

Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular

Redox Unbalance: NADPH Oxidase as Therapeutic Target in Blood Pressure Control

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

Resumo

Vários estudos destacam as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) como importantes contribuintes na patogênese de numerosas doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, aterosclerose e falência cardíaca. Tais espécies são moléculas altamente bioativas e com vida curta derivadas, principalmente, da redução do oxigênio molecular. O complexo enzimático da NADPH oxidase é a maior fonte dessas espécies reativas na vasculatura. Sob condições fisiológicas, a formação e eliminação destas substâncias aparecem balanceadas na parede vascular. Durante o desbalanço redox, entretanto, há um aumento na atividade da NADPH oxidase e predomínio de agentes pró-oxidantes, superando a capacidade de defesa orgânica antioxidante. Além disso, tal hiperatividade enzimática reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico, crucial para a vasodilatação e a manutenção da função vascular normal. Apesar de a NADPH oxidase relacionar-se diretamente à disfunção endotelial, foi primeiramente descrita por sua expressão em fagócitos, onde sua atividade determina a eficácia dos mecanismos de defesa orgânica contra patógenos. As sutis diferenças existentes entre as unidades estruturais das NADPH oxidases, a depender do tipo celular que as expressa, podem ter implicações terapêuticas, permitindo a inibição seletiva do desequilíbrio redox induzido pela NADPH oxidase, sem comprometer, entretanto, sua participação nas vias fisiológicas de sinalização celular que garantem a proteção contra microorganismos.

Introdução

Vários estudos demonstram que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) contribuem efetivamente para

Palavras-chave

NADPH oxidase, inibidores da NADPH oxidase, espécies de oxigênio reativas, espécie de nitrogênio reativas, oxirredução, doenças cardiovasculares.

a patogênese de agravos cardiovasculares, como hipertensão, aterosclerose, hipertrofia e falência cardíacas e reestenose, além de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão. Múltiplos sistemas enzimáticos produzem ERONs e seus derivados na vasculatura, incluindo ciclooxigenase, lipoxigenase, citocromo P450, xantina oxidase (XO), mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico sintase (NOS) e NADPH oxidase - esta última uma das mais importantes fontes destas substâncias, tanto em células endoteliais como musculares lisas¹⁻²².

Desde as observações de Baehner e cols.²³ há cerca de 40 anos - que permitiram a descoberta da NADPH oxidase²⁴ - vários foram os estudos desenvolvidos para compreender a relação entre o referido complexo enzimático e o desbalanço redox (estresse oxidativo). O aumento da produção de ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e outras ERONs está implicado na aterosclerose, hipertensão arterial, proliferação celular e hipertrofia. Entretanto, o papel da NADPH oxidase em tais processos permanece incerto devido, principalmente, à presença de múltiplas isoformas de Nox (subunidades constituintes da NADPH oxidase) e seus ligantes, bem como à falta de inibidores específicos^{25,26}. O complexo enzimático atua como doador de elétron para a redução do O_2 a $\cdot\text{O}_2^-$, segundo a reação $2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NAD(P)} + \text{H}^+$ ^{10,16,22,25,27}.

$\cdot\text{O}_2^-$: produção pela NADPH oxidase e sua relação com o $\cdot\text{NO}$

Os experimentos pioneiros de Furchgott e Zawadzki²⁸ primeiro demonstraram a existência de um fator relaxante derivado de endotélio que foi subsequentemente identificado como $\cdot\text{NO}$ ²⁹, produzido a partir da L-arginina pela ação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)²⁹⁻³² na presença de cofatores, principalmente a tetrahidrobiopterina (H_4B ; Figura 1). O $\cdot\text{NO}$ difunde-se para as células musculares lisas vasculares e ativa a guanilato ciclase, promovendo a vasodilatação mediada pelo GMP cíclico²⁹⁻³³. Em condições normais, o $\cdot\text{NO}$ desempenha papel chave na manutenção da parede vascular num estado quiescente por inibição da inflamação, proliferação celular e trombose, reduzindo o tônus vascular, a ativação de plaquetas e leucócitos, a proliferação de células musculares lisas, a deposição de matriz extracelular e a morte de células endoteliais³⁴⁻³⁶. O $\cdot\text{NO}$ é também um radical livre e, quando produzido juntamente com o $\cdot\text{O}_2^-$, reage extremamente rápido para formar uma espécie pró-inflamatória altamente reativa: o

Correspondência: 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

Artigo recebido em 28/02/09; revisado recebido em 22/05/09; aceito em 08/06/09.

ânion peroxinitrito (ONOO^- ; vasodilatador menos potente que o NO). Assim, a maior parte da citotoxicidade atribuída ao NO é derivada do ONOO^- ^{5,37}. Este último é um importante mediador da peroxidação de lipídios, incluindo a oxidação da LDL, evento crucial para a aterogênese⁵.

Fisiologicamente, certa quantidade de O_2^- intracelular é requerida para a sinalização normal desempenhada pelo NO . Todavia, patologicamente, o aumento extracelular da primeira espécie diminui a biodisponibilidade do NO , reduzindo sua difusão para o músculo liso vascular^{38,39}. Em determinadas circunstâncias, a produção crônica de ERONs (aumento da atividade da NADPH oxidase, por exemplo) excede a capacidade dos antioxidantes celulares enzimáticos (como a glutationa peroxidase-1 - principal enzima antioxidante no citosol e nas mitocôndrias^{35,36} - e as formas de superóxido dismutase ligadas à membrana, responsáveis por dismutar o ânion superóxido em H_2O_2) e não enzimáticos, contribuindo para a doença vascular por indução da ativação endotelial sustentada^{29,40}. Grandes quantidades de O_2^- formadas captam a maior parte ou todo o NO , promovendo a formação de ONOO^- ^{34,41}. O O_2^- gerado pode ainda ser transformado em radical hidroxil, que se difunde para o músculo liso vascular e induz a produção de endoperóxidos vasoconstritores, como a prostaglandina H_2 e prostanoídes⁴¹, derivados da peroxidação do ácido aracôdônico catalisada por radicais livres, considerados marcadores do aumento sistêmico do desbalanço redox *in vivo*⁴². O excesso de produção de O_2^- , com conseqüente diminuição da biodisponibilidade do NO , pode ser promovido ainda por metais de transição, tais como ferro, cobre, mercúrio e chumbo. Alguns destes contaminantes ambientais importantes são capazes de aumentar a produção de radicais livres via ativação do complexo enzimático NADPH oxidase^{43,44}, sendo este mecanismo uma causa provável para a hipertensão induzida pelas referidas espécies químicas.

Estudos de Wiggers e cols.⁴⁵ demonstraram, em ratos, que a exposição a baixas concentrações de mercúrio induz disfunção endotelial tanto em vasos de condutância como de resistência. Os autores sugerem que esse evento decorre, provavelmente, da redução da biodisponibilidade do NO devido ao aumento na produção vascular de O_2^- . Dessa forma, é possível que o tratamento com o mercúrio afete a expressão proteica ou, mais especificamente, a atividade da NADPH oxidase.

Tal desequilíbrio relaciona-se às ERONs pelo fato de o O_2^- ser fundamental à respiração celular, havendo diversos sistemas enzimáticos que utilizam este substrato como um aceptor de elétrons^{1,20}. A família dessas espécies inclui moléculas altamente bioativas com vida curta derivadas, principalmente, da redução do O_2 . Fisiologicamente, a formação e a eliminação das ERONs são balanceadas na parede vascular⁴⁶, cujo papel chave é desempenhado pelo endotélio na manutenção do tônus vascular e na pressão sanguínea pela liberação de substâncias vasoativas, como o NO ⁴⁷. O aumento de ERONs devido ao desbalanço redox foi constatado em aorta, carótida, mesentérica e coronárias de ratos e camundongos idosos, sugerindo que este desequilíbrio está associado ao envelhecimento, com o aumento da atividade da NADPH oxidase⁴⁸. Evidências experimentais indicam que o dano oxidativo induzido por espécies reativas decorre do aumento da produção de O_2^- e seu metabolismo e/ou da redução da biodisponibilidade de NO ^{25,49}. Contudo, apesar do excesso de ERONs ser tóxico, concentrações fisiológicas dessas espécies podem funcionar como sinal mediador de diversas respostas, incluindo migração celular e crescimento^{20,22,50}, já que, sob condições normais e na maioria das artérias, a produção de NO predomina, de modo que este radical retira pequenas quantidades de O_2^- formado^{40,51-53}, garantindo a manutenção do equilíbrio no estado oxidativo orgânico.

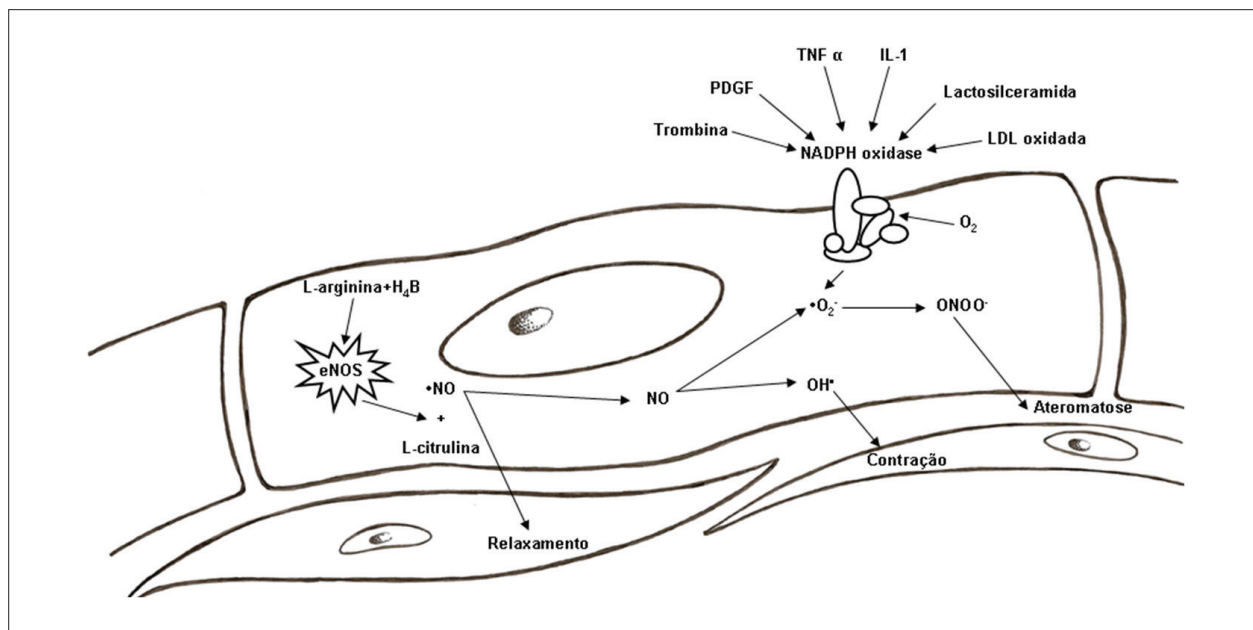


Fig. 1 - Mecanismos de ativação da NADPH oxidase e sua relação com o metabolismo do NO .

A inibição não seletiva da NADPH oxidase compromete a sinalização celular fisiológica

A NADPH oxidase melhor caracterizada é a fagocítica, presente em macrófagos e neutrófilos, sendo um complexo proteico multimérico com componentes na membrana celular e no citoplasma. O componente associado à membrana é o citocromo b558-oxidase, formado por uma subunidade maior, a gp91phox (o termo “phox” deriva de “phagocytic oxidase”)⁷, e uma menor, p22phox. Além dessas, a enzima compreende três subunidades citoplasmáticas (p47phox, p67phox e p40phox) e uma pequena proteína G regulatória (Rac2). A ativação da NADPH oxidase inicia-se pela fosforilação (em serina) da subunidade citoplasmática p47phox, desencadeando sua migração para a membrana, onde, juntamente com a Rac, associa-se ao citocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima^{1,5,17,37,53-58} (Figura 2).

A NADPH oxidase expressa nas células vasculares difere daquela encontrada em fagócitos, tanto pela estrutura bioquímica quanto pelas funções⁵. Foi inicialmente encontrada em neutrófilos, reconhecidamente essenciais na defesa contra microorganismos eliminados pela combinação de diversos mecanismos que incluem a geração de $\cdot\text{O}_2^-$ produzido pelas subunidades endoteliais p40phox, p47phox e gp91phox da NADPH oxidase⁵⁴. Curiosamente, os grupamentos catalíticos gp91phox, p22phox, p47phox e p67phox também foram encontrados em fibroblastos da adventícia^{7,13,22,55}.

A identificação de subunidades homólogas à gp91phox resultou na formação da família Nox (de “Nonphagocytic NADPH Oxidase”), constituída atualmente por sete

membros (Nox1, Nox2 [formalmente conhecida como gp91phox], Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2 [Dual oxidase])^{10,56,57}. Os principais componentes do complexo enzimático NADPH oxidase, Nox1 e Nox4, são altamente expressos nas células vasculares e aumentados durante o processo de remodelamento vascular, como na hipertensão e aterosclerose⁷. Essas sutis diferenças na expressão estrutural oferecem a oportunidade de desenvolvimento de inibidores específicos da NADPH oxidase vascular que não comprometam a sinalização fisiológica e as funções fagocíticas mediadas por ERONs⁵.

Várias características das NADPH oxidases são notáveis. Primeiro, a enzima vascular produz $\cdot\text{O}_2^-$ em baixos níveis por longos períodos de tempo, a maior parte intracelularmente, onde desempenha papel na sinalização celular^{1,5,14,16,46,50,59} (Figura 3). Segundo, a gp91phox é, geralmente, substituída por Nox1 ou Nox4 homólogas, particularmente no músculo liso. Terceiro, enquanto a Nox homóloga e a subunidade p22phox ligada à membrana são essenciais para manter uma unidade estável que suporte a transferência eletrônica para a geração de $\cdot\text{O}_2^-$, permanece ainda obscuro o papel dos componentes citosólicos na NADPH oxidase, cujo último aspecto exige implicações na ativação e especificidade dos inibidores da referida enzima^{1,5,14,16,46}. Além disso, a expressão das subunidades parece variar ainda em células musculares lisas de diferentes vasos. Células musculares lisas derivadas de artéria de resistência humana (HVSMC) parecem expressar uma subunidade gp91phox semelhante à neutrofílica⁶⁰. O homólogo da gp91phox, Nox1, é expresso em células musculares lisas de rato (RVSMC) e camundongo⁶¹ e células musculares lisas de aorta humana (ASMC), não aparecendo

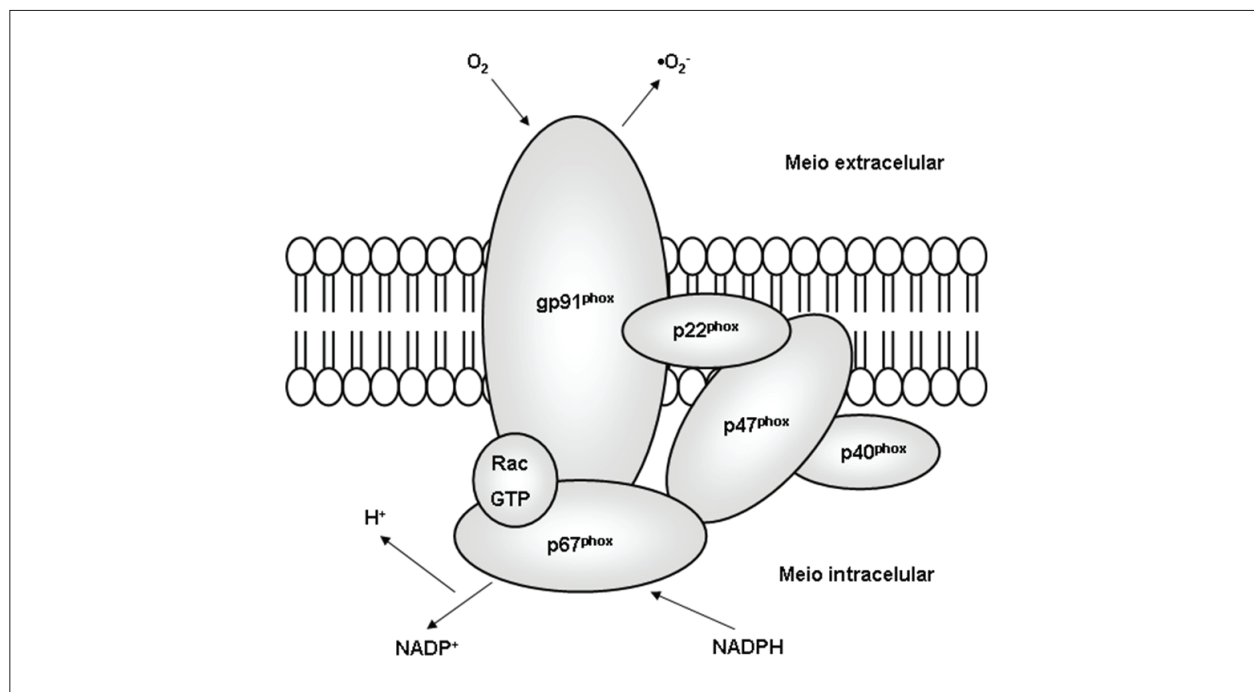


Fig. 2 - Estrutura da NADPH oxidase fagocítica. A gp91phox é o ligante da NADPH com função transportadora de elétrons na NADPH oxidase ativa. A produção de $\cdot\text{O}_2^-$ extracelular ocorre pela redução de um elétron do O_2 via gp91phox, usando β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). Adaptado de Dusting e cols., 2005.

em artérias de resistência de humanos⁶⁰. A Nox1 possui 56% de homologia com a gp91phox humana e, em conjunto com a p22phox, é o provável componente funcional do citocromo b558 em ASMCs e RVSMC⁶². Nox4, outro homólogo da gp91phox, é expresso em RVSMC, ASMC e HVSMC. Células endoteliais expressam principalmente as subunidades Nox2 e Nox4. A expressão de Nox1 é menos proeminente no endotélio e pode ser aumentada durante o processo de adesão leucocitária e estresse de cisalhamento. Nox2 e Nox4 parecem ser as subunidades funcionais mais importantes em células endoteliais, contribuindo de maneira semelhante na produção de espécies reativas⁶³.

Há também evidências de que a NADPH oxidase é encontrada no núcleo celular, envolvendo-se na expressão gênica. Vários grupos identificaram subunidades de NADPH oxidase em membranas internas. Entretanto, as consequências da ativação da NADPH oxidase em regiões perinucleares ainda não são claras²⁰.

Ativação enzimática: papel central das subunidades p47phox e gp91phox

O evento inicial mais relevante para a ativação da NADPH oxidase envolve a fosforilação da p47phox e a consequente interação com a gp91phox^{1,16}. A ligação entre domínios homólogos de duas estruturas Src autoinibem a ligação com a p22phox. Tal interação autoinibitória é perdida na fosforilação, permitindo a ligação entre as subunidades p47phox e p22phox¹, ocorrendo a ativação da NADPH oxidase. Corroborando, a deleção gênica da subunidade gp91phox confere proteção contra acidente vascular cerebral isquêmico em camundongos, por evitar disfunção da barreira hematoencefálica⁶⁴.

As NADPH oxidases são ativadas e reguladas por diversos fatores, como forças mecânicas, hormônios e citocinas, dentre os quais se destacam a trombina, o Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), a lactosilceramida, a Interleucina-1 e a LDL oxidada (Figura 1). Esta última aumenta a produção de EROns e a expressão de Nox4 no endotélio humano^{1,5}. Macrófagos cultivados acumulam grandes quantidades de colesterol quando expostos à LDL modificada (receptores para LDL são abundantes nestas células, indicando que tais estruturas estariam envolvidas na formação de células espumosas ateroscleróticas)^{58,65}.

Em células musculares lisas vasculares, a angiotensina II (Ang II) é um potente estimulador da atividade da NADPH oxidase. Este peptídeo angiotensinérgico é conhecido fator na patogênese da maioria das desordens cardiovasculares, podendo induzir a formação de $\cdot\text{O}_2^-$, em parte, pelas NADPH oxidases vasculares⁵. A ativação mediada pela Ang II foi demonstrada inicialmente por Griendling e cols.⁶⁶, destacando a importância das concentrações de Ang II no aumento da atividade da NADPH oxidase nas células musculares lisas vasculares^{1,15,16}. Apesar da sinalização pela qual a Ang II estimula a NADPH oxidase não ter sido elucidada por completo, as vias da PLD, da PKC, da PLA2, PI3K e tiol-oxireductases parecem estar envolvidas⁶⁷⁻⁶⁹. No músculo liso vascular, a tirosina quinase Src regula a atividade da NADPH oxidase estimulada pela Ang II, induzindo a fosforilação e translocação da subunidade p47phox¹⁵. Além disso, a Src é essencial para os efeitos da Ang II na síntese das subunidades da NADPH, estimulando o aumento na expressão da gp91phox, p22phox, p47phox e p67phox⁶⁰. Somando-se a isso, a fosforilação da Src antecede a ativação das cascatas ERK1/2 e JNK no músculo liso vascular, levando à migração, crescimento celular, apoptose e deposição de colágeno⁷⁰, ativando complexos de adesão focal, com importante

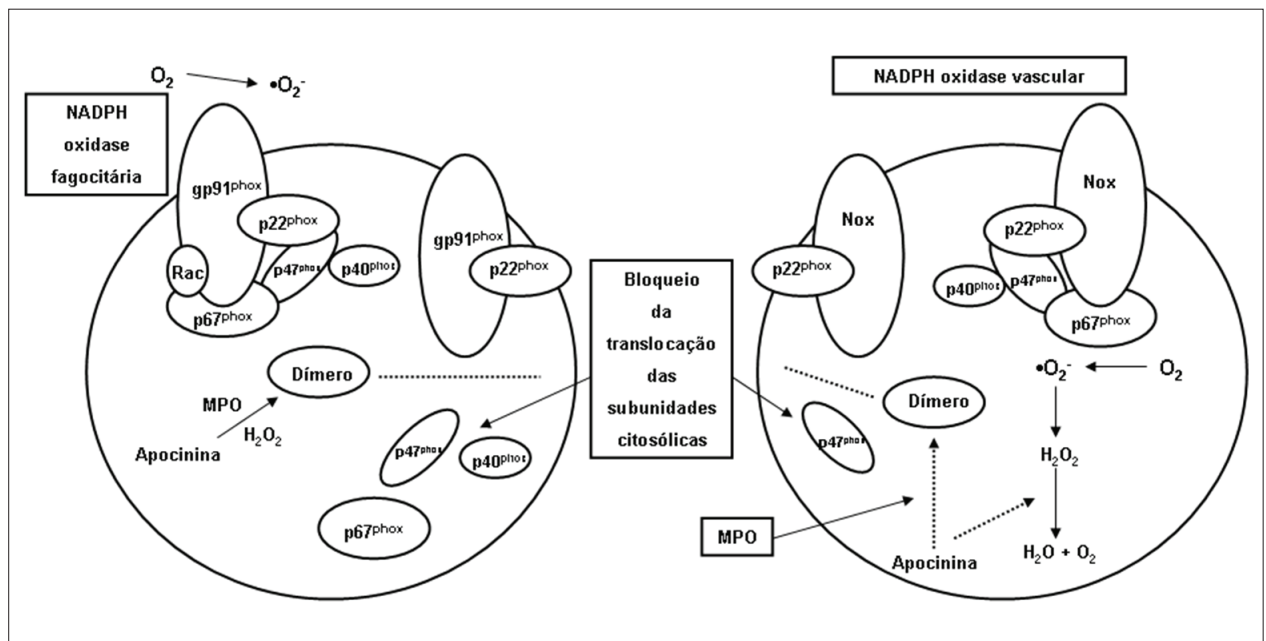


Fig. 3 - Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina. A inibição somente é efetiva na presença dos dímeros de apocinina, condição possível quando do acréscimo de mieloperoxidase (MPO) em células vasculares desprovidas desta enzima. Adaptado de Touyz, 2008.

Artigo de Revisão

participação na resposta inflamatória vascular⁷¹. Essas vias proliferativas e inflamatórias retroalimentam positivamente a ativação da NADPH oxidase na vasculatura. No músculo liso vascular, a transativação do receptor EGF parece estar envolvida, levando à ativação da PI3 quinase e da proteína RacG pequena minutos após a ativação do receptor AT1 de angiotensina^{5,11,14,16,20,46,72,73}. A Ang II atua aumentando a expressão das subunidades da NADPH oxidase em horas ou dias^{5,11,14,15,46}. Em modelos animais propostos por Rajagopalan e cols.¹¹, a produção de $\cdot\text{O}_2^-$ vascular, a atividade da NADPH oxidase e os níveis de expressão de p22phox, gp91phox, p67phox e Nox1 estavam aumentados (para a NADPH oxidase, houve aumento de 100%).

Quando da ativação pela Ang II, o H_2O_2 , gerado a partir do $\cdot\text{O}_2^-$ produzido pela NADPH oxidase, é essencial para a hipertrofia das células musculares lisas vasculares⁵⁴, atuando ainda como um vasoconstritor (Figura 4). Entretanto, em certos leitos vasculares, tanto em humanos como em camundongos, o H_2O_2 endógeno, em baixas concentrações, atua como um fator relaxante dependente de endotélio, promovendo hiperpolarização e vasodilatação periféricas, coronariana e em artérias cerebrais^{74,75}. Em cultura de células musculares lisas, a Ang II induz hipertrofia, mediada pelo H_2O_2 por meio da ativação da expressão de proto-oncogenes, MAP quinases e Akt/PKB⁵⁴. Em camundongos

com deficiência no gene que expressa a gp91phox, a Ang II falha na indução da hipertrofia cardíaca¹⁷. Além disso, evidências experimentais indicam que o $\cdot\text{NO}$ é um fator quimioatraente para a angiogênese e a inibição de sua produção bloqueia a neoformação vascular⁴⁹. Adicionalmente, a Ang II também promove mecanismos envolvidos na resposta inflamatória, podendo estimular simultaneamente a produção de $\cdot\text{NO}$ e $\cdot\text{O}_2^-$ pelas células endoteliais, situação favorável à formação de $\cdot\text{ONOO}^-$ ^{1,13,46,76}. Curiosamente, a ativação da NADPH oxidase pela Ang II é atenuada pela Ang-(1-7)¹², um componente biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina^{17,25,77}. A Ang-(1-7) parece inibir a fosforilação da Src induzida pela Ang II¹², promovendo vasodilatação dependente de endotélio por indução da liberação de $\cdot\text{NO}$ ³⁶. Quanto aos mecanismos de ativação humoral, a aldosterona regula as MAP quinases e a geração de $\cdot\text{O}_2^-$ pela NADPH oxidase através de mecanismos c-Src dependentes⁷². Algumas ações terapêuticas de drogas hipotensoras (bloqueadores de receptor de angiotensina e inibidores da enzima conversora de angiotensina) são atribuídas à inibição da NADPH oxidase, com conseqüente redução na produção de ERONS²⁵. Entretanto, ainda não se sabe se estratégias terapêuticas que tenham como alvo tais espécies podem trazer benefícios diretos no manejo de pacientes hipertensos¹⁸.

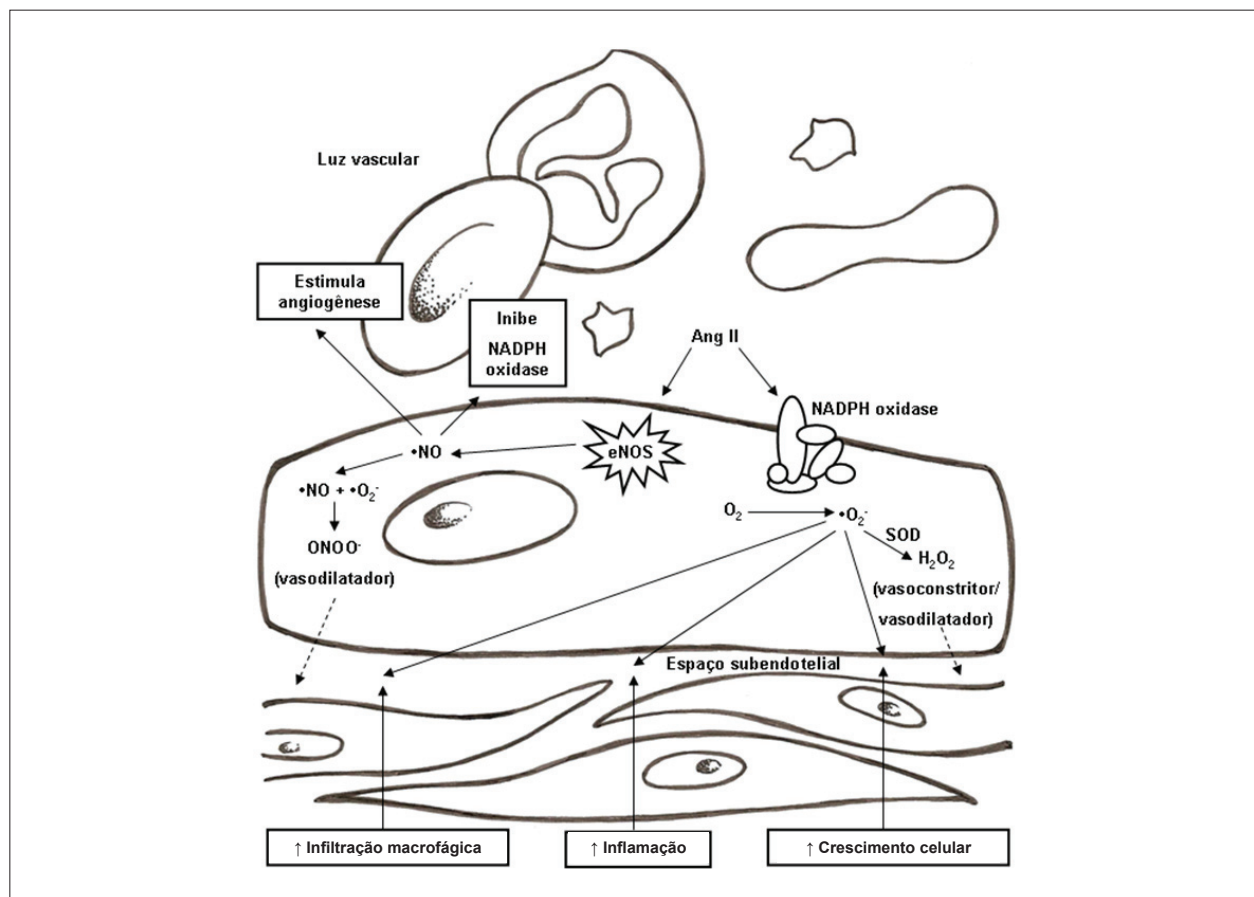


Fig. 4 - A ativação da NADPH oxidase pela Ang II promove aumento da inflamação e da infiltração de macrófagos no espaço subendotelial, mecanismos relacionados à progressão da placa aterosclerótica. Adaptado de Schiffrin e cols., 2003.

Doenças cardiovasculares e neurodegenerativas relacionam-se com a atividade aumentada da NADPH oxidase

Estudos clínicos demonstraram que as ERONs desempenham importante papel na hipertensão. A produção dessas espécies sofre aumento em pacientes com hipertensão essencial, hipertensão renovascular, hipertensão maligna e pré-eclâmpsia²⁵. Além disso, a produção aumentada de $\cdot\text{O}_2^-$ pela NADPH oxidase em vasos relaciona-se a fatores de risco para a aterosclerose (Fig. 1) e prejuízo da função endotelial em pacientes com doença coronariana⁵. A produção de $\cdot\text{O}_2^-$ aparece aumentada em vasos ateroscleróticos^{2,4,42}, contribuindo para o início de eventos pró-inflamatórios, com regulação da transcrição gênica de moléculas de adesão de células vasculares e proteínas quimioatraentes para monócitos⁷⁸. Pacientes com aterosclerose apresentam tanto disfunção endotelial como desbalanço redox. Entretanto, o mecanismo preciso de associação entre esses dois eventos em humanos ainda é desconhecido⁴².

A disfunção endotelial relaciona-se com o aumento da atividade da NADPH oxidase (pelo aumento da expressão de suas subunidades catalíticas^{14,53,79}), já que lesões ateroscleróticas em coronárias humanas mostram intensa expressão de gp91phox na região vulnerável da placa. Além disso, a Nox4 está aumentada durante a fase de formação do ateroma, cujo aparecimento se dá em forma reduzida em lesões avançadas. Veias safenas magnas e artérias mamárias internas de pacientes com diabete melito apresentam aumento da atividade da NADPH oxidase e da eNOS desacoplada (neste estado, a enzima atua como produtora de $\cdot\text{O}_2^-$ em vez de $\cdot\text{NO}$) quando comparadas com grupo controle, evidenciando a relação existente entre a NADPH oxidase e as lesões ateroscleróticas¹⁴.

A suplementação vitamínica pode reduzir o desbalanço redox vascular e melhorar o estado oxidativo total. Como exemplo, alguns modelos animais nos quais as propriedades antioxidantes das vitaminas C e E associam-se ao decréscimo na ativação da NADPH oxidase^{42,80} e o aumento da atividade da SOD (o maior sistema de defesa celular contra o $\cdot\text{O}_2^-$ na vasculatura⁴⁶). Postula-se que a vitamina E, hidrofóbica, poderia inibir a formação do complexo enzimático das subunidades da NADPH oxidase⁴⁹. Apesar dessas observações, testes clínicos com vitaminas antioxidantes não demonstraram benefícios terapêuticos quanto à mortalidade em eventos cardiovasculares^{25,46}. Além disso, dependendo, principalmente, da posologia, tais substâncias podem apresentar propriedades pró-oxidantes, com interações orgânicas deletérias. Como os dados de grandes estudos clínicos prospectivos falharam em demonstrar os efeitos benéficos dos antioxidantes²⁵, o que se recomenda é a manutenção de uma dieta balanceada sem suplementação vitamínica, visto que os danos potenciais de tal suplementação ainda não estão bem definidos.

Na hipertensão, o produto da ativação da NADPH oxidase, o $\cdot\text{O}_2^-$, promove a oxidação da H_4B , ocasionando um aumento no desacoplamento da eNOS, elevando-se os níveis desta espécie de oxigênio, reduzindo-se a biodisponibilidade do $\cdot\text{NO}$ ¹⁴. Assim, acredita-se que a H_4B possa estar deficiente em condições associadas à função endotelial alterada, como

hipercolesterolemia, diabete, hipertensão e tabagismo. Stroes e cols.⁸¹ mostraram que o tratamento com H_4B aumenta a vasodilatação em humanos com hipercolesterolemia, ao passo que a remoção desta biopterina implica o desacoplamento da eNOS⁴⁰. Reforçando esses achados, a superexpressão da eNOS previne o remodelamento da vasculatura pulmonar induzido por hipóxia crônica⁵², ocasionando mudanças estruturais e alterações nos processos celulares que resultam em aumento da relação camada média: lúmen vascular^{82,83}.

Outro fator implicado no aumento do desbalanço redox é a endotoxemia. Durante seu curso, a liberação de lipopolissacarídes promove aumento da expressão e da atividade de xantina oxidase e da NADPH oxidase⁴⁶. O aumento de ERONs dependentes de NADPH oxidase em endossomos é importante para a resposta imune pró-inflamatória²⁰. Neutrófilos ativados produzem $\cdot\text{O}_2^-$, radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e ácido hipocloroso (HOCl), além de peptídeos microbicidas e proteases⁸⁴ responsáveis pela resposta imune eficaz. A ativação neutrofílica na fagocitose de pneumococos induz a produção de ERONs pela NADPH oxidase. Além disso, o bloqueio da ativação da NADPH oxidase durante meningite bacteriana aguda em animais experimentais acarreta defesa deficiente contra *Streptococcus pneumoniae*⁸⁵.

Quanto à produção do $\cdot\text{NO}$, estudos clínicos e experimentais demonstram que a administração da L-arginina restabelece a síntese deste radical e a função vascular em várias doenças cardiovasculares, sugerindo que o prejuízo na disponibilidade do aminoácido precursor está presente nestes agravos. Os níveis reduzidos de L-arginina também promovem o desacoplamento da eNOS, resultando em aumento das ERONs³⁴.

Drogas doadoras de $\cdot\text{NO}$ (nitrodilatadores) têm sido usadas no tratamento de doença coronariana, hipertensão e falência cardíaca, tendo ações antiinflamatórias na parede vascular como supressoras da oxidação de lipoproteínas, inibidoras da migração e proliferação de células musculares lisas vasculares e inibidoras da agregação plaquetária. Atuam ainda como supressoras da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas após a estimulação com fatores pró-inflamatórios. Tais aspectos previnem a infiltração de células inflamatórias na parede vascular, onde também há oposição às ações pró-inflamatórias das ERONs. Além disso, descobriu-se recentemente que o $\cdot\text{NO}$ parece exercer efeito anti-inflamatório na parede arterial por supressão de enzimas geradoras de ERONs, particularmente a NADPH oxidase⁵.

As proteínas Nox relacionam-se ainda com outras numerosas desordens orgânicas, incluindo câncer, reabsorção óssea e Doença de Alzheimer, por serem expressas em diversos tecidos^{1,80,86}. Evidências demonstram o papel da Nox2 em processos neurodegenerativos, como Doença de Parkinson, acidente vascular encefálico, trauma cerebral e meningite, devido, principalmente, à neurotoxicidade das ERONs^{57,87}. Dessa forma, os inibidores da Nox apresentam potencial clínico notável, particularmente se não inibirem a atividade dos fagócitos¹.

Inibidores da NADPH oxidase: potencial alvo terapêutico

Inibidores farmacológicos da NADPH oxidase que

bloqueiam diretamente a atividade desta enzima têm sido descritos compreendendo estruturas peptídicas e não peptídicas. O DIP-difenileneiodônio^{5,10} e 4'-hidroxi-3-metoxiacetofenona (a apocinina, isolada da planta medicinal *Picrorhiza kurroa*)⁸⁸ têm sido largamente utilizados para bloquear a atividade da NADPH oxidase *in vitro*⁵. Atualmente, sabe-se que o DPI-difenileneiodônio não é seletivo e age como um oxidante inespecífico⁶. Já a apocinina, por sua vez, tem múltiplas ações biológicas além dos efeitos antioxidantes⁵, sendo caracterizada como um inibidor da NADPH oxidase desde a década de 80⁶. Estudos de Godbole e cols.⁸⁹ demonstraram que a apocinina restabelece a produção de nitrito e a vasodilatação em artérias femorais comuns de suínos⁸⁹. Como o DIP não representa um inibidor específico da NADPH oxidase, a apocinina tornou-se muitíssimo popular⁶, com 692 registros de publicações no banco de dados PubMed até 15 de janeiro de 2009, dos quais 571 são específicos para a chave "apocynin NADPH oxidase inhibition", demonstrando a forte correlação entre os termos.

Os leucócitos são capazes de mediar o efeito inibitório da apocinina. Sugere-se que a mieloperoxidase (MPO), seletivamente expressa em leucócitos, é necessária para a ocorrência do efeito inibitório desta substância. Em células HEK293, desprovidas de MPO, a formação de dímeros de apocinina não ocorre mesmo após superexpressão das isoformas Nox⁶. Quando MPO humana é adicionada, os dímeros são identificados nas células com superexpressão de isoformas Nox ou nas células coincubadas com H₂O₂. Na ausência de H₂O₂ ou Nox, a produção dimérica pelas células HEK293 é inibida. Em leucócitos estimulados, os dímeros são prontamente detectáveis, ao passo que em células vasculares estimuladas não ocorre tal produção, mesmo na presença de MPO. Dessa forma, os autores sugerem que a apocinina atuaria como antioxidante e não como inibidor da NADPH oxidase em células não fagocíticas^{6,88}, sendo a ação inibitória para a NADPH oxidase restrita a leucócitos que expressam MPO⁶ (Fig. 3). Entretanto, outras peroxidases que não a MPO podem influenciar a atividade da apocinina, sendo possível que células vasculares possuam enzimas peroxidativas capazes de ativar este inibidor. Tal fato é reforçado por achados em células endoteliais, nas quais dímeros de apocinina foram identificados, com a apocinina inibindo de forma concentração dependente a atividade da NADPH oxidase, a formação de ERONs e a proliferação celular⁸⁸.

Pagano e cols.⁹⁰ desenvolveram o peptídeo quimérico gp91ds-Tat, composto de nove aminoácidos da capa proteica do HIV e nove aminoácidos do gp91phox^{1,10}. Essa substância reage com a p47phox e interfere na ligação desta subunidade com a gp91phox. A porção "Tat" permite ao gp91ds-Tat penetrar na célula, sendo um efetivo inibidor de oxidases que contêm gp91phox. Contudo, apesar de peptídeos como

o referido serem úteis em intervenções experimentais, os processos de biotransformação dificultam sua administração por via oral, limitando seu potencial na terapêutica clínica¹.

Inibidores peptídicos da NADPH oxidase são também descritos, como o antibiótico PR-39, secretado endogenamente por células intestinais e neutrófilos de humanos e suínos. Além de atuarem em células imunitárias, inibem a atividade da NADPH oxidase não fagocítica. Inicialmente, o PR-39 era visto como inibidor específico da NADPH oxidase. No entanto, estudos recentes mostraram que o antibiótico apresenta vários efeitos, em parte porque se liga a domínios SH3 de outras proteínas e em parte porque interage com lipídios de membrana⁵.

Conclusão

Identifica-se que a NADPH oxidase emergiu como uma das principais estruturas envolvidas no desbalanço redox vascular. Como o *NO também é capaz de suprimir a atividade da NADPH oxidase, acredita-se que este evento apresente implicações diretas não apenas no desenvolvimento da doença vascular, mas também na recuperação aguda da lesão de isquemia e reperfusão, na qual o desbalanço dependente de NADPH tem grande contribuição^{1,5}.

O desenvolvimento de inibidores específicos de oxidases, baseado nas unidades Nox, pode fornecer ferramentas para elucidar os papéis destas enzimas experimentalmente. Também pode ser útil no tratamento de diversas doenças¹, principalmente no que se refere à inibição enzimática seletiva com o intuito de reduzir o dano vascular decorrente da produção excessiva de ERONs sem, entretanto, comprometer o mecanismo de sinalização celular dependente das referidas espécies.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à FAPEAL e ao PPSUS-2006/Ministério da Saúde-FAPEAL pelo apoio financeiro concedido.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo CNPq, PROCAD-NF/CAPES e FAPEAL.

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
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.
8. 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.
9. 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.
10. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidase, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008; 31: S170-S180.
11. Rajagopalan S, Kutr 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.
12. 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.
13. 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.
14. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003; 42: 1075-81.
15. Touyz RM, Yao C, 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.
16. 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.
17. 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.
18. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1041-4.
19. Ülker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Antioxidante vitamins C and E ameliorate hyperglycaemia-induced oxidative stress in coronary endothelial cells. *Diabetes, Obes Metab.* 2004; 6: 442-51.
20. Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE.* 2006; 349: re8.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Soberman RJ. The expanding network of redox signaling: new observations, complexities, and perspectives. *J Clin Invest.* 2003; 111: 571-4.
25. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44: 248-52.
26. 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.
27. 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.
28. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-6.
29. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115: 1285-95.
30. Évora 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hasfner G, Tiret L, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients 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.

Artigo de Revisão

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. Noxa1 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: nox1 mediates angiotensin-II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 2001; 88: 888-94.
63. Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M, Kietzmann T, Hess J, Gorch 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 Biochem 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 G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue: lucigenin but not coelenterazine 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 LGK, 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 angiotensina II. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 14483-8.