

Desbalance Redox: NADPH Oxidasa como un Objetivo Terapéutico en el Manejo Cardiovascular

Luiza A. Rabêlo^{1,2}, Valéria Nunes de Souza¹, Lucas José Sá da Fonseca¹, Walkyria O. Sampaio^{2,3}

Universidade Federal de Alagoas¹, Maceió, AL; Universidade Federal de Minas Gerais², Belo Horizonte, MG; Centro Universitário de Belo Horizonte - Uni-BH³, Belo Horizonte, MG - Brasil

Resumen

Varios estudios destacan las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON) como importantes contribuyentes en la patogénesis de numerosas enfermedades cardiovasculares, incluyendo hipertensión, aterosclerosis y falla cardíaca. Tales especies son moléculas altamente bioactivas y con vida corta derivadas, principalmente, de la reducción del oxígeno molecular. El complejo enzimático de la NADPH oxidasa es la mayor fuente de esas especies reactivas en la vasculatura. En condiciones fisiológicas, la formación y eliminación de esas sustancias aparecen balanceadas en la pared vascular. Durante el desbalance redox, sin embargo, hay un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa y predominio de agentes prooxidantes, superando la capacidad de defensa orgánica antioxidante. Además de ello, tal hiperactividad enzimática reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico, crucial para la vasodilatación y el mantenimiento de la función vascular normal. A pesar de que la NADPH oxidasa se relaciona directamente con la disfunción endotelial, fue primeramente descrita por su expresión en fagocitos, en los que su actividad enzimática determina la eficacia de los mecanismos de defensa orgánica contra patógenos. Las diferencias sutiles entre las unidades estructurales de las NADPH oxidasas, dependiendo del tipo celular que las expresa, pueden tener implicaciones terapéuticas, permitiendo la inhibición selectiva del desequilibrio redox inducido por la NADPH oxidasa, sin comprometer, con todo, su participación en las vías fisiológicas de señalización celular que garantizan la protección contra microorganismos.

Introducción

Varios estudios demuestran que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON) contribuyen efectivamente para

Palabras clave

NADPH oxidasa, inhibidores de la NADPH oxidasa, especies de oxígeno reactivas, especies de nitrógeno reactivas, óxido-reducción, enfermedades cardiovasculares.

la patogénesis de agravamientos cardiovasculares, como hipertensión, aterosclerosis, hipertrofia y falla cardíaca, y reestenosis, además de lesiones derivadas de isquemia y perfusión. Múltiples sistemas enzimáticos producen ERON y sus derivados en la vasculatura, incluyendo ciclooxigenasa, lipoxigenasa, citocromo P450, xantina oxidasa (XO), mieloperoxidasa (MPO), óxido nítrico sintasa (NOS) y NADPH oxidasa - esta última una de las más importantes fuentes de estas sustancias, tanto en las células endoteliales como musculares lisas¹⁻²².

Desde las observaciones de Baehner et al²³ hace cerca de 40 años - que permitieron el descubrimiento de la NADPH oxidasa²⁴ - varios fueron los estudios desarrollados para comprender la relación entre el referido complejo enzimático y el desbalance redox (estrés oxidativo). El aumento de la producción de anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y otras ERON está implicado en la aterosclerosis, hipertensión arterial, proliferación celular e hipertrofia. No obstante, el papel de la NADPH oxidasa en tales procesos continúa incierto debido, principalmente, a la presencia de múltiples isoformas de Nox (subunidades constituyentes de la NADPH oxidasa) y sus ligantes, así como a la falta de inhibidores específicos^{25,26}. El complejo enzimático actúa como donante de electrones para la reducción del O_2 a $\cdot\text{O}_2^-$; según la reacción $2\text{O}_2 + \text{NAD(P)} \text{H} \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NAD(P)} + \text{H}^{+10,16,22,25,27}$.

$\cdot\text{O}_2^-$: producción por la NADPH oxidasa y su relación con el NO

Los experimentos pioneros de Furchgott y Zawadzki²⁸ primero demostraron la existencia de un factor relajante derivado de endotelio que fue posteriormente identificado como $\cdot\text{NO}$ ²⁹, producido a partir de la L-arginina por la acción de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)²⁹⁻³² en la presencia de cofactores, principalmente la tetrahidrobiopterina (H_4B ; Figura 1). El $\cdot\text{NO}$ se difunde hacia las células musculares lisas vasculares y activa la guanilato ciclasa, promoviendo la vasodilatación mediada por el GMP cíclico²⁹⁻³³. En condiciones normales, el $\cdot\text{NO}$ desempeña un papel clave en el mantenimiento de la pared vascular en estado de quietud por inhibición de la inflamación, proliferación celular y trombosis, reduciendo el tono vascular, la activación de plaquetas y leucocitos, la proliferación de células musculares lisas, la deposición de matriz extracelular y la muerte de células endoteliales³⁴⁻³⁶. El $\cdot\text{NO}$ es también un radical libre y, cuando se produce conjuntamente con el $\cdot\text{O}_2^-$, reacciona extremadamente rápido para formar una especie

Correspondencia: Luiza A. Rabêlo •

Praça Afrânio Jorge SN - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - Prado - 5701-002 - Maceió, AL - Brasil

E-mail: luizaa.rabelo@uol.com.br

Artículo recibido el 28/02/09; revisado recibido el 22/05/09; aceptado el 08/06/09.

proinflamatoria altamente reactiva. El anión peroxinitrito ($\cdot\text{ONOO}^-$; vasodilatador menos potente que el $\cdot\text{NO}$). Así, la mayor parte de la citoxidasa atribuida al $\cdot\text{NO}$ se deriva del $\cdot\text{ONOO}^-$ ^{5,37}. Este último es un importante mediador de la peroxidación de lípidos, incluyendo la oxidación de la LDL, evento crucial para la aterogénesis⁵.

Fisiológicamente, cierta cantidad de $\cdot\text{O}_2^-$ intracelular se requiere para la señalización normal desempeñada por el $\cdot\text{NO}$. No obstante, patológicamente, el aumento extracelular de la primera especie disminuye la biodisponibilidad del $\cdot\text{NO}$, reduciendo su difusión para el músculo liso vascular^{38,39}. En determinadas circunstancias, la producción crónica de ERON (aumento de la actividad de la NADPH oxidasa, por ejemplo) excede la capacidad de los antioxidantes celulares enzimáticos (como la glutatión peroxidasa-1 - principal enzima antioxidante en el citosol y en las mitocondrias^{35,36} - y las forma superóxido dismutasa enlazadas a la membrana, responsables por dismutar el anión superóxido en H_2O_2) y no enzimáticos, contribuyendo para la enfermedad vascular por inducción de la activación endotelial sostenida^{29,40}. Grandes cantidades de $\cdot\text{O}_2^-$ formadas captan la mayor parte o todo el $\cdot\text{NO}$, promoviendo la formación de $\cdot\text{ONOO}^-$ ^{34,41}. El $\cdot\text{O}_2^-$ generado puede además ser transformado en radical hidroxilo, que se difunde hacia el músculo liso vascular e induce la producción de endoperóxidos vasoconstrictores, como la prostaglandina H_2 y prostanoides⁴¹, derivados de la peroxidación del ácido araquidónico catalizada por radicales libres, considerados marcadores del aumento sistémico del desbalance redox *in vivo*⁴². El exceso de producción de $\cdot\text{O}_2^-$, con la consiguiente disminución de la biodisponibilidad del $\cdot\text{NO}$, puede ser promovido además por metales de transición, tales como hierro, cobre, mercurio y plomo. Algunos de estos contaminantes ambientales importantes son capaces de aumentar la producción de radicales libres mediante la activación del complejo enzimático NADPH

oxidasa^{43,44}, siendo este mecanismo una causa probable para la hipertensión inducida por las referidas especies químicas.

Estudios de Wiggers et al⁴⁵ demostraron, en ratones, que la exposición a bajas concentraciones de mercurio induce disfunción endotelial tanto en vasos de conducción como de resistencia. Los autores sugieren que este evento se deriva, probablemente, de la reducción de la biodisponibilidad del $\cdot\text{NO}$ debido al aumento en la producción vascular de $\cdot\text{O}_2^-$. De esta forma, es posible que el tratamiento con el mercurio afecte la expresión proteica o, más específicamente, la actividad de la NADPH oxidasa.

Tal desequilibrio se relaciona a las ERON por el hecho de ser el O_2 fundamental para la respiración celular, habiendo diversos sistemas enzimáticos que utilizan este sustrato como un aceptor de electrones^{1,20}. La familia de estas especies incluye moléculas altamente bioactivas con vida corta derivadas, principalmente, de la reducción del O_2 . Fisiológicamente, la formación y la eliminación de las ERON son balanceadas en la pared vascular⁴⁶, cuyo papel clave es desempeñado por el endotelio en el mantenimiento del tono vascular y en la presión sanguínea por la liberación de sustancias vasoactivas, como el $\cdot\text{NO}$ ⁴⁷. El aumento de ERON debido al desbalance redox fue constatado en aorta, carótida, mesentérica y coronarias de ratas y ratones viejos, sugiriendo que este desequilibrio está asociado al envejecimiento, con el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa⁴⁸. Evidencias experimentales indican que el daño oxidativo inducido por especies reactivas se deriva del aumento de la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ y su metabolismo y/o de la reducción de la biodisponibilidad de $\cdot\text{NO}$ ^{25,49}. Con todo, a pesar de que el exceso de ERON es tóxico, concentraciones fisiológicas de estas especies pueden funcionar como señal mediadora de diversas respuestas, incluyendo migración celular y crecimiento^{20,22,50}, ya que, en condiciones normales y en la mayoría de las arterias, la producción de $\cdot\text{NO}$ predomina,

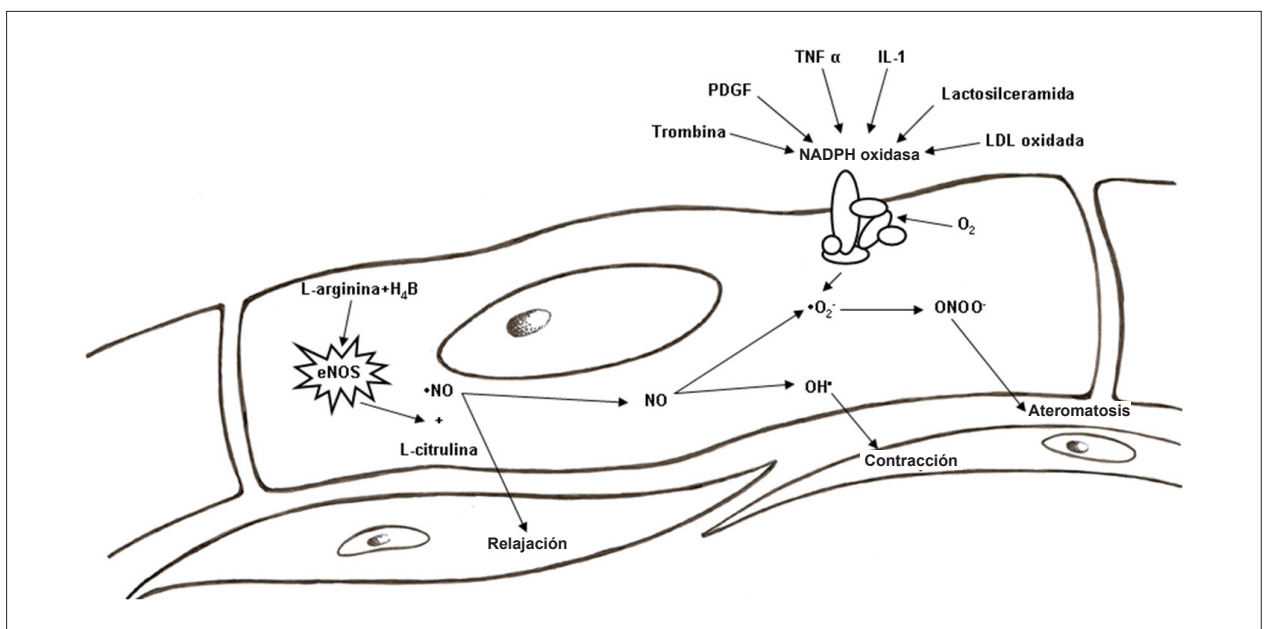


Fig. 1 - Mecanismos de activación de la NADPH oxidasa y su relación con el metabolismo del $\cdot\text{NO}$.

de modo que este radical retira pequeñas cantidades de $\cdot\text{O}_2^-$ formado^{40,51-53}, asegurando el mantenimiento del equilibrio en el estado oxidativo orgánico.

La inhibición no selectiva de la NADPH oxidasa compromete la señalización celular fisiológica

La NADPH oxidasa mejor caracterizada es la fagocítica, presente en macrófagos y neutrófilos, siendo un complejo proteico multimérico con componentes en la membrana celular y en el citoplasma. El componente asociado a la membrana es el citocromo b558-oxidasa, formado por una subunidad mayor, la gp91phox (el término "phox" deriva de "phagocytic oxidase")⁷, y una menor, p22phox. Además de ellas, la enzima comprende tres subunidades citoplasmáticas (p47phox, p67phox y p40phox) y una pequeña proteína G reguladora (Rac2). La activación de la NADPH oxidasa se inicia por la fosforilación (en serina) de la subunidad citoplasmática p47phox, desencadenando su migración hacia la membrana, donde conjuntamente con la Rac se asocia al citocromo b558, iniciando la actividad catalítica de la enzima^{1,5,17,37,53-58} (Figura 2).

La NADPH oxidasa expresada en las células vasculares difiere de aquella encontrada en fagocitos, tanto por su estructura bioquímica como por sus funciones⁵. Fue encontrada inicialmente en neutrófilos, que se sabe son esenciales en la defensa contra microorganismos eliminados por la combinación de diversos mecanismos que incluyen la generación de $\cdot\text{O}_2^-$ producido por las subunidades endoteliales

p40phox, p47phox y gp91phox de la NADPH oxidasa⁵⁴. Curiosamente, los agrupamientos catalíticos gp91phox, p22phox, p47phox y p67phox también fueron encontrados en fibroblastos de la adventicia^{7,13,22,55}.

La identificación de subunidades homólogas a la gp91phox resultó en la formación de la familia Nox (de "Nonphagocytic NADPH Oxidase"), constituida actualmente por siete miembros (Nox1, Nox2 [formalmente conocida como gp91phox], Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2 [Dual oxidase])^{10,56,57}. Los principales componentes del complejo enzimático NADPH oxidasa, Nox1 y Nox4, son altamente expresados en las células vasculares y aumentados durante el proceso de remodelado vascular, como en la hipertensión y la aterosclerosis⁷. Estas diferencias sutiles en la expresión estructural ofrecen la oportunidad de desarrollo de inhibidores específicos de la NADPH oxidasa vascular que no comprometan la señalización fisiológica y las funciones fagocíticas mediadas por ERON⁵.

Varias características de las NADPH oxidasas son notables. Primero, la enzima vascular produce $\cdot\text{O}_2^-$ en niveles bajos por largos períodos de tiempo, la mayor parte intracelularmente, donde desempeña un papel en la señalización celular^{1,5,14,16,46,50,59} (Figura 3). Segundo, la gp91phox es generalmente sustituida por Nox1 o Nox4 homólogas, particularmente en el músculo liso. Tercero, mientras la Nox homóloga y la subunidad p22phox ligada a la membrana son esenciales para mantener una unidad estable que soporte la transferencia electrónica para la generación de $\cdot\text{O}_2^-$, permanece todavía oscuro el papel de los componentes citosólicos en la NADPH oxidasa, cuyo último aspecto muestra implicaciones en la activación y especificidad de los

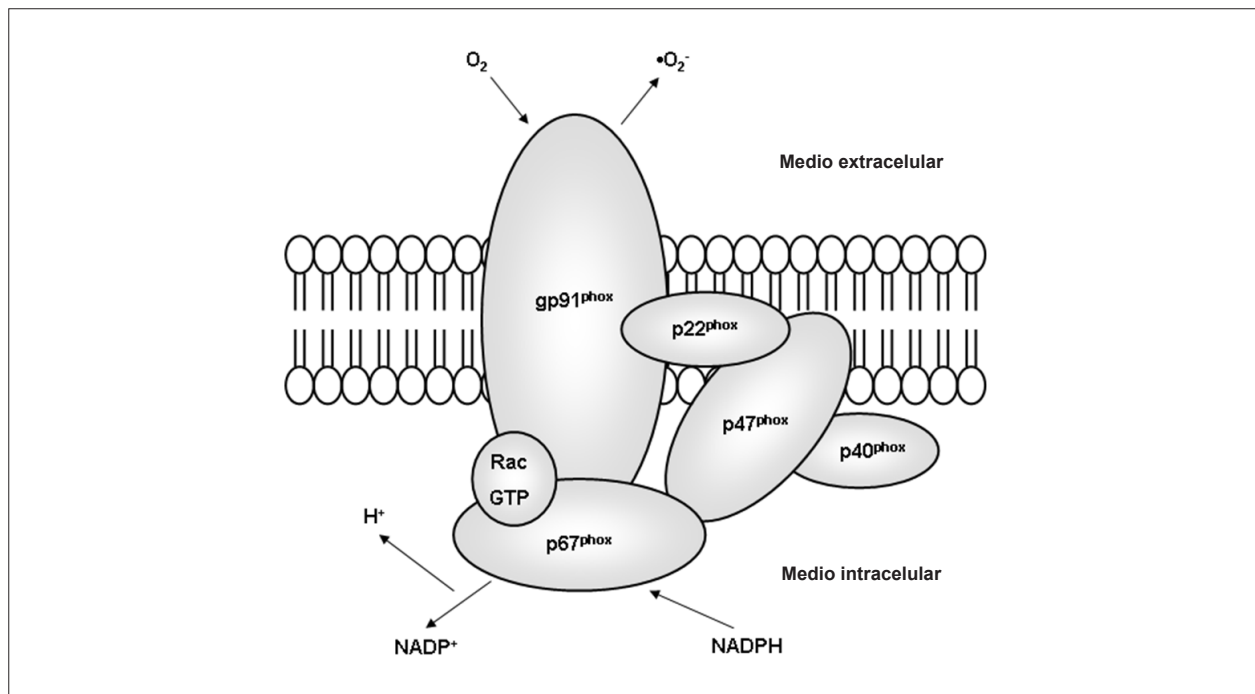


Fig. 2 - Estructura de la NADPH oxidasa fagocítica. La gp91phox es el ligante de la NADPH con función transportadora de electrones en la NADPH oxidasa activa. La producción de $\cdot\text{O}_2^-$ extracelular ocurre por la reducción de un electrón del O_2 mediante gp91phox, usando β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). Adaptado de Dusting et al, 2005.

inhibidores de la referida enzima^{1,5,14,16,46}. Además de ello, la expresión de las subunidades parece variar además en células musculares lisas de diferentes vasos. Células musculares lisas derivadas de arteria de resistencia humana (HVSMC) parecen expresar una subunidad gp91phox similar a la neutrofílica⁶⁰. El homólogo de la gp91phox, Nox1, se expresa en células musculares lisas de ratas (RVSMC) y ratones⁶¹ y células musculares lisas de aorta humana (ASMC), no apareciendo en arterias de resistencia de humanos⁶⁰. La Nox1 posee un 56% de homología con la gp91phox humana y, en conjunto con la p22phox, es el probable componente funcional del citocromo b558 en ASMCs y RVSMC⁶². Nox4, otro homólogo de la gp91phox, se expresa en RVSMC, ASMC y HVSMC. Células endoteliales expresan principalmente las subunidades Nox2 y Nox4. La expresión de Nox1 es menos prominente en el endotelio y puede ser aumentada durante el proceso de adhesión leucocitaria y esfuerzo cortante. Nox2 y Nox4 parecen ser las subunidades funcionales más importantes en células endoteliales, contribuyendo de manera similar en la producción de especies reactivas⁶³.

También hay evidencias de que la NADPH oxidasa se encuentra en el núcleo celular, involucrándose en la expresión génica. Varios grupos identificaron subunidades de NADPH oxidasa en membranas internas. No obstante, las consecuencias de la activación de la NADPH oxidasa en regiones perinucleares todavía no están claras²⁰.

Activación enzimática: papel central de las subunidades p47phox y gp91phox

El evento inicial más relevante para la activación de la NADPH oxidasa involucra la fosforilación de la p47phox y su consiguiente interacción con la gp91phox^{1,16}. La unión entre dominios homólogos de dos estructuras Src autoinhiben

la unión con la p22phox. Tal interacción autoinhibidora se pierde en la fosforilación, permitiendo el vínculo entre las subunidades p47phox y p22phox¹, ocurriendo la activación de la NADPH oxidasa. Corroborando, la delección génica de la subunidad gp91phox ofrece protección con el accidente vascular cerebral isquémico en ratones, por evitar la disfunción de la barrera hematoencefálica⁶⁴.

Las NADPH oxidasas son activadas y reguladas por diversos factores, como fuerzas mecánicas, hormonas y citocinas, entre los cuales se destacan la trombina, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), a lactosilceramida, la Interleucina-1 y la LDL oxidada (Figura 1). Esta última aumenta la producción de ERON y la expresión de Nox4 en el endotelio humano^{1,5}. Macrófagos cultivados acumulan grandes cantidades de colesterol cuando se exponen a la LDL modificada (receptores para LDL son abundantes en estas células, indicando que tales estructuras estarían involucradas en la formación de células espumosas ateroscleróticas)^{58,65}.

En células musculares lisas vasculares, la angiotensina II (Ang II) es un potente estimulador de la actividad de la NADPH oxidasa. Este péptido angiotensinérgico es un conocido factor en la patogénesis de la mayoría de los desórdenes cardiovasculares, pudiendo inducir la formación de $\cdot\text{O}_2^-$, en parte por las NADPH oxidasas vasculares⁵. La activación mediada por la Ang II fue demostrada inicialmente por Griendling et al⁶⁶, destacando la importancia de las concentraciones de Ang II en el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa en las células musculares lisas vasculares^{1,15,16}. A pesar de que la señalización por la cual la Ang II estimula la NADPH oxidasa no ha sido elucidada por completo, las vías de la PLD, de la PKC, de la PLA2, PI3K y tiol oxidorreductasas parecen estar involucradas⁶⁷⁻⁶⁹. En el músculo liso vascular, la tirosina quinasa Src regula la actividad de la NADPH

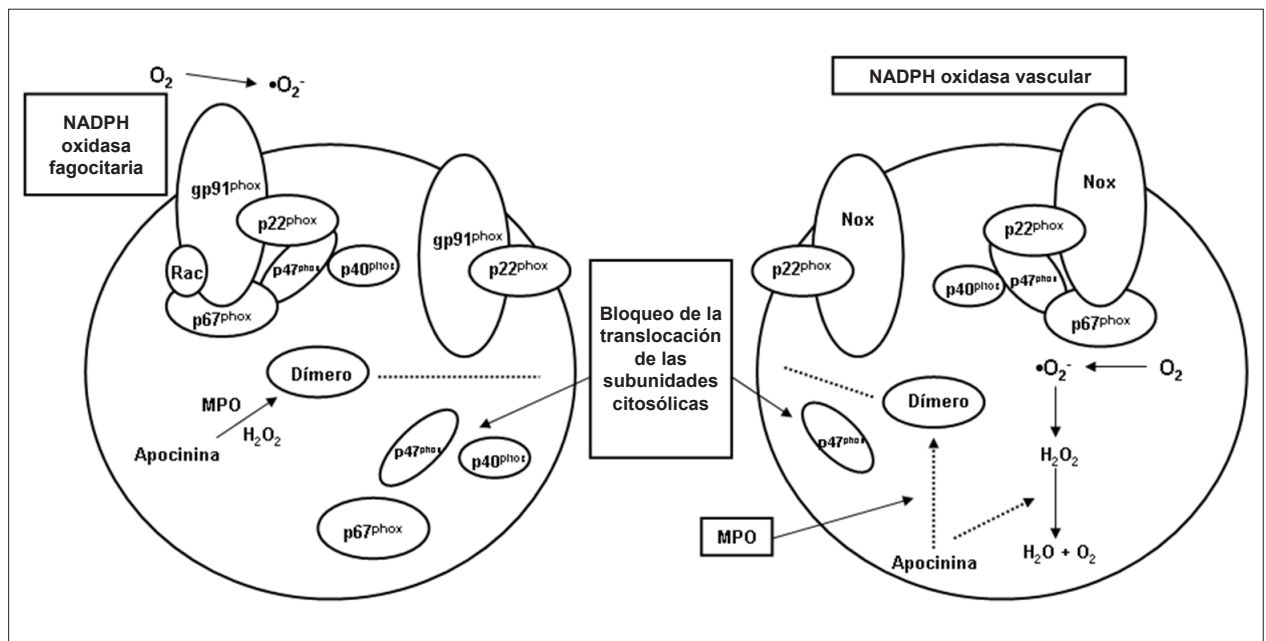


Fig. 3 - Mecanismo de inhibición de la NADPH oxidasa por la apocinina. La inhibición sólo es efectiva en la presencia de los dímeros de apocinina, condición posible cuando se agrega mieloperoxidasa (MPO) en células vasculares desprovistas de esta enzima. Adaptado de Touyz, 2008.

Artículo de Revisión

oxidasa estimulada por la Ang II, induciendo la fosforilación y translocación de la subunidad p47phox¹⁵. Además de ello, la Src es esencial para los efectos de la Ang II en la síntesis de las subunidades de la NADPH, estimulando el aumento en la expresión de la gp91phox, p22phox, p47phox y p67phox⁶⁰. Sumándose a ello, la fosforilación de la Src antecede la activación de las cascadas ERK1/2 y JNK en el músculo liso vascular, llevando a la migración, crecimiento celular, apoptosis y deposición de colágeno⁷⁰, activando complejos de adhesión focal, con importante participación en la respuesta inflamatoria vascular⁷¹. Esas vías proliferativas e inflamatorias retroalimentan positivamente la activación de la NADPH oxidasa en la vasculatura. En el músculo liso vascular, la transactivación del receptor EGF parece estar involucrada, llevando a la activación de la PI3 quinasa y de la proteína RacG pequeña minutos después de la activación del receptor AT1 de angiotensina^{5,11,14,16,20,46,72,73}. La Ang II actúa aumentando la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa en horas o días^{5,11,14,15,46}. En modelos animales propuestos por Rajagopalan et al¹¹, la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ vascular, la actividad de la NADPH oxidasa y los niveles de expresión de p22phox, gp91phox, p67phox y Nox1 estaban aumentados (para la NADPH oxidasa, hubo aumento del 100%).

En la activación por la Ang II, el H_2O_2 generado a partir del $\cdot\text{O}_2^-$ producido por la NADPH oxidasa, es esencial para

la hipertrofia de las células musculares lisas vasculares⁵⁴, actuando también como un vasoconstrictor (Figura 4). Sin embargo, en ciertos lechos vasculares, tanto en humanos como en ratones, el H_2O_2 endógeno, a bajas concentraciones, actúa como un factor relajante dependiente de endotelio, promoviendo hiperpolarización y vasodilatación periféricas, coronaria y en arterias cerebrales^{74,75}. En cultivo de células musculares lisas, la Ang II indujo hipertrofia, mediada por el H_2O_2 por medio de la activación de la expresión de protooncogenes, MAP quinasa y Akt/PKB⁵⁴. En ratones con deficiencia en el gen que expresa la gp91phox, la Ang II falla la inducción de la hipertrofia cardíaca¹⁷. Además de ello, evidencias experimentales indican que el $\cdot\text{NO}$ es un factor quimioatractivo para la angiogénesis y la inhibición de su producción bloquea la neoformación vascular⁴⁹. Adicionalmente la Ang II también promueve mecanismos involucrados en la respuesta inflamatoria, pudiendo estimular simultáneamente la producción de $\cdot\text{NO}$ e $\cdot\text{O}_2^-$ por las células endoteliales, situación favorable a la formación de $\cdot\text{ONOO}^-$ ^{1,13,46,76}. Curiosamente, la activación de la NADPH oxidasa por la Ang II es atenuada por la Ang-(1-7)¹², un componente biológicamente activo del sistema renina-angiotensina^{17,25,77}. La Ang-(1-7) parece inhibir la fosforilación de la Src inducida por la Ang II¹², promoviendo vasodilatación dependiente de endotelio por inducción de la liberación de $\cdot\text{NO}$ ³⁶. En cuanto

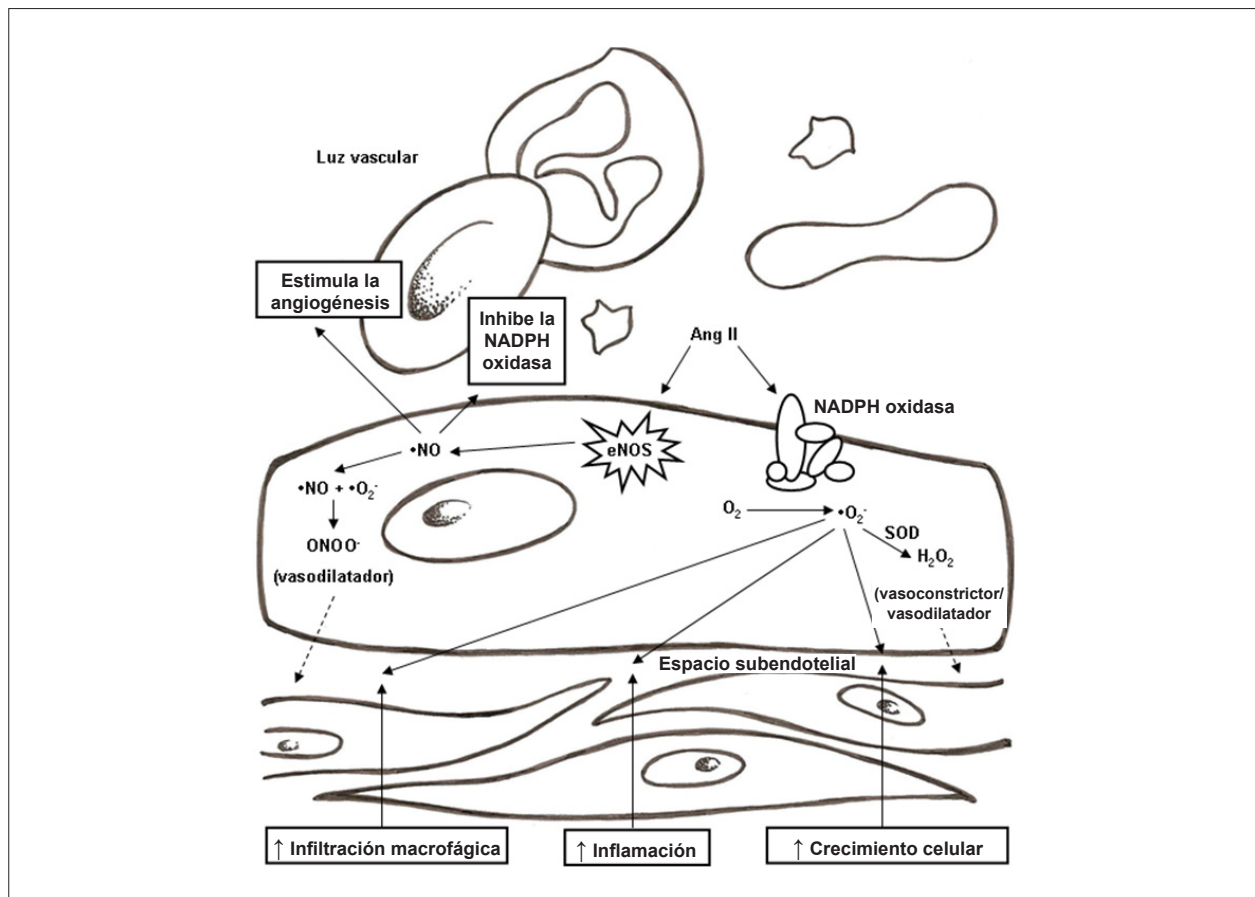


Fig. 4 - La activación de la NADPH oxidasa por la Ang II promueve aumento de la inflamación y de la infiltración de macrófagos en el espacio subendotelial, mecanismos relacionados a la progresión de la placa ateromatosa. Adaptado de Schiffrin et al, 2003.

a los mecanismo de activación humoral, la aldosterona regula las MAP quinatas y la generación de $\cdot\text{O}_2^-$ por parte de la NADPH oxidasa a través de mecanismos dependientes de c-Src⁷². Algunas acciones terapéuticas de drogas hipotensoras (bloqueadores de receptor de angiotensina e inhibidores de la enzima conversora de angiotensina) se atribuyen a la inhibición de la NADPH oxidasa, con la consiguiente reducción en la producción de ERON²⁵. No obstante, todavía no se sabe si estrategias terapéuticas que tenían como objetivo tales especies pueden traer beneficios directos en el manejo de pacientes hipertensos¹⁸.

Enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas se relacionan con la actividad aumentada de la NADPH oxidasa

Estudios clínicos demostraron que las ERON desempeñan un importante papel en la hipertensión. La producción de estas especies sufre aumento en pacientes con hipertensión esencial, hipertensión renovascular, hipertensión maligna y preeclampsia²⁵. Además de ello, la producción aumentada de $\cdot\text{O}_2^-$ por la NADPH oxidasa en vasos se relaciona con factores de riesgo para la aterosclerosis (Fig. 1) y perjuicio de la función endotelial en pacientes con enfermedad coronaria⁵. La producción de $\cdot\text{O}_2^-$ aparece aumentada en vasos ateroscleróticos^{2,40,42}, contribuyendo para el inicio de eventos proinflamatorios, con regulación de la transcripción génica de moléculas de adhesión de células vasculares y proteínas quimioatrativas para monocitos⁷⁸. Pacientes con aterosclerosis presentan tanto disfunción endotelial como desbalance redox. No obstante, el mecanismo preciso de asociación entre esos dos eventos en humanos todavía es desconocido⁴².

La disfunción endotelial se relaciona con el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa (por el aumento de la expresión de sus subunidades catalíticas^{14,53,79}), ya que lesiones ateroscleróticas en coronarias humanas muestran intensa expresión de gp91phox en la región vulnerable de la placa. Además de ello, la Nox4 está aumentada durante la fase de formación del ateroma, cuya aparición se da en forma reducida en lesiones avanzadas. Venas safenas magnas y arterias mamarias internas de pacientes con diabetes mellitus presentan aumento de la actividad de la NADPH oxidasa y del eNOS desacoplada (en este estado, la enzima actúa como productora de $\cdot\text{O}_2^-$ en vez de $\cdot\text{NO}$) al compararlas con el grupo control, poniendo de manifiesto la relación existente entre la NADPH oxidasa y las lesiones ateroscleróticas¹⁴.

La suplementación vitamínica puede reducir el desbalance redox vascular y mejorar el estado oxidativo total. Como ejemplo, algunos modelos animales en los cuales las propiedades antioxidantes de las vitaminas C y E se asocian a la disminución en la activación de la NADPH oxidasa^{42,80} y al aumento de la actividad de la SOD (el mayor sistema de defensa celular contra el $\cdot\text{O}_2^-$ en la vasculatura⁴⁶). Se postula que la vitamina E, hidrofóbica, podría inhibir la formación del complejo enzimático de las subunidades de la NADPH oxidasa⁴⁹. A pesar de esas observaciones, pruebas clínicas con vitaminas antioxidantes no mostraron beneficios terapéuticos con relación a la mortalidad en eventos cardiovasculares^{25,46}. Además de ello, dependiendo

principalmente de la posología, tales sustancias pueden presentar propiedades prooxidantes, con interacciones orgánicas perjudiciales. Como los datos de grandes estudios clínicos prospectivos fallaron en demostrar los efectos benéficos de los antioxidantes²⁵, lo que se recomienda es el mantenimiento de una dieta balanceada sin suplemento vitamínico, visto que los daños potenciales de tal suplemento todavía no están bien definidos.

En la hipertensión, el producto de la activación de la NADPH oxidasa, el $\cdot\text{O}_2^-$, promueve la oxidación de la H_4B , ocasionando un aumento en el desacoplamiento de la eNOS, elevando los niveles de esta especie de oxígeno, reduciendo la biodisponibilidad del $\cdot\text{NO}$ ¹⁴. Así, se cree que la H_4B puede estar deficiente en condiciones asociadas a la función endotelial alterada, como hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión y tabaquismo. Stroes et al⁸¹ mostraron que el tratamiento con H_4B aumenta la vasodilatación en humanos con hipercolesterolemia, al tiempo que la remoción de esta bipterina implica el desacoplamiento de la eNOS⁴⁰. Reforzando estos hallazgos, la sobreexpresión de la eNOS previene el remodelado de la vasculatura pulmonar inducido por hipoxia crónica⁵², ocasionando cambios estructurales y alteraciones en los procesos celulares que resultan en aumento de la relación capa media: lumen vascular^{82,83}.

Otro factor implicado en el aumento del desbalance redox es la endotoxemia. Durante su curso, la liberación de lipopolisacáridos promueve un aumento de la expresión y de la actividad de xantina oxidasa y de la NADPH oxidasa⁴⁶. El aumento de ERON dependientes de NADPH oxidasa en endosomas es importante para la respuesta inmune proinflamatoria²⁰. Neutrófilos activados producen $\cdot\text{O}_2^-$, radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y ácido hipocloroso (HOCl), además de péptidos microbicidas y proteasas⁸⁴ responsables por la respuesta inmune eficaz. La activación neutrofílica en la fagocitosis de neumococos induce la producción de ERON por la NADPH oxidasa. Además de ello, el bloqueo de la activación de la NADPH oxidasa durante la meningitis bacteriana aguda en animales experimentales conlleva una defensa deficiente contra *Streptococcus pneumoniae*⁸⁵.

En cuenta a la producción del $\cdot\text{NO}$, estudios clínicos y experimentales demuestran que la administración de la L-arginina restablece la síntesis de este radical y la función vascular en varias enfermedades cardiovasculares, sugiriendo que el perjuicio en la disponibilidad del aminoácido precursor está presente en estos agravamientos. Los niveles reducidos de L-arginina también promueven el desacoplamiento de la eNOS, resultando en aumento de las ERON³⁴.

Drogas donantes de $\cdot\text{NO}$ (nitrodilatadores) se han usado en el tratamiento de enfermedad coronaria, hipertensión y falla cardíaca, presentando acciones antiinflamatorias en la pared vascular como supresoras de la oxidación de lipoproteínas, inhibidoras de la migración y proliferación de células musculares lisas vasculares e inhibidoras de la agregación plaquetaria. Actúan además como supresoras de la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas después de la estimulación con factores proinflamatorios. Tales aspectos previenen la infiltración de células inflamatorias en la pared vascular, donde también hay oposición a las acciones proinflamatorias de las ERON. Además de ello, recientemente

Artículo de Revisión

se descubrió que el *NO parece ejercer efecto antiinflamatorio en la pared arterial por supresión de enzimas generadoras de ERON, particularmente la NADPH oxidasa⁵.

Las proteínas Nox se relacionan además con otros numerosos desórdenes orgánicos, incluyendo cáncer, reabsorción ósea y Mal de Alzheimer, por ser expresadas en diversos tejidos^{1,80,86}. Evidencias muestran el papel de la Nox2 en procesos neurodegenerativos, como Enfermedad de Parkinson, accidente vascular encefálico, trauma cerebral y meningitis, debido principalmente, a la neurotoxicidad de las ERON^{57,87}. De esa forma, los inhibidores de la Nox presentan potencial clínico notable, particularmente si no inhibieran la actividad de los fagocitos¹.

Inhibidores de la NADPH oxidasa: potencial objetivo terapéutico

Inhibidores farmacológicos de la NADPH oxidasa que bloquean directamente la actividad de esta enzima se han descrito comprendiendo estructuras péptídicas y no péptídicas. El DIP- difenileneiodonio^{5,10} y la 4'-hidroxí-3-metoxiacetofenona (la apocinina, aislada de la planta medicinal *Picrorhiza kurroa*)⁸⁸ han sido ampliamente utilizados para bloquear la actividad de la NADPH oxidasa *in vitro*⁵. Actualmente, se sabe que el DIP - difenileneiodonio no es selectivo y actúa como un oxidante inespecífico⁶. Ya la apocinina, a su vez, tiene múltiples acciones biológicas además de los efectos antioxidantes⁵, siendo caracterizada como un inhibidor de la NADPH oxidasa desde la década de 80⁶. Estudios de Godbole et al⁸⁹ demostraron que la apocinina restablece la producción de nitrito y la vasodilatación en arterias femorales comunes de suinos⁸⁹. Como el DIP no representa un inhibidor específico de la NADPH oxidasa, la apocinina se volvió extremadamente popular⁶, con 692 registros de publicaciones en el banco de datos de PubMed hasta el 15 de enero de 2009, de los cuales 571 son específicos para la clave "apocynin NADPH oxidase inhibition", demostrando la fuerte correlación entre los términos.

Los leucocitos son capaces de mediar el efecto inhibidor de la apocinina. Se sugiere que la mieloperoxidasa (MPO), expresada selectivamente en leucocitos, es necesaria para la ocurrencia del efecto inhibidor de esta sustancia. En células HEK293, desprovistas de MPO, la formación de dímeros de apocinina no ocurre, aun después de la sobreexpresión de las isoformas Nox⁶. Cuando se agrega MPO humana, los dímeros son identificados en las células con sobreexpresión de isoformas Nox o en las células co-incubadas con H₂O₂. En ausencia de H₂O₂ o Nox, la producción dimerica por las células HEK293 se inhibe. En leucocitos estimulados, los dímeros son rápidamente detectables, al tiempo que en células vasculares estimuladas no ocurre tal producción, aun en la presencia de MPO. De esa forma, los autores sugieren que la apocinina actuaría como antioxidante y no como inhibidor de la NADPH oxidasa en células no fagocíticas^{6,88}, estando la acción inhibitoria de la NADPH oxidasa restringida a leucocitos que expresan MPO⁶ (Fig. 3). No obstante, otras peroxidases distintas de la MPO pueden influir en la actividad de la apocinina, siendo posible que células vasculares posean enzimas peroxidativas capaces de activar este inhibidor. Tal

hecho es reforzado por hallazgos en células endoteliales, en las cuales se han identificado dímeros de apocinina, con la apocinina inhibiendo de forma dependiente de la concentración, la actividad de la NADPH oxidasa, la formación de ERON y la proliferación celular⁸⁸.

Pagano et al⁹⁰ desarrollaron el péptido quimérico gp91ds-Tat, compuesto por nueve aminoácidos de la capa proteica del VIH y nueve aminoácidos de la gp91phox^{1,10}. Esta sustancia reacciona con la p47phox e interfiere en la unión de esta subunidad con la gp91phox. La fracción "Tat" permite que el gp91ds-Tat penetre en la célula, siendo un inhibidor efecto de oxidasas que contienen gp91phox. Con todo, a pesar de que péptidos como el referido son útiles en intervenciones experimentales, los procesos de biotransformación dificultan su administración por vía oral, limitando su potencia en la terapéutica clínica¹.

Inhibidores péptídicos de la NADPH oxidasa también se han descrito, con el antibiótico PR-39, secretado en forma endógena por células intestinales y neutrófilos de humanos y suinos. Además de actuar en células inmunitarias, inhiben la actividad de la NADPH oxidasa no fagocítica. Inicialmente, el PR-39 era visto como inhibidor específico de la NADPH oxidasa. No obstante, estudios recientes mostraron que el antibiótico presentaba varios efectos, en parte porque se une a dominios SH3 de otras proteínas y en parte porque interactúa con lípidos de membrana⁵.

Conclusión

Se identifica que la NADPH oxidasa surgió como una de las principales estructuras involucradas en el desbalance redox vascular. Como el *NO también es capaz de suprimir la actividad de la NADPH oxidasa, se cree que este evento presente implicaciones directas, no sólo en el desarrollo de la enfermedad vascular, sino también en la recuperación aguda de la lesión de isquemia y reperfusión, en la cual el desbalance dependiente de NADPH tiene gran contribución^{1,5}.

El desarrollo de inhibidores específicos de oxidasas, basado en las unidades Nox, puede ofrecer herramientas para elucidar los papeles de estas enzimas experimentalmente. También puede ser útil en el tratamiento de diversas enfermedades¹, principalmente en lo que se refiere a la inhibición enzimática *selectiva* con el objetivo de reducir el daño vascular derivado de la producción excesiva de ERON sin, sin embargo, comprometer el mecanismo de señalización celular dependiente de las referidas especies.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CNPq (Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico), a la FAPEAL (Fundación de Amparo a la Investigación del Estado de Alagoas) y al PPSUS (Programa de Investigación para el Sistema Único de Salud)-2006/Ministerio de la Salud-FAPEAL por el apoyo financiero concedido.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio fue parcialmente financiado por el CNPq.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de la disertación de Maestría de la Universidad Federal de Bahía y Hospital Português.

Referencias

- Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 471-8.
- Cangemi R, Angelico F, Loffredo L, Ben MD, Pignatelli P, Martini A, et al. Oxidative stress-mediated arterial dysfunction in patients with metabolic syndrome: effect of ascorbic acid. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43: 853-9.
- Cosentino F, Barker J, Brand MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, et al. Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 496-502.
- Custodis F, Baumhäkel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Böhm M, et al. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein e deficient mice. *Circulation.* 2008; 117: 2377-87.
- Dusting GJ, Selemidis S, Jiang F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 100 (Suppl.1): 97-103.
- Heumüller S, Wild S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HHHW, Busse R, Schröder K, et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* 2008; 51: 1-7.
- Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Comp Physiol.* 2003; 285: R277-R297.
- Moens AL, Takimoto E, Tocchetti CG, Chakir K, Bedja D, Cormaci G, et al. Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation.* 2008; 117: 2626-36.
- Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshev I, Dansky HM. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Circ Res.* 2005; 96: 1178-84.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidase, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008; 31: S170-S180.
- Rajagopalan S, Kutrz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, 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.* 1999; 97: 1916-23.
- Sampaio WO, Castro CH, Santos RAS, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension.* 2007; 50: 1093-8.
- Schiffrin EL, Touyz RM. Inflammation and vascular hypertrophy induced by angiotensin II: role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species independently of blood pressure elevation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 707-9.
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003; 42: 1075-81.
- Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src Induces phosphorylation and translocation of p47phox: role of superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1-9.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 2002; 90: 1205-13.
- Touyz RM, Mercure C, He Y, Javeshghani D, Yao G, Callera GE, et al. Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase. *Hypertension.* 2005; 45: 530-7.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1041-4.
- Ülker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Antioxidant vitamins C and E ameliorate hyperglycaemia-induced oxidative stress in coronary endothelial cells. *Diabetes, Obes Metab.* 2004; 6: 442-51.
- Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE.* 2006; 349: re8.
- Yokoyama M, Inoue N. How vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression are regulated. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1540-1.
- Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res.* 2002; 91: 54-61.
- Baehner RL, Gilman N, Karnovsky ML. Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes comparative studies. *J Clin Invest.* 1970; 49: 692-700.
- Soberman RJ. The expanding network of redox signaling: new observations, complexities, and perspectives. *J Clin Invest.* 2003; 111: 571-4.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44: 248-52.
- Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Chantemele EB, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1627-33.
- Zhang L, Sheppard OR, Shah AM, Brewer AC. Positive regulation of the NADPH oxidase NOX4 promoter in vascular smooth muscles cells by E2F. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45 (5): 679-85.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-6.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115: 1285-95.
- Evora PRB, Pearson PJ, Rodrigues AJ, Viaro F, Schaff HV. Relaxamento dependente do endotélio causado pela poli-L-arginina: implicações sobre a hiperpolarização como mecanismo de vasodilatação. *Arq Bras Cardiol.* 2003; 80: 621-5.
- Pereira LMM, Mandarim-de-Lacerda CA. Estudo quantitativo da microcirculação miocárdica na hipertensão arterial por progressiva inibição da síntese do óxido nítrico. *Arq Bras Cardiol.* 1999; 73: 407-12.
- Santhanam L, Lim HK, Lim HK, Mirel V, Brown T, Patel M, et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2007; 101: 692-702.
- Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Parkington HC, Head GA, Evans RG. Endothelial dysfunction and arterial pressure regulation during early diabetes in mice: roles for nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarization factor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293: R707-R713.
- Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34: 906-11.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hasfner G, Tiret L, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients

Artículo de Revisión

- with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1605-13.
36. de Haan JB, Witting PK, Stefanovic N, Pete J, Daskalakis M, Kola I, et al. Lack of the antioxidant glutathione peroxidase-1 does not increase atherosclerosis in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J Lipid Res.* 2006; 47: 1157-67.
37. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122: 339-52.
38. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, et al. S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 2004; 10: 1200-7.
39. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, et al. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation.* 2008; 117: 2211-23.
40. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, et al. Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001; 103: 1282-8.
41. Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest.* 2001; 107: 23-4.
42. Lavi S, Yang EH, Prasad A, Mathew V, Barsness GW, Rihal CS, et al. The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans. *Hypertension.* 2007; 51: 127-33.
43. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74: 139-62.
44. Yu Z, Zhang J, Wang X, Chen J. Excessive copper induces the production of reactive oxygen species, which is mediated by phospholipase D, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and antioxidant system. *J Integr Plant Biol.* 2008; 50 (2): 157-67.
45. Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Perez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, et al. Low-mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295: H1033-H1043.
46. Wassmann S, Wassman K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 2004; 44: 381-6.
47. Ülker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS And NADPH oxidase activities. *Hypertension.* 2003; 41: 534-9.
48. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87: 315-424.
49. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant Effects of Vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001; 38 [part2]: 606-11.
50. Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res.* 2000; 87: 26-32.
51. Hildeman DA, Mitchell T, Kappler T, Marrack P. T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest.* 2003; 111: 575-81.
52. Fresquet F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R, et al. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol.* 2006; 148: 714-23.
53. Xu P, Costa-Gonçalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in mas gene-deleted mice. *Hypertension.* 2008; 51 [part2]: 574-80.
54. Jankowski A, Grinstein S. A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential: quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils. *J Biol Chem.* 1999; 274: 26098-104.
55. Cifuentes ME, Pagano PJ. c-Src and smooth muscle NAD(P)H oxidase: assembling a path to hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 919-21.
56. Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF Jr. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol.* 2008; 181: 1129-39.
57. Schäppi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause K. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol.* 2008; 30: 255-71.
58. Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski H, Morawietz H. Induction of NAD(P)H Oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potencial of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy. *Circulation.* 2001; 104: 1767-72.
59. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest.* 2003; 111: 769-78.
60. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He H, Quinn MT, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 2002; 90: 1205-13.
61. Ambasta RK, Schreiber JC, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP. Nox1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41 (2): 193-201.
62. Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, et al. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox 1 mediates angiotensin-II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Cir Res.* 2001; 88: 888-94.
63. Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M, Kietzmann T, Hess J, Gorchach A. Nox2 and Nox4 mediate proliferative response in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8 (9-10): 1473-84.
64. Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, Busse R, et al. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke.* 2007; 38: 3000-6.
65. Steinbretcher UP. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem.* 1987; 262: 3603-8.
66. Griendling KK, Minuri CA, Ollerenshaw TD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth cells. *Circ Res.* 1994; 74: 1141-8.
67. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000; 52 (4): 639-72.
68. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Minieri CA, Akers M, Lassegue B, Griendling KK. Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal.* 1999; 1 (2): 167-79.
69. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005; 280 (49): 40813-9.
70. Kyam M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kagami S, Izawa Y, Fujita Y, et al. Src and Cas are essentially but differentially involved in angiotensin II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-jun NH2-terminal kinase activation. *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 832-41.
71. Gual JL. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int J Bioch Cell Biol.* 1997; 29: 1085-96.
72. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension.* 2005; 45: 773-9.
73. Kawahara T, Quinn MT, Lamberth JD. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Doux) family of enzymes. *BMC Evol Biol.* 2007; 7: 109.
74. Rabêlo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite J, Lemos VS. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H2O2. *Br J Pharmacol.* 2003; 138: 1215-20.
75. Thengchaisri N, Shipley R, Ren Y, Parker J, Kuo L. Exercise training restores coronary arteriolar dilation to NOS activation distal to coronary artery occlusion: role of hydrogen peroxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 791-8.

76. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reaction with DNA and protein. *J Clin Invest.* 2003; 111: 583-93.
77. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2002; 40: 774-9.
78. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson C, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue: lucigenin but not coeleterazine enhances superoxide formation. *Circ Res.* 1999; 84: 1203-11.
79. Stocker R, Huang A, Jeranian E, Hou JY, Wu TT, Thomas SR, et al. Hypochlorous acid impairs endothelium-derived nitric oxide bioactivity through a superoxide-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 2028-33.
80. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2003; 111: 785-93.
81. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1997; 99: 41-6.
82. Bahia L, Aguiar LCK, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. O endotélio na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50 (2): 291-303.
83. Touyz RM. Vascular remodeling, retinal arteries, and hypertension. *Hypertension.* 2007; 50: 603-4.
84. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo M. Priming of neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol.* 2008; 30: 279-89.
85. Paul R, Obermaier B, Van Ziffle J, Angele B, Pfister HW, Lowell CA, et al. Myeloid Src kinases regulate phagocytosis and oxidative burst in pneumococcal meningitis by activating NADPH oxidase. *J Leukoc Biol.* 2008; 84 (4): 1141-50.
86. Delwing D, Delwing D, Bavaresco CS, Wyse ATS. Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular arginine administration. *Brain Res.* 2008; 1193: 120-7.
87. Li B, Guo Y, Sun M, Dong H, Wu S, Wu D, et al. The NADPH oxidase is involved in lipopolysaccharide-mediated motor neuron injury. *Brain Res.* 2008; 1226: 199-208.
88. Touyz RM. Apocynin, NADPH oxidase and vascular cells: a complex matter. *Hypertension.* 2008; 51: 172-4.
89. Godbole AS, Lu X, Guo X, Kassab GS. NADPH oxidase has a directional response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296: H152-H158.
90. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 14483-8.