



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

Ana Filipa Coutinho de Castro

Stress oxidativo e Hipertensão Arterial Essencial

Abril, 2010

# FMUP

Ana Filipa Coutinho de Castro  
Stress Oxidativo e Hipertensão Arterial Essencial  
Oxidative Stress and Essential Arterial Hypertension

**Mestrado Integrado em Medicina**

**Área: Cardiologia**

**Trabalho efectuado sobre a Orientação de:  
Prof. Doutor Manuel Joaquim Lopes Vaz da Silva**

**Revista Portuguesa de Cardiologia**

**Abril, 2010**

**Nome:** Ana Filipa Coutinho de Castro

**Endereço electrónico:** m04164@med.up.pt

**Título da Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio:** Stress Oxidativo e Hipertensão Arterial Essencial

**Nome completo do Orientador:** Prof. Doutor Manuel Joaquim Lopes Vaz da Silva

**Nome completo do Co-Orientador:** Não aplicável

**Ano de conclusão:** 2010

**Designação da área do projecto de opção:** Cardiologia

É autorizada a reprodução integral desta Monografia apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/10

Assinatura: Ana Filipa Coutinho de Castro

**Projecto de Opção do 6º ano - DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Eu, **Ana Filipa Coutinho de castro**, abaixo assinado, nº mecanográfico: 040801164, aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/10

Assinatura: Ana Filipa Coutinho de castro

## Resumo

---

A hipertensão arterial é um importante factor de risco para várias doenças cardiovasculares, nomeadamente para o acidente vascular cerebral, enfarte agudo do miocárdio e doença renal crónica. Em Portugal atinge cerca de 40% da população adulta, sendo que apenas uma pequena percentagem dos doentes tem a doença controlada. Portugal é ainda o líder europeu da taxa de mortalidade por acidente vascular cerebral.

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento de hipertensão são complexos e ainda não completamente esclarecidos. No entanto, tem havido ao longo das últimas décadas evidência crescente, que sugere uma associação entre as espécies reactivas de oxigénio e a hipertensão arterial. As espécies reactivas de oxigénio são produzidas como intermediárias das reacções de redução-oxidação e são fundamentais para a fisiologia celular. Todavia, quando há um aumento da sua biodisponibilidade podem lesar os diferentes componentes celulares e iniciar vários processos patológicos, conduzindo a um estado de stress oxidativo.

Uma importante fonte de espécies reactivas, a nível vascular e renal, é a família de NADPH oxidasas não-fagocíticas, recentemente identificada e da qual fazem parte a Nox1, Nox2, Nox3 e Nox4, que parecem ter um importante papel nos mecanismos fisiopatológicos cardiovasculares, nomeadamente nos que levam ao desenvolvimento e manutenção de hipertensão arterial. Na verdade, o stress oxidativo e a hipertensão, muito mais do que estabelecerem uma relação causa-efeito, parecem fazer parte de um ciclo vicioso, em que o aumento de um provoca consequentemente o incremento do outro. Tendo em consideração o papel do stress oxidativo na hipertensão, têm sido extensamente estudadas as suas acções nos principais órgãos envolvidos no desenvolvimento desta doença. Entre estes, são de destacar o rim, o cérebro e o sistema cardiovascular. A nível renal, tem sido sugerido que as principais estruturas que intervêm nesta relação são a arteríola aferente, o glomérulo, o tubo contornado proximal, a porção espessa do ramo ascendente da ansa de Henle e a mácula densa. Por sua vez, no sistema nervoso central têm sido identificados várias regiões e núcleos, entre os quais se encontram a região prosencefálica que circunda o terceiro ventrículo, os centros de controlo cardiovasculares pontomedulares da região cerebral posterior e o barorreceptor carotídeo. Finalmente, no sistema cardiovascular as espécies reactivas parecem ser intermediárias dos mecanismos através dos quais a angiotensina II provoca hipertensão arterial.

Ao longo dos últimos anos têm sido desenvolvidos vários estudos, com o objectivo de poder intervir de forma terapêutica na relação stress-oxidativo – hipertensão arterial. Entre as substâncias mais estudadas encontram-se os antioxidantes, nomeadamente a vitamina E e a vitamina C, que, no entanto, não revelaram resultados promissores. Todavia, estão actualmente a ser investigados outros fármacos, com mecanismos de acção diferentes, tais como *scavengers* de radicais livres e inibidores das Nox, cujos resultados ainda se desconhecem.

Este trabalho tem como objectivo fazer uma revisão sobre os actuais conhecimentos acerca da relação entre o stress oxidativo e a hipertensão arterial.

Palavras-Chave: Espécies Reactivas de Oxigénio, Stress Oxidativo, NADPH oxidase, Hipertensão Arterial.

## Abstract

---

Hypertension is a major risk factor for various cardiovascular diseases, particularly for stroke, myocardial infarction and chronic kidney disease. In Portugal reaches about 40% of the adult population but only a small percentage of patients have the disease controlled. Portugal is the European leader in the mortality rate from stroke.

The mechanisms that lead to the development of hypertension are complex and not yet fully understood. However, there have been during recent decades a growing evidence that suggests an association between reactive oxygen species and hypertension. The reactive oxygen species are produced as intermediates of an oxidation-reduction reaction and are essential for cell physiology. However, because there is an increase in its bioavailability, it can damage different cellular components and initiate various pathological processes, leading to a state of oxidative stress.

An important source of ROS, both vascular and renal function, is the family of non-phagocytic NADPH oxidase, recently identified and part of the Nox1, Nox2, and Nox4 NOX3 which seem to have an important role in cardiovascular pathophysiology, including that one which leads to the development and maintenance of hypertension. Indeed, oxidative stress and hypertension, much more than establish a cause-effect relationship, seem to be part of a vicious cycle in which increased thereby causing an increase in another.

Considering the role of oxidative stress on hypertension, that have been extensively studied especially their actions in key agencies involved in the development of this disease. Among these, we highlight the kidney, brain and cardiovascular system. About the level of renal function has been suggested that the main areas involved in this relationship are the afferent arteriole, the glomerulus, bypassed the tube proximal portion of the thick ascending limb of loop of Henle and macula densa. Indeed, in the central nervous system have been identified several regions and nuclei, among which the prosencephalic at the region surrounding the third ventricle, the cardiovascular control centers in the region pontomedulares posterior cerebral and carotid baroreceptor. Finally, the cardiovascular system may seem to be the reactive intermediate of the mechanisms through which angiotensin II causes hypertension.

Over the past few years several studies were conceived in order to discover a therapeutical way to interfere with the duality oxidative stress-hypertension.

Among the most studied substances are the antioxidants, including vitamin E and vitamin C, which, however, have revealed promising results. However, are currently being investigated other drugs with different action mechanisms, such as scavengers of free radicals and inhibitors of Nox, whose results are still unknown.

This paper aims to review the current knowledge about the relationship between oxidative stress and hypertension.

Key-words: Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress, NADPH oxidase, Arterial Hypertension.

## Índice

---

Resumo .....	1
Abstract .....	7
Índice .....	9
Índice de Figuras.....	10
Índice de Quadros .....	10
Lista de Abreviaturas .....	11
Introdução .....	13
Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS) .....	15
Formação das ROS .....	16
Importância das ROS na fisiologia .....	18
Sistema NADPH oxidase e ROS .....	19
Principal fonte de espécies reactivas de oxigénio nos tecidos .....	19
Polimorfismos genéticos da NADPH oxidase - implicações na fisiopatologia das doenças cardiovasculares .....	23
Stress Oxidativo .....	25
Defesas antioxidantes.....	26
Stress oxidativo e HTA, causa e o efeito? .....	27
Mecanismos através dos quais o stress oxidativo aumenta a PA .....	28
a) Afecção do metabolismo do NO e da fisiologia vascular .....	28
b) Indução da inflamação .....	29
c) Interação com o sistema renina-angiotensina (SRA) .....	30
d) Alterações da fisiologia renal .....	31
e) Interação com sistema nervoso central (SNC) .....	33
f) Alterações morfo-funcionais da parede vascular .....	35
Controlo do stress oxidativo no tratamento da hipertensão .....	36
Conclusão .....	43
Bibliografia.....	44

## ***Índice de Figuras***

---

Figura 1.....	17
Figura 2.....	20
Figura 3.....	32
Figura 4.....	34
Figura 5.....	38
Figura 6.....	39

## ***Índice de Quadros***

---

Quadro I.....	20
Quadro II.....	24
Quadro III.....	37
Quadro IV.....	40
Quadro V.....	41
Quadro VI.....	41

## *Lista de Abreviaturas*

---

<b>ADMA</b>	Dimetil-arginina assimétrica
<b>AGE</b>	Produtos terminais de glicação avançada
<b>AGL</b>	Ácidos gordos livres
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>AP-1</b>	Proteína-1 activadora
<b>AT<sub>1</sub></b>	Receptor de tipo 1 da angiotensina
<b>AT<sub>2</sub></b>	Receptor de tipo 2 da angiotensina
<b>AV3-V</b>	Região antero-ventral do 3º ventrículo
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>BH4</b>	Tetrahydrobiopterina
<b>BVL</b>	Bolbo ventro-lateral
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloro
<b>D1</b>	Receptor tipo 1 da dopamina
<b>DC</b>	Doença coronária
<b>DCV</b>	Doença cardiovascular
<b>e-</b>	Electrão
<b>ECA</b>	Enzima conversora da angiotensina
<b>EGF</b>	Factor de crescimento epidérmico
<b>eNOS</b>	NO síntase endotelial
<b>EPM</b>	Eminência pré-óptica mediana
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>GPx</b>	Glutationa peroxidase
<b>GSH</b>	Glutationa reduzida
<b>GSSG</b>	Glutationa oxidada
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>HOCL</b>	Ácido hipocloroso
<b>HTA</b>	Hipertensão arterial
<b>ICAM1</b>	Molécula de adesão intercelular 1
<b>ICV</b>	Injecção intracerebroventricular
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>JNK</b>	Cínase N-terminal do c-Jun

<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baixo peso molecular
<b>L-NAME</b>	Éster da metil-L-nitroarginina
<b>MAPK</b>	Proteína cínase activada pelo mitogénio
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MR</b>	Receptor mineralocorticoide
<b>Na</b>	Sódio
<b>NF-k B</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	NO síntase
<b>NoxA1</b>	Nox-activating protein I
<b>NoxO1</b>	Nox-organizing protein I
<b>NPB</b>	Núcleo parabraquial
<b>NPV</b>	Núcleo paraventricular
<b>NTS</b>	Núcleo do tracto solitário
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigénio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>OSF</b>	Órgão sub-fornical
<b>OVLT</b>	<i>organum vasculosum lateral terminalis</i>
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PDGF</b>	Factor derivado de plaquetas
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SPA</b>	Substância cinzenta periaquedutal
<b>SRA</b>	Sistema renina-angiotensina
<b>SRRA</b>	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>TFG</b>	Taxa de filtração glomerular
<b>TGF-β</b>	Factor transformador de crescimento β
<b>TNF- α</b>	Factor de necrose tumoral α
<b>VCAM1</b>	Molécula de adesão das células vasculares

## Introdução

---

A hipertensão arterial (HTA) assume actualmente, um papel crucial no desenvolvimento de doença cerebrovascular, doença cardíaca isquémica e ainda insuficiência cardíaca e renal, contribuindo para aproximadamente 7,1 milhões de mortes prematuras por ano<sup>1</sup>. Nos Estados Unidos da América (EUA) a prevalência de HTA é de cerca de 20%, sendo que, segundo os dados do *National Statistics Vital Reports*, em 2004, de um total de 2 397 615 mortes, 861 190 deveram-se a doenças cardiovasculares (DCV). Destas, 451 326 deveram-se a doença coronária (DC), 150 074 a doença cerebrovascular, 28 585 a doença cardíaca hipertensiva e 23 076 (1%) relacionaram-se com a HTA essencial e doença renal hipertensiva (13ª causa de morte). Naquele país, a taxa de mortalidade ajustada para a idade foi de 800,8 mortes por 100000 habitantes e relacionada com a hipertensão foi de 3,2 por 100 000 habitantes<sup>2</sup>.

Em Portugal, a taxa de mortalidade no ano de 2008, em indivíduos com menos de 65 anos de idade, por acidente vascular cerebral (AVC) foi de 9,9 por 100 000 habitantes e por DC de 10,1 por 100 000 habitantes<sup>3</sup>. A HTA é muito comum em Portugal, atingindo cerca de 40% da população adulta<sup>4</sup>. Trata-se de uma patologia que, durante anos, cursa de forma assintomática, pelo que só se identifica avaliando a pressão arterial (PA) regularmente. Quando não tratada e/ou não devidamente controlada, implica como já referido, um risco elevado de DCV, que pode manifestar-se sob a forma de AVC (isquémico ou hemorrágico), síndromes coronários agudos (angina instável, enfarte agudo do miocárdio ou morte súbita), angina estável, insuficiência cardíaca e insuficiência renal terminal. Segundo os dados mais recentes do Ministério da Saúde, em Portugal existem aproximadamente dois milhões de hipertensos, dos quais somente metade tem conhecimento de que tem PA elevada, apenas um quarto está medicado e meramente 16% estão controlados<sup>5</sup>. Todavia, estes números representam já um grande avanço ocorrido nos últimos anos, no controlo deste problema de saúde pública. Na verdade, há cerca de quinze ou vinte anos só 5 ou 6 em cada 100 doentes hipertensos estavam devidamente controlados (segundo o critério PA <140/90 mmHg).

No ano 2000 morreram 105 000 portugueses. As DCV e os AVC foram responsáveis por 40% desses óbitos e contribuíram enormemente para a morbilidade e má qualidade de vida de muitos doentes. No ano de 2008 morreram 104 280 portugueses, dos quais 32,3% por DCV<sup>6</sup>.

Portugal é, ainda, o país da União Europeia com a taxa de mortalidade por AVC mais elevada, favorecida pela alta prevalência da HTA, insuficientemente diagnosticada e tratada<sup>7</sup>. No resto da Europa o panorama não é muito diferente. No estudo EUROASPIRE-II, 25% dos inquiridos tinha HTA diastólica, 46% HTA sistólica, 26% HTA sistólica isolada e globalmente 50% eram hipertensos<sup>8</sup>. As repercussões que a HTA provoca no órgãos-alvo (sistema nervoso central, aparelho cardiovascular e rins), e a consequente morbilidade e mortalidade tão elevadas que lhe estão associadas, tornam ainda mais premente a necessidade de encontrar completas explicações fisiopatológicas para esta doença. Acresce ainda a

necessidade de métodos de identificação adequados para a elaboração de uma estratégia terapêutica mais global, que integre concomitantemente a redução e controlo da pressão arterial, a correcção da disfunção endotelial e a protecção dos órgão-alvo. Idealmente, este plano terapêutico deveria poder ser instituído quer de forma preventiva, quer após a instalação da alteração morfo-funcional, de forma a mitigá-la ou mesmo a promover uma regressão significativa das agressões desenvolvidas.

Genericamente, existem dois tipos de hipertensão arterial: a primária ou essencial ou idiopática e a secundária. A HTA primária não tem uma causa específica detectável e representa cerca de 90% dos casos de hipertensão. Por sua vez, na forma secundária (que é menos frequente) há geralmente envolvimento dos rins (doenças do parênquima ou estenose da artéria renal) ou das glândulas endócrinas, nomeadamente da supra-renal (como, por exemplo: Síndrome de Cushing em que há produção excessiva de cortisol; Síndrome de Cohn/hiperaldosteronismo primário no qual há aumento da formação de aldosterona pelo córtex; feocromocitoma em que há excesso de produção de catecolaminas pela medula).

Em termos hemodinâmicos, a HTA primária pode ser dividida em 3 subtipos, de acordo com a idade de instalação. Num dos extremos deste espectro, a HTA sistólica, que ocorre no adulto jovem (dos 17 aos 25 anos), é mais frequente no homem e caracteriza-se por aumento do débito cardíaco e espessamento da aorta, provavelmente associados a hiperactividade do sistema nervoso simpático. Num grupo intermédio, encontram-se os indivíduos com idades compreendidas entre os 30 e os 50 anos, nos quais há uma HTA diastólica, com PA sistólica normal ou elevada, constituindo a verdadeira HTA essencial. Considera-se que este aumento tensional, que é também mais frequente no sexo masculino, esteja associado a um aumento de peso (que frequentemente ocorre nesta idade) e à síndrome metabólica. Hemodinamicamente, ocorre diminuição da capacidade renal para excretar sódio, que consequentemente leva a expansão do volume plasmático. Esta última, em associação com o aumento da actividade neuro-hormonal, conduz a uma reacção auto-reguladora do tecido muscular liso, que resulta em vasoconstricção das arteríolas de resistência e, portanto, num aumento das resistências arteriais periféricas. Finalmente, no outro extremo do espectro, a HTA isolada do adulto (após os 55 anos) caracteriza-se por uma PA sistólica > 140mmHg e uma PA diastólica < 90 mmHg. Contrariamente aos 2 subtipos referidos anteriormente, este tipo de HTA é mais frequente no sexo feminino e resulta do espessamento arterial que ocorre com a idade<sup>9</sup>.

Apesar de existirem inúmeros factores que conhecidamente contribuem para o desenvolvimento da HTA essencial, tais como a predisposição genética (doença poligénica com uma patogénese muito heterogénea e com uma importante interacção com factores exógenos), a idade, a obesidade, a sensibilidade ao sal, o sexo, a hiperactividade do sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a resistência à insulina, a sua precisa etiopatogénese permanece por esclarecer<sup>10</sup>. Ao longo dos últimos anos vários estudos de experimentação animal e de índole clínica, forneceram evidência para o estabelecimento de uma relação causal entre stress oxidativo e inflamação, na patogénese da HTA, quer na sua vertente hereditária, quer na sua vertente adquirida.<sup>11</sup>

Esta assunção tem como base as seguintes observações: o stress oxidativo está associado a níveis elevados de PA em quase todos os modelos animais de HTA; o controlo e a redução do stress oxidativo diminuem a PA em animais hipertensos; a indução do stress oxidativo causa HTA em animais saudáveis e geneticamente normais e o bloqueio da produção de espécies reactivas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species* – ROS) diminui a resposta tensional à infusão, por exemplo, de angiotensina II (Ang II); o stress oxidativo e a HTA associada são acompanhados de uma infiltração renal tubulo-intersticial de linfócitos T e macrófagos; as intervenções que visam a prevenção e a reversão da inflamação melhoram o stress oxidativo e baixam a pressão arterial em animais hipertensos<sup>11</sup>. De forma recíproca, foi também demonstrado que a HTA causa stress oxidativo e inflamação em animais de experiência. Em conjunto, estes achados demonstram que o stress oxidativo, a inflamação e a HTA participam num ciclo vicioso, no qual cada um dos três factores pode recrutar e amplificar os outros. Este ciclo tem um papel fundamental, não só na patogénese, mas também na manutenção da hipertensão e no desenvolvimento das suas complicações renais e cardiovasculares<sup>12</sup>.

O presente trabalho tem assim, como principal objectivo, proceder a uma revisão sobre o potencial papel do stress oxidativo e das espécies reactivas de oxigénio na génese da HTA.

Para tal foi realizada uma pesquisa na Pubmed, utilizando a *query* ("hypertension OR "high blood pressure") AND ("oxidative stress" OR "NADPH oxidase"). Do total de artigos obtidos, foi dada preferência aos artigos mais recentes. Em determinadas temáticas abordadas foi necessária uma nova pesquisa de artigos não obtidos na pesquisa inicial, para a qual foi utilizada a mesma base de dados.

## ***Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS)***

---

A vida para um organismo aeróbio é, metaforicamente falando, uma espada de dois gumes. Se, por um lado, o oxigénio é uma fonte de energia, necessária ao complexo conjunto de reacções químicas fundamentais à vida, por outro, é um poderoso agente oxidante que pode danificar a infra-estrutura celular essencial para estes processos, tornando-se deletério. Apesar de no seu estado molecular o oxigénio ser relativamente inerte, a sua reactividade aumenta quando lhe é adicionado ou removido um electrão, o que pode ocorrer nomeadamente por acção enzimática, dando assim origem às várias espécies reactivas de oxigénio<sup>13</sup>.

As causas para o efeito deletério do oxigénio foram obscuras até à publicação da teoria dos radicais livres, por Gershman *et al.* em 1954, que estabelecia que a sua toxicidade era devida a formas de oxigénio parcialmente reduzidas<sup>14</sup>. O mundo dos radicais livres nos sistemas biológicos foi posteriormente estudado por Denham Harman que, em 1956, propôs o conceito de que os radicais livres desempenhassem um papel no processo do envelhecimento<sup>15</sup>. Esta nova concepção desencadeou uma intensa pesquisa nesta área. Alguns anos depois, McCord e Fridovich descobriram a enzima

superóxido dismutase (SOD), o que permitiu fundamentar a importância dos radicais livres nos sistemas vivos<sup>16</sup>. Na história da descoberta da importância dos radicais livres pode ainda ser destacada uma terceira era de investigação, na qual Mittal e Murad (1977) demonstraram que o radical hidroxil estimula a activação da guanilciclase e, conseqüentemente a formação de um segundo mensageiro, o monofosfato cíclico de guanosina (GMPC)<sup>17</sup>. Estes estudos estiveram na gênese da compreensão de que os seres vivos, ao longo da sua evolução, não só se adaptaram à coexistência com os radicais livres, como também desenvolveram vários mecanismos para o seu uso vantajoso em várias funções fisiológicas<sup>18</sup>.

As ROS, também denominadas “espécies derivadas de oxigênio”, são produzidas como intermediários das reacções de redução-oxidação (redox), nas quais o O<sub>2</sub> é transformado em H<sub>2</sub>O<sup>19</sup>. Constituem, assim, metabolitos de oxigênio, que podem receber electrões de outras moléculas (oxidação), doar electrões para outras moléculas (redução) ou ainda reagir com outras moléculas e tornarem-se parte dessas (modificação oxidativa)<sup>20</sup>. Compreendem dois grupos principais: os radicais livres (como o O<sub>2</sub><sup>-</sup> e o OH<sup>•</sup>) e os derivados de O<sub>2</sub> não-radicais (como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>21</sup>. Os radicais livres possuem um ou mais electrões desemparelhados e, por isso, têm maior instabilidade e reactividade do que os derivados não radicais, que desta forma, têm uma semi-vida mais longa<sup>19</sup>.

### Formação das ROS

As fontes primárias de ROS são a cadeia transportadora de electrões da mitocôndria e várias oxidases, incluindo a NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, isoenzimas do citocromo P450, glicose oxidase e a NO síntase não conjugada<sup>11,12, 22,23</sup>. Na figura 1 pode ver-se os compostos e as enzimas dos sistemas pró-oxidantes e anti-oxidantes disponíveis no organismo humano.

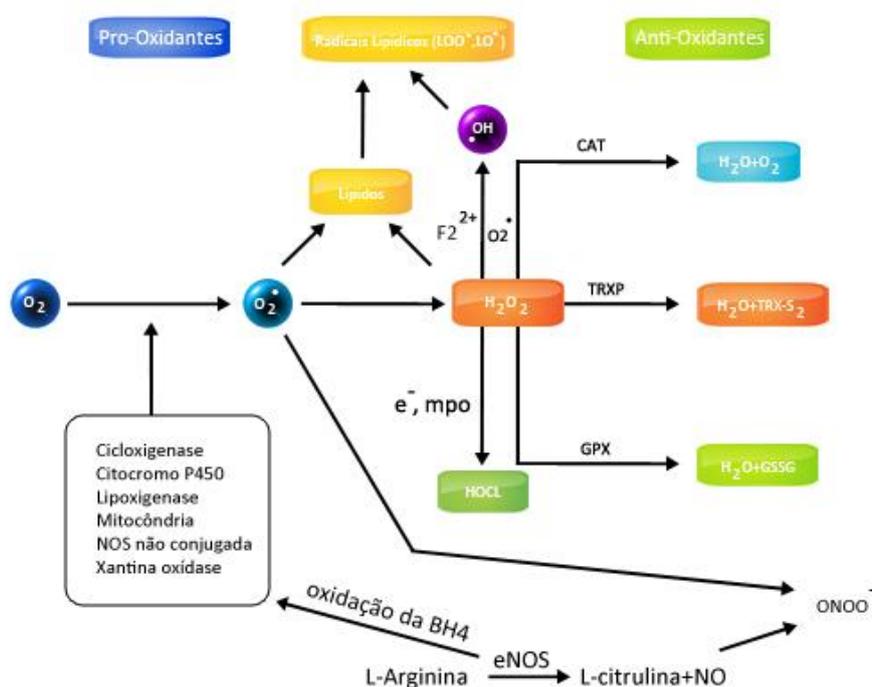


Figura 1: G3nese e metabolismo das esp3cies reactivas de oxig3nio. BH4: tetrabiopterina; CAT: catalase; GPX: glutaciona peroxidase; GSSG: glutaciona oxidada; MPO: mieloperoxidase; NOS: s3ntese do 3xido n3trico; eNOS: s3ntese do 3xido n3trico endotelial; TRXP: tioredoxina. Retirado e adaptado de Harrison D. *et al.* (2009)<sup>20</sup>, Papaharalambus C. *et al.* (2007)<sup>24</sup> e Xu S. *et al.* (2006)<sup>25</sup>.

A primeira reac33o a envolver a s3ntese de uma ROS no organismo 3 a que leva 3 forma33o do radical super3xido ( $O_2^{\cdot -}$ ). Este 3 formado por redu33o, atrav3s da introdu33o de um electr3o na mol3cula de oxig3nio, segundo a reac33o:  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$ . O an3o super3xido 3 uma mol3cula citot3xica, extremamente reactiva, com semi-vida curta e que pode lesar, desnaturar ou modificar as mol3culas cont3guas<sup>11,26</sup>. Por outro lado, sendo uma mol3cula com carga, n3o atravessa as membranas celulares (excepto atrav3s de canais i3nicos) e n3o se distribui muito al3m do seu local de produ33o<sup>19,27</sup>. Esta propriedade do super3xido permite-lhe que o seu poder oxidativo possa ser facilmente compartimentado, tornando-o numa mol3cula microbicida ideal para destruir microorganismos invasores, dentro dos fagossomas de neutr3filos e macr3fagos, sem provocar dano oxidativo ao resto da c3lula<sup>13</sup>. A cadeia transportadora de electr3es da mitoc3ndria 3 a principal fonte de ATP nas c3lulas dos mam3feros e por isso 3 essencial 3 vida. A forma33o de super3xido ocorre principalmente ao n3vel deste organelo celular (figura 1)<sup>18</sup>. Durante a transdu33o de energia, um pequeno n3mero de electr3es reagem prematuramente com o oxig3nio, formando o radical livre an3o super3xido, que tem sido implicado na fisiopatologia de uma variedade de doen3as<sup>18</sup>.

De particular import3ncia no sistema cardiovascular 3 a reac33o directa do super3xido com o mon3xido de azoto (3xido n3trico ou NO) derivado do endot3lio, que 3 provavelmente a mol3cula vasoprotectora end3gena mais importante, levando 3 forma33o de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e 3 redu33o do NO biodispon3vel:  $(O_2^{\cdot -} + NO) \rightarrow ONOO^-$ <sup>13,11</sup>. O peroxinitrito 3 uma esp3cie de nitrog3nio extremamente reactiva, que ataca, desnatura e danifica l3pidos, prote3nas e 3cidos nucleicos<sup>11,28</sup>.

As consequ3ncias da reac33o entre o super3xido e o NO s3o de 2 tipos. Primeiro, h3 redu33o da biodisponibilidade do NO e, desta forma, diminui33o dos efeitos vasoprotectores desta mol3cula (promotora de vasodilata33o e de ac33es anti-ades3o do mon3cito e anti-ateroscler3tica, anti-agregante plaquet3ria e anti-tromb3tica)<sup>29</sup>. Segundo, o produto desta reac33o, o peroxinitrito, tem um potencial oxidante semelhante ao radical hidroxil e tem sido implicado como mediador principal na peroxida33o lip3dica e nitrosila33o das prote3nas, altera33es estas que est3o envolvidas na patog3nese da doen3a cardiovascular<sup>11</sup>.

Normalmente, tal como pode ser observado na figura 1, o super3xido 3 convertido em per3xido de hidrog3nio ( $H_2O_2$ ), que n3o tem carga, e pode assim facilmente difundir atrav3s das membranas celulares<sup>13,27</sup>. Esta reac33o pode ser catalisada espontaneamente ou por uma fam3lia de enzimas denominada super3xido dismutase (SOD). T3m sido descritas tr3s isoformas diferentes de SOD nos mam3feros: isoforma citoplasm3tica (SOD1; SOD cobre/zinco); isoforma mitocondrial (SODMn; SOD que

contém manganésio) e uma SOD extracelular (SODec)<sup>19</sup>:  $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H \rightarrow H_2O + O_2$ <sup>11</sup>. A isoforma mais abundante a nível vascular é a SODec que poderá tornar-se num importante alvo terapêutico<sup>19</sup>.

Apesar de serem denominadas espécies “reactivas” de oxigénio, quer o anião superóxido, quer o peróxido de hidrogénio exibem um grau razoavelmente elevado de discriminação no que toca aos seus alvos biológicos: o anião superóxido reage preferencialmente com grupos ferro-enxofre, encontrados em muitos factores de transcrição. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem como alvo os resíduos cisteína dos canais iónicos, peroxidases, cínases, entre outros<sup>11</sup>. De destacar no sistema cardiovascular é a capacidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de modular as vias de contracção e promotoras do crescimento nas células musculares lisas<sup>30</sup>.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é convertido normalmente em água, ou pela catalase (CAT) ou pela glutathiona peroxidase (GPx). A GPx utiliza a glutathiona reduzida como seu substrato:  $2 H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$  (CAT);  $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$  (glutathiona oxidada)<sup>11</sup>.

No entanto, na presença de dadores de electrões, tais como o ferro (Fe<sup>2+</sup>) ou o cobre (ex. Cu<sup>2+</sup>) ou superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é convertido no radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>):  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$  (Reacção de Fenton);  $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O^2$  (reacção de Haber Weiss)<sup>11</sup>. Este é um dos agentes oxidantes mais potentes alguma vez identificado e que reage indiscriminadamente com a maioria das moléculas biológicas, atacando e desnaturando lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos (ex. ADN). Na verdade, o radical hidroxilo é responsável pela oxidação das lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL) ao nível da parede dos vasos, estando assim intimamente relacionado com a formação das placas ateroscleróticas<sup>13</sup>. Os radicais hidroxilo e peroxinitrito são muito e indistintamente reactivos, de forma que irão reagir com o primeiro substrato com o qual contactem<sup>13</sup>.

As células fagocitárias, na presença de inflamação, convertem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ácido hipocloroso, através da enzima mieloperoxidase (MPO), que é muito abundante nestas células (ver figura 1.):  $H_2O_2 + Cl^- + H \rightarrow HOCl + H_2O$ . O ácido hipocloroso é altamente reactivo e pode oxidar uma variedade de moléculas, incluindo proteínas, causando lesão e disfunção. Os produtos das reacções da MPO são muito abundantes nas placas de aterosclerose<sup>11</sup>.

### **Importância das ROS na fisiologia**

Embora tenham sido inicialmente consideradas produtos tóxicos resultantes do metabolismo celular, sabe-se actualmente que as ROS são ubiqüitárias e que, portanto, podem ser encontrados em todos os sistemas vivos. Reconhece-se ainda que têm um papel nas vias de sinalização sendo, desta forma, fundamentais para a fisiologia celular<sup>20</sup>. Na verdade, um grande número de funções fisiológicas é controlado por vias de sinalização dependentes de ROS, como sejam a produção de NO dependente de ROS; a produção de ROS pela NADPH oxidase das células fagocitárias; produção de ROS pela NADPH oxidase das células não fagocitárias; regulação do tónus vascular e outras funções reguladoras dependentes do NO; produção de ROS, como sensor de alterações da concentração de oxigénio;

regulação *redox* da adesão celular e das respostas imunitárias; apoptose induzida por ROS, entre outros<sup>18</sup>.

No sistema cardiovascular, as principais ROS produzidas são o anião superóxido, o óxido nítrico, o radical hidroxilo e o peroxinitrito<sup>10</sup>. A nível molecular, estas espécies reactivas actuam como moléculas de sinalização, que influenciam diversas vias de transdução do sinal, através da oxidação de resíduos cisteína em determinadas moléculas alvo. Nas células vasculares, as ROS activam canais iónicos (nomeadamente de cálcio e potássio), cínases redox-sensíveis e factores de transcrição, influenciando desta forma o crescimento celular, a inflamação, a apoptose, a senescência, a secreção, a migração, a contracção/dilatação, a permeabilidade, a inflamação e a fibrose. Conclui-se assim que as espécies reactivas de oxigénio têm um impacto fundamental na manutenção da integridade vascular<sup>10</sup>.

## Sistema NADPH oxidase e ROS

### Principal fonte de espécies reactivas de oxigénio nos tecidos

As ROS, a nível vascular, são produzidas por uma grande variedade de enzimas, nomeadamente xantina oxidases, lipoxigenases, cicloxigenases, NO síntases e peroxidases, tal como foi previamente referido<sup>31,22</sup>. No entanto, é de notar, que as NADPH oxidases são um grupo enzimático cuja função primária é a de catalisar a produção de ROS e estão particularmente adaptadas para intervirem nas vias de sinalização *redox*<sup>32</sup>. A NADPH oxidase clássica foi primeiramente descrita e caracterizada em células fagocitárias e considerava-se que era exclusivamente utilizada no mecanismo de defesa contra microrganismos invasores<sup>30</sup>.

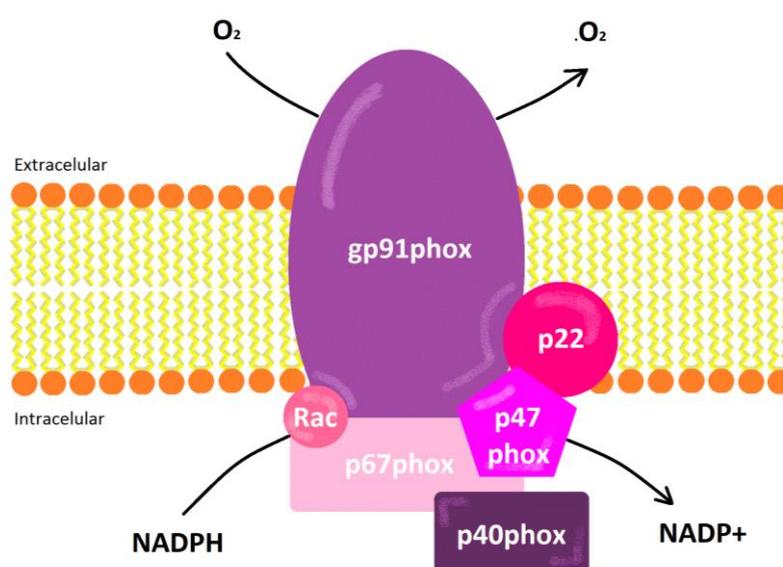


Figura 2: Diagrama esquemático da estrutura do complexo NADPH oxidase activo. Retirado e adaptado de Bengtsson S. et al. (2003)<sup>29</sup>.

Como se pode constatar pela observação da figura 2, a NADPH oxidase constitui um complexo enzimático, do qual fazem parte duas proteínas transmembranares, conhecidas colectivamente como flavocitocromo *b558*: uma subunidade grande, *gp91phox* (onde *phox* significa oxidase fagocítica) e uma subunidade pequena, *p22phox*,<sup>30, 27</sup>. É a este nível que nas células fagocíticas se encontra todo o aparelho transportador de electrões da NADPH oxidase, que catalisa a redução em um electrão da molécula de oxigénio, utilizando para isso a forma reduzida do dinucleotídeo fosfatado de nicotinamida e adenina (NADPH) como dador de electrões<sup>31, 33</sup>. Acopladas ao complexo transmembranar existem três subunidades citoplasmáticas (*p47phox*, *p67phox* e *p40phox*) e uma proteína G de baixo peso molecular (Rac2) (ver figura 2).

Num fagócito em “repouso”, os diferentes elementos do complexo NADPH oxidase encontram-se dispersos em diferentes partes da célula. Quando ocorre um estímulo, os componentes citoplasmáticos deslocam-se para o fagossoma ou para a membrana plasmática e agrupam-se com as proteínas integrais da membrana para formar um complexo enzimático, pronto a funcionar<sup>30</sup>.

Diferentes estudos desenvolvidos ao longo das últimas décadas têm revelado que as NADPH oxidases não se encontram exclusivamente em células fagocitárias, mas numa grande variedade de outras células e tecidos<sup>30</sup>, nomeadamente nas células musculares lisas, células endoteliais, fibroblastos cardíacos e da adventícia das artérias e cardiomiócitos, tal como se pode constatar pela observação do quadro I<sup>32,22</sup>.

Quadro I: NADPH oxidase (NOX) e seus homólogos.

	Distribuição tecidual	Subunidades					Homologia com a NOX2 (%)
		p22phox	p47phox	p67phox	p40phox	Rac	
NOX1	Cólon, tecido muscular liso, útero e próstata.	✓	NOXO1	NOXA1	?	?	56
NOX2	Células fagocíticas, endotélio, cardiomiócito, tecido muscular liso (?) e pulmão.	✓	✓	✓	✓	✓	-
NOX3	Ouvido interno, rim, pulmão, fígado e baço.	?	✓+NoxO1	✓+NoxA1	?	?	58
NOX4	Rim, tecido muscular liso, endotélio e cardiomiócitos.	✓	?	?	?	?	39
NOX5	Tecido linfóide, testículos, próstata, mama e cérebro.	?	?	?	?	?	27

NoxO: *Nox-organizing protein I* (homólogo da *p47phox*); NoxA1: *Nox-activating protein I* (homólogo da *p67phox*); ?: desconhecido.

No entanto, foram identificadas diferenças na actividade bioquímica das oxidases fagocíticas e não fagocíticas, que permitiram concluir a existência de uma família NADPH oxidase, constituída por elementos com diferentes homólogos da subunidade *gp91phox*<sup>32</sup>. Esta família é constituída por 7 membros, Nox1, Nox2 (*gp91phox* – na antiga terminologia), Nox3, Nox4 e Nox5 (NADPH oxidase), Duox1 e Duox2<sup>19</sup>, que são codificados por diferentes genes<sup>32</sup> e dos quais apenas quatro são expressos na parede vascular<sup>13,34</sup>. A Nox1 encontra-se nas células endoteliais e musculares lisas; a Nox2 nas células endoteliais e nos fibroblastos da adventícia (para além de neutrófilos, macrófagos, células T e plaquetas); a Nox 4 nas células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos da adventícia e a Nox5 nas células endoteliais<sup>13</sup>. Todavia, as diferentes Nox podem também ser identificadas noutros tecidos e órgãos extravasculares, tal como pode ser comprovado pela análise do Quadro I.

Existem ainda homólogos dos elementos citoplasmáticos *p47phox* e *p67phox*, que são respectivamente denominados NoxO1 e NoxA1 e que parecem ter uma distribuição tecidual semelhante à Nox1. Considera-se, desta forma, que estejam envolvidos na activação da Nox1. A Rac 2 é uma pequena proteína com actividade enzimática GTPase, que está limitada aos leucócitos. No entanto, a Rac1 (homóloga da Rac 2) é expressa ubiquitariamente e pode substituir o Rac2<sup>13</sup>.

Em termos moleculares, a família Nox pode ser classificada em dois grupos, de acordo com a organização estrutural dos seus domínios transmembranares: as Nox1 a 4 contêm seis domínios transmembranares e ao nível do seu terminal-C citoplasmático contêm locais de ligação NADPH e FAD; a Nox5 tem uma estrutura básica similar mas tem um terminal-N adicional, de ligação do Ca<sup>2+</sup> *calmodulin-like protein*<sup>32</sup>.

### **Regulação da actividade da NADPH oxidase**

Nas células cardiovasculares, a forma como as subunidades de NADPH oxidase interagem entre si e originam o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ainda não é completamente conhecida. No entanto, aparentemente todas as Nox necessitam da subunidade *p22phox* para funcionarem (ver figura 2)<sup>19, 30, 35</sup>. Tal como foi previamente referido, a activação da Nox2 inicia-se com a translocação dos vários componentes citoplasmáticos em direcção ao complexo transmembranar. A ligação do componente *p67phox* ao local de activação da Nox2 dá início à actividade catalítica, mas é necessária a interacção da subunidade *p47phox* com a *p22phox* para facilitar este processo. A união do Rac (Rac 2 ou Rac 1) activado é, também, importante para a total activação da oxidase<sup>32</sup>. A fosforilação *p47phox* constitui um factor chave para a activação da Nox2, na medida em que é fundamental para a sua translocação para o citocromo b558 membranar. Enquanto que a Nox2 necessita das subunidades *p47phox* e *p67phox* para a sua actividade, a Nox1 pode interagir com homólogos destas 2 subunidades, recentemente identificados, o NADPH oxidase *organizer1* (NOXO1) e NADPH oxidase *activator1* (NOXA1), respectivamente (ver quadro)<sup>19</sup>.

Contrariamente, a Nox4 parece ser constitutivamente activa<sup>32</sup>, não necessitando, assim, de nenhuma subunidade citoplasmática para ser funcional<sup>31</sup>, embora isto não tenha sido demonstrado nas células musculares lisas. Permanecem por esclarecer quais os estímulos que poderão activar a Nox4, mas tem sido sugerido que esta isoforma possa ser activada pelo lipopolissacarídeo ou pela insulina<sup>32</sup>.

A Nox1, tal como pode ser observado no quadro 1, encontra-se principalmente nas células epiteliais do cólon, nas células endoteliais e nas células musculares lisas vasculares. Esta isoforma desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro e no crescimento celular. Necessita da subunidade membranar *p22phox* para a sua actividade, assim como das subunidades *p47phox* e *p67phox*. A Nox2 é a subunidade catalítica da oxídase da cadeia respiratória dos fagócitos, mas é também expressa nas células vasculares, cardíacas, renais e nervosas.

A Nox2 humana é uma proteína com uma massa molecular de 70-90 kDa, que é instável sem a subunidade *p22phox* e que necessita das subunidades citoplasmáticas para a sua completa activação. O gene Nox2 localiza-se no cromossoma X e é induzido e altamente regulado pela angiotensina II.

A Nox3 encontra-se distribuída ao nível do tecido fetal e do ouvido interno do adulto, estando envolvida na função vestibular. Não tem sido identificada nas células vasculares nem envolvida na patogénese de doenças cardiovasculares.

A Nox4, inicialmente denominada renox (oxídase renal) devido à sua grande abundância a nível renal, pode também ser encontrada nas células vasculares, nos fibroblastos e osteoclastos (Quadro I). Tem sido também encontrada no retículo endoplasmático e no núcleo de células vasculares. Enquanto que a Nox4 produz principalmente  $H_2O_2$ , a Nox1 dá origem a  $O_2^{\cdot-}$ , que é subsequentemente convertido a  $H_2O_2$ . Esta diferença, no que concerne aos produtos resultantes das acções das Nox1 e Nox4 pode contribuir para distinguir os papéis destas, na sinalização celular. Os dados obtidos experimentalmente sobre a regulação da Nox4 são controversos. No entanto, tem sido relatado que forma um heterodímero com a *p22phox* para a completa estabilização e actividade do complexo enzimático. Constatou-se, que a formação de ROS pelas Nox1, Nox2 e Nox3 é inibida por uma mutação na região rica em prolina da subunidade *p22phox*. Todavia, a actividade da Nox4 não é inibida por esta mutação. Acresce ainda que a Nox4 parece não necessitar das subunidades *p47phox*, *p67phox*, *p40phox* ou Rac para a sua activação. Foi, contudo, recentemente identificada uma proteína que se liga à Nox4 (a NoxR1) e que parece ser importante para a sua regulação. Ao nível vascular, concretamente no que respeita ao tecido muscular liso e às células endoteliais, a Nox4 tem sido implicada na migração celular, proliferação, angiogénese e diferenciação celular. No rim, a Nox4 parece regular a síntese de eritropoetina, funcionando, para isso, como um sensor de oxigénio. Neste órgão, o excesso de produção de ROS tem consequências fisiopatológicas importantes, porque está associado a lesão tecidual e reacções inflamatórias que afectam a fisiologia normal das células tubulares e glomerulares.

A Nox5 é um homólogo dependente do  $Ca^{2+}$ , que pode ser encontrado nos testículos, no tecido linfocítico e nas células vasculares, tendo sido identificadas quatro variantes de Nox5, nomeadamente a Nox5a, Nox5b, Nox5g e Nox5d. Tal como foi anteriormente referido, contrariamente a outras Nox

vasculares, a Nox5 possui um domínio terminal amino *calmodulin-like*, com quatro locais de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$  e, não necessita da subunidade p22*phox* ou outras subunidades para a sua activação. A regulação da Nox5 é feita directamente pelo cálcio intracelular, cuja ligação induz uma alteração configuracional, com consequente aumento da produção de ROS. Ainda não é conhecida a importância funcional da Nox5 vascular. No entanto, tem sido implicada na proliferação de células endoteliais e angiogénese, na proliferação das células musculares lisas vasculares induzida pelo factor de crescimento derivado de plaquetas e no dano oxidativo provocado pela aterosclerose. Na verdade, foi demonstrado que a Nox5 vascular é activada pela trombina, pelo factor de crescimento derivado de plaquetas e pela ionomicina. As Duox1 e Duox2 são as Nox tireoideias envolvidas na biossíntese de hormonas tireoideias. Desconhece-se se desempenham algum papel na função vascular<sup>10</sup>.

De uma forma geral, a NADPH oxidase é activada por vários factores de crescimento, citocinas, *shear stress* e hormonas vasoactivas, tais como a bradicinina, trombina, endotelina e angiotensina II<sup>36,37,38</sup>.

### ***Polimorfismos genéticos da NADPH oxidase - implicações na fisiopatologia das doenças cardiovasculares***

A NADPH oxidase é regulada por uma variedade de factores fisiopatológicos importantes, nomeadamente factores humorais e mecânicos que interagem com predisposições genéticas<sup>30</sup>. Os factores humorais relacionados com as doenças cardiovasculares regulam a expressão e actividade da NADPH oxidase vascular. No entanto, estão também envolvidos na activação desta enzima nas células mononucleares. Entre estes factores destacam-se: factores de crescimento, como o factor derivado de plaquetas (PDGF), o factor de crescimento epidérmico (EGF) e o factor transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); citocinas, como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1) e o factor de agregação plaquetar; factores metabólicos, como a hiperglicemia, hiperinsulinemia, ácidos gordos livres (AGL), produtos terminais de glicação avançada (AGE) e agonistas de receptores acoplados a proteínas G como a serotonina, trombina, bradicinina, endotelina e angiotensina II)<sup>19</sup>. Por outro lado, também as forças mecânicas, incluindo o estiramento cíclico e o *shear stress* laminar e oscilatório, estimulam a NADPH oxidase vascular. Finalmente, determinados condicionantes genéticos podem regular a produção de superóxido pela NADPH oxidase. Neste âmbito, identificou-se que mutações nos genes que codificam as proteínas gp91*phox*, p22*phox*, p47*phox* e p67*phox* provocam doença granulomatosa crónica, que é um distúrbio hereditário raro do sistema imunitário inato<sup>30</sup>. Assim sendo, e considerando a elevada prevalência de várias DCV a nível mundial, o estudo dos vários polimorfismos genéticos relativos às diferentes subunidades da NADPH oxidase tem vindo a conquistar a atenção da comunidade científica.

Estudos desenvolvidos com a finalidade de identificar a importância das diferentes subunidades de NADPH oxidase na regulação da função deste heterodímero, permitiram reconhecer que os pacientes com doença granulomatosa crónica e com proteínas Nox2 não detectáveis apresentavam deficiência de

p22 $phox$ . Concludentemente, a proteína p22 $phox$  é uma subunidade fundamental para o funcionamento desta oxidase. Compreende-se assim que, de entre os genes que codificam os componentes da NADPH oxidase, aquele que ao longo da última década tem suscitado maior interesse é o gene que codifica a proteína p22 $phox$ .

Actualmente, considera-se que a p22 $phox$  interage com as Nox1, Nox2, Nox3 e Nox4 e que a sua ligação aos restantes heterodímeros proporciona uma estabilização do complexo proteico. No ser humano, a p22 $phox$  é codificada pelo gene CYBA, que se localiza no braço longo do cromossoma 16 na posição 24 . Trata-se de um gene que pesa 8,5 Kb e é composto por 6 exões e 5 intrões que codificam um RNA de 600 pb. Têm sido identificados vários polimorfismos genéticos, ao nível do promotor e das sequências de exões do gene p22 $phox$ , alguns dos quais são capazes de influenciar a expressão genética e a activação da NADPH oxidase. Desta forma conduzem a uma variação funcional significativa relativa ao stress oxidativo, entre diferentes indivíduos. Além disso, alguns destes polimorfismos têm sido associados com diversas doenças cardiovasculares, tal como a HTA essencial, a doença arterial coronária, doença cerebrovascular e nefropatia diabética e não diabética, tal como se pode observar pela análise do quadro II.

Quadro II: Associação do polimorfismos do gene CYBA, que codifica a proteína p22 $phox$ , com o risco de desenvolver doença cardiovascular

Polimorfismo Genético	Risco Cardiovascular	Doença cardiovascular
C242T	HTA essencial	Doença coronária
	Diabetes mellitus	Doença cerebrovascular
	Hipercolesterolemia	Nefropatia
	Tabaco	
A640G	Diabetes mellitus	Doença coronária
-930 <sup>A/G</sup>	HTA	
	Diabetes mellitus	
-675 <sup>A/T</sup>	HTA	

Retirado e adaptado de San Jose G. *et al.* (2008)<sup>30</sup>.

O polimorfismo C242T localiza-se no exão 4 e codifica uma alteração no codão do tipo CAC→TAC, resultando numa substituição não conservativa de um resíduo histidina (His<sup>72</sup>) por um resíduo tirosina. Esta alteração pode destruir o local de ligação heme da proteína p22 $phox$ . Tem sido sugerido que o polimorfismo C242T afecta a actividade funcional da NADPH oxidase, quer em condições fisiológicas, quer patológicas e que a substituição do resíduo His<sup>72</sup> por tirosina leva a uma perda de função oxidativa e a uma diminuição da produção de ROS e stress oxidativo a nível vascular. No que concerne especificamente à associação deste polimorfismo com a HTA, Raijmakers *et al.* (2002) relatou uma

ausência de associação entre o polimorfismo C242T e pré-eclâmpsia<sup>39</sup>, enquanto que Moreno *et al*, (2006) encontrou uma associação significativa entre o mesmo polimorfismo e HTA numa população caucasiana<sup>40</sup>.

Por sua vez, o polimorfismo -930<sup>A/G</sup> localiza-se na região promotora do CYBA, na posição -930 do codão ATG e foi inicialmente associado a HTA essencial numa população espanhola de 156 indivíduos<sup>41</sup>. Esta associação foi corroborada por um estudo levado a cabo numa população maior, com 623 indivíduos, na qual se identificou um aumento significativo na frequência do alelo G em indivíduos hipertensos<sup>42</sup>. A associação deste polimorfismo à HTA foi também confirmada por Kokubo *et al*. em 2005<sup>43</sup>. Aqueles autores mostraram que o genótipo GG (comparado com o GA+AA), numa população de 3652 indivíduos japoneses do sexo masculino estava associado a hipertensão. Apesar de haver alguma controvérsia acerca da associação deste polimorfismo com outras doenças cardiovasculares, a importância da sua potencial funcionalidade na HTA foi reafirmada por San José *et al*. (2004)<sup>42</sup> que demonstrou que indivíduos hipertensos com o genótipo GG apresentam aumento significativo dos níveis proteicos e de RNAm da p22<sup>phox</sup> fagocítica e aumento da actividade da NADPH oxidase<sup>42</sup>. Por outro lado, a produção de NO foi menor em doentes hipertensos com genótipo GG do que com genótipo AA/AG, o que sugere a repercussão funcional fenotípica do polimorfismo -930A/G.

O polimorfismo -675<sup>A/T</sup> localiza-se na região promotora do gene CYBA na posição -675 do codão ATG. A mudança do alelo T pelo alelo A parece estar envolvida na eliminação de uma sequência alvo potencial para a ligação do factor de transcrição HIF-1 $\alpha$  (factor-1 $\alpha$  indutível pela hipóxia). San-José *et al* (2008) identificaram a associação deste polimorfismo à HTA essencial, demonstrando que a prevalência do genótipo TT era superior em hipertensos, comparativamente a normotensos<sup>44</sup>. Demonstraram ainda, que para além de níveis tensionais mais elevados, os indivíduos dentro do grupo de hipertensos e com genótipo TT, tinham também maior espessamento das camadas íntima e média da artéria carótida, comparativamente aos genótipos TA/AA o que traduzia o desenvolvimento de um processo aterosclerótico subclínico mais precoce. Este polimorfismo está também associado à activação da NADPH oxidase nas células fagocíticas<sup>30</sup>.

É de realçar ainda que a expressão da Nox2 e muitos dos seus “reguladores” estão aparentemente sobre-expressos na presença de factores de risco cardiovasculares. Este facto, juntamente com a capacidade da NADPH oxidase (isoforma Nox2) de gerar níveis elevados (tóxicos) de ROS, torna-a uma candidata muito forte a ser um alvo terapêutico na doença cardiovascular<sup>13</sup>.

## STRESS OXIDATIVO

---

O stress oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio que ocorre no estado *redox* de um sistema, no qual o potencial oxidante prevalece sobre as moléculas anti-oxidantes, determinando assim um

aumento da disponibilidade de ROS, que conseqüentemente lesam os diferentes componentes celulares e conduzem a vários processos fisiopatológicos<sup>30</sup>. O aumento da biodisponibilidade das espécies reactivas pode ser devido ao incremento da sua formação, ao comprometimento do sistema antioxidante ou somatório de ambos.

### *Defesas antioxidantes*

Ao longo da evolução, de forma a assegurar a sua sobrevivência, os seres vivos foram desenvolvendo mecanismos de defesa, designadamente no que concerne ao stress oxidativo. É este sistema de defesa que permite que em condições normais, as ROS e os produtos que resultam das suas reacções bioquímicas sejam neutralizados e transformados em moléculas inócuas para o organismo<sup>11</sup>. O sistema antioxidante natural consiste de uma complexa organização bioquímica, disposta de acordo com os compartimentos intra e extracelular, e da qual faz parte uma grande quantidade de enzimas e moléculas antioxidantes. Estes mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos têm origem em fontes endógenas e exógenas<sup>11</sup>, e mesmo em baixas concentrações, atrasam ou previnem significativamente a oxidação de um substrato oxidável<sup>19</sup>.

Tal como se encontra ilustrado na fig.1, as principais enzimas que participam nos processos antioxidantes a nível vascular são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (TRXP). A SOD é responsável pela catálise da dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  e, das suas 3 isoformas referidas anteriormente, a SOD extracelular é a de maior importância a nível vascular. A sua produção e secreção ocorrem ao nível da célula muscular lisa, ligando-se posteriormente aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular, na superfície da célula endotelial, desempenhando, desta forma, um papel essencial na regulação do estado redox no interstício vascular<sup>45</sup>.

Nas células vasculares, a glutathione reduzida desempenha um papel basilar na regulação do estado redox intracelular, provendo equivalentes redutores a várias vias bioquímicas<sup>46</sup>. De entre estas reacções, é de destacar aquela em que a glutathione peroxidase reduz o  $H_2O_2$  e os peróxidos lipídicos a água e álcoois lipídicos, oxidando, para isso, a glutathione reduzida a dissulfido de glutathione (glutathione oxidada).

A catalase é, igualmente, uma enzima intracelular antioxidante, que se encontra predominantemente ao nível dos peroxissomas, mas também, em alguma percentagem, no citoplasma das células. Caracteristicamente é muito activa quando existem níveis elevados de stress oxidativo dentro das células e, quando tal acontece, catalisa o  $H_2O_2$  em água e oxigénio molecular, protegendo assim, os elementos intracelulares dos efeitos nocivos do peróxido de hidrogénio<sup>47</sup>.

Por último, a tioredoxina redutase é uma enzima do sistema antioxidante responsável por reduções dependentes do grupo tiol<sup>48</sup>.

Tal como foi referido, os compostos anti-oxidantes podem ser subdivididos em enzimáticos e não-enzimáticos. De entre as moléculas não enzimáticas são de destacar, alguns anti-oxidantes não específicos, como a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e a vitamina C (ácido ascórbico), que exercem a sua acção, sequestrando radicais livres, tais como o OH $\cdot$  (vitamina C).

É ainda importante constatar que quando uma molécula anti-oxidante reage com uma ROS, torna-se ela mesma num radical livre que tem, também, de ser neutralizado por outra molécula ou enzima antioxidante. Concludentemente, o consumo elevado de antioxidantes pode paradoxalmente principiar ou agravar os níveis de stress oxidativo, por acúmulo de radicais livres, resultantes da sua actividade antioxidante. Este facto talvez justifique a conclusão obtida por alguns estudos no âmbito da prevenção da doença cardiovascular, e mesmo neoplásica, em que se verificou o aumento do risco de doença, em vez da sua diminuição, quando se fazia suplementação com vários anti-oxidantes. Estas conclusões permitem, assim, destacar a importância do equilíbrio do sistema anti-oxidante na conservação da saúde e prevenção da doença.<sup>11</sup>

Apesar de na HTA o excesso de formação de ROS ser a causa mais comum de stress oxidativo, parece haver também eventualmente uma redução primária do sistema anti-oxidante. Constata-se, a título de exemplo, que ratos com uma deficiência hereditária de SOD mitocondrial, demonstram uma HTA sensível ao sal e ratos com depleção de glutatona, que exibem um aumento dos valores tensionais<sup>11</sup>. Por outro lado, e como acima mencionado, o stress oxidativo constante pode esgotar os sistemas não enzimáticos e inactivar as enzimas anti-oxidantes e, assim, secundariamente haver um enfraquecimento das defesas anti-oxidantes.

### ***Stress oxidativo e HTA, causa e o efeito?***

Ao longo dos últimos anos tem vindo a aumentar a consistência acerca de uma relação causal entre stress oxidativo, HTA e inflamação. Esta evidência assenta na constatação de uma forte associação entre HTA e stress oxidativo, ao nível dos principais órgãos relacionados com esta patologia, ou seja, rim, vasos sanguíneos e cérebro, em quase todas as formas de HTA, quer adquirida, quer hereditária, em animais de experiência<sup>12</sup>. Foi também constatado que a utilização de doses farmacológicas de antioxidantes reduz a PA em ratos hipertensos, contrariamente ao que acontece em normotensos<sup>11</sup>. Vaziri et al. (2008) considera que constituem evidências directas para esta relação causal os seguintes factos: a indução do stress oxidativo em animais geneticamente não modificados provoca HTA; animais de experiência com deficiência de SODMn demonstram HTA sensível ao sal; a Ang II quando estimula o receptor de tipo 1 (AT1) provoca a activação da NADPH oxidase a nível vascular e renal, com consequente aumento dos níveis de ROS e HTA, resposta esta que é reduzida pela administração de um inibidor da NADPH oxidase e pela supressão da expressão da subunidade p22phox. Conclui-se assim, que as espécies reactivas de oxigénio desempenham um papel fundamental na acção pró-hipertensora exercida pela Ang II.

Todavia, na verdade não só o stress oxidativo origina HTA, como também a HTA predispõe à formação de stress oxidativo, estando, desta forma, envolvidos num ciclo vicioso em que cada um tem capacidade para causar o outro. Vaziri et al. (2008) considera como confirmadora desta assunção a presença de stress oxidativo na região a montante de uma coarctação da aorta abdominal em animais de experiência, mas não na região a jusante. Tendo em conta que ambas as regiões estão sujeitas ao mesmo fluxo sanguíneo, à mesma acção hormonal e mesmos factores humorais, o aumento do stress oxidativo é devido à HTA e ao shear stress<sup>11</sup>.

Conclui-se assim que estas duas entidades constituem um ciclo vicioso de génese de HTA, incremento do stress oxidativo sustentado e maiores níveis de pressão arterial, que consequentemente levam a aceleração do processo aterosclerótico e a outras modificações estruturais do aparelho cardiovascular, com as previsíveis lesões de órgão-alvo e inerentes morbidade e mortalidade.

## ***Mecanismos através dos quais o stress oxidativo aumenta a PA***

---

### ***a) Afecção do metabolismo do NO e da fisiologia vascular***

O stress oxidativo pode aumentar a PA, através do envolvimento directo das ROS no metabolismo do NO, o que por um lado diminui a sua biodisponibilidade e por outro atenua a sua síntese, nos tecidos e órgãos-chave envolvidos na regulação da pressão arterial. A diminuição da biodisponibilidade do NO ocorre através da reacção directa das ROS com o NO, que desta forma, o inactivam (figura 1). Todavia, as espécies reactivas diminuem também a disponibilidade da tetrahidrobiopterina (BH4), que é um co-factor importante para a funcionalidade da NOS, provocando assim o desacoplamento da eNOS, o que consequentemente conduz à diminuição da formação do NO. Por outro lado, as ROS inibem a dimetilamino-hidrolase dimetilarginina, que é a enzima que metaboliza a dimetil-arginina assimétrica (ADMA), o que resulta na acumulação deste substrato, que é um potente inibidor endógeno da NOS. Acresce ainda que há também um aumento da expressão da enzima que catalisa a formação da ADMA<sup>11</sup>.

A diminuição da disponibilidade do NO vascular e, consequentemente do seu efeito vasodilatador, por acção do stress oxidativo, pode aumentar as resistências vasculares sistémicas e, assim, a PA. Adicionalmente, a nível renal, a redução da disponibilidade do NO, pode aumentar a resistência vascular renal, amplificar a reabsorção tubular de sódio e água e, desta forma, provocar uma expansão do volume extracelular, com consequente aumento da HTA. Por sua vez, a diminuição do NO cerebral pode aumentar a actividade do sistema nervoso simpático, que pode cooperar para o aumento da PA<sup>11</sup>. Finalmente, a nível vascular sistémico, o stress oxidativo pode promover a disfunção endotelial, quer pela redução do NO, quer pela promoção da aterosclerose. Na verdade, as ROS fomentam a adesão de monócitos à parede vascular, a oxidação das moléculas LDL, a apoptose de células endoteliais, a

formação das células espuma e o conseqüente desenvolvimento de estrias lipídicas e placas de ateroma. As espécies reactivas promovem ainda a remodelação vascular (com acumulação de matriz proteica, migração, transformação e proliferação de fibroblastos). Estas alterações da parede vascular permitem a manutenção da HTA e a progressiva arteriosclerose e trombose.<sup>11</sup>

Ao nível da membrana celular, as ROS levam à oxidação não-enzimática do ácido araquidónico em lipoproteínas e fosfolípidos, de cuja reacção resulta a formação de produtos pró-inflamatórios vasoconstritivos, tais como os isoprostanos, que podem contribuir para o aumento da PA e complicações renais e cardiovasculares<sup>11</sup>.

Finalmente, as ROS podem aumentar a concentração do cálcio ionizado ao nível do citoplasma das células musculares lisas, o que em última instância aumenta o tónus muscular<sup>11</sup>.

Por tudo o que foi dito, compreende-se que o stress oxidativo pode favorecer o desenvolvimento de HTA e doença cardiovascular através lesão e disfunção endotelial<sup>11</sup>.

### **b) Indução da inflamação**

O stress oxidativo e a inflamação estão inextricavelmente ligados, sendo que um gera o outro para dar origem a um circuito de *feedback* positivo, em que o aumento do stress oxidativo leva ao incremento do processo inflamatório e, os mediadores da inflamação activam de forma intensa as várias espécies reactivas<sup>12</sup>. Neste contexto, as ROS resultantes da génese do stress oxidativo activam as vias intracelulares de transdução do sinal redox-sensíveis, nas quais se incluem a cínase N-terminal do c-Jun (JNK), a proteína cínase activada pelo mitogénio (MAPK), e factores de transcrição como a proteína-1 activadora (AP-1), e o factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$  B)<sup>12</sup>. Este último é activado por concentrações micromolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e constitui um factor geral de transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias, quimocinas e moléculas de adesão<sup>12</sup>. Por outro lado, o stress oxidativo induz ainda as proteínas do choque tóxico que, por sua vez, estimulam também a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão das moléculas de adesão como a selectina-E, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), molécula de adesão das células vasculares (VCAM1).<sup>12</sup> O conjunto destes eventos culmina com a activação de leucócitos, a sua conseqüente infiltração dos tecidos (i.e. inflamação), com aumento acrescido da produção de ROS por estas células e por aquelas que residem a nível tecidual, tais como macrófagos, células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos. Desta forma, se compreende o circuito de *feedback* positivo que se estabelece entre o stress oxidativo e a inflamação.

Acresce ainda o facto de que na medida em que a produção de ROS é uma característica fisiológica intrínseca das células imunitárias activadas, que constituem a imunidade inata, a sua simples activação vai ser responsável pelo aumento do stress oxidativo nos tecidos afectados. Este stress oxidativo irá entrar também no circuito previamente referido, intensificando adicionalmente o processo inflamatório.

### ***c) Interação com o sistema renina-angiotensina (SRA)***

A angiotensina II para além do seu papel fundamental no desenvolvimento de HTA, na medida em que provoca a retenção de sódio (via libertação de aldosterona), tem ainda capacidade para promover a inflamação e stress oxidativo a nível renal e vascular.

Na verdade, evidência crescente sugere que a formação de ROS e a activação das cascatas de oxidação-redução, mediadas pela NADPH oxidase, estão envolvidas de forma crítica na HTA induzida pela Ang II<sup>49</sup>. A Ang II exerce a sua acção através de dois receptores distintos: os receptores tipo 1 (AT1) e os receptores tipo 2 (AT2). Apesar de o receptor AT2 estar expresso em pequena quantidade nos adultos, encontra-se sobre-expresso em estados patológicos, tais como na lesão vascular, na depleção salina, na insuficiência ou hipertrofia cardíacas. Os estudos realizados indicam que os efeitos resultantes da estimulação do receptor AT1 são opostos aos consequentes à activação do receptor AT2. Enquanto a estimulação do receptor AT1 estimula o crescimento celular, a angiogénese e a vasoconstrição, a activação do receptor AT2 desencadeia precisamente os efeitos opostos, ou seja, anti-proliferação, anti-angiogénese e vasodilatação. Desta forma, os receptores AT1 e AT2 são os candidatos ideais para a manutenção do equilíbrio entre as acções do NO e das ROS<sup>49</sup>. A Ang II, actuando através do receptor AT1, estimula a NADPH oxidase, levando consequentemente à acumulação dos radicais livres superóxido, peróxido de hidrogénio e peroxinitrito<sup>12, 38, 46</sup>. Assim, nos estados patológicos, a estimulação do receptor AT1 pela Ang II, que se encontra em níveis circulatórios e tecidulares aumentados, irá produzir uma resposta inflamatória. Pelo contrário, o bloqueio do receptor AT1, aquando do aumento dos níveis de Ang II, irá permitir a estimulação do receptor AT2 e, assim, obter os efeitos benéficos dos bloqueadores dos receptores da angiotensina<sup>28, 49</sup>. Concomitantemente, a Ang II estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimocinas, factores de crescimento e moléculas de adesão, que causam inflamação e fibrose<sup>12</sup>. Por sua vez, a nível renal, a inflamação promove a produção de Ang II, pelas células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e macrófagos e pelas células epiteliais tubulares<sup>12</sup>. Este facto tem sido observado em estudos levados a cabo em animais hipertensos<sup>12</sup>. Na verdade, tem sido constatado que no rim, o stress oxidativo mediado pela Ang II e pela inflamação tem efeitos importantes na função e estrutura vascular renal. A título de exemplo, uma infusão contínua de uma dose de Ang II, que aumente ligeiramente a pressão arterial em animais de experiência, provoca uma HTA sustentada, que é caracterizada pelo aumento da expressão da NADPH oxidase e consequentemente da formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Simultaneamente, há também disfunção endotelial, com diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina ao nível das arteríolas aferentes. Se adicionarmos tempol, que é um fármaco que penetra intracelularmente e que mimetiza a enzima superóxido dismutase, a resposta vasodilatadora que ocorre em resposta à acetilcolina é recuperada<sup>50</sup>. Acresce ainda que a infusão de uma dose de Ang II que aumenta ligeira e sustentadamente a PA leva a uma contracção exagerada do músculo liso vascular. A contracção muscular lisa é primariamente mediada pela activação dos receptores prostanóides, que é feita pelo tromboxano A2. Este é um prostanóide vasoconstritor

resultante da acção da cicloxigenase 2 sobre o ácido araquidónico<sup>51</sup>. Conclui-se portanto, que a angiotensina II está intimamente envolvida no ciclo vicioso, do qual fazem parte o stress oxidativo e inflamação<sup>12</sup>.

No rim encontram-se presentes todos os elementos do sistema renina-angiotensina (SRA), nomeadamente o angiotensinogénio, a enzima conversora da angiotensina (ECA), a Ang II e os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> da Ang II. Navar *et al.* (2002, 2004) demonstrou que o SRA intra-renal funciona independentemente dos factores que regulam a actividade plasmática deste mesmo sistema<sup>52, 53</sup> e esta assunção foi exemplificada por Vanegas (2005), que demonstrou que o desenvolvimento de nefrite intersticial e HTA está associado a um aumento da concentração intra-renal de Ang II, mas sem alteração dos seus níveis plasmáticos<sup>54</sup>.

Contrariamente ao que acontece quando há uma activação patológica do SRA, a sua activação fisiológica não provoca stress oxidativo ou inflamação<sup>12</sup>, o que parece pressupor a existência de condições facilitadoras, das quais a HTA pode fazer parte.

#### d) Alterações da fisiologia renal

No rim, os diferentes componentes da NADPH oxidase são expressos na maioria dos seus elementos estruturais, nomeadamente nas células renais, vasos sanguíneos, glomérulos, podócitos, fibroblastos intersticiais, porção espessa medular da ansa de Henle, mácula densa, tubo contornado distal e ducto colector<sup>20</sup>, e podem ser activados por inúmeros estímulos. Alguns dos efeitos das ROS a nível renal estão sumariados na figura 3.

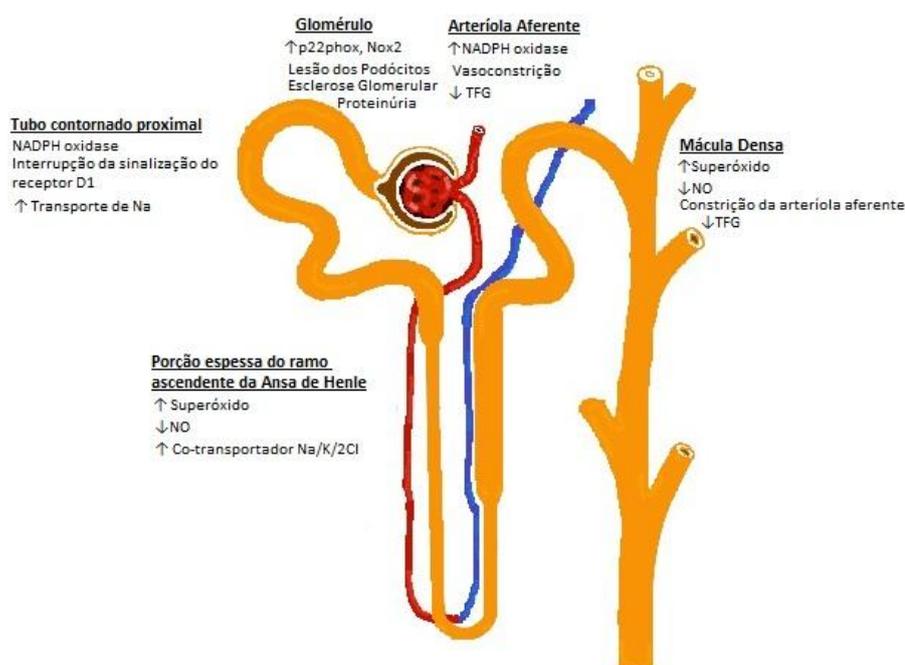


Figura 3: Representação esquemática de um glomérulo justamedular, demonstrando os locais de produção de ROS e seus potenciais papéis no transporte e reabsorção de sódio e regulação da pressão arterial. D1: receptor tipo 1 da dopamina; Na: sódio; NO: óxido nítrico TFG: taxa de filtração glomerular. Retirado e adaptado de Harrison DG. & Gongora MC. (2009)<sup>20</sup>.

Tal como se encontra ilustrado, neste órgão, os principais alvos do stress oxidativo são a arteríola aferente, o glomérulo, o tubo contornado proximal, a porção espessa do ramo ascendente da ansa de Henle e a porção cortical do tubo colector. De forma semelhante à que ocorre em outros vasos, o aumento do stress oxidativo a nível da arteríola aferente pode diminuir a biodisponibilidade do NO, aumentando, desta forma, a vasoconstrição arteriolar aferente e, conseqüentemente reduzir a taxa de filtração glomerular (TFG)<sup>20</sup>. Estudos realizados em animais de experiência demonstraram que a HTA induzida pela Ang II amplifica a expressão da subunidade *p22phox*, estimula a actividade da NADPH oxidase e provoca disfunção endotelial nas arteríolas aferentes<sup>55</sup>.

No glomérulo renal, a lesão dos podócitos, que precede o aparecimento de proteinúria, é evidente numa fase precoce da instalação de HTA sensível ao sal, em ratos Dahl, e é revertida pelo bloqueio da aldosterona. No entanto, estas alterações estruturais não são melhoradas com doses equi-hipotensivas de hidralazina. Na verdade, existe uma sobre-expressão da subunidade *p22phox* e da *Nox2* nos glomérulos destes animais<sup>56</sup>. A importância das ROS na lesão glomerular é suportada, ainda, pela constatação de que o tempol (um *scavenger* de radicais livres) diminui a esclerose glomerular e a proteinúria em ratos Dahl sensíveis ao sal,<sup>57</sup>.

As células do tubo contornado proximal também contêm os diferentes componentes da NADPH oxidase, onde são mantidos num estado inactivo. Os agonistas dos receptores D1 da dopamina inibem a NADPH oxidase desta porção tubular, enquanto que a Ang II a estimula<sup>20</sup>. As ROS e a NADPH oxidase têm ainda uma função fundamental na modulação do transporte de sódio, através da alteração da função de troca das ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e ATPase  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que existem ao nível das membranas, basal e apical, (respectivamente) das células tubulares proximais<sup>58, 59-60</sup>. Esta modulação é possível, na medida em que o transporte de sódio é estimulado pela Ang II e inibido pela dopamina, e o stress oxidativo aumenta o efeito da Ang II e perturba a sinalização da dopamina, aumentando, desta forma, o transporte de sódio a nível do tubo proximal<sup>59-60</sup>. A forma como as células tubulares proximais são afectadas pelas ROS, NO e outras alterações fisiopatológicas que ocorrem na HTA, é um alvo recente de grande investigação<sup>20</sup>.

Um outro mecanismo importante através do qual as ROS, a nível do córtex renal, podem modular o metabolismo do sódio, é através da alteração do *feedback* tubuloglomerular, que é um fenómeno mediado pela interacção da mácula densa com a porção ascendente da ansa de Henle, quando esta entra em contacto com o seu próprio glomérulo. A mácula densa é sensível à concentração de sódio ao nível do tubo proximal, através do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ . Este co-transportador estimula moléculas sinalizadoras, nomeadamente o NO produzido pela NO síntase neuronal, que dilata as arteríolas aferentes e aumenta a filtração glomerular<sup>20, 61</sup>. Do exposto anteriormente, compreende-se

que um aumento do  $O_2^{\cdot-}$  no interior ou na proximidade da mácula densa, pode diminuir a biodisponibilidade do NO, levando a uma vasoconstrição da arteríola aferente e conseqüente redução da TFG<sup>20</sup>.

O stress oxidativo na medula renal tem sido associado à reabsorção de sódio e à modulação da pressão arterial. Tal como em outros vasos sanguíneos, existe um balanço entre o  $O_2^{\cdot-}$  e o NO formados ao nível das células da medula, incluindo as células epiteliais da porção ascendente espessa da ansa de Henle e os pericitos dos vasos rectos. Wu et al. (1999) constatou que há marcadamente uma maior actividade da NO síntase ao nível da medula renal do que no córtex<sup>62</sup>, facto que parece contribuir para uma regulação independente da perfusão cortical e medular. Na verdade, as células da porção espessa da ansa de Henle libertam NO, que difunde para os pericitos próximos dos vasos rectos, promovendo a vasodilatação destes vasos<sup>63-64</sup>. Assim, há um incremento do fluxo medular e, aumentando as forças de *Starling* intersticiais, ocorre o movimento de sódio para os tubos, com amplificação da natriurese e diurese. A inibição da NO síntase medular com o L-NAME (éster da metil-L-nitroarginina) provoca uma redução marcada da perfusão medular e promove a reabsorção de sódio sem alterar o fluxo cortical, o que é também a favor do funcionamento independente desta enzima, relativamente à NO síntase cortical<sup>20</sup>. Tal como foi referido anteriormente, todos os componentes da NADPH oxidase estão presentes na medula renal e podem ser activados pela Ang II sistémica ou produzida localmente, com aumento conseqüente do  $O_2^{\cdot-}$ . Este radical livre leva a uma vasoconstrição dos vasos rectos e reduz as forças de *Starling*, favorecendo o movimento do sódio para dentro destes vasos. Há assim, uma diminuição da natriurese e aumento da pressão arterial.

Em suma, todas estas considerações relativas às diferentes acções das ROS no controlo da função renal enfatizam a importância do seu papel, não só como mediadores fisiopatológicos, mas também como sendo fundamentais para a fisiologia renal normal, na qual permitem a modulação do equilíbrio do sódio.

### **e) Interação com sistema nervoso central (SNC)**

O SNC é necessário para a produção e manutenção da maioria das formas de HTA experimental, quer pela acção nervos simpáticos eferentes, quer de hormonas, tais como a Ang II e a aldosterona, que exercem os seus efeitos pró-hipertensores a nível sistémico, mas também central<sup>20</sup>. Fortemente a favor deste facto, é a evidência de que a destruição de uma região do prosencéfalo, que circunda o terceiro ventrículo cerebral antero-ventral (AV3-V), previne o desenvolvimento de muitas formas de HTA induzida em animais de experiência<sup>65</sup>. Esta região prosencefálica inclui a eminência pré-óptica mediana, o *organum vasculosum* da porção lateral terminal e o núcleo periventricular pré-óptico, tal como se pode observar na figura 4<sup>20</sup>.

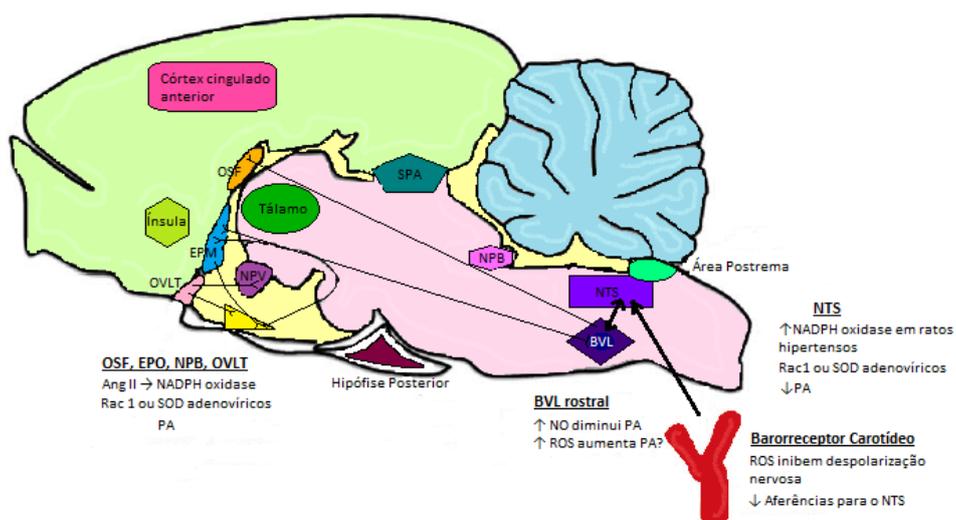


Figura 4: Representação esquemática de um cérebro demonstrando os centros que se pensa estarem afectados pelas ROS na HTA. BVL: bolbo ventro-lateral; EPM: eminência pré-óptica mediana; NPB: núcleo parabraquial; NTS: núcleo do tracto solitário; NPV: núcleo paraventricular; OSF: órgão sub-fornical; OVLT: *organum vasculosum lateral terminalis*; SPA: substância cinzenta periaquedutal. Retirado e adaptado de Harrison DG. & Gongora MC. (2009)<sup>20</sup>.

Após a destruição desta região, virtualmente todos os efeitos centrais da Ang II são anulados, entre os quais a estimulação da sede, a secreção de vasopressina e o aumento da descarga simpática<sup>20</sup>. No que concerne à importância no controle da PA, acresce ainda o facto destas regiões cefálicas estarem também interligadas a outras áreas envolvidas na regulação cardiovascular central. Entre estas, destaca-se o órgão subfornical (OSF), que é um órgão circunventricular sem barreira hemato-encefálica, o que permite que os sinais hormonais periféricos enviados para a região AV3-V sejam traduzidos num aumento da descarga simpática e da PA (figura 4)<sup>20</sup>. O OSF também comunica com outros centros de controlo cardiovascular importantes, localizados nas regiões média e posterior cerebrais, dos quais fazem parte o núcleo parabraquial (NPB), o núcleo do tracto solitário (NTS) e o bolbo antero-ventro-lateral.

Nas últimas décadas, têm surgido novos dados que sugerem que a sinalização nestes centros cerebrais é modulada pela produção local de ROS que, desta forma, podem contribuir para a HTA<sup>20</sup>. A favor deste pressuposto, Zimmerman *et al.* (2002, 2004) comprovou que uma injeção intracerebroventricular (ICV) de um adenovírus que codifica a SOD diminui marcadamente a HTA provocada pela injeção sistémica, ou no mesmo local, de Ang II<sup>66-67</sup>.

Tal como foi mencionado previamente, as projecções a partir do órgão subfornical interagem com os centros no hipotálamo e existe evidência de que as ROS, derivadas da NADPH oxidase, aumentam o tráfico nervoso nesta região. No entanto, as ROS parecem intervir no estabelecimento de interligações a outros níveis centrais. De acordo com este pressuposto, Erdos *et al.* (2006) demonstrou que uma injeção ICV de Ang II aumenta a produção de  $O_2^-$  mediada pela NADPH oxidase, não apenas no SFO, mas também nos núcleos hipotalâmicos anteriores, entre os quais se destacam a eminência mediana

pré-óptica e no núcleo paraventricular do hipotálamo (figura 4)<sup>68</sup>. A corroborar a importância das ROS a nível central, foi ainda possível constatar que sua formação e os efeitos hemodinâmicos resultantes da administração central de Ang II são bloqueados pela apocinina, um inibidor da NADPH oxidase. Conclui-se assim, que a Ang II e os seus efeitos na NADPH oxidase parecem coordenar a activação de vários centros cerebrais, de forma a promover uma resposta hipertensiva.

Relativamente ao controlo da PA a nível central, é ainda de destacar uma sinalização importante entre o prosencéfalo e os centros de controlo cardiovasculares pontomedulares na região cerebral posterior. Nesta região localiza-se o núcleo do tracto solitário, que regula a PA e que recebe aferências do OSF e retransmite estímulos inibitórios com origem nos barorreceptores, que são inibidos pela Ang II<sup>69</sup>. Os estudos realizados, que envolviam neurónios do NTS, demonstraram que a Ang II aumenta a actividade dos canais de cálcio tipo L através da formação de ROS pela NADPH oxidase<sup>70</sup>. Foi ainda demonstrado que as actividades da NADPH oxidase e do Rac1 estão aumentadas no NTS de ratos espontaneamente hipertensos e com propensão a AVC<sup>71</sup>. Nozoe *et al.* (2007) revelou também que a injeção de um adenovírus que iniba o Rac-1, ou um adenovírus que aumente a SOD no NTS, reduz a pressão arterial, a frequência cardíaca, a noradrenalina urinária e um marcador do stress oxidativo nestes animais<sup>71</sup>. Este autor fornece, desta forma, uma evidência consistente para o papel do stress oxidativo no NTS, neste modelo de HTA.

Tal como em outros territórios vasculares e órgãos, também a nível central uma consequência importante do aumento da produção de  $O_2^-$  é a diminuição do NO, que tem uma acção fundamental na regulação central da PA. Um local que também tem sido estudado com o objectivo de conhecer as acções centrais das ROS no controlo da PA é a porção ventro-lateral do bulbo (BVL). A BVL localiza-se inferiormente ao NTS, recebendo e enviando sinais para este núcleo, regulando assim, de forma importante o tónus cardiovascular simpático (Guyenet PG, *et al.* 1990 citado por Harrison)<sup>20</sup>. Kishi *et al.* (2003) demonstrou que intervenções experimentais que aumentam o NO na porção rostral do BVL reduzem a PA, enquanto que incrementos no stress oxidativo nesta região, a aumentam<sup>72</sup>. Existe ainda evidência de que a função de barorreflexo, que é geralmente anormal na HTA crónica, é modulada pelas ROS. Normalmente, quando há um aumento da PA, há activação do barorreflexo carotídeo, resultando em bradicardia e diminuição da actividade simpática. Na HTA crónica há diminuição desta resposta, um fenómeno que é denominado “*baroreflex resetting*”.

#### **f) Alterações morfo-funcionais da parede vascular**

Provavelmente, o alvo do stress oxidativo mais estudado na HTA é a parede vascular, na qual a principal fonte de  $O_2^-$  é a NADPH oxidase<sup>20</sup>. Neste âmbito, a experiência decisiva que demonstrou que a Ang II podia estimular a NADPH oxidase foi feita pela primeira vez, por Griendling KK *et al.* (1994) em células musculares lisas em cultura<sup>73</sup> e confirmada por Rajagopalan S. *et al.* (1996) nos vasos de ratos infundidos com Ang II<sup>74</sup>. A HTA aumenta a formação de ROS em todas as camadas da parede vascular,

sendo que as suas principais fontes são NADPH oxidase e a síntase do óxido nítrico desacoplada (figura 1)<sup>20</sup>. O aumento da produção de  $O_2^{\cdot-}$  vascular é, em parte, responsável pela diminuição da vasodilatação dependente do endotélio e, a sua eliminação com formas membranares alvo de SOD ou fármacos que mimetizam a SOD, aumentam marcadamente a vasodilatação dependente do endotélio nos vasos de animais hipertensos<sup>74,75</sup>. A nível vascular, uma consequência importante da produção de ROS, é a hipertrofia do músculo liso, sendo que particularmente o  $H_2O_2$  tem sido implicado no efeito hipertrófico da Ang II em células de cultura.<sup>76</sup> Constatam-se ainda, que a hipertrofia muscular lisa está marcadamente aumentada em ratos com sobre-expressão da NADPH oxidase no tecido muscular liso<sup>77</sup>. Na HTA a hipertrofia do músculo liso vascular é um componente crítico da remodelação vascular que tipicamente ocorre nesta doença.

## **CONTROLO DO STRESS OXIDATIVO NO TRATAMENTO DA HTA**

---

O controlo com sucesso do stress oxidativo numa determinada condição requer uma compreensão profunda dos seus mecanismos celulares e bioquímicos e das suas múltiplas interacções, potenciações e sinergismos. Ao longo das últimas 3 décadas tem-se tentado controlar e equilibrar o stress oxidativo com a administração de compostos de origem natural, como a vitamina C a vitamina E, o beta-caroteno, o selenium, entre outros.

A vitamina C é um potente antioxidante endógeno que regula o potencial redox intracelular através da sua interacção com a glutathione e é capaz de promover uma acção de remoção (*scavenger*) de ROS. Este antioxidante reverte o stress oxidativo induzido pelas substâncias tóxicas do tabaco, mas aumenta a adesão dos monócitos ao endotélio. Assim, a vitamina C pode influenciar a doença coronária por interferir com a actividade na lesão aterosclerótica e não por reduzir a extensão e a dimensão das lesões fixas estabelecidas. A susceptibilidade das partículas LDL a uma maior oxidação parece estar relacionada com a diminuição das concentrações de tocoferol-alfa ou com redução da razão tocoferol/ácidos gordos poli-insaturados. Em alguns estudos, a vitamina E aumentou a *compliance* da parede arterial, diminuiu a adesão dos monócitos e das plaquetas ao endotélio e a agregação plaquetária. Apesar destes mecanismos de acção potencialmente benéficos, os ensaios clínicos com a vitamina C, E e beta-caroteno revelaram que esta estratégia terapêutica é ineficaz (ver quadro III). Assim, de uma forma algo surpreendente, como se pode constatar pela observação do quadro III, os diversos antioxidantes de origem natural, testados em estudos de prevenção primária e secundária, revelaram-se infrutíferos. Porém, até à data não houve nenhum estudo clínico exclusivamente com o objectivo de testar a eficácia na prevenção do aparecimento da HTA ou do seu melhor controlo.

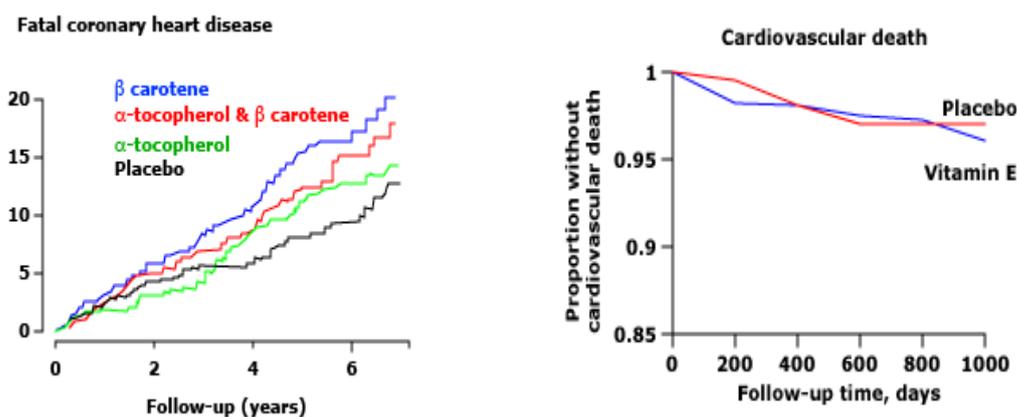
Quadro III: Estudos de prevenção primária e secundária de doença cardiovascular com vitaminas antioxidantes.

Estudo	População	Agentes testados	Resultados cardiovasculares
<b>Prevenção Primária</b>			
Chinese Cancer Prevention Trial	29584 homens e mulheres	combinação: $\beta$ -caroteno, vitamina E e selênio	redução aparente do risco de AVC
Finnish $\alpha$ -tocopherol, $\beta$ -Carotene Cancer Prevention Trial	29133 homens fumadores	$\beta$ -caroteno, vitamina E	$\beta$ -caroteno: sem benefício sobre doença coronária; vitamina E: sem benefício sobre a doença coronária; aumento aparente do risco de hemorragia cerebral
U.S. Physicians' Health Study (PHS)	22071 médicos	$\beta$ -caroteno	sem redução de eventos coronários
$\beta$ -Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET)	18314 homens fumadores e com contacto com asbestos	combinação: $\beta$ -caroteno e retinol	sem redução de eventos coronários
Skin Cancer Prevention Study	1805 homens e mulheres com cancro da pele	B-caroteno	sem redução de eventos coronários
<b>Prevenção Secundária</b>			
Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)	2002 homens e mulheres com doença coronária	vitamina E	diminuição significativa do risco de enfarte do miocárdio; aumento aparente de mortalidade cardiovascular
ATBC report	1795 homens fumadores	$\beta$ -caroteno; vitamina E	sem modificar risco de enfarte do miocárdio em doentes com angina
HOPE study	9541 doentes (follow-up 4,5 anos)	vitamina E (400 U/dia)	sem modificar risco para morte por doença cardiovascular, enfarte miocárdio ou AVC; aumento do risco para insuficiência cardíaca? (HOPE-TOO) extensão do HOPE por 2,5 anos)
Heart Protection Study	20536 (história de doença coronária, doença vascular, diabetes)	vitamina E (900U/d), vitamina C 250 mg/d e $\beta$ -caroteno 20 mg/d ou placebo	sem modificar risco na incidência de enfarte miocárdio ou mortalidade cardiovascular
GISSI prevention trial	11324 doentes (3 meses após enfarte agudo miocárdio)	Vitamina E e óleo de peixe	sem redução de eventos coronários

Retirado e adaptado de Gaziano e Manson (1999)<sup>78</sup> e de Tangney e Rosenson (2010)<sup>79</sup>.

Pela observação da figura 6 torna-se claramente evidente que nos estudos realizados por Tangney e Rosenson (2010) nenhuma das vitaminas reduziu significativamente a mortalidade por doença coronária ou por doença cardiovascular<sup>79</sup>.

Figura 5: Representação gráfica da relação entre a administração de diferentes antioxidantes naturais e mortalidade por doença coronária e por doença cardiovascular.



Retirado e adaptado de Tangney, Rosenson (2010)<sup>79</sup>.

A mera administração de uma ou mais vitaminas antioxidantes não pode curar o stress oxidativo na HTA, doença renal, diabetes ou outras entidades clínicas pois, as vias intracelulares de activação das ROS são múltiplas e interactuantes (por exemplo, a MAPK, 1 tipo de cínase que leva à activação de factores de transcrição, como por exemplo o NF-kB, pode ser estimuladas por outras substâncias que não a angiotensina II ou a aldosterona). Como descrito anteriormente, a disfunção endotelial causada pelos diversos factores de risco podem activar a NADPH oxidase e a formação de ROS não dependente da activação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Assim, e alternativamente, intervenções específicas direccionadas para um factor causal específico são mais efectivas. Sabendo-se que a HTA pode causar stress oxidativo, as intervenções terapêuticas que reduzem a pressão arterial representam uma terapia antioxidante ideal para o stress oxidativo associado à HTA (ver figura 6). Adicionalmente, na medida em que a estimulação dos receptores AT1 pela Ang II promove stress oxidativo e HTA, através da activação e sobre-expressão da NADPH oxidase, os fármacos que bloqueiam o sistema renina-angiotensina podem ser considerados terapias específicas para o tratamento do stress oxidativo em determinados tipos de HTA, especialmente quando associada a doença renal crónica e diabetes *mellitus* (ver figura 6).

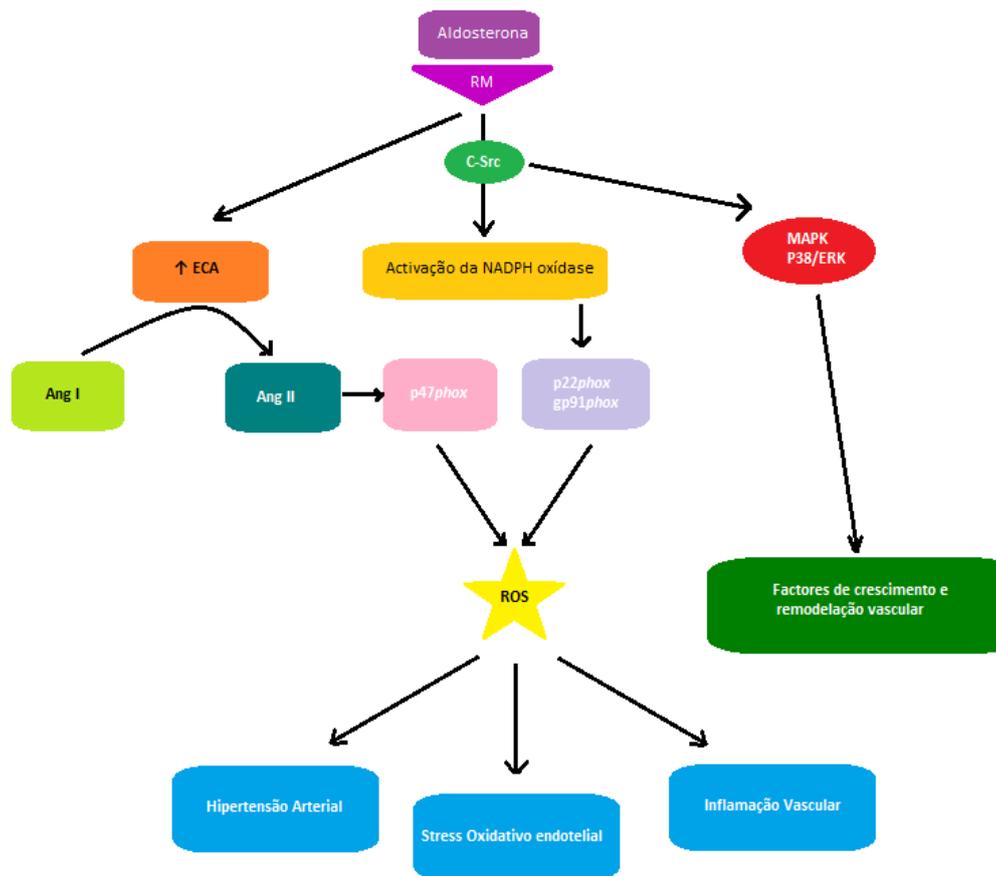


Figura 6: Sistema renina-angiotensina-aldosterona, activação das Nox e de outros sistemas redox e formação de ROS. Ang: angiotensina; MR: receptor mineralocorticoide; NO: óxido nítrico; SRR: sistema renina-angiotensina-aldosterona. Retirado e adaptado de Lastra-Lastra *et al* (2009)<sup>80</sup>.

Pelo exposto na figura e tendo em conta tudo o que foi anteriormente referido acerca do normal metabolismo das ROS, o controlo e o equilíbrio da produção das ROS podem ser feito a vários níveis, nomeadamente com IECAs ou ARA, com dadores directos ou indirectos de NO, inibindo selectivamente a NADPH oxidase, aumentando as concentrações de catalase ou de glutathione reductase ou inibindo a superóxido dismutase (ver figuras 1 e 6).

Na verdade, a administração de vitamina E ou C não resolve o problema de fundo que é a produção sustentada de ROS, a inactivação do NO e a incapacidade, por exemplo, da catalase em diminuir o potencial redox e a agressão consequente das células.

De forma semelhante, o controlo adequado da glicemia na diabetes e estratégias que visam reduzir os lípidos na dislipidemia são as medidas mais efectivas na redução do stress oxidativo associado a estas condições. Finalmente, o consumo de uma dieta rica em antioxidantes naturais e outros micronutrientes essenciais (presentes nas frutas frescas, vegetais e nozes), assim como a prática de exercício físico regular e o controlo do peso, são desejáveis no combate ao stress oxidativo e na promoção da saúde<sup>11</sup>.

Como já mencionado, os estudos de prevenção cardiovascular e neoplásica que utilizaram elevadas doses de vários compostos antioxidantes, nomeadamente tocoferol-alfa, beta-caroteno, ácido ascórbico, selénio e outros agentes, não mostraram benefício e alguns deles mostraram mesmo um aumento do risco, em vez da sua diminuição<sup>11</sup>. Como referido por Vaziri *et al* (2006) e se encontra sumariado no quadro IV, vários factores possivelmente contribuem para a ausência de benefício e potenciais efeitos adversos na utilização de doses elevadas de determinados agentes antioxidantes<sup>11</sup>.

Quadro IV: Explicações possíveis para a falência dos ensaios clínicos que estudaram a utilização de compostos antioxidantes no tratamento da HTA.

O agente antioxidante não é capaz de prevenir a interacção das ROS com as moléculas-alvo.
O antioxidante não consegue alcançar o local específico onde determinada reacção ocorre (pex. fase lipídica versus fase aquosa).
Não é possível inactivar as grandes quantidades de espécies reactivas resultantes da própria actuação dos compostos antioxidantes (intensificação do stress oxidativo devido ao desequilíbrio do sistema antioxidante).
Na medida em que o stress oxidativo é primariamente causado pelo excesso de formação de ROS, a administração de compostos antioxidantes constitui uma medida sintomática, em vez de uma medida curativa no tratamento do stress oxidativo na HTA e na DCV.
O sistema antioxidante não tem capacidade para abolir o stress oxidativo induzido pela inflamação, que é um componente essencial da resposta imune inata.

Retirado e adaptado de Vaziri ND. *et al.* (2008)<sup>11</sup>.

Por tudo o que foi exposto previamente, compreende-se em primeira instância que, na medida em que o stress oxidativo e a HTA não são provocados pela deficiência em nenhum composto antioxidante, não podem ser corrigidos pela administração de tais agentes. Em segundo lugar, a administração de quantidades supra-fisiológicas de determinados compostos antioxidantes levaria a uma acumulação dos seus metabolitos radicais livres (por exemplo o radical ascorbilo da vitamina C, o radical tocoferoxil da vitamina E, etc) o que pode, na verdade, piorar o stress oxidativo. Por estas e outras razões listadas na tabela, o consumo de elevadas doses destes agentes não é recomendada para o tratamento da HTA e da doença cardiovascular.

Dada a falência da terapêutica antioxidante com os compostos naturais referenciados, tem-se assistido nas últimas 2 décadas a uma intensa investigação na procura de novos antioxidantes, de novos alvos e de novas estratégias mais abrangentes. Mas apesar do imenso esforço investigacional dispendido poucos avanços efectivos têm sido conseguidos. No quadro V podem ver-se alguns novos fármacos com propriedades antioxidantes e seus alvos preferenciais.

Quadro V: Alguns antioxidantes e o seu mecanismo de ação

Antioxidante	Mecanismo de ação
<i>N</i> -acetyl-L-cisteína	Estimula a produção de cisteína, que é um precursor da glutatona
MnTBAP	Reduz o stress oxidativo subsequente à formação de peroxinitrito.
Tioredoxina redúctase	Aumenta os níveis de tioredoxina
M40403	Mimético da superóxido dismutase, que tem actividade catalítica semelhante.

Quadro VI: Alguns novos antioxidantes, seus mecanismos de ação, fase clínica em que se encontra o estudo e suas possibilidades terapêuticas.

Fármaco	Mecanismo ação	Fase clínica	Possíveis usos terapêuticos
Pegorgotein (forma conjugada superóxido dismutase)	Scavenger de radicais livres	Fase III (descontinuado)	Para utilização em traumatismos e queimaduras; para tratamento no pós- transplante renal da lesão resultante da não reperfusão renal; uso potencial em distúrbios resultantes da toxicidade do oxigénio (ex. Doenças pulmonares associadas a asbestos, patologias renais, quadros de inflamação musculo- esquelética, enfarte do miocárdio, lesão do nervo óptico por células fagocíticas; síndrome de distress respiratório em recém- nascidos prematuros.
GKT 03	Inibidor da Nox		Lesão de reperfusão isquémica, HTA, hipertensão pulmonar idiopática
AEOL 10150	Inibidor da angiogénese, antioxidants, scavengers de radicais livres, scavenger de ROS, inibidores das	Pre-clínica e fase I	Síndrome de radiação aguda, esclerose amiotrófica lateral, cancro, doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose cística, distúrbios gastrointestinais, doenças

	ROS, inibidores da superóxido dismutase.		pulmonares, mucosite, edema pulmonar, doenças cutâneas, lesões da medula espinal, AVC.
NV 04 (análogo de uma hormona fenólica sintética)	antioxidante	I	HTA; outras doenças cardiovasculares
CSL-111	Scavenger de radicais livres	II	Síndromes coronárias agudas e AVC
Edaravone	Scavenger de radicais livres	Fase IV	Enfarte cerebral
INO 4885	Metaloporfirina que inibe potencialmente a lesão celular oxidativa; degrada o peroxinitrito.	I	Doenças renais
VM 106	Modulador da NADPH oxidase	I/II	Doenças granulomatosas crónicas
WS 1442 [Crataegutt] É um extracto da planta espinheiro-alvar.	Scavenger de radicais livres, inibidores da elastase dos leucócitos.	Comercializado	Insuficiência cardíaca

Retirado e adaptado da base de dados Adis (2009).

Na literatura científica abundam dados muito relevantes obtidos em células isoladas ou em modelos animais experimentais, de várias doenças cardiovasculares, sobre o ponto de vista de “prova de conceito”, relativamente ao benefício potencial de novos antioxidantes ou de fármacos que inibem a formação de ROS. No entanto, poucos dados estão publicados em revistas ou sites da internet acessíveis. No quadro VI podem ver-se alguns desses fármacos que já passaram a fase pré-clínica e que estão num programa de desenvolvimento para potenciais usos terapêuticos em várias doenças cardiovasculares humanas, incluindo a HTA, o enfarte do miocárdio, o AVC e doenças desmielinizantes do sistema nervoso central. Aparentemente, ainda não foi encontrado um alvo suficientemente selectivo que permita manipular o potencial redox das células humanas de uma forma segura e eficaz (como por exemplo, o bloqueio selectivo de uma das Nox).

## Conclusão

As ROS, particularmente o  $O_2^{\cdot -}$  e o  $H_2O_2$ , funcionam como segundos mensageiros, intervindo em numerosas vias de sinalização celular, que desempenham um papel importante na biologia vascular e na doença cardiovascular.

Na HTA, há um desequilíbrio do sistema antioxidante natural, com activação de enzimas pró-oxidantes, nomeadamente da NADPH oxidase, o que se traduz num aumento das ROS, mas também parece haver uma disfunção das enzimas antioxidantes. Dos diferentes elementos que constituem a NADPH oxidase não-fagocítica, as Nox1 e Nox4, parecem desempenhar um papel particularmente importante no desenvolvimento das lesões que ocorrem no sistema cardiovascular. Esta enzima pode ser activada por vários estímulos activam esta enzima, sendo de referir os agentes vasoactivos, os factores de crescimento, os factores metabólicos e as forças mecânicas. A angiotensina II, por acção directa sobre o seu receptor AT1, que leva ao aumento das espécies reactivas, estimula o crescimento celular, a angiogénese e a vasoconstrição, que contribuem para o desenvolvimento e manutenção da HTA. Estes efeitos pró-hipertensores da Ang II são também observados a nível renal, onde para além de provocar a retenção de sódio, promove a inflamação, que tem acções importantes neste órgão.

O stress oxidativo contribui para a lesão vascular pela promoção do crescimento celular, da deposição de matriz proteica extracelular, activação de metaloproteinases da matriz, inflamação, disfunção endotelial, e aumento do tónus vascular, características fenotípicas da HTA. No rim, as principais estruturas envolvidas na HTA por acção do stress oxidativo são a arteríola aferente (onde há estimulação da NADPH oxidase, vasoconstrição e conseqüente redução da TFG), o glomérulo, o tubo contornado proximal (onde há estimulação do transporte de sódio), a porção espessa do ramo ascendente da ansa de Henle e a mácula densa. A nível do sistema nervoso central a região prosencefálica que circunda o terceiro ventrículo, os centros de controlo cardiovasculares pontomedulares da região cerebral posterior e o barorreceptor carotídeo têm sido envolvidos no desenvolvimento de HTA. No entanto, e apesar de bem caracterizados em animais de experiência, o envolvimento destes órgãos no desenvolvimento de HTA no ser humano, carece de fundamento, sendo assim necessária uma maior investigação na área do stress oxidativo na HTA humana. Só desta forma, com a melhor compreensão dos mecanismos que regulam o metabolismo da ROS e a identificação dos processos que promovem o stress oxidativo, poderá tornar-se possível o desenvolvimento de terapias mais efectivas, de forma a que, as acções malélicas das ROS possam ser reduzidas. Estas terapias poderão ter algum potencial na prevenção do desenvolvimento de HTA, assim como na reversão de algumas das alterações morfo-funcionais já estabelecidas e que são dependentes do stress oxidativo.

## *Agradecimentos*

---

*Ao Prof. Doutor Manuel Vaz Silva por toda a orientação, ajuda e apoio na elaboração deste trabalho.*

## Bibliografia

---

1. World Health Organization ISOHWG 2003. World Health Organization (WHO)/ International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension* 2003; 21:1983-92.
2. Miniño AM HM, Murphy SL, Kochanek KD. Deaths: Final data for 2004. *National Vital Statistics Reports* 2007; 55(19):1-119.
3. M. S. AVC - primeira causa de morte em Portugal. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde* 2009. 12-9.
4. Macedo Ed. Estudo da prevalência, tratamento e controlo da hipertensão arterial em Portugal. *Anamnesis* 2004;130:7-8.
5. "A hipertensão arterial é um reconhecido factor de risco das doenças cardiovasculares. Em Portal da Saúde. Disponível através de :  
<http://www.portaldasauade.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/doencas/doencas+do+aparelho+circulatorio/hipertensao+arterial.htm>. Acedido em 15.04.10.
6. Anuário Estatístico de Portugal - 2008. Em Instituto Nacional de Estatística. Acedido através de: [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=80161516&PUBLICACOESmodo=2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=80161516&PUBLICACOESmodo=2). Acedido em 15.04.10. 2010.
7. Health in Portugal 2007. Em <http://www.min-saude.pt/portal>. Disponível através de: [http://www.contratualizacao.minsaude.pt/Downloads\\_Contrat/Informa%C3%A7%C3%A3o%20T%C3%A9cnica20Online/Health\\_in\\_Portugal.pdf](http://www.contratualizacao.minsaude.pt/Downloads_Contrat/Informa%C3%A7%C3%A3o%20T%C3%A9cnica20Online/Health_in_Portugal.pdf); .
8. Scholte op Reimer WJM GA, Boersma E, Simoons ML (eds.). *Cardiovascular Diseases in Europe. Euro Heart Survey – 2006*. Sophia Antipolis. European Society of Cardiology 2006.
9. Kaplan NM, Victor RG. Primary Hypertension: Pathogenesis. In *Kaplan's Clinical Hypertension*. Wolters Kluwer Health: Lippicott Williams & Wilkins. 2010; 43-44.
10. Sedeek M, Hebert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:122-7.
11. Vaziri ND. Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. *Iran J Kidney Dis* 2008;2:1-10.
12. Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:582-93.
13. Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther* 2008;120:254-91.
14. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P & Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation—A mechanism in common. *Science* 1954;119:623–6.

15. Harman D. Aging—A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J Gerontol* 1956;11.
16. McCord JM, & Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969;244:6049–55.
17. Mittal CK, & Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide-dismutase and hydroxyl radical—Physiological regulator of guanosine 3,5-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:4360–4.
18. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
19. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 2:S170-80.
20. Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am* 2009;93:621-35.
21. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000;18:655-73.
22. Miller AA, De Silva TM, Jackman KA, Sobey CG. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:1037-43.
23. Ward NC, Croft KD. Hypertension and oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:872-6.
24. Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:48-54.
25. Xu S, Touyz RM. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. *Can J Cardiol* 2006;22:947-51.
26. Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F606-16.
27. Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:217-26.
28. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:222-33.
29. Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:849-54.
30. San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:173-82.
31. Williams HC, Griendling KK. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:9-16.
32. Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 2008;60:21-8.

33. Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:247-55.
34. Zalba G, San Jose G, Moreno MU, et al. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001;38:1395-9.
35. Suematsu M, Suzuki H, Delano FA, Schmid-Schonbein GW. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation* 2002;9:259-76.
36. De Champlain J, Wu R, Girouard H, et al. Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2004;26:593-601.
37. Jiang F, Drummond GR, Dusting GJ. Suppression of oxidative stress in the endothelium and vascular wall. *Endothelium* 2004;11:79-88.
38. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004;122:339-52.
39. Raijmakers MT, Roes EM, Steegers EA, Peters WH. The C242T-polymorphism of the NADPH/NADH oxidase gene p22phox subunit is not associated with pre-eclampsia. *J Hum Hypertens* 2002;16:423-5.
40. Moreno MU, San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens* 2006;24:1299-306.
41. Moreno MU, San José, G., Orbe, J. et al. Preliminary characterisation of the promoter of the human p22phox gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett* 2003;542:27-31.
42. San Jose G, Moreno MU, Oliván S, et al. Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension* 2004;44:163-9.
43. Kokubo Y, Iwai, N, Tago, N. et al. Association analysis between hypertension and CYBA, CLCNKB, and KCNMB1 functional polymorphisms in the Japanese population: the Suita Study. *Circ J* 2005;69:138-42.
44. Moreno MU, San Jose G, Fortuno A, et al. A novel CYBA variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. *J Hypertens* 2007;25:1620-6.
45. Wassmann S WK, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 2004;44:381-6.
46. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:860-6.
47. H. C. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 2005;68:26-36.

48. Kajiya M HM, Inai Y, Kiyooka T et al. Impaired NO mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H2737–H44.
49. Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 2:S181-4.
50. Wang D, Chen Y, Chabrashvili T, *et al.* Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* 2003;14.
51. Wang D, Chabrashvili T, Wilcox CS. Enhanced contractility of renal afferent arterioles from angiotensin-infused rabbits: roles of oxidative stress, thromboxane prostanoid receptors, and endothelium. *Circ Res* 2004;94.
52. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 2002;39:316–22.
53. Navar LG, Nishiyama A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:107–15.
54. Vanegas V, Ferrebuz A, Quiroz Y, Rodríguez-Iturbe B. Hypertension in Page (cellophane wrapped) kidney is due to interstitial nephritis. *Kidney Int* 2005;68:1161–70.
55. Wang D CY, Chabrashvili T, *et al.* Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(11):2783–9.
56. Nagase M SS, Yoshida S, *et al.* Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 2006;47(6):1084–93.
57. Meng S CG, Gannon AW, *et al.* Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2003;41(6):1346–52.
58. Banday AA LM. Loss of biphasic effect on Na/K-ATPase activity by angiotensin II involves defective angiotensin type 1 receptor-nitric oxide signaling. *Hypertension* 2008;52(6):1099–105.
59. Banday AA FF, Lokhandwala MF. Oxidative stress causes renal dopamine D1 receptor dysfunction and hypertension via mechanisms that involve nuclear factor-kappaB and protein kinase C. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(5):1446–57.
60. Banday AA LY, Lokhandwala MF. Oxidative stress causes renal dopamine D1 receptor dysfunction and salt-sensitive hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 2008;51(2):367–75.
61. Vallon V TT, Barajas L, *et al.* Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(8):1599–606.
62. Wu F PF, Cowley AW Jr, *et al.* Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 2):F874–81.

63. Cowley AW Jr MT, Mattson D, et al. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284(6):R1355–69.
64. Dickhout JG MT, Cowley AW Jr. Tubulovascular nitric oxide crosstalk: buffering of angiotensin II-induced medullary vasoconstriction. *Circ Res* 2002;91(6):487–93.
65. Gordon FJ HJ, Brody MJ, et al. Effect of lesions of the anteroventral third ventricle (AV3V) on the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1982;4(3):387–93.
66. Zimmerman MC LE, Lang JA, et al. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 2002;91(11):1038–45.
67. Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davissou RL. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res* 2004;95:210–6.
68. Erdos B BC, King MA, et al. Acute pressor effect of central angiotensin II is mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide in the hypothalamic cardiovascular regulatory nuclei. *J Hypertens* 2006;24(1):109–16.
69. Luoh SH CS. Inhibition of baroreflex by angiotensin II via Fos expression in nucleus tractus solitarius of the rat. *Hypertension* 2001;38(1):130–5.
70. Wang G AJ, Huang J, et al. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci* 2004;24(24):5516–24.
71. Nozoe M HY, Koga Y, et al. Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2007;50(1).
72. Kishi T HY, Kimura Y, et al. Overexpression of eNOS in RVLM improves impaired baroreflex control of heart rate in SHRSP. Rostral ventrolateral medulla. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003;41(2):255–60.
73. Griendling KK MC, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74(6):1141–8.
74. Rajagopalan S KS, Munzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97(8):1916–23.
75. Schnackenberg CG WC. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney Int* 2001;59(5):1859–64.
76. Zafari AM U-FM, Akers M, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*;32(3):488–95.
77. Weber DS RP, Mellis AM, et al. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(1):37–42.
78. Gaziano JM MJ. Antioxidant Vitamins. In: *Clinical Trials in Cardiovascular Disease: a companion to Braunwald's heart disease*. Charles H Hennekens 1st edition 1999:415–21

79. Tangney CC RR. Nutritional antioxidants in coronary heart disease. Em: UpToDate, 2010 (<http://www.uptodate.com>).
80. Lastra-Lastra G SJR-EK, Manrique-Acevedo C, Lastra-González G. Role of Aldosterone and Angiotensin II in Insulin Resistance: An Update. Clin Endocrinol 2009;71(1):1-6.