 4A3 e CYP 4A8) e quatro isoformas CYP4F (CYP4F1, CYP 4F4, CYP 4F5 e CYP 4F6) com capacidade de produzir o 20-HETE em vários tecidos de rato. No Homem, as isoformas homólogas que catalisam a formação de 20-HETE são o CYP4A11, CYP4F2 e CYP4F3, sendo as duas primeiras as maioritárias (Williams et al., 2010). Enzimas das subfamílias CYP4A, 4B e 4F catalisam a ω -hidroxilação do AA em 20-HETE, especificamente, o CYP4A6, CYP4A7, CYP4A10 e CYP4A12. CYP4F12 converte o AA em 18-HETE e o CYP4F2 parece ser o principal responsável pela formação de 20-HETE (Powell et al., 1998).

O ácido araquidónico também pode ser metabolizado em 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17- e 18-HETE pelos enzimas CYP. Estes enzimas realizam a adição de um grupo hidroxilo na região subterminal e no grupo bis-álíco do AA (Roman, 2002).

Para além de formar EETs, o CYP2C8 também produz 11-, 13- e 15-HETE, enquanto o CYP2C9 catalisa a formação de 12-, 13-HETE. No Homem, o CYP4F8 e CYP4F12 catalisa a formação de 18-HETE (Bylund J., Bylund M., Oliw, 2001; Bylund J. et al., 2000).

7. Metabolismo dos eicosanóides derivados do CYP

Uma vez formados, os EETs são instáveis devido a seu rápido metabolismo, a Figura 7 mostra o resumo das vias metabólicas a que os EETs estão sujeitos. Contudo, há algumas diferenças quantitativas e qualitativas entre os quatro regioisómeros.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

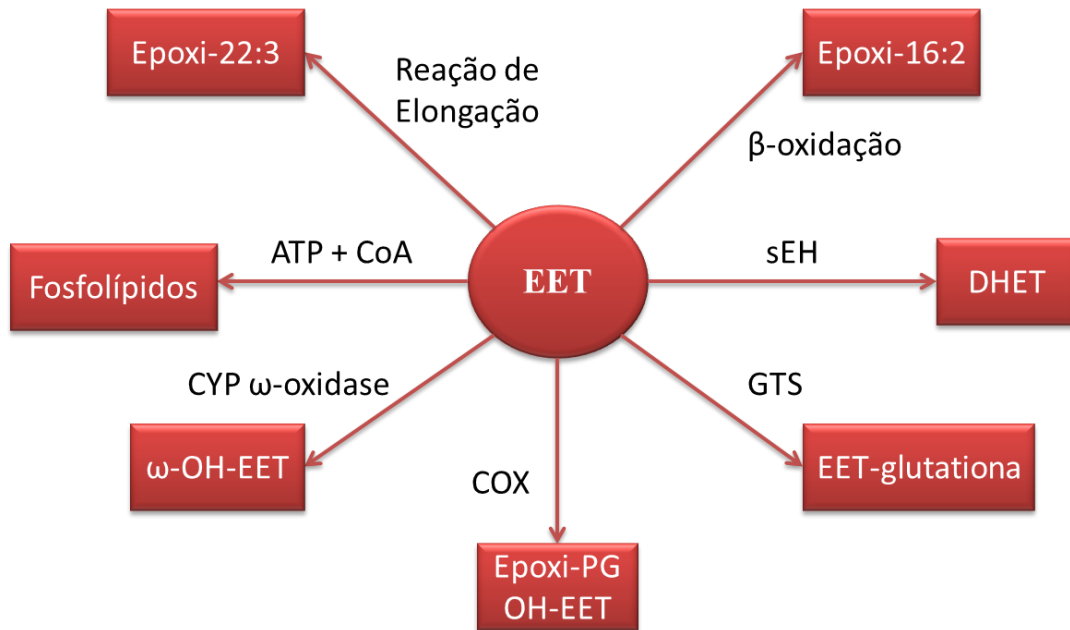


Figura 7. As vias metabólicas dos EETs.

7.1. Incorporação nos fosfolípidos membranares

Após a formação, os EETs e HETEs são rapidamente incorporados nos fosfolípidos membranares, maioritariamente na posição sn-2, em diversos tipos de células, e são hidrolisados dos fosfolípidos pela PLA₂. A incorporação dos EETs nos fosfolípidos ocorre pela ação da acil-Coenzima-A sintase (Karara et al., 1991). Muitos estudos têm mostrado a existência de grandes concentrações de EETs nos fosfolípidos extraídos de plaquetas humanas (Zhu et al., 1995), células do músculo liso vascular, células do endotélio vascular e do coração humano e de rato (Roman, 2002). No coração os cardiomiócitos incorporam grandes quantidades de EETs e DHETs na membrana celular (Wu et al., 1996).

Grande parte dos EETs são incorporados em PC, mas em muitos casos o fosfatidilinositol (PI) contém uma maior percentagem de 14,15-EET do que qualquer outro regioisómero. Estudos com incubação de células endoteliais com 14,15-EET e células do músculo liso com 11,12-EET mostraram que depois dos EETs serem inicialmente acumulados nos fosfolípidos membranares, eles são continua e



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

progressivamente hidrolisados e libertados para o fluido extracelular em forma de DHETs (Spector & Norris, 2007).

As ações dos EETs podem ser reguladas pela localização dos EETs nas membranas celulares e ligações a proteínas. A incorporação dos EETs nos fosfolípidos das membranas celulares contribui para os seus níveis no plasma e tecidos. Um facto interessante é que muitos dos fosfolípidos que contêm EETs no plasma estão presentes nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Spector & Norris, 2007).

7.2. Metabolismo pela sEH

A principal via catabólica é a metabolização dos EETs pela epóxido hidrólase solúvel (sEH) em ácidos dihidroeuicosatrienóicos (DHETs) que têm uma atividade biológica inferior aos EETs (Imig et al., 1996; Yu et al., 2000). Contudo, em alguns estudos, os EETs e DHETs são equipotentes nas artérias coronárias (Oltmanet al., 1998). Dos quatro regioisómeros, os 8,9-, 11,12- e 14,15-EET são melhores substratos para a sEH, enquanto o 5,6-EET é usado com pouca eficiência pelo enzima, Figura 5.

7.3. Reações de β -oxidação e de alongação

Por outro lado, a metabolização de 11,12-EET ou 14, 15-EET por β -oxidação, dá origem a metabolitos de 16 carbonos, ou por reações de alongação, a metabolitos de 22 carbonos, que são posteriormente incorporados nos fosfolípidos (Fang et al., 1996). A respeito dos HETEs, estes podem ser rapidamente metabolizados por β -oxidação. Contudo, estas vias só são importantes em células onde a atividade da sEH é baixa ou está inibida (Fang et al., 2001).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

7.4. Outras vias metabólicas secundárias

Adicionalmente, os EETs e 20-HETE podem ser posteriormente metabolizados pelos enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase e CYP. Por exemplo, 5,6- e 8,9-EETs, 20-HETEs, e HETEs subterminais (16-, 17-, 18 e 19-HETE) são bons substratos da ciclooxigenase. O 5,6-EET é convertido num análogo PG, o 5,6epoxi-PGE₁, e o 8,9-EET é convertido em 11,12-hidroxi-8,9-EET. Estas vias metabólicas têm como função regular a atividade dos EETs nos seus tecidos (Homma et al., 1993; Roman, 2002). No que diz respeito ao 20-HETE, este pode ser metabolizado pela enzima COX para formar endoperóxidos vasoconstritores ou prostanóides vasodilatadores (Williams et al., 2010).

Os CYP ω -oxidases têm a capacidade de adicionar um grupo metilo no hidroxilo terminal de 8,9-EET, 11,12-EET e 14,15-EET. Os EETs podem também sofrer reações de conjugação com glutationa pela glutationa-S-transferase (GST), preferencialmente para o 14, 15-EET (Spearman et al., 1985).

8. Os Citocromos P450

Os citocromos P450 são uma superfamília de hemo-proteínas que medeiam o metabolismo oxidativo, peroxidativo e redutor de compostos exógenos e endógenos tais como os poluentes ambientais, pesticidas, esteroides, prostaglandinas e ácidos gordos (Guengerich, 2001).

Atualmente, no genoma humano, são conhecidas 18 famílias e 43 subfamílias CYP contendo 57 genes ativos e 58 pseudogenes, com os membros das famílias 1, 2, 3 e 4 a terem um papel importante no metabolismo de diversos compostos (Quintas, Freire, Halpern, 2008; Zhou, Liu, Chowbay, 2009). Os enzimas do citocromo P450 estão classificados em famílias, subfamílias e isoenzimas individuais baseadas na homologia da sua sequência de aminoácidos (Danielson, 2002).

A maior parte dos enzimas CYP são principalmente expressos no fígado, contudo diversos enzimas CYP foram detetados no sistema cardiovascular, sendo as famílias CYP2C, 2J e 4A as mais estudadas ao nível das suas ações cardiovasculares.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

9. Expressão dos Citocromos P450 no tecido cardiovascular

A expressão e regulação dos enzimas CYP no coração e vasos sanguíneos está amplamente documentada. O Quadro 3 mostra a expressão de várias famílias CYP, que inclui CYP1, CYP2, CYP3 e CYP4.

Quadro 3. Expressão de CYPs no sistema cardiovascular.

CYP	Nível	Tecido	Espécies
CYP1A1	ARNm, proteína e atividade	Coração, células endoteliais, células do músculo liso vascular	Homem, murganho e rato
CYP1A2	Proteína	Células endoteliais	Homem
CYP1B1	ARNm e proteína	Coração, veias e células do músculo liso	Homem, murganho e rato
CYP2B6/7	ARNm	Coração	Homem e rato
CYP2C8/9/11	ARNm e atividade	Células endoteliais e coração	Homem e murganho
CYP2D6	ARNm	Coração	Homem
CYP2E1	ARNm e proteína	Endocárdio e vasos coronários	Homem e rato
CYP2J2	ARNm, proteína e atividade	Células endoteliais e miócitos	Homem e rato
CYP3A4	Proteína	Endotélio, endocárdio e vasos coronários	Homem
CYP4A11	ARNm	Coração	Homem
CYP4B1	ARNm	Coração	Homem
CYP4F3	ARNm	Leucócitos Polimorfonucleares	Homem, murganho e rato
CYP4F12	ARNm	Coração	Homem



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

9.1.Família CYP1

A expressão da família CYP1 no Homem e em animais é bem conhecida. No sistema cardiovascular, a sua expressão encontra-se maior nas células endoteliais das artérias, capilares e veias, e nas paredes do septo alveolar. No fígado, a expressão é encontrada nas células endoteliais da veia porta (Granberg, Brunstrom, Brandt, 2000).

A expressão do CYP1A1 não é constitutiva no sistema cardiovascular, embora possa ser induzida em certas condições (Kerzee & Ramos, 2001). Por exemplo, o CYP1A1 foi detetado em células do músculo liso da artéria coronária humana tratadas com 3-metilcolantreno (Dubey et al., 2004). Thum & Borlak detetaram o ARNm do CYP1A1 no ventrículo direito, aorta ascendente e na aurícula esquerda em doentes com cardiomiopatia dilatada e no ventrículo esquerdo em indivíduos saudáveis (Thum & Borlak, 2000, 2002). Recentemente, foi detetado a presença de ARNm do CYP1A1 nos tecidos do ventrículo esquerdo em corações humanos (Michaud et al., 2010). No caso do CYP1A2 a sua presença no tecido cardiovascular é incerta. Thum & Borlak não detetaram, contudo, noutro estudo, o CYP1A2 foi detetado no endotélio do endocárdio e veias coronárias (Minamiyama et al., 1999; Thum & Borlak, 2000, 2002).

A expressão do CYP1B1, em contraste com a expressão do CYP1A1, é constitutiva e indutível nas células do músculo liso vascular (Kerzee & Ramos, 2001). Um estudo relatou que o *CYP1B1* é o segundo gene *CYP* mais expresso no coração humano (Bieche et al., 2007). No Homem, o ARNm do CYP1B1 é expresso nas veias (Bertrand-Thiebault et al., 2004) e nas células do músculo liso da artéria coronária humana tratadas com 3-metilcolantreno (Dubey et al., 2004). No rato, o enzima CYP1B1 foi detetado nas células endoteliais e nas células do músculo liso da aorta (Moorthy et al., 2003).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

9.2.Família CYP2

No caso da família CYP2, a sua expressão no tecido cardiovascular inclui as subfamílias CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E e CYP2J (Thum & Borlak, 2000). Vários estudos indicam a expressão das subfamílias CYP2C e CYP2J em células epiteliais, endoteliais, músculo liso, cardiomiócitos, vasos sanguíneos, rim, pulmão e pâncreas. O CYP2C8 é expresso principalmente no endotélio, o CYP2C9 no rim e o CYP2J2 no endotélio e miocardiócitos (Xu, Zhang, Wang, 2011).

A expressão no ventrículo direito de ARNm do CYP2B6/7 e CYP2D6 foi encontrada em doentes com cardiomiopatia dilatada (Thum & Borlak, 2000). No que diz respeito à expressão do CYP2E1, Thum & Borlak verificaram-na em ambos os ventrículos e aurículas, septo interventricular e aorta (Thum & Borlak, 2000). Em amostras de autópsia humana, o CYP2E1 foi encontrado no endocárdio e coronárias. Contudo, não foi observada a presença do CYP2C9 e CYP2D6 (Minamiyama et al., 1999). É reportado que o CYP2B6/7, CYP2D6 e CYP2C8/19 são expressos predominantemente no ventrículo direito (Thum & Borlak, 2000).

Um outro CYP desta família tem sido reportado no tecido cardiovascular de humanos e animais, o CYP2J. No coração humano, a expressão do CYP2J2 é alta e constitutiva (Thum T, Borlak J., 2002). Um estudo recente relata que as concentrações de ARNm do CYP2J2 no coração são 900 vezes maior do que as do CYP2C8 e CYP2C9 (Delozier et al., 2007). Além disto, o ARNm do CYP2J2 é o mais abundante nos ventrículos direito e esquerdo de coração humano, e a sua expressão é maior no sexo feminino quando comparado com o sexo masculino (Michaud et al., 2010).

9.3.Família CYP3

Poucos estudos relatam a expressão da família CYP3 no tecido cardiovascular. Os CYP3A4, CYP3A5 e CYP3A7 não foram encontrados no tecido do coração em doentes com cardiomiopatia dilatada (Thum & Borlak, 2000). Porém, um estudo relata a expressão do CYP3A4 em células endoteliais do endocárdio e vasos coronários



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

humanos (Minamiyama et al., 1999). Contudo o estudo com vista à análise da expressão desta família no tecido cardiovascular precisa ser aprofundado.

9.4.Família CYP4

Ao contrário do que se observa com a família CYP3, muitos estudos têm mostrado que a família CYP4 é altamente expressa no tecido cardiovascular humano e de outros animais. No que se refere ao coração, tanto no cão como no humano o CYP4A foi detetado. No cão, a atividade dos CYP4A1, CYP4A2 e CYP4F foi detetada, já no humano o mRNA CYP4F12 foi detetado (Bylund J., Bylund M., Oliw, 2001; Nithipatikom et al., 2004). A família CYP4A tem sido encontrada em artérias pulmonares de coelhos, na vasculatura de ratazanas e microvasos cerebrais de gato (Harder et al., 1994; Zhu et al., 2000; Kunert et al., 2001). A expressão do mRNA e da proteína do CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3 e CYP4A8 tem sido reportada em células do músculo liso vascular renal, cerebral, pulmonar e do músculo esquelético de arteríolas (Gebremedhin et al., 2000; Kunert et al., 2001; Roman, 2002).

No Homem, dois membros da subfamília CYP4A foram encontrados no rim, CYP4A11 e CYP4A22. O enzima CYP4A11 converte principalmente o AA em 20-HETE no rim, ao passo que, o CYP4A22 foi detetado ao nível do ARNm, mas aparentemente codifica uma proteína não funcional (Gainer et al., 2005). No que diz respeito ao *CYP4F2*, a sua expressão no tecido cardiovascular é pouco conhecida, mas parece ser principalmente expresso no rim humano (Zordoky & El-Kadi, 2010).

9.5.Regulação dos enzimas CYP450

9.5.1 Regulação da atividade

Os gases endógenos vasodilatadores óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) inibem a formação de EETs e 20-HETE pela ligação ao grupo heme dos enzimas CYP, inativando-os. Níveis baixos de NO também inibem a formação de EETs e



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

DHETs (Roman, 2002). Um estudo mostrou que o NO atenua a relaxação pelo EDHF dependente da atividade CYP em artérias coronárias em suínos. Facto interessante, é que a resposta mediada pelo EDHF é detetada quando a NOS e a ciclooxigenase estão inibidas, sugerindo que a ação EDHF pelos EETs atua como um mecanismo vasodilatador compensatório em situações onde a ação vasodilatadora do NO está comprometida. Por exemplo, em situações onde a biodisponibilidade de NO esteja reduzida no endotélio devido a uma disfunção, como por exemplo na hipertensão essencial, espera-se que a inibição intrínseca da atividade CYP/EDHF seja aliviada em resposta (Bauersachs et al., 1996).

9.5.2 Regulação da expressão

A expressão dos enzimas CYP que metabolizam o AA é influenciada por diversos fatores. No rato, a expressão do CYP4A1 e de CYP4A3 ao nível do ARNm e proteína é alta no rim de neonatais e esse valor diminui na idade adulta. O contrário acontece com o CYP4A2, onde a proteína não é expressa no rim de neonatais mas os seus valores aumentam com a idade (Omata et al., 1992). A regulação positiva da expressão do CYP4A1, que é a isoforma que mais contribui para a formação de 20-HETE, deve contribuir para o crescimento pós-natal e desenvolvimento do rim, devido à sua potente ação mitogénica (Roman, 2002).

A expressão destes enzimas pode ser alterada por substâncias endógenas. A angiotensina II aumenta a formação de EETs no tubo proximal. Por outro lado, a formação do 20-HETE é aumentada pelo fator de crescimento epidérmico, dopamina e hormona paratiroide (Roman, 2002). Os vasoconstritores como a angiotensina II, vasopressina e norepinefrina ativam as fosfolipases nas células do músculo liso vascular, aumentando a libertação de AA e consequentemente a formação de 20-HETE (Capdevila & Falck, 2002; Roman, 2002). Os glucocorticoides, mineralocorticoides e progesterona aumentam a expressão da proteína CYP4A no rim. Estudos mostraram que o óxido nítrico (NO) aumenta a expressão de CYP4A apesar de inibir a formação de EETs e 20-HETE. Contudo, o NO regula negativamente a formação das isoformas CYP2C que produzem EETs (Roman, 2002).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

Os androgénios aumentam a expressão do CYP4A e a formação de 20-HETE, sugerindo que esta seja o principal mediador da ativação endotelial induzida por androgénios, resistência vascular e hipertensão. Pensa-se que esta ação seja devida à ativação do NF- κ B, uma via pro-inflamatória. Este aumento da expressão do CYP4A pode explicar a diferença entre sexos na regulação da pressão arterial e o aumento de prevalência de hipertensão nos homens (Wu & Schwartzman, 2011).

O sal também mostrou alterar a expressão génica de CYPs. Em ratos submetidos a uma dieta rica em sal, a expressão dos CYP4A diminuiu na vasculatura e rim. Contudo, a expressão do CYP2C23 aumentou e conseqüentemente a formação de EETs. Devido a isto e ao facto dos EETs inibirem o transporte de sódio no tubo proximal e nos ductos coletores, pensa-se que a regulação positiva da atividade CYP tenha um papel importante no desenvolvimento da hipertensão sensível ao sal (Roman, 2002).

10. Ação biológica dos metabolitos do citocromo P450 do AA

10.1. Os EETs

Os EETs são produzidos no endotélio pelos CYP epoxigenases 2C ou 2J e atuam no relaxamento de vários vasos sanguíneos graças ao seu papel na hiperpolarização derivada do endotélio. Os EETs são libertados pelas células endoteliais em resposta a agonistas de receptores, tais como a acetilcolina ou bradicinina para realizarem funções autócrinas e parácrinas que regulam o sistema cardiovascular e renal (Gauthier et al., 2005).

10.2. Função dos EETs

O mecanismo de ação dos EETs pode variar. Em algumas artérias, os EETs são libertados pelas células endoteliais e são transferidos para o músculo liso vascular onde causam a ativação dos canais de potássio, hiperpolarização e relaxação através do



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

mecanismo de ligação a proteína G ou ativação do canal recetor de potencial transitório (TRP). Em outras artérias, os EETs ativam os TRP no endotélio causando hiperpolarização endotelial que é transferida para as células do músculo liso pelas junções comunicantes ou pela ação dos iões potássio. Em algumas artérias os mecanismos são usados em combinação. Os EETs são EDHF que medeiam uma porção do relaxamento da acetilcolina, bradicinina e stresse de cisalhamento, uma vez que, este relaxamento é inibido por bloqueadores de potássio e inibidores do citocromo P450.

Os EETs sintetizados no endotélio, que vão hiperpolarizar o músculo liso vascular, atuam como fatores parácrinos. As células endoteliais libertam os EETs que, por sua vez, vão atuar nas células do músculo liso provocando a abertura dos canais de BK_{Ca} e, conseqüentemente, a hiperpolarização das células do músculo liso e o relaxamento. Visto assim, os EETs aparentam atuar como EDHF. As células musculares lisas não sintetizam EETs (Campbell et al., 2006). Por outro lado, o efeito autócrino acontece pela síntese de EETs endoteliais ou pela sua libertação da membrana fosfolipídica pela ação da fosfolipase A_2 , interagindo diretamente com canais iónicos e ativando componentes de sinalização transducional ou fatores de transcrição (Spector, 2009).

10.3. Os EETs como fator hiperpolarizante dependente do endotélio

As suas propriedades vasodilatadoras têm vindo a ser explicadas pela sua ação como fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF) que contribui para a resposta vasodilatadora da acetilcolina e bradicinina, regulando o tónus vascular. Muitos estudos usando artérias de uma variedade de espécies incluindo o Homem indicam que os EETs agem como EDHFs. A atividade EDHF é definida pela relaxação dependente do endotélio nas artérias tratadas com inibidores da COX e NOS e da hiperpolarização dependente do endotélio das células do músculo liso. A hiperpolarização dependente do endotélio e a relaxação produzidas pela ação da bradicinina, acetilcolina e stresse de cisalhamento ocorrem mesmo na presença de inibidores da COX e NOS. A hiperpolarização e o relaxamento são inibidos por bloqueadores dos canais de cálcio. (Campbell & Fleming, 2010)



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

Até ao momento, duas interpretações mecanísticas favorecem a ideia de que os EETs atuam como EDHFs. Muitos estudos foram realizados para verificar a ação dos EETs como um fator libertado pelas células endoteliais que atua nas células musculares lisas, Figura 8, ou com efeitos autócrinos nas células endoteliais, aumentando a concentração intercelular de cálcio e ativando os canais K_{Ca} , levando a hiperpolarização das células endoteliais, Figura 9 (Popp et al., 1996; Gebremedhin et al., 1998).

10.4. Mecanismo da transferência de um fator

Num estudo usando artérias coronárias bovinas como doadora do EDHF, tratadas com inibidores da COX e NOS, e os canais de potássio dependentes de cálcio K_{Ca} das células muscular lisa como detetor do EDHF, verificaram que a adição de bradicinina na artéria provoca um aumento da atividade dos canais K_{Ca} e hiperpolarização das células musculares lisas. Contudo, a adição de inibidores de enzimas CYP à artéria bloqueiam o efeito da bradicinina, o mesmo acontece em artérias sem endotélio inteiro. Os efeitos da bradicinina na artéria são simulados pela adição de EETs nas células musculares lisas. Conclui-se que a bradicinina está presente na libertação de um EDHF na artéria e que ele é bloqueado pelos inibidores de enzimas CYP, o que implica a atividade EETs neste processo (Gebremedhin et al., 1998). Noutro estudo, usando artérias coronárias de porco e células endoteliais coronárias, os autores obtiveram resultados semelhantes. A hiperpolarização das células musculares lisas pela bradicinina é bloqueada por inibidores de enzimas CYP e a atividade EDHF, induzida pela bradicinina, aumenta com β -naftoflavona, um indutor CYP, o que permitiu concluir que a bradicinina provoca a libertação de um EDHF dependente da atividade CYP endotelial (Popp et al., 1996). Contudo, estes estudos não conseguiram identificar se o fator era um EET ou se o EET é responsável pela libertação desse fator no endotélio.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

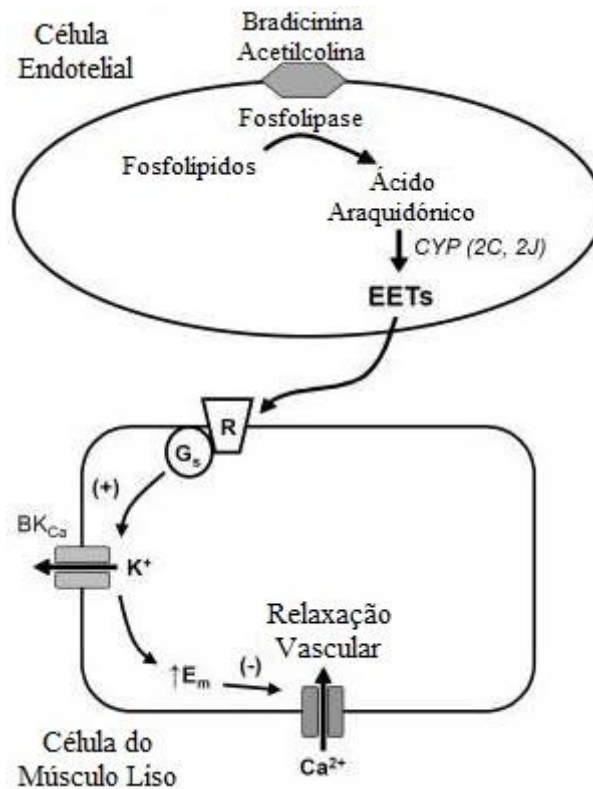


Figura 8. Proposta de mecanismo para a transferência de EETs.

Posto isto, pode-se concluir que os inibidores dos enzimas CYP monooxigenases conseguem inibir a resposta vasodilatadora dependente do endotélio pela ação da acetilcolina e bradicinina que persiste após a inibição da NOS e ciclooxigenase. Contudo, não se pode concluir que a inibição da resposta EDHF dependa da libertação de EETs pelo endotélio. De facto, os inibidores de CYPs, como clotrimazol e miconazol, não são específicos e podem interagir com os canais de potássio (Edwards et al., 1996). Porém, o uso de oligonucleótidos antisense para o CYP2C8/9 mostrou capacidade de diminuir a hiperpolarização dependente do endotélio e relaxamento em artérias coronárias de suínos (Fisslthaler et al., 1999; Fisslthaler, Fleming, Busse, 2000) e em artérias de hamster (Bolz et al., 2000).

Noutro estudo, em artérias coronárias bovinas, usando um antagonista que bloqueia a ação dos EETs no endotélio, 14,15-EEZEE, a bradicinina provocou a dilatação da artéria. O que indica que os EETs não atuam no endotélio. A adição de 14, 15-EET no endotélio não dilatou a artéria, mostrando que o EET não é responsável pela libertação de qualquer fator dilatador por parte do endotélio. Contudo, a adição de 14, 15-EEZE no



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

músculo liso leva a que a artéria não se dilata pela ação da bradicinina. Isto indica que, pelo menos nesta artéria, os EETs agem como EDHF que se transferem do endotélio e atuam nas células do músculo liso, onde causam hiperpolarização e relaxamento. É interessante notar que os níveis de 14, 15-EET e 12, 12-EET são aumentados pela bradicinina na artéria (Gauthier et al., 2005). Os 5, 6-EET e 14, 15-EET mostraram capacidade de relaxar as células do músculo liso pela ativação dos canais K_{Ca} (Gauthier et al., 2003).

10.5. Mecanismo de transferência da hiperpolarização

Os canais recetores de potencial transitório (TRP) no endotélio são alvos da ação dos EETs. Os EETs ativam os TRPV4 que, por sua vez, vão ativar os canais de potássio endoteliais, aumentando o influxo de Ca^{2+} , provocando a sua hiperpolarização e consequentemente o relaxamento do músculo liso vascular, Figura 9 (Fleming et al., 2007). Os 5,5-EET e 8,9 EET ativam os canais TRPV4 Ca^{2+} endoteliais (Vriens et al., 2005).

Os EETs hiperpolarizam as células endoteliais contribuindo para a libertação dos iões de potássio. Os iões de potássio vão ativar a Na-K ATPase na célula muscular lisa, hiperpolarizando a membrana. A hiperpolarização vai inibir a ativação dos canais de cálcio sensíveis a voltagem reduzindo a entrada de cálcio, proporcionando o relaxamento das células do músculo liso vascular. Contudo, a hiperpolarização do endotélio pelos EETs pode levar a hiperpolarização da célula muscular lisa pelas junções comunicantes mio-endoteliais (Campbell & Falck, 2007; Campbell & Fleming, 2010).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

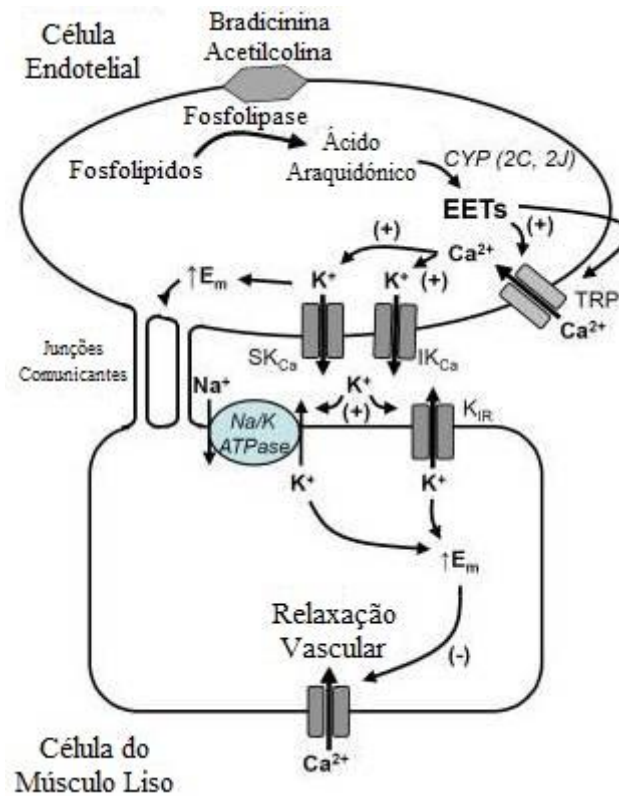


Figura 9. Proposta de mecanismo de transferência da hiperpolarização pelos EETs.

Em suma, os estudos disponíveis mostram que os EETs derivados do endotélio agem como EDHF em algumas artérias. Contudo, em certas artérias humanas ou de animais, os EETs não são sintetizados ou não têm atividade. Nessas artérias, outros mediadores como os iões potássio, o peróxido de hidrogénio, o peptído natriurético tipo C e metabolitos da LOX do AA estão envolvidos na resposta ao EDHF. Os EETs não são, assim, mediadores universais da resposta EDHF em todos os domínios vasculares, o que está de acordo com a expressão heterogénea relativa dos enzimas CYP2C e CYP2J no endotélio vascular (Campbell & Fleming, 2010).

10.6. Mecanismos celulares e moleculares da ação dos EETs

Os EETs exercem diversos efeitos sobre o tónus vascular, hemostasia e inflamação. As ações dos EETs são baseadas em estudos usando misturas racémicas. Dependendo



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

da concentração os EETs vão ter uma ação particular, ou seja, enquanto algumas ações ocorrem em baixas concentrações fisiológicas, outras ocorrem em concentrações maiores. É interessante notar que a hiperpolarização e relaxação das células do músculo liso ocorrem em baixas concentrações (Campbell & Fleming, 2010).

10.6.1 Os EETs como ligandos do recetor acoplado à proteína G

Estudos mostraram que o 14,15-EET liga-se a recetores que estão acoplados à proteína G levando a uma cascata de sinalização intracelular. A ativação dos canais BK_{Ca} pelos EETs parece não ocorrer pela ligação direta com um domínio extracelular, mas estudos mostram que a ativação dos canais de BK_{Ca} das células do músculo liso pelos EETs e EDHF necessitam da presença da proteína G. Isto porque, o 11,12-EET ativa os canais de BK_{Ca} em *cell-attached patches* de células do músculo liso de artérias coronárias bovinas, mas não têm efeito em *inside-out patches*, indicando que um componente citosólico ou via de sinalização celular que não esta presente em *inside-out patches* é necessário para a atividade dos EETs (Campbell & Fleming, 2010).

Contudo, a adição de GTP à superfície citoplasmática dos *inside-out patches* leva a ativação dos canais BK_{Ca} pelo 11,12-EET, e esta ação é inibida pelo inibidor da proteína G, GDPβS, e por um anticorpo anti-Gαs. Isto leva a que a ação do 11,12-EET na ativação dos canais BK_{Ca} seja mediada pelo mecanismo Gαs. Estudos em células endoteliais mostraram que o 11,12-EET aumenta o acoplamento do $GTP\gamma^{35}S$ ao Gαs. Outros regioisómeros dos EETs também levam ao acoplamento mas com menos atividade em relação ao 11,12-EET (Campbell & Fleming, 2010).

Estudos em artérias coronárias bovinas indicam que o 11,12-EET estimula a ADP-ribosilação da proteína G. Inibidores da ADP-ribosilação bloqueiam a capacidade do 11,12-EET de ativar os canais BK_{Ca} e causar relaxação. A ativação pelos EETs dos canais BK_{Ca} em *inside-out patches* é rapidamente revertida após remoção dos EETs enquanto em *cell-attached patches* a reversão é lenta. Sabendo que, nas células do músculo liso e endoteliais, os EETs aumentam a acumulação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), isto pode contribuir para o prolongamento da ação dos EET, uma vez que é consistente com o envolvimento do Gαs na ação dos EET. Muitos estudos



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

indicam que a ativação pelos EETs dos canais BK_{Ca} permite que os iões potássio saiam da célula muscular lisa e que o gradiente eletroquímico criado resulte na hiperpolarização da membrana e relaxamento. Assim sendo, a resposta estimulada pelos EETs sugere que a ligação a um local de ligação específico é necessária. Há uma vasta evidência sugerindo um local de ligação ou recetor para os EETs nas células do músculo liso, e que a sua atividade inicia-se pela interação com uma proteína na superfície celular. Esta ligação é inibida pelo $GTP\gamma S$ indicando que o local de ligação ou recetor está acoplado a proteína G. Contudo, vários recetores foram estudados para avaliar a afinidade com os EETs mas, até ao momento, nenhum recetor EET foi identificado (Campbell & Fleming, 2010).

10.6.2 Ação dos EETs sobre os canais de recetores de potencial transitório (TRP)

Os canais recetores de potencial transitório funcionam como canais catiónicos não seletivos. Estes canais podem mediar o influxo de cálcio em células endoteliais e do músculo liso nas quais estão presentes vários tipos de canais. O mecanismo de ação dos EETs envolve duas classes de canais de TRP. O canal TRP vanilóide do tipo 4 (TRPV4) pode ser ativado pelo 5,6-EET e 8,9-EET, este último com menor potência, Figura 10 (Watanabe et al., 2003).

Em células endoteliais de ratinho o 11,12- e 14,14-EET não afetam o influxo de cálcio através dos canais TRPV4, mas em células do músculo liso de artérias cerebrais de rato, 11,12-EET e um agonista do TRPV4 aumentam a corrente do TRPV4. O 11,12-EET provoca a libertação espontânea de cálcio do retículo sarcoplasmático (Ca^{2+} sparks) que ativa os canais de K_{Ca} promovendo uma corrente transitória de potássio para o exterior que hiperpolariza a membrana, Figura 10 (Campbell & Fleming, 2010). A indução por parte do 11,12-EET é inibida pela supressão da expressão TRPV4 com um oligonucleótido antisense. Isto permite concluir que os canais TRPV4 formam um complexo com os canais de BK_{Ca} que é ativado pelo 11,12-EET resultando na hiperpolarização da membrana e relaxação. Devido ao facto dos efeitos serem



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

específicos dos EETs, pensa-se que o canal TRPV4 seja um recetor extracelular dos EETs (Campbell & Fleming, 2010).

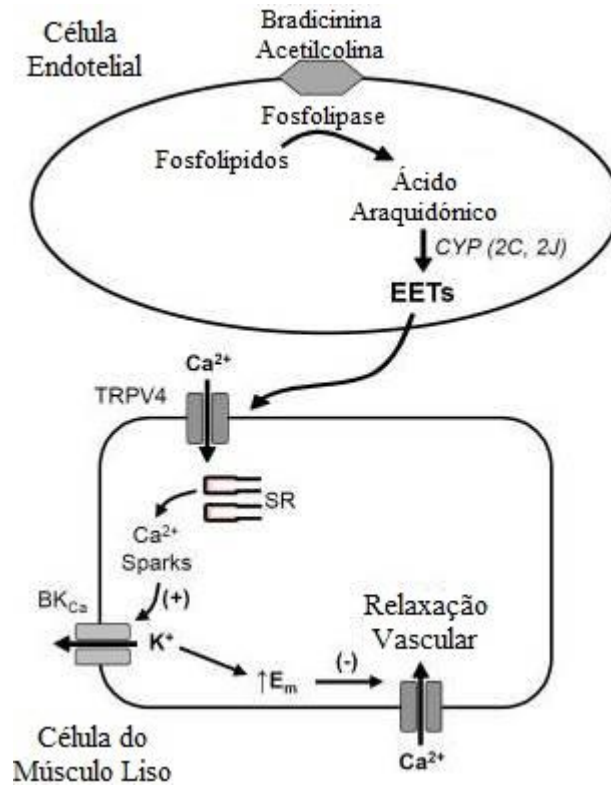


Figura 10. Proposta de mecanismo de ação dos EETs sobre os canais TRPV4 nas células do músculo liso.

Os canais TRPV4 também são expressos em células endoteliais humanas e de rato e são ativados pelo 5,6- e 8,9-EET levando ao aumento do cálcio intracelular. A inibição do CYP2C9 com sulfafenazol bloqueia esse efeito, enquanto que após o aumento da expressão do CYP2C9 com nifedipina o efeito é exacerbado. Isto indica que o metabolito do CYP2C9 é responsável pela ativação do canal TRPV4 e aumento do cálcio intracelular nas células endoteliais. A hiperpolarização e dilatação pela acetilcolina sofrem uma redução de 75% em artérias mesentéricas de ratinho com o TRPV4 comprometido. A dilatação induzida pelo stresse de cisalhamento e o fluxo sanguíneo está também relacionado com a libertação espontânea de cálcio (Earley et al., 2009). A dilatação não dependente do NO e PG em artérias carótidas de murganhos requer uma atividade CYP epoxigenase, pois a sua dilatação falha em artérias com o



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

TRPV4 comprometido, e a sua ativação necessita da translocação do canal para a membrana (Loot et al., 2008). É interessante notar que em murganhos sem os canais TRPV4 a pressão sanguínea é alta, o que aparenta fazer do TRPV4 uma importante regulador da dilatação induzida pelo fluxo sanguíneo (Earley et al., 2009).

Contudo, em vasos estimulados pela bradicinina a dilatação, mediada pelo EDHF, é muito diferente. Nas células endoteliais humanas, a bradicinina aumenta a atividade CYP e o influxo de cálcio, que por sua vez, é bloqueado por inibidores dos CYPs e antagonistas dos EETs e é exacerbado por inibidores da sEH, um inativador EET. Nas células endoteliais, os canais TRP envolvidos na resposta à bradicinina são os canais TRPC3 e TRPC6. A bradicinina ativa os canais TRP que são transferidos para uma *caveola* onde modulam o influxo de cálcio pela ação do 11,12-EET (Fleming et al., 2007).

A resposta à hiperpolarização e dilatação pelo 11,12-EET é reduzida para metade quando é removido o endotélio em artérias de murganho *wild-type* (de referência). Posto isto, ambos os canais TRPV4 das células do músculo liso e endoteliais são importantes na vasodilatação das artérias mesentéricas em resposta a fatores derivados do endotélio (Earley et al., 2009).

10.6.3 Efeito dos EETs sobre os canais TRP e recetor acoplado a proteína G

Apesar do mecanismo pelo qual os EETs ativam os canais TRP não estar totalmente esclarecido. Contudo, como antes mencionado, os EETs promovem a translocação intracelular dos canais TRP para a membrana celular (*caveola*). A translocação dos canais TRP é dependente da ativação da proteína cinase A (PKA) pelo AMPc, o que é consistente com a ativação do recetor acoplado a *Gas*. O bloqueio da ação do AMPc inibe a translocação do canal TRP e inibe a indução pela bradicinina, o aumento intracelular de cálcio dependente do CYP e da hiperpolarização nas células endoteliais (Fleming et al., 2007). A ação do 11,12-EET tem sido ligada à estimulação da atividade *Gas*/adenilato ciclase/PKA (Carroll et al., 2006). Contudo, mais estudos serão necessários para que se estabeleça o mecanismo de associação entre os EETs e proteína G na regulação da atividade e translocação do canal TRP.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

10.6.4 Ação dos EETs sobre o recetor de tromboxanos

Num estudo, Behm et al. identificaram um novo mecanismo de vasodilatação dos EETs. Nesse estudo, usando a aorta e artérias mesentéricas de murganho pré-constritas com um agonista do recetor de tromboxanos (TP), o 14,15-EET induziu a relaxação das mesmas. Porém, o efeito foi similar em artérias de referência e com os canais TRPV4 e BK_{Ca} comprometidos. A relaxação induzida pelo EET parece não envolver estes canais. Nos mesmos vasos pré-constritos com fenilafrina, endotelina-1 ou cloreto de potássio, o 14,15-EET não conseguiu promover a sua relaxação. Como tal, o 14,15-EET parece funcionar como um antagonista seletivo e competitivo do recetor TP (Behm et al., 2009).

Contudo, este efeito não se estende a todas as artérias e espécies, isto porque, o 11,12-EET relaxa as artérias mesentéricas pré-constritas com fenilafrina em ratinhos de referência mas não acontece em ratinhos com o canal TRPV4 comprometido. O mecanismo de relaxação difere entre regioisómeros, o 14,15-EET antagoniza os recetores TP e o 11,12-EET atua através dos canais TRPV4 e K_{Ca} . Posto isto, a inibição do recetor TP pelos EETs não pode ser considerada um mecanismo universal para a relaxação mediada por EETs. Visto que os EETs antagonizam os recetores TP em algumas artérias, é importante estudar o efeito de dilatadores em artérias pré-constritas com diversos agonistas, de forma a esclarecer as vias de sinalização que regulam a contração e relaxação (Campbell & Fleming, 2010).

10.6.5 Ação dos EETs nos canais de potássio dependentes do ATP

Ye et al. estudaram a ação dos EETs nos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) em células do músculo liso de artérias mesentéricas de rato. Neste estudo, o 11,12-EET provocou a ativação dos canais K_{ATP} em células do músculo liso tratadas com iberiotoxina, um inibidor dos canais BK_{Ca} . Os canais K_{ATP} são conhecidos por serem modulados por mecanismos dependentes das proteínas cinase A e C. Contudo, a



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

relaxação estimulada pelo 11,12-EET nas mesmas artérias é inibida pela glibenclamida, um inibidor dos canais K_{ATP} , ou pela inibição da PKA. Todos os quatro regioisómeros são ativadores dos canais K_{ATP} (Ye, Zhou, Lee, 2005).

Noutro estudo, Ye et al. estudaram a ativação dos canais K_{ATP} pelo 14,15-EET em células do músculo liso. Contudo, a ativação era inibida pelo antagonista EET 14,15-EE5ZE, um anticorpo contra a $G_{\alpha s}$ e inibidores da ADP ribosilação. A ativação dos canais K_{ATP} pelo 14,14-EET parece ser semelhante a ativação dos canais BK_{Ca} já mencionados. Posto isto, e sabendo que os EETs estimulam a acumulação de AMPc nas células do músculo liso, pensa-se que a os EETs ativam a $G_{\alpha s}$ pela ADP ribosilação estimulando a adenilato ciclase e, conseqüentemente, o aumento de AMPc. Por sua vez, o AMPc ativa a PKA levando a fosforilação e ativação dos canais K_{ATP} contribuindo para a hiperpolarização da membrana e relaxação, Figura 11 (Ye et al., 2006).

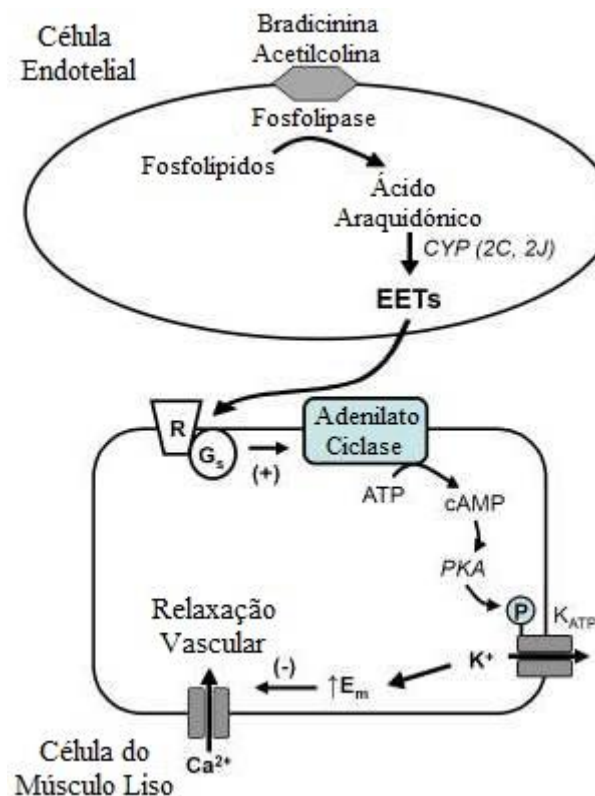


Figura 11. Proposta de mecanismo de ativação dos canais K_{ATP} nas células do músculo liso pelos EETs.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

10.6.6 Ação dos EETs sobre a heme-oxigenase e monóxido de carbono

Adicionalmente, os EETs podem ativar indiretamente os canais de K_{Ca} por outros mecanismos. Os 11, 12-EET podem aumentar a atividade da heme oxigenase (HO) e consequentemente gerar monóxido de carbono (CO) que, por sua vez, vai ativar os canais K_{Ca} e hiperpolarizar a membrana. Em artérias mesentéricas de rato constrictas com fenilafrina, a dilatação estimulada pelo 11,12-EET é prevenida por um inibidor da HO, mesoporfirina de crómio (CrMP), bem como pela iberiotoxina. Contudo, nem todos os EETs seguem este perfil, enquanto a relaxação do 8,9-EET e 14,15-EET é inibida pelo CrMP, a relaxação do 5,6-EET não é alterada. O 11,12-EET causa um aumento de libertação de CO em 30% nas artérias mesentéricas, um efeito que desaparece com a inibição da HO (Sacerdoti et al., 2006).

10.7. 20-HETE

As células musculares vasculares lisas expressam principalmente CYP hidrolases, especificamente as isoformas CYP4A e CYP4F, responsáveis pela formação de 20-HETE. O 20-HETE é produzido pelas células do músculo liso pela estimulação da angiotensina II, endotelina, norepinefrina (Miyata & Roman, 2005) e serotonina, e é também aumentado por inibidores da NOS (Williams et al., 2010). O 20-HETE é o único metabolito da via do CYP produzido pelas células do músculo liso e possui um papel importante na regulação do tónus vascular e função renal (Campbell & Fleming, 2010).

Na vasculatura, o 20-HETE possui propriedades pró-hipertensivas pois aumenta a resistência vascular pelo aumento da contração das células do músculo liso e diminui a vasodilatação dependente do endotélio. Por outro lado, o 20-HETE contribui para efeito anti-hipertensivo mas ao nível renal, promovendo a natriurese e diurese pela inibição do mecanismo de transporte iónico no epitélio tubular. A proteína CYP4A, responsável pela biossíntese de 20-HETE, não está distribuída de igual forma ao longo da vasculatura, neste sentido, a biossíntese de 20-HETE aumenta na vasculatura de pequeno calibre e nas de grande calibre não são detetados quaisquer níveis de 20-HETE.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

Desta forma o 20-HETE possui propriedades ao nível da microcirculação (Wu & Schwartzman, 2011).

10.8. Mecanismo pró-hipertensivo

Ao contrário do que acontece com os EETs, o 20-HETE possui uma potente ação vasoconstritora devido ao seu efeito inibitório nos canais iónicos. Atua no controlo do tónus vascular no cérebro, rim, coração e baço. A fosforilação e inibição dos canais K_{Ca} nas células do músculo liso vascular, por parte do 20-HETE, levam ao aumento nos níveis de potássio intracelular e conseqüentemente a diminuição do potencial de membrana. Isto leva a ativação dos canais de cálcio e ao aumento da concentração intracelular de cálcio, provocando a despolarização da membrana e a contração das células do músculo liso vascular (Zou et al., 1996; Gebremedhin et al., 1998; Roman, 2002).

A vasoconstrição induzida pelo 20-HETE normalmente envolve uma ação direta com as células do músculo liso. O uso de estruturas análogas mostrou que atuavam como agonistas e antagonistas, o que sugere um sítio de ligação específico ou recetor para o 20-HETE. Estruturas como 5-HETE, 15-HETE e 19-HETE, que antagonizam a ação vasoconstritora do 20-HETE, podem ser considerados inibidores endógenos (Félétou, 2011).

O 20-HETE tem a capacidade de ativar a PKC, a proteína cinase ativada por mitogénios (MAPK) e a tirosina cinase src que, por sua vez, fosforilam e inibem os K_{Ca} . A inibição dos K_{Ca} leva a despolarização da membrana e ao aumento da concentração citosólica de cálcio pela abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L, nas células do músculo liso (Wu & Schwartzman, 2011).

O 20-HETE é capaz de antagonizar o efeito de relaxação, por parte do EDHF, envolvendo a inibição da Na^+/K^+ -ATPase (Randriamboavonjy et al., 2005).

Apesar de tudo os HETEs têm sido descritos como cardiotóxicos devido as suas ações pró-inflamatórias e pró-oxidativas, o que leva a lesão do endotélio vascular (Roman, 2002).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

10.9. Ação do 20-HETE nas células endoteliais – Via da eNOS

O 20-HETE pode também atuar nas células do endotélio para além das suas ações nas células do músculo liso. A capacidade do 20-HETE diminuir a relaxação induzida por acetilcolina sugere que a homeostasia do NO é afetada. O aumento da expressão do *CYP4A2* em ratos por adenovírus teve como consequência a hipertensão e aumento da expressão de *CYP4* e produção de 20-HETE ao nível das artérias renais. Verificou-se também a disfunção endotelial pela redução da resposta vasodilatadora da acetilcolina e dos níveis de NO, e pelo aumento dos níveis de anião superóxido. O mesmo acontece em ratos modelos de hipertensão induzida por androgénios, e em ambos os casos a hipertensão e a disfunção vascular desaparecem com inibidores da síntese de 20-HETE. O 20-HETE intervém na síntese e biodisponibilidade do NO. Nas células endoteliais, o 20-HETE causa o desacoplamento da eNOS inibindo a associação da HSP90 com a eNOS levando a redução da produção e da biodisponibilidade de NO (Wu & Schwartzman, 2011).

Contudo, o 20-HETE pode também agir como vasodilatador dependente do endotélio, atuando na ativação da eNOS pelo aumento da fosforilação da eNOS e da PKB levando ao aumento da produção de NO, ou na via da ciclooxigenase na circulação pulmonar (Chen et al., 2006; Fang et al., 2006).

Outros estudos indicam que o desacoplamento da eNOS pelo 20-HETE e a disfunção endotelial estão relacionados com o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e I κ B cinase (IKK). A disfunção endotelial do 20-HETE envolve uma parte da componente inflamatória. O uso do anti-inflamatório partenolida mostrou negar a inibição do 20-HETE na relaxação induzida pela acetilcolina. Em suma, os mecanismos de ação do 20-HETE são diferentes no endotélio e no músculo liso, uma vez que, a disfunção endotelial causada pelo 20-HETE no endotélio é dependente da ativação da via IKK, no músculo liso as ações do 20-HETE não necessitam da ativação de IKK (Wu & Schwartzman, 2011).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

10.10. Ação do 20-HETE sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona

Como já referido, a angiotensina II contribui para a biossíntese de 20-HETE e também mostrou estimular a libertação de 20-HETE em vasos pré-glomerulares e a síntese renal de 20-HETE. Na vasculatura periférica o aumento da produção de 20-HETE contribui para a resposta vasoconstritora da angiotensina II e a sua inibição atenua o efeito pressor renal da angiotensina II. Foi demonstrado que a contínua inibição da biossíntese de 20-HETE diminuía o desenvolvimento de hipertensão dependente da angiotensina II, o que sugere a contribuição do 20-HETE nas ações hipertensivas da angiotensina II (Wu & Schwartzman, 2011).

Mais precisamente o 20-HETE mostrou ser um potente indutor da expressão enzima conversora da angiotensina (ECA) vascular nas células endoteliais. Por exemplo, em ratos transgênicos que expressam o CYP4A2 ou tratados com androgénios, onde a expressão e síntese de 20-HETE está aumentada, a expressão da ECA renal e vascular também está aumentada. Porém, o aumento da expressão da ECA é eliminado pela ação de inibidores da síntese de 20-HETE. Mais, em ratos modelos de hipertensão com uma sobre-expressão do CYP4A2 no endotélio vascular, a pressão arterial é normalizada pela ação de IECAs ou antagonistas dos recetores da angiotensina II (ARAs). Visto assim, a indução da ECA pelo 20-HETE leva ao aumento dos níveis da angiotensina II e as suas ações hipertensivas através do recetor da angiotensina II nas células endoteliais e do músculo liso. Isto sugere que o sistema renina-angiotensina-aldosterona exacerbe a disfunção vascular induzida pelo 20-HETE, sendo uma parte do mecanismo de hipertensão causado pelo 20-HETE (Wu & Schwartzman, 2011).

11. Ação dos enzimas do metabolismo do AA na fisiologia e fisiopatologia cardiovascular

Theken et al. observaram nos seus estudos que a razão epóxido:diol era alta em doentes com doença arterial coronária (DAC) comparativamente aos indivíduos saudáveis, em todos os subgrupos populacionais. Este fato significa que a atividade



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

metabólica da sEH aparenta ser baixa na presença. No mesmo estudo, verificaram que os doentes com DAC tinham também altos níveis de EETs e tendência para terem baixos níveis de DHETs comparativamente aos indivíduos saudáveis (Theken et al., 2012).

Apesar do mecanismo subjacente à supressão compensatória da sEH não estar esclarecido, foi reportado que o gene que expressa a sEH, *EPHX2*, era um gene relacionado com a suscetibilidade para a insuficiência cardíaca. Na insuficiência cardíaca estável, no Homem, a expressão cardíaca de sEH é 60% inferior comparativamente a indivíduos controlo. Pensa-se que a regulação transcricional negativa da sEH, de forma a aumentar os níveis de EETs, seja um mecanismo adaptativo em DCV no Homem. A supressão da atividade metabólica da sEH pode também ocorrer pela inibição da sEH pelas ROS presentes na DAC estável (Theken et al., 2012).

12.Suscetibilidade ao risco cardiovascular

Nos últimos anos, a suscetibilidade genética para as doenças cardiovasculares tem sido alvo de estudo, com o objetivo de entender a fisiopatologia das doenças. A expressão de muitos enzimas CYP e a produção dos metabolitos endógenos está alterada nas DCV. Para além dos enzimas CYP, a sEH tem um papel importante no metabolismo do AA. Uma grande variabilidade interindividual na atividade da sEH no Homem foi reportada e os polimorfismos do gene *EPHX2* têm sido estudados de forma a avaliar a eventual associação com várias DCV. Muitos estudos têm mostrado associações entre variantes genéticas e as DCV. Com o atual conhecimento sobre a importância dos enzimas Citocromo P450 e da sEH na fisiologia cardiovascular, os polimorfismos genéticos destes enzimas podem determinar a suscetibilidade individual às DCV.

Atualmente, polimorfismos genéticos em CYP epoxigenases (*CYP1A2*, *CYP2C*, *CYP2J2*), sEH (*EPHX2*) e CYP ω -hidroxilases (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP4A11* e



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

CYP4F2) têm sido associados com a suscetibilidade às DCV em diversos estudos epidemiológicos. Um resumo destes polimorfismos foi publicado por Zordoky & El-Kadi, Quadro 4 (Zordoky & El-Kadi, 2010).

Quadro 4. Polimorfismos genéticos na via metabólica CYP do AA.

Polimorfismos	Variante	Fenótipo
Via CYP hidroxilases	<i>CYP1A1 MspI</i>	Indução aumentada
	<i>CYP1B1</i> *3/*4	Atividade aumentada
	<i>CYP4A11</i> F434S	Atividade diminuída
	<i>CYP4F2</i> V433M	Atividade diminuída
Via CYP epoxigenase	<i>CYP1A2</i> *1F	Atividade aumentada (Fumadores)
	<i>CYP2C8</i> *2/*3/*4	Atividade diminuída
	<i>CYP2C9</i> *2/*3	Atividade diminuída
	<i>CYP2C19</i> *2/*3/*4	Inativação
	<i>CYP2J2</i> *7	Transcrição reduzida
Via sEH	R287Q	Atividade diminuída
	K55R	Atividade aumentada

12.1. Polimorfismos nos *CYP450* da via do ácido araquidônico

12.1.1 Polimorfismos no gene *CYP1A1*

Muitos estudos já mostraram a existência de polimorfismos genéticos no gene *CYP1A1*. Esses polimorfismos têm sido associados com o aumento da atividade *CYP1A1* ou com a sua indução. Um dos polimorfismos mais estudado é o *CYP1A1 MspI* que corresponde a uma alteração da regulação do *CYP1A1* levando a elevada indução da enzima. Apesar de haver muitos poucos estudos de associação entre o risco de DCV e o metabolismo do AA com os polimorfismos genéticos do *CYP1A1*, a



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

importância clínica de polimorfismos neste gene está bem estabelecida no contexto do risco de cancro do pulmão em fumadores (Zordoky & El-Kadi, 2010).

12.1.2 Polimorfismos no gene *CYP1A2*

A atividade *CYP1A2* possui uma variabilidade interindividual causada por polimorfismos genéticos que controlam a atividade enzimática. Um dos polimorfismos mais estudados é a transversão do nucleótido citosina para adenina na posição 734 a jusante do primeiro nucleótido transcrito do gene *CYP1A2*. Indivíduos fumadores, portadores do genótipo A/A, possuem uma maior atividade metabólica da enzima.

Tal como no gene *CYP1A1*, poucos estudos há sobre a associação entre do polimorfismo genético *CYP1A2* e o risco de DCV. Num estudo de caso controlo o genótipo C/C foi associado com um aumento do risco de EAM, contudo, o mesmo estudo, não foi verificado o papel do *CYP1A2* como um enzima epoxigenase da via do AA. Em outro estudo, a associação entre o consumo de café, polimorfismo *CYP1A2*, e o risco de hipertensão foi revelado. Nesse estudo, a variante alélica *CYP1A2**1F, que contribuía para a redução da atividade do *CYP1A2*, contribuía para o risco de hipertensão em indivíduos que consumiam café. Apesar do estudo centrar no metabolismo da cafeína em portadores da variante alélica *1F, a baixa formação de EETs vasodilatadores pelo mesmo alelo pode ser um potencial fator contribuinte para o risco (Zordoky & El-Kadi, 2010).

12.1.3 Polimorfismos no gene *CYP1B1*

Estudos mostraram que o *CYP1B1* é expresso em tecidos cardiovasculares, é esperado que os polimorfismos no *CYP1B1* que alteram a sua expressão tenham um papel na nas DCV. Num estudo recente, a associação entre o *CYP1B1**3 e o risco de DCV, mostrou um *hazard ratio* para o EAM de 1,9 para o genótipo GG versus CC entre indivíduos que nunca fumaram. Contudo, este resultado não foi confirmado num novo



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

estudo. Atualmente, não existe nenhum estudo sobre a influência dos polimorfismos do CYP1B1 no metabolismo do AA (Zordoky & El-Kadi, 2010).

12.2. Polimorfismos na subfamília CYP2C

Os CYP2C8, CYP2C9 e CYP2C19 são genes altamente polimórficos e os seus polimorfismos mostraram afetar o metabolismo do AA em diversos estudos. Por exemplo, a variante alélica CYP2C8*3 mostrou levar a um défice no metabolismo do AA para o 11,12- e 14,15-EET relativamente a variante alélica de referência (CYP2C8*1).

Contudo, e apesar do papel dos metabolitos do CYP2C8, CYP2C9 e CYP2C19 na vasodilatação e cardioproteção, parece não haver associação entre os polimorfismos do CYP2C e as DCV, ou, no geral, são contraditórias, Quadro 5.

Quadro 5. Associação entre os polimorfismos da subfamília CYP2C e as DCV.

Polimorfismo	Doença	População	Associação
<i>CYP2C8*2 e CYP2C8*3</i>	EAM	Caucasiana	Sem risco
	AVC	Caucasiana	Sem risco
	Hipertensão	Afro-Americana	Sem risco
	Hipertensão	Caucasiana e Afro-Americana	Sem risco
<i>CYP2C8 I264M e K399R</i>	DAC	Caucasiana	Alto risco*
	DAC	Afro-Americana	Sem risco
<i>CYP2C9*2 e CYP2C9*3</i>	EAM	Caucasiana	Sem risco
	AVC	Caucasiana	Sem risco
	Hipertensão	Afro-Americana	Sem risco
<i>CYP2C9*2</i>	Aterosclerose	Turca	Alto risco
<i>CYP2C19*3</i>	Aterosclerose	Turca	Alto risco

Nota: * o alto risco de DAC está presente nos fumadores.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

12.3. Polimorfismos no gene *CYP2J2*

Os polimorfismos genéticos estão associados a variabilidade interindividual da expressão do ARNm e proteína do *CYP2J2*. Foram verificados para o gene *CYP2J2* cerca de 20 SNPs, dos quais quatro levam a redução do metabolismo do AA. Muitos estudos foram realizados para avaliar a associação entre os polimorfismos *CYP2J2* e as DCV, Quadro 6 (Spiecker et al., 2004).

Quadro 6. Associação entre os polimorfismos no *CYP2J2* e as DCV.

Polimorfismo	Doença	População	Associação
<i>CYP2J2</i> *7	DAC	Alemã	Alto risco
	DAC	Caucasiana	Sem risco
	DAC	Afro-Americana	Baixo risco
	DAC	Sueca	Sem risco
	Hipertensão	Russa	Alto risco
	Hipertensão	Afro-Americana	Sem risco
	Hipertensão	Caucasiana	Baixo risco*
	Hipertensão	Sueca	Sem risco
	EAM	Tailandesa	Alto risco
	AVC	Sueca	Sem risco
	AVC	Chinesa	Sem risco
<i>CYP2J2</i> rs10889160 e rs11572325	EAM	Caucasiana	Alto risco

Nota: * o baixo risco está presente nos homens.

Dada a importância do *CYP2J2* na função vascular, Spiecker et al. estudaram variantes genéticas do gene *CYP2J2* de 132 doentes. Neste estudo foram identificados polimorfismos localizados nos exões, intrões, região 3'-UTR e na região promotora. Entre as variantes genéticas estudadas, um dos polimorfismos mais relevantes em termos de frequência e importância funcional está localizado na posição -50 próximo da



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

região promotora que corresponde a substituição de um nucleótido de guanidina por uma timidina (*G-50T*). A variante polimórfica *G-50T* (*CYP2J2*7*) resulta na perda do local de ligação do fator de transcrição Sp1 na região promotora do *CYP2J2*, resultando na diminuição de 50% da atividade do promotor *CYP2J2* o que representa uma diminuição da expressão (Spiecker et al., 2004).

A importância funcional do polimorfismo *CYP2J2*7* foi demonstrada em indivíduos humanos. A concentração plasmática do maior metabolito *CYP2J2* a partir do AA, 14,15-EET, foi medida. Devido ao facto dos EETs formados serem rapidamente hidrolisados no correspondente diol (DHET), dos quais são os metabolitos mais estáveis, o 14,15-DHET foi considerado um relevante marcador da atividade *CYP2J2*. Visto considerarem que os níveis de 14,15-DHET refletem mais na atividade *CYP2J2* do que na atividade sEH e que a maior parte do metabolitos epoxigenase observados são DHET, após a colheita da amostra (Spiecker et al., 2004).

As concentrações médias de DHET são significativamente baixas em indivíduos com o *CYP2J2*7*, Figura 12, o que demonstra a influência do polimorfismo *CYP2J2*7* na atividade epoxigenase (Spiecker et al., 2004).

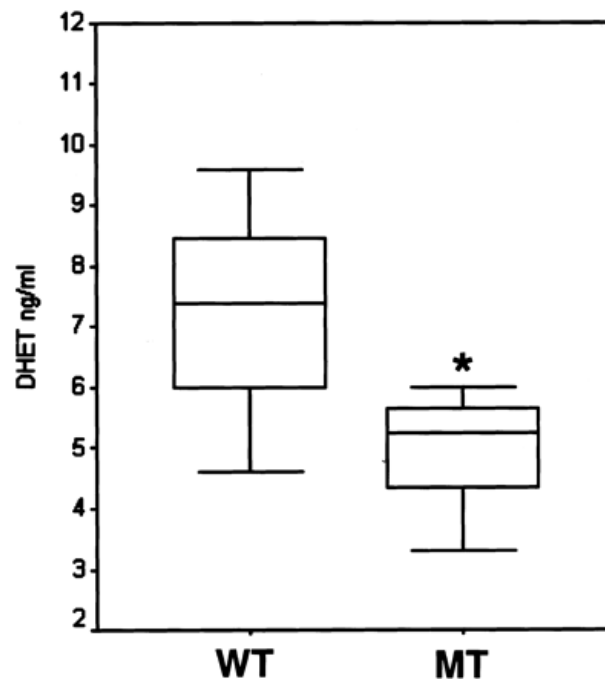


Figura 12. Concentração plasmática de 14,15-DHET entre indivíduos com a variante *G-50T* (MT) e de referência (WT).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

Após avaliarem 289 doentes com angiografia documentada de DAC e 255 indivíduos de controlo (indivíduos sem DAC, excluída por angiografia). A associação entre o polimorfismo *CYP2J2**7 e DAC após ajustamento da idade, género e fatores de risco cardiovascular mostrou estar associado com um OR de 2,23. Verificaram, também, que a frequência de isquemia cerebral e síndromes coronárias agudas foi ligeiramente alta em indivíduos com o *CYP2J2**7 em comparação aos indivíduos com o genótipo GG, contudo, sem algum significado estatístico (Spiecker et al., 2004).

Contudo, na população Caucasiana, nenhuma associação entre o polimorfismo *CYP2J2**7 e a DAC não foi identificada pelo *The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC)* e *Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC)*. Contraditoriamente ao estudo de Spiecker et al., Lee et al. obteve, significativamente, em Afro-Americanos, uma associação entre a variante alélica *CYP2J2**7 e o baixo risco de DAC, o que vai contra com o efeito benéfico dos EETs na vasculatura. Uma das explicações pode ser o fato de Spiecker et al., no seu trabalho, definir a DAC com base na angiografia e não com base na incidência do evento clínico como no estudo ARIC. No mesmo estudo, na coorte ARIC, a relação entre o polimorfismo *CYP2J2**7 e o risco de DAC parece diferir entre a população Caucasiana e a população Afro-Americana. Contudo, a influência do polimorfismo *CYP2J2**7 na biossíntese de EETs em ambas as populações Caucasianas e Afro-Americanas não foi estudado *in vivo* (Lee et al., 2007).

Outros estudos focaram na associação entre o polimorfismo *CYP2J2* e a hipertensão, contudo, os resultados não são consistentes. Um estudo realizado na população Russa mostrou uma forte associação entre o *CYP2J2**7 e a hipertensão com um OR de 4,79 e a associação mantém-se significativa após ajustamento da idade, género e história familiar de hipertensão. Por outro lado, num estudo em Afro-Americanos, a variante alélica *CP2J2**7 não mostrou uma associação com a hipertensão essencial.

De indo em contra com as descobertas de Spiecker et al., King et al. reportou uma significativa associação a variante *CP2J2**7 e a diminuição do risco de hipertensão essencial em homens Caucasiano e sem história de hipertensão familiar. A diminuição da transcrição do *CYP2J2* pela variante *CP2J2**7 e consequentemente os baixos níveis



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

plasmáticos de EET não são consistentes com o papel protetor da variante *CP2J2*7* demonstrado pelo trabalho de King et al. Uma possível explicação é que alguns EETs podem causar vasoconstrição em certos domínios vasculares e/ou em certas condições experimentais (King et al., 2005).

A variante *CP2J2*7* foi estudada também no âmbito do EAM. Num estudo com 400 indivíduos Tailandeses, a variante alélica T é um fator de risco independente para o EAM prematuro com um OR de 1,78. Os outros fatores de risco independentes foram o ato de fumar com um OR de 3,05, a diabetes mellitus com um OR de 3,24 e a hipertensão com um OR de 1,95. Neste mesmo estudo, e consistente com o estudo de Spieker et al., os níveis plasmáticos de DHET foram significativamente mais baixos nas amostras de doentes de EAM com a variante alélica *CYP2J2*7* T do que no indivíduo portadores do genótipo GG (Liu et al., 2007).

No estudo recente da *Malmö Diet and Cancer cardiovascular arm* (MDC-CVA) onde foi genotipado o *CYP2J2* em 5740 participantes, não foi encontrada nenhuma associação entre a variante alélica *CYP2J2*7*, a hipertensão, DAC e AVC (Fava et al., 2010).

12.4. Polimorfismos na subfamília *CYP4A*

A alteração de produção de 20-HETE já foi observada em diversas patologias de entre as quais as doenças cerebrovascular isquémica, hipertensão e diabetes. Atualmente, muitos estudos realizados indicam a ligação do *CYP4A* ao desenvolvimento de hipertensão e da doença isquémica cerebral e cardíaca em animais experimentais. Outros estudos mostraram uma correlação entre a excreção urinária de 20-HETE, stresse oxidativo e disfunção endotelial em indivíduos juntamente com associação ente o polimorfismo *CYP4F2*, a hipertensão e o AVC.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

12.4.1 Polimorfismos no gene *CYP4A11*

Apesar das variantes genéticas do *CYP4A11* não estarem totalmente esclarecidas, num estudo sobre a população Coreana, foram identificados 70 polimorfismos, o que torna o gene *CYP4A11* muito polimórfico. A variante genética mais importante do *CYP4A11* é a variante T8590C, que representa a substituição do nucleótido timidina por citosina no nucleótido 8590 do gene *CYP4A11* resultando na substituição do aminoácido 434 fenilalanina por serina, a qual leva à redução da atividade do enzima *CYP4A11* (Gainer et al., 2005).

Quadro 7. Associação entre os polimorfismos no *CYP4A11* e as DCV.

Polimorfismo	Doença	População	Associação
<i>CYP4A11</i> T8590C	Hipertensão	Afro-Americana	Sem risco
	Hipertensão	Americana branca	Alto risco
	Hipertensão	Afro-Americana	Alto risco
	Hipertensão	Caucasiana	Alto risco
	Hipertensão	Sueca	Alto risco
	Hipertensão	Japonesa	Baixo risco
	Hipertensão	Australiana branca	Sem risco
	AVC	Sueca	Sem risco
	DAC	Sueca	Sem risco

Relativamente ao metabolito do *CYP4A11*, a excreção de 20-HETE na urina de 24 horas mostrou ser baixa em indivíduos portadores do alelo C do que dos portadores do genótipo TT e os mesmos tinham a pressão diastólica alta (Ward et al, 2008). Os indivíduos portadores do genótipo *CYP4A11* CC comparativamente aos indivíduos portadores da variante alélica T de referência tinham disfunção endotelial demonstrada pela vasoconstrição coronária induzida por acetilcolina (Hermann et al., 2009).

A associação entre a variante alélica 8590C e a hipertensão foi analisada em diversos estudos. Em Caucasianos do Tennessee, a variante alélica 8590C foi associada



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

ao aumento do risco de hipertensão com um OR de 2,32, este mesmo resultado foi confirmado numa coorte maior com um OR de 1,23 (Gainer et al., 2005).

A *Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease* (MONICA) *Augsburg echocardiographic substudy* também estudou a variante polimórfica *CYP4A11* T8590C no contexto da hipertensão com uma amostra de 1397 indivíduos alemães. Neste estudo, os indivíduos com o genótipo CC tinha os níveis de pressão sanguínea sistólica e diastólica alta (Mayer et al., 2005). De igual forma, um estudo com 6002 indivíduos suecos, mostrou que os portadores da variante alélica C tinham a pressão sistólica e diastólica alta e grande prevalência de hipertensão (Fava et al., 2008). Contudo, nenhuma associação foi evidente entre a mesma variante alélica 8590C e a hipertensão num estudo de caso-controlo na população Australiana (Ward et al, 2008).

Em negros Americanos com doença renal hipertensiva no estudo da *African Study of Kidney Disease* (AASK), o genótipo CC foi associado com uma pressão sanguínea sistólica e de pulso basais significativamente altas, nos homens mas não nas mulheres. O mesmo alelo mostrou estar associado ao aumento de incidência de doença renal em estado final ou morte nos indivíduos com proteinúria (Gainer et al., 2008).

12.4.2 Polimorfismos no gene *CYP4F2*

Atualmente conhecem-se no gene *CYP4F2* humano cerca de 225 SNPs, sendo que um desses polimorfismos já foi identificado como tendo importância funcional. O polimorfismo genético *CYP4F2* G1347A (*CYP4F2**3) na região codificante leva a substituição de um aminoácido na enzima (V433M). Este polimorfismo mostrou diminuir a formação de 20-HETE em 50% *in vitro*, contudo, mostrou aumentar a excreção urinária de 20-HETE numa amostra de indivíduos hipertensos e normotensos. Os autores explicam que a diminuição da produção de 20-HETE devido a uma mutação pode levar ao aumento homeostático na produção de 20-HETE a nível renal por regulação positiva de outro CYP ω -hidroxilase (Ward et al, 2008). Contudo, e sabendo que o 20-HETE é também produzido nos rins, não se sabe qual é a contribuição da produção vascular sistémica de 20-HETE na concentração urinária de 20-HETE.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controle do tônus vascular

Devido a importância funcional do polimorfismo *CYP4F2* V433M, muitos estudos investigaram a sua associação com as DCV.

Num estudo com a população Australiana, os indivíduos portadores da variante alélica *CYP4F2* 1347A tinham significativamente a pressão sanguínea sistólica elevada quando comparados com os indivíduos com o genótipo GG. Neste mesmo estudo, a excreção de 20-HETE na urina dos indivíduos com a variante alélica *CYP4F2* 1347A estava significativamente mais elevada. Contudo, não se sabe se o aumento de 20-HETE provoca o aumento da pressão sanguínea ou se o aumento da pressão sanguínea leva ao aumento da excreção renal de 20-HETE (Ward et al., 2008).

No estudo da MDC-CVA, o genótipo *CYP4F2* GA/AA não foi associado com o aumento da hipertensão, mas quando analisado nos homens, os portadores da variante alélica *CYP4F2* A tinham significativamente uma pressão arterial diastólica e sistólica alta e uma maior tendência de prevalência de hipertensão do que os portadores do genótipo *CYP4F2* GG. No mesmo estudo, a incidência de AVC foi evidente nos homens portadores da variante alélica *CYP4F2* A em comparação com os portadores do genótipo *CYP4F2* GG (Fava et al., 2008). Ainda, num estudo de caso-controle em Indianos com AVC, o mesmo genótipo *CYP4F2* GA/AA foi associado a hipertensão (Munshi et al., 2011). Por outro lado, num estudo de caso-controle em Japoneses, a prevalência da variante alélica *CYP4F2* A não foi significativamente diferente entre os casos de hipertensão e os indivíduos normotensos (Fu et al, 2008).

12.5. Polimorfismos na sEH

A sEH é também um enzima importante no metabolismo do AA, que catalisa a conversão do EETs nos seus respectivos DHETs. O gene responsável pela sua expressão é o gene *EPHX2*, que possui cerca de 45 quilobases e 19 exões que codificam 555 aminoácidos. Uma grande variabilidade interindividual na atividade sEH em humanos já foi reportada, o que sugere a existência de polimorfismos no gene *EPHX2*. Atualmente, muitos polimorfismos já foram identificados no gene sEH humano que consistem num SNP, Figura 13 (Przybyla-Zawislak et al., 2003).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

Estudos *in vitro* verificaram a funcionalidade dos polimorfismos K55R e R287Q que levam ao aumento e diminuição da atividade sEH, respetivamente. Isto sugere que, o polimorfismo *EPHX2* K55R estará associado com os baixos níveis de EETs e a um fenótipo pro-hipertensivo, e, por outro lado, o *EPHX2* R287Q estará associado a níveis altos de EETs e a um efeito vasodilatador (Przybyla-Zawislak et al., 2003). Num estudo, os portadores do genótipo *EPHX2* K55R tinham uma razão EET/DHET diminuída e uma atividade sEH alta *ex vivo* (Lee et al., 2011).

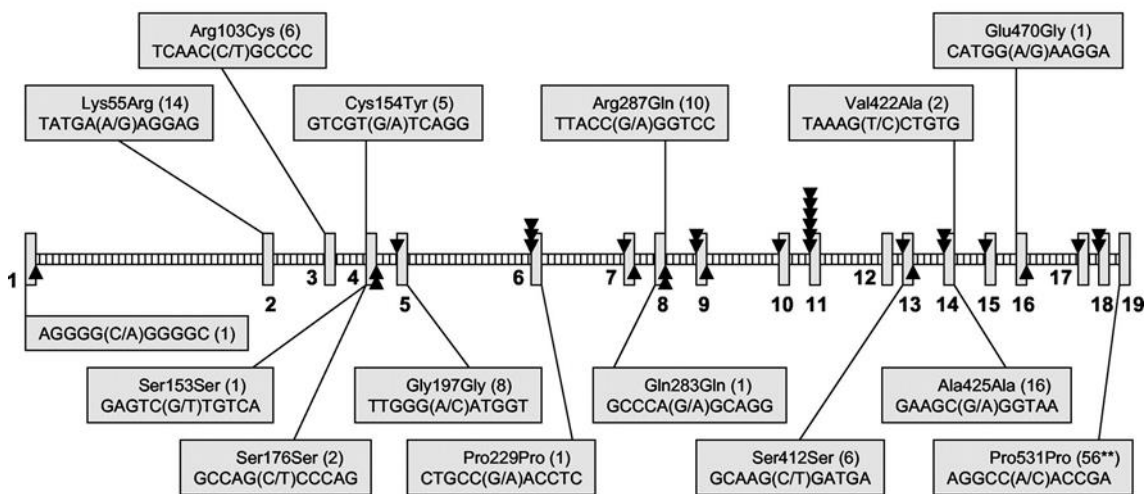


Figura 13. Identificação dos diversos SNPs no gene humano da sEH, *EPHX2*.

Num estudo da ARIC com 2065 participantes, 1085 casos incidentes de DAC e 980 sem casos, a associação entre o risco de DAC e a variante alélica polimórfica K55R foi encontrada em Caucasianos mas não em Afro-Americanos (Lee et al., 2011).

No estudo da MDC-CVA, com uma coorte de Suecos, foi mostrado que o polimorfismo K55R do gene *EPHX2* confere um alto risco de prevalência de hipertensão e aumenta o risco de AVC em homens homocigóticos quando comparados aos indivíduos portadores de pelo menos um alelo de referência. Neste mesmo estudo a variante alélica *EPHX2* K55R não mostrou influenciar o desenvolvimento de hipertensão (Fava et al., 2005).

Num estudo sobre a população Americana constituída por 265 indivíduos, dos quais 198 eram brancos e 67 eram negros, Lee et al. investigaram a associação entre os polimorfismos *EPHX2* K55R e R287Q e o risco de DCV. O fluxo sanguíneo braquial



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

(FSB) foi estudado através da técnica da pletismografia por oclusão venosa (*strain-gauge venous occlusion plethysmography*) no estado basal e em resposta a infusão intra-arterial de bradicinina, metacloolina e nitroprussiato de sódio. A resistência vascular braquial (RVB) foi calculada como sendo a razão da pressão arterial média e o FSB (Lee et al., 2011).

Em Americanos brancos portadores da variante alélica *EPHX2* 55R em resposta a bradicinina tiveram significativamente o FSB mais baixo e a RVB mais alta, em relação aos indivíduos de referência (K/K), Figura 14. O aumento da atividade sEH conferida pelo polimorfismo parece diminuir os efeitos vasodilatadores dos EETs (Lee et al., 2011).

Lys55Arg

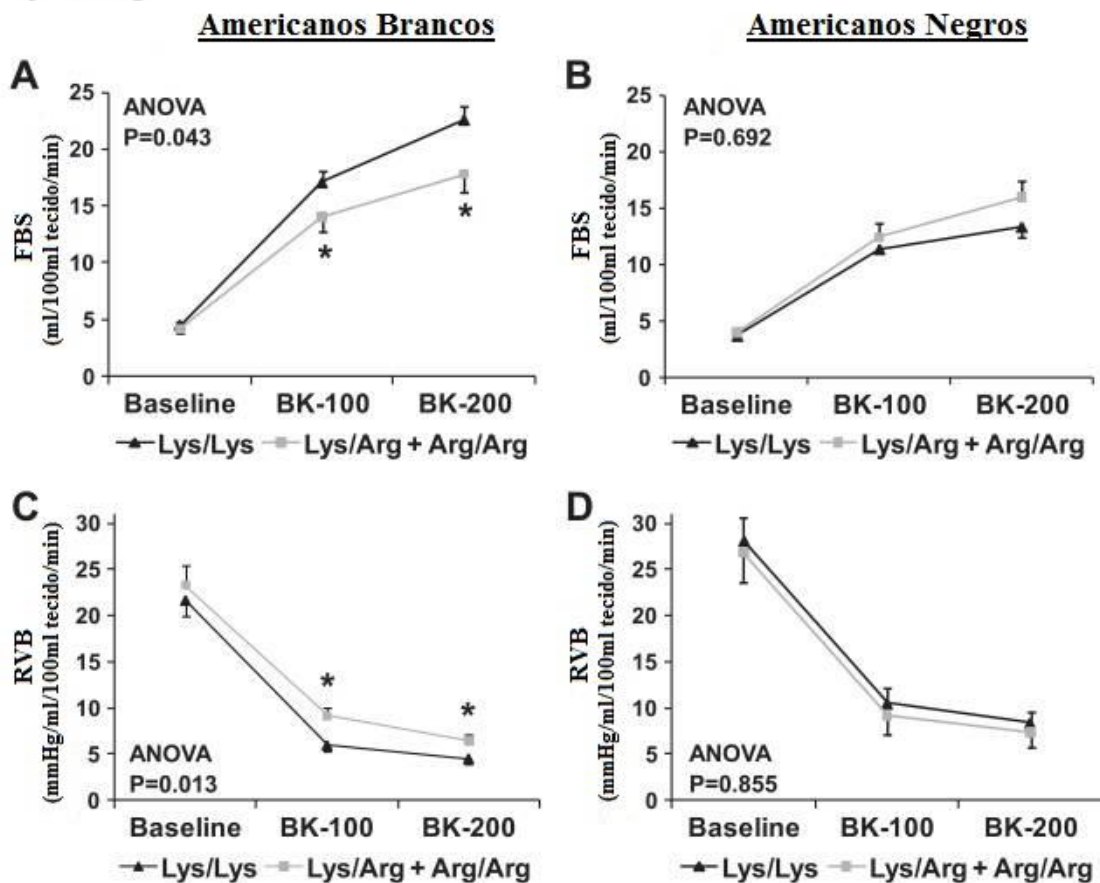


Figura 14. Efeito da vasodilatação no polimorfismo *EPHX2* K55R na resposta a bradicinina.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

Nos negros portadores da variante alélica 287Q a RVB em repouso foi significativamente mais baixo do que nos indivíduos de referência (R/R), o que sugere um efeito protetor para o desenvolvimento de hipertensão, Figura 15. A diminuição da atividade metabólica da sEH dada pelo polimorfismo *EPHX2* K55R parece exacerbar os efeitos vasodilatadores dos EETs (Lee et al., 2011).

Arg287Gln

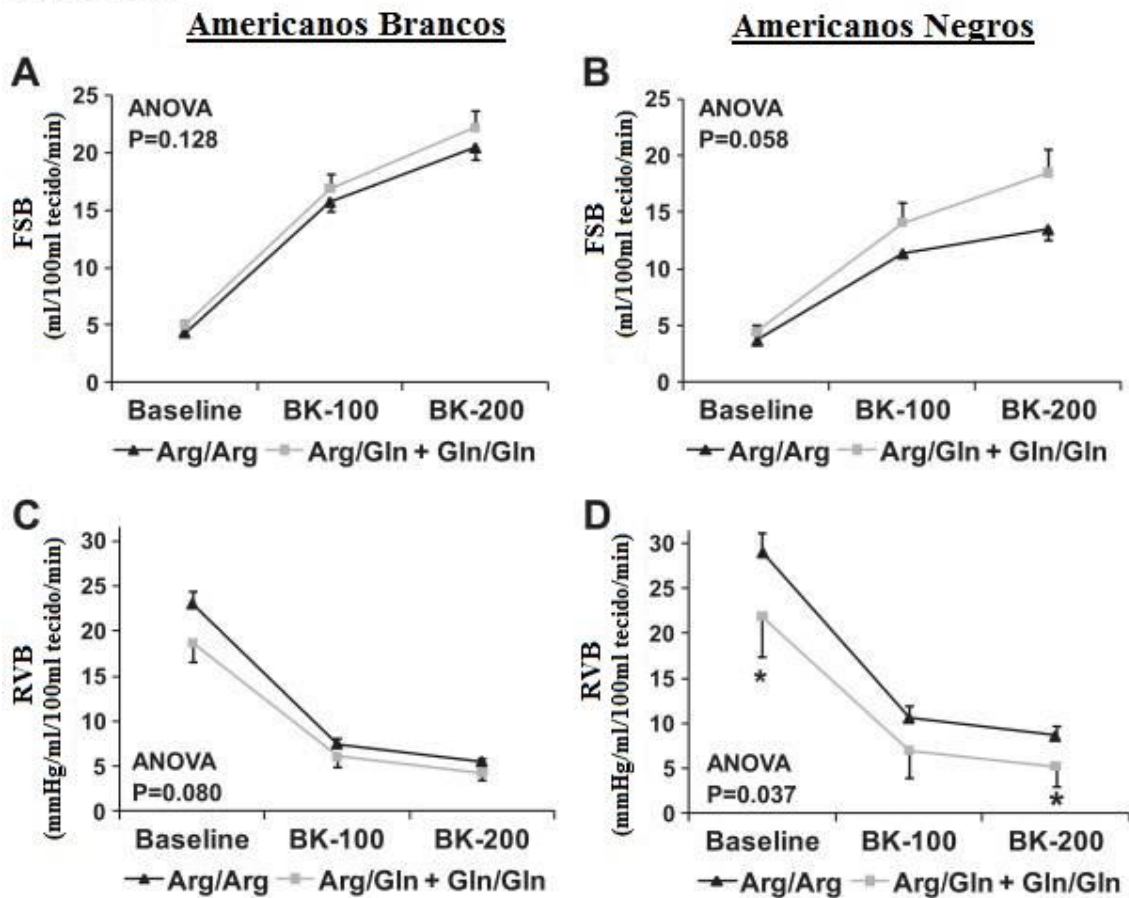


Figura 15. Efeito da vasodilatação no polimorfismo *EPHX2* R287Q na resposta a bradicinina.

Neste estudo, a relação entre o polimorfismo *EPHX2* R287Q e a resposta vasodilatadora foi mais evidente em indivíduos Americanos negros do que nos indivíduos Americanos brancos estudados. Os seus resultados sugerem que as diferenças interindividuais na exposição aos EETs baseados nos genótipos K55R e



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controle do tônus vascular

R287Q contribuem para as diferenças fisiológicas verificadas na vasculatura braquial através dos seus efeitos reguladores sobre a vasculatura (Lee et al., 2011).

13.Potenciais alvos terapêuticos

Os EETs mostraram ser potentes vasodilatadores e aparentam possuir, no geral, propriedades cardioprotetoras. Contudo, uma das limitações das propriedades vasodilatadoras dos EETs é o seu metabolismo pelo sEH ou pela β -oxidação em metabolitos com atividade biológica inferior correspondente aos dióis, DHETs. O alvo terapêutico mais promissor é a inibição da sEH. Os inibidores da sEH exacerbem as propriedades benéficas dos EETs, e, por esta razão, têm sido investigados como possível tratamento para as doenças cardiovasculares.

Os estudos genéticos suportam a ideia de que os EETs e a enzima sEH são alvos terapêuticos para a DCV. Os polimorfismos genéticos dos citocromos P450 2C8/9 e 2C foram associados com a hipertensão, o enfarte do miocárdio e a doença cardiovascular e neles envolvia o gene da sEH (*EPHX2*) com a DAC e o acidente vascular cerebral isquêmico.

Assim, os efeitos biológicos benéficos dos EETs podem ser usados em tratamentos terapêuticos para a hipertensão, aterosclerose, doenças pulmonares, diabetes, dor, inflamação, distúrbio imunológicos, entre outras patologias. Posto isto, os inibidores da sEH podem ter um valor terapêutico em uma grande variedade de DCV e poderão ser particularmente benéficos em doentes com certos genótipos.

Por outro lado, o 20-HETE mostrou ser um potente vasoconstritor e o seu aumento de produção contribui para o aumento do stresse oxidativo, disfunção endotelial e da resistência vascular periférica associado a hipertensão. Devido a importância do 20-HETE na regulação do tônus vascular e a sua alteração de expressão e produção na hipertensão, é de esperar a formulação de potenciais terapêuticas com fármacos que atuam na via do 20-HETE para o tratamento da hipertensão.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

13.1. Inibidores da sEH e seus efeitos cardiovasculares

A primeira principal abordagem terapêutica dos inibidores da sEH foi a hipertensão. Esta abordagem teve como principio desenvolver agonistas EET metabolicamente estáveis ou bloquear o metabolismo EET de forma a exacerbar a ação dos EETs endógenos. Não obstante, foram desenvolvidos análogos de ureia de EETs com atividade agonista e também inibidores da sEH. O *N,N'*-diciclohexilurea (DCU) o foi o primeiro inibidor da sEH a demonstrar efeitos biológicos *in vivo*, baixando a pressão arterial e diminuindo a excreção urinária de DHET em ratos hipertensivos. A primeira administração crónica, por injeção intraperitoneal durante quatro dias, foi realizada com o inibidor 1-ciclohexil-3-dodecil-urea (CDU) levando a uma redução da pressão arterial em ratos hipertensos derivado pela infusão de angiotensina (Imig & Hammock, 2009).

Devido a fraca solubilidade destes compostos tanto em água ou em solvente orgânico estes compostos não podiam ser usados para determinar a sua eficácia *in vivo*, surgiu, assim, a necessidade de desenvolver outros compostos para administração oral. Um dos primeiros exemplos foi o ácido 12-(3-adamantan-1-il-ureido) dodecanóide (AUDA) que demonstrou baixar a pressão arterial em modelos de hipertensão de rato e ratinho (Imig & Hammock, 2009).

Estudos mostram que a presença de um inibidor sEH em vasos sanguíneos isolados exacerbe as respostas de relaxação mediada pelos EETs. Estes resultados abriram caminho para desenvolvimento de inibidores sEH com o potencial tratamento de DCV. Facto importante, os inibidores da sEH já entraram em ensaios clínicos para o tratamento de DCV. Um desses inibidores da sEH foi desenvolvido pela *Arête Therapeutics*, a primeira classe de inibidores sEH AR9281 começou os ensaios clínicos de fase I em Outubro de 2007, contudo, o composto não mostrou eficácia nos estudos de fase II. O composto apresentou não ter uma potente inibição da sEH humana e tinha um tempo de semivida no sangue pequeno (Imig & Hammock, 2009).

Os inibidores da sEH já mostraram possuir propriedades protetoras na hipertensão, no AVC, na EAM, hipertrofia cardíaca e aterosclerose. Isto leva a que estes inibidores tenham um potencial para o tratamento de diversas DCV e a sua morbilidade associada.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

A disfunção endotelial que ocorre na DCV é atenuada pelos inibidores sEH (Imig & Hammock, 2009).

13.2. Inibidores do 20-HETE

Partindo do conhecimento de que a produção vascular de 20-HETE está alterada em animais modelos de hipertensão e que os polimorfismos nos *CYP4A11* e *CYP4F2* estão associados ao desenvolvimento de hipertensão em humanos, o estudo e desenvolvimento de fármacos que atuam na via do 20-HETE abriu caminho para um novo potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão, os inibidores da síntese de 20-HETE.

Muitos inibidores seletivos da síntese do 20-HETE já foram desenvolvidos, tendo sido essenciais para o estudo do seu mecanismo de ação e fisiologia. Sendo eles, inibidores do *CYP4A* e *CYP4F*, o ácido 17-octadecínico (17-ODYA), o N-metilsulfunil-12,12-dibromododec-11-enamida (DDMS), o ácido dibromododec-11-enóico (DDBB), o *N*-hidroxi-*N'*-(4-butil-2-metilfenil)formamida (HET016) e o *N*-(3-cloro-4-morfolina-4-il)fenil-*N'*-hidroximidoforamida (TS011). Mais recentemente, foram sintetizados análogos do 20-HETE que bloqueiam as suas ações vasoconstritoras, o ácido 20-hidroxi-eucosa-6(Z),15(Z)-dienóico (6-,15-,20-HEDE) e o 20-hidroxi-eucosa-6(Z),15(Z)-dienoil glicina (6-,15-,20-HEDGE) (Williams et al., 2010).

Os inibidores da síntese do 20-HETE já mostraram diminuir a pressão arterial provocada pela angiotensina II e em modelos de hipertensão induzida por androgénios, do qual possuem uma produção vascular de 20-HETE aumentada, stresse oxidativo e disfunção endotelial. Por exemplo, um inibidor da síntese do 20-HETE, o HET016, mostrou diminuir o desenvolvimento de hipertensão e stresse oxidativo vascular em animais tratados com androgénios. Ambos os inibidores e antagonistas do 20-HETE mostraram reduzir a área de isquemia e reperfundir a circulação coronária e cerebral (Williams et al., 2010).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

14. Conclusão

Os estudos até ao momento indicam que os EET medeiam uma fração da relaxação dependente do endotélio pela acetilcolina, bradicinina e stresse de cisalhamento em algumas artérias. Eles causam hiperpolarização e relaxação nas células do músculo liso; contudo, o seu mecanismo de ação e função como EDHF varia entre os leitos vasculares e as espécies. Os EET também mostraram que, em situações de disfunção endotelial onde a biodisponibilidade de NO está reduzida, as vias CYP e EET sustentam a dilatação dependente do endotélio. Os estudos mostrados sugerem que os EET podem atuar de forma dependente ou independente de um recetor. Porém, o alvo molecular ou recetor dos EET necessita ser identificado e, assim, poder-se-ão definir os precisos mecanismos de sinalização molecular. Posto isto, os CYP epoxigenases e os EET têm um papel importante na regulação da homeostasia cardiovascular.

No que se refere a terapêutica, um grande avanço tem sido feito no desenvolvimento de inibidores da sEH como alvo terapêutico para as DCV. Contudo, os inibidores possuem um grande potencial no tratamento das DCV incluindo, a hipertensão e a DAC. Por outro lado, o desenvolvimento de novas ferramentas biológicas e farmacológicas como os agonistas ou antagonistas dos EET é necessário para melhor definir as ações cardiovasculares dos EET.

Relativamente ao 20-HETE, este metabolito mostra possuir uma atividade pró-hipertensiva e pró-oxidativa, podendo ser responsável pela disfunção endotelial. Contudo, o 20-HETE atua como natriurético no túbulo renal e vasoconstritor na vasculatura. O uso de inibidores da síntese de 20-HETE já mostraram prevenir os seus efeitos negativos sobre o endotélio e o desenvolvimento de patologias cardíacas como a hipertensão.

No que diz respeito a genética, muitos estudos mostraram a associação entre os polimorfismos dos CYP e da sEH e o risco de DCV. Contudo, poucos estudos foram realizados no contexto do metabolismo do ácido araquidónico. Por outro lado, outros estudos conseguiram analisar estes polimorfismos e o nível de DHET no plasma humano. Uma limitação possível é o facto de que um específico polimorfismo “inocente” possa estar num forte *linkage disequilibrium* com o polimorfismo que



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

realmente está associado com a doença. Visto isto, a ligação entre os polimorfismos genéticos dos CYP da via do ácido araquidónico e as DCV é um aspeto que deve ser mais bem estudado, a fim de selecionar terapias individualizadas para melhor tratar as DCV.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

15. Bibliografia

- Baranowska M, Kozłowska H, Korbut A, Malinowska B. (2007). Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw*, 61, 596-605.
- Batlouni, Michel. (2001). Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*, 8, 328-338.
- Bauersachs J, Popp R, Hecker M, et al. (1996). Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation*, 94, 3341-3347.
- Behm DJ, Ogbonna A, Wu C, Burns-Kurtis CL, Douglas SA. (2009). Epoxyeicosatrienoic acids function as selective, endogenous antagonists of native thromboxane receptors: Identification of a novel mechanism of vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther.*, 328, 231-239.
- Bertrand-Thiebault, C., Ferrari, L., Bouterin-Falson, O., Kockx, M., Desquand-Billiald, S., Fichelle, J. M., et al. (2004). Cytochromes P450 are differently expressed in normal and varicose human saphenous veins: linkage with varicosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 5, 295-301.
- Bieche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P., & de Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenetics and genomics*, 17, 731-742.
- Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, De Wit C, Fleming I, Busse R, Pohl U. (2000). Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J.*, 14, 255-260.
- Busse R, Edwards G, Féletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.*, 23(8), 374-380.
- Bylund J, Hidestrand M, Ingelman-Sundberg M, e Oliw EH. (2000). Identification of CYP4F8 in human seminal vesicles as a prominent 19-hydroxylase of prostaglandin endoperoxides. *J Biol Chem*, 275, 21844-21849.
- Bylund, J., Bylund, M., & Oliw, E. H. (2001). cDNA cloning and expression of CYP4F12, a novel human cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun*, 3, 892-897.
- Cai H, Harrison DG. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.*, 87(10), 840-844.
- Cai, Y. (2009). Arachidonic acid cytochrome P450 4F2 in hypertension: what can we learn from a transgenic mouse model? *Kidney Int*, 12, 1253-1254.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

- Campbell WB, Falck JR. (2007). Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*, 49 pt2, 590-595.
- Campbell WB, Fleming I. (2010). Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflügers Arch*, 459, 881–895.
- Campbell WB, Holmes BB, Falck JR, Capdevila JH, Gauthier KM. (2006). Adenoviral expression of cytochrome P450 epoxygenase in coronary smooth muscle cells: Regulation of potassium channels by endogenous 14(S),15(R)-EET. *Am J Physiol.*, 290, H64–H71.
- Campbell WB, Pratt PF, Gebremedhin D, Harder DR. (1996). Epoxyeicosatrienoic acids are endothelium-derived hyperpolarizing and vasodilating factors in bovine coronary arteries. In: Vanhoutte PM, ed. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Amsterdam, the Netherlands: Harwood Academic*, 81–89.
- Capdevila JH, Falck JR. (2002). Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68–69, 325–344.
- Capdevila, J. H., Falck, J. R., & Imig, J. D. (2007). Roles of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases in the control of systemic blood pressure and experimental hypertension. *Kidney Int*, 6, 683–689.
- Carroll MA, Doumad AB, Li J, Cheng MK, Falck JR, McGiff JC. (2006). Adenosine2A receptor vasodilation of rat preglomerular microvessels is mediated by EETs that activate the cAMP/PKA pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 291, F155-161.
- Chen Y, Medhora M, Falck JR, Pritchard KA Jr, Jacobs ER. (2006). Mechanisms of activation of eNOS by 20-HETE and VEGF in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291, L378-385.
- Cohen RA, Vanhoutte PM. (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, 92, 3337–3349.
- Danielson, P. B. (2002). The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab*, 3, 561–597.
- Delozier, T. C., Kissling, G. E., Coulter, S. J., Dai, D., Foley, J. F., Bradbury, J. A., Murphy, E., Steenbergen, C., Zeldin, D. C., & Goldstein, J. A. (2007). Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35, 682-688.
- Dubey, R. K., Jackson, E. K., Gillespie, D. G., Zacharia, L. C., & Imthurn, B. (2004). Catecholamines block the antimitogenic effect of estradiol on human coronary artery smooth muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 8, 3922–3931.
- Earley S, Pauyo T, Drapp R, Tavares MJ, Liedtke W, Brayden JE. (2009). TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. *Am J Physiol.*, 297, H1096–H1102.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

- Edwards G, Zygmunt PM, Högestätt ED, Weston AH. (1996). Effects of cytochrome P450 inhibitors on potassium currents in mechanical activity in rat portal vein. *Br J Pharmacol.*, 119, 691–701.
- Elbekai, R. H., & El-Kadi, A. O. (2006). Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther*, 2, 564–587.
- Fang X, Faraci FM, Kaduce TL, Harmon S, Modrick ML, Hu S, Moore SA, Falck JR, Weintraub NL, Spector AA. (2006). 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is a potent dilator of mouse basilar artery: role of cyclooxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 291, H2301–2307.
- Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, Harmon S, Teesch LM, Morisseau C, Thompson DA, Hammock BD, Spector AA. (2001). Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem*, 276, 14867–14874.
- Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, Vanrollins M, e Spector AA. (1996). Functional implications of a newly characterized pathway of 11,12- epoxyeicosatrienoic acid metabolism in arterial smooth muscle. *Circ Res*, 79, 784-793.
- Fava C, Montagnana M, Danese E, et al. (2005). Homozygosity for the EPHX2 K55R polymorphism increases the long-term risk of ischemic stroke in men: a study in Swedes. *Pharmacogenet Genomics*, 20(2), 2829–2837.
- Fava, C., Montagnana, M., Almgren, P., Hedblad, B., Engstrom, G., Berglund, G., et al. (2010). The common functional polymorphism -50G>T of the CYP2J2 gene is not associated with ischemic coronary and cerebrovascular events in an urban-based sample of Swedes. *J Hypertens*, 28(2), 294–299.
- Fava, C., Montagnana, M., Almgren, P., Rosberg, L., Lippi, G., Hedblad, B., et al. (2008). The v433m variant of the CYP4F2 is associated with ischemic stroke in male Swedes beyond its effect on blood pressure. *Hypertension*, 52(2), 373–380.
- Félétou M, Köhler R, Vanhoutte PM. (2010). Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep.*, 12, 267-275.
- Félétou, Michel. (2011). *The Endothelium - Multiple Functions of the Endothelial Cells - Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators* (Vol. I). Morgan & Claypool Life Sciences.
- Fisslthaler B, Fleming I, Busse R. (2000). EDHF: a cytochrome P450 metabolite in coronary arteries. *Semin Perinatol.*, 24, 15-19.
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 401, 493–497.
- Fleming, I., A. Reuben, R. Poop, B. Fisslthaler, S. Schrodte, A. Sander, J. Haendeler, J. R. Falck, C. Morisseau, B. D. Hammock, et al. (2007). Epoxyeicosatrienoic



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular

acids regulate Trp channel dependent Ca^{2+} signaling and hyperpolarization in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27, 2612–2618.

Fu Z, Nakayama T, Sato N, et al. (2008). Haplotype-based case-control study of the human CYP4F2 gene and essential hypertension in Japanese subjects. *Hypertens Res*, 31(9), 1719–1726.

Gainer JV, Bellamine A, Dawson EP, et al. (2005). Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension. *Circulation*, 111(1), 63–69.

Gainer JV, Lipkowitz MS, Yu C, et al. (2008). Association of a CYP4A11 variant and blood pressure in black men. *J Am Soc Nephrol*, 19(8), 1606–1612.

Gauthier KM, Edwards EM, Falck JR, Reddy DS, Campbell WB. (2005). 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid represents a transferable endothelium-dependent relaxing factor in bovine coronary arteries. *Hypertension*, 45, 666–671.

Gauthier KM, Jagadeesh SG, Falck JR, Campbell WB. (2003). 14,15-Epoxyeicosanoic-5(Z)-enoic-mSI: a 14,15- and 5,6-EET antagonist in bovine coronary arteries. *Hypertension*, 42, 555–561.

Gebremedhin D, Harder DR, Pratt PF, Campbell WB. (1998). Bioassay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries: role of a cytochrome P450 metabolite. *J Vasc Res.*, 35, 274–284.

Gebremedhin, D., Lange, A. R., Lowry, T. F., Taheri, M. R., Birks, E. K., Hudetz, A. G., et al. (2000). Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res*, 1, 60-65.

Gomes, Tâmara K. de C.; Oliveira, Suzana L. de. (2010). O papel dos ácidos graxos essenciais no perfil de eicosanóides e sua repercussão na resposta imune. *Nutrire*, 35(1), 167-186.

Granberg, A. L., Brunstrom, B., & Brandt, I. (2000). Cytochrome P450- dependent binding of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and benzo [a]pyrene (B[a]P) in murine heart, lung, and liver endothelial cells. *Arch Toxicol*, 10, 593-601.

Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, 6, 611–650.

Harder, D. R., Gebremedhin, D., Narayanan, J., Jefcoat, C., Falck, J. R., Campbell, W. B., et al. (1994). Formation and action of a P-450 4A metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels. *Am J Physiol*, 5 (Pt 2), H2098–H2107.

Hardman, J. G.; Limbird, L.E.; Gilman, A. G. (2001). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (10^a ed.). McGraw-Hill.

Hermann M, Hellermann JP, Quitzau K, et al. (2009). CYP4A11 polymorphism correlates with coronary endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease – the ENCORE Trials. *Atherosclerosis*, 207(2), 476–479.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

- Homma T, Zhang JY, Shimizu T, Prakash C, Blair IA, Harris RC. (1993). Cyclooxygenase derived metabolites of 8,9-epoxyeicosatrienoic acid are potent mitogens for cultured rat glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 191, 282-288.
- Imig JD, Hammock BD. (2009). Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov.*, 8(10), 794-805.
- Imig JD, Navar LG, Roman RJ, Reddy KK, Falck JR. (1996). Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature. *J Am Soc Nephrol.*, 7, 2364-70.
- Jenkins, C. M. (2009). Eicosanoid signalling pathways in the heart. *Cardiovasc Res*, 82, 240-249.
- Karara A, Dishman E, Falck JR, Capdevila JH. (1991). Endogenous epoxyeicosatrienoyl-phospholipids. A novel class of cellular glycerolipids containing epoxidized arachidonate moieties. *J Biol Chem*, 266, 7561-7569.
- Kerzee, J. K., & Ramos, K. S. (2001). Constitutive and inducible expression of Cyp1a1 and Cyp1b1 in vascular smooth muscle cells: role of the Ahr bHLH/ PAS transcription factor. *Circ Res*, 7, 573-582.
- King, L. M., Gainer, J. V., David, G. L., Dai, D., Goldstein, J. A., Brown, N. J., et al. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet Genomics*, 15(1), 7-13.
- Kroetz, D. L., & Xu, F. (2005). Regulation and inhibition of arachidonic acid omega-hydroxylases and 20--HETE formation. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45, 413-438.
- Kudo I, Murakami M. (2002). Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 3-58.
- Kunert, M. P., Roman, R. J., Alonso-Galicia, M., Falck, J. R., & Lombard, J. H. (2001). Cytochrome P-450 omega-hydroxylase: a potential O₂ sensor in rat arterioles and skeletal muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 4, H1840-H1845.
- Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC. (2007). CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenet Genomics.*, 17(5), 349-358.
- Lee CR, Pretorius M, Schuck RN, Burch LH, Bartlett J, Williams SM, Zeldin DC, Brown NJ. (2011). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) is associated with forearm vasodilator responses in humans. *Hypertension*, 57(1), 116-122.
- Liu PY, Li YH, Chao TH, Wu HL, Lin LJ, Tsai LM, Chen JH. (2007). Synergistic effect of cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2*7 polymorphism with smoking on the onset of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 195(1), 199-206.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

- Loot AE, Popp R, Fisslthaler B, Vriens J, Nilius B, Fleming I. (2008). Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilation. *Cardiovas Res.*, 80, 445-452.
- Matlung HL, Bakker EN, VanBavel E. (2009). Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. *Antioxid Redox Signal.*, 11(7), 1699-1709.
- Mayer, B., Lieb, W., Gotz, A., Konig, I. R., Aherrahrou, Z., Thiemig, A., et al. (2005). Association of the T8590C polymorphism of CYP4A11 with hypertension in the Monica Augsberg echocardiographic substudy. *Hypertension*, 46(4), 766–771.
- Michaud, V., Frappier, M., Dumas, M. C., & Turgeon, J. (2010). Metabolic activity and mRNA levels of human cardiac CYP450s involved in drug metabolism. *PLoS One*, 5, e15666.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Akiyama, T., Imaoka, S., Inoue, M., Funae, Y. (1999). Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett*, 3, 165–169.
- Miyata N, Roman RJ. (2005). Role of 20-hydroxyecosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res*, 41, 175–193.
- Moorthy, B., Miller, K. P., Jiang, W., Williams, E. S., Kondraganti, S. R., & Ramos, K. S. (2003). Role of cytochrome P4501B1 in benzo[a]pyrene bioactivation to DNA-binding metabolites in mouse vascular smooth muscle cells: evidence from 32P-postlabeling for formation of 3-hydroxybenzo[a] pyrene and benzo[a]pyrene-3,6-quinone as major proximate genotox. *J Pharmacol Exp Ther*, 1, 394–401.
- Munshi A, Sharma V, Kaul S, Al-Hazzani A, Alshatwi AA, Shafi G, et al. (2011). Association of 1347 G/A cytochrome P450 4F2 (CYP4F2) gene variant with hypertension and stroke. *Mol Biol Rep*, 39(2), 1677-1682.
- Nelson MT, Quayle JM. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.*, 268(4 pt1), C799-822.
- Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. (1999). In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation. *Am J Physiol.*, 277, H1252–H1259.
- Nithipatikom, K., Holmes, B. B., McCoy, M. J., Hillard, C. J., & Campbell, W. B. (2004). Chronic administration of nitric oxide reduces angiotensin II receptor type 1 expression and aldosterone synthesis in zona glomerulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 5, E820–E827.
- Oltman CL, Weintraub NL, VanRollins M, Dellsperger KC. (1998). Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circ Res.*, 83, 932–939.
- Oltman, C. L., Weintraub, N. L., VanRollins, M., & Dellsperger, K. C. (1998). Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circ Res*, 9, 932-939.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

- Omata K, Abraham NG, Escalante B e Schwartzman ML. (1992). Age-related changes in renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 262, F8–F16.
- Pinto, A. M. (Coord.). (2007). In *Fisiopatologia – Fundamentos e Aplicações* (pp. 355-386). LIDEL.
- Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Fleming I, Busse R. (1996). A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol*, 497, 699-709.
- Powell, P. K., Wolf, I., Jin, R., & Lasker, J. M. (1998). Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11. *J Pharmacol Exp Ther*, 3, 1327–1336.
- Przybyla-Zawislak BD, Srivastava PK, Vazquez-Matias J, Mohrenweiser HW, Maxwell JE, Hammock BD, Bradbury JA, Enayetallah AE, Zeldin DC, Grant DF. (2003). Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase. *Mol Pharmacol.*, 64(2), 482-490.
- Quintas, Alexandre; Freire, Ana Ponces; Halpern, Manuel J. (2008). *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. LIDEL.
- Randriamboavonjy V, Kiss L, Falck JR, Busse R, Fleming I. (2005). The synthesis of 20-HETE in small porcine coronary arteries antagonizes EDHF-mediated relaxation. *Cardiovasc Res.*, 65, 487–494.
- Roman, Richard J. (2002). P-450 Metabolites of Arachidonic Acid. *Physiol Rev*, 82, 131–185.
- Sacerdoti D, Bolognesi M, Di Pascoli M, Gatta A, McGiff JC, Schwartzman ML, Abraham NG. (2006). Rat mesenteric arterial dilator response to 11,12-epoxyeicosatrienoic acid is mediated by activating heme oxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 291, H1999–2002.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D. & Tate, P. (2003). *Anatomia & Fisiologia*. Lusociência.
- Sobey CG. (2001). Potassium Channel Function in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, 28-38.
- Spearman ME, Goodwin RM, Estabrook RW, Falck JR, Manna S, Leibman KC, Myrphy RC, Capdevila J. (1985). Novel glutathione conjugates formed by epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Arch Biochem Biophys*, 242, 225-230.
- Spector, A. A. (2009). Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res*, 50, S52-S56.
- Spector, A. A.; Norris, A. W. (2007). Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *J. Physiol. Cell Physiol*, 292, 996-1012.
- Spiecker M, Darius H, Hankeln T, Soufi M, Sattler AM, Schaefer JR, Node K, Börgel J, Mügge A, Lindpaintner K, Huesing A, Maisch B, Zeldin DC, Liao JK. (2004).



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2. *Circulation*, 110(15), 2132–2136.

Theken KN, Schuck RN, Edin ML, Tran B, Ellis K, Bass A, Lih FB, Tomer KB, Poloyac SM, Wu MC, Hinderliter AL, Zeldin DC, Stouffer GA, Lee CR. (2012). Evaluation of cytochrome P450-derived eicosanoids in humans with stable atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 222, 530–536.

Thum T, Borlak J. (2002). Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J*, 12, 1537–1549.

Thum T., Borlak J. (2000). Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet*, 355, 979–983.

Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B, Suzuki M, Janssens A, Voets T, Morisseau C, Hammock BD, Fleming I, Busse R, Nilius B. (2005). Modulation of Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res*, 97, 908–915.

Ward NC, Tsai IJ, Barden A, et al. (2008). A single nucleotide polymorphism in the CYP4F2 but not CYP4A11 gene is associated with increased 20-HETE excretion and blood pressure. *Hypertension*, 51(5), 1393–1398.

Watanabe H, Viriens J, Prenin J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, 424, 434–438.

Williams JM, Murphy S, Burke M, Roman RJ. (2010). 20-hydroxyeicosatetraenoic acid: a new target for the treatment of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56, 336–344.

Wu CC, Schwartzman ML. (2011). The role of 20-HETE in androgen-mediated hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 96(1-4), 45-53.

Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, e Zeldin DC. (1996). Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem*, 271, 3460-3468.

Xu X., Zhang X. A., Wang D. W. (2011). The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 597–609.

Ye D, Zhou W, Lee H-C. (2005). Activation of rat mesenteric arterial Katp channels by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Am J Physiol.*, 288, H358–H364.

Ye D, Zhou W, Lu T, Jagadeesh SG, Falck JR, Lee H-C. (2006). Mechanism of rat mesenteric arterial KATP channel activation by 14,15-epoxyeicosatrienoic acid. *Am J Physiol.*, 290, J1326–H1336.

Yu, Z., Xu, F., Huse, L. M., Morisseau, C., Draper, A. J., Newman, J. W., et al. (2000). Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res*, 87, 992–998.



Doenças cardiovasculares:

Metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidónico no controlo do tónus vascular

- Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. (2009). Roles of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases in the control of systemic blood pressure and experimental hypertension. *Drug Metab Rev.*, 41, 89-295.
- Zhu Y, Schieber EB, McGiff JC, e Balazy M. (1995). Identification of arachidonate P-450 metabolites in human platelet phospholipids. *Hypertension*, 25, 854-859.
- Zhu, D., Bousamra, M., II, Zeldin, D. C., Falck, J. R., Townsley, M., Harder, D. R., et al. (2000). Epoxyeicosatrienoic acids constrict isolated pressurized rabbit pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2, L335–L343.
- Zordoky B. N., El-Kadi A.O. (2010). Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 125, 446–463.
- Zordoky BN, El-Kadi AO. (2010). Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther.*, 125, 446-463.
- Zordoky, B. N., & El-Kadi, A. O. (2008). Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure. *Current drug metabolism*, 9, 122-128.
- Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR, Roman RJ. (1996). 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal arterioles. *Am J Physiol.*, 270, R228–237.