

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE A REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR E A EFICÁCIA DAS TERAPIAS ANTIOXIDANTES

INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS ON THE REGULATION OF VASCULAR TONE AND THE EFFICACY OF ANTIOXIDANT THERAPIES

VINICIUS GUADAGNIN¹, LUANA ZANETTIN¹, CAMILA CRISTINA ROSSI SILVA¹, JESSICA SILVESTRE FURTADO¹, MÁRIO DOS ANJOS NETO FILHO^{5*}

1. Acadêmico(a) do curso de graduação em Medicina da Faculdade Ingá; 2. Prof. Dr. Adjunto da Disciplina de Farmacologia e Terapêutica Medicamentosa da Faculdade Ingá.

* Rodovia PR-317, 6114, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87035-510. marioneto.uninga@hotmail.com

Recebido em 04/02/2015. Aceito para publicação em 12/07/2015

RESUMO

Muitas doenças vasculares são motivadas por falhas no mecanismo de vasodilatação endotélio-dependente, referida como "disfunção endotelial." Esta falha pode ser atribuída à menor biodisponibilidade de fatores derivados do endotélio, como o NO. Um dos principais efeitos do estresse oxidativo sobre os leitos vasculares é a redução da atividade biológica do NO, consolidando a disfunção endotelial, que, por sua vez, é considerado um precursor da aterosclerose. Assim, considerando-se a importância funcional já conhecida do endotélio vascular, bem como do músculo liso vascular para a regulação da pressão arterial e de outros parâmetros/ funções fisiológicas do sistema cardiovascular, o presente estudo tem por objetivo evidenciar o potencial prejuízo causado pelo estresse oxidativo sobre os leitos vasculares.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse oxidativo, EROS, endotélio vascular, músculo liso vascular.

ABSTRACT

Many vascular diseases are motivated by failures in the endothelium-dependent vasodilation mechanism, referred to as "endothelial dysfunction." This failure can be attributed to the low bioavailability of endothelium-derived factors such as NO. One of the main effects of oxidative stress on the vascular beds is the reduction of biological activity of NO, consolidating endothelial dysfunction, which, in turn, is considered a precursor of atherosclerosis. Thus, considering the functional importance already known vascular endothelial and vascular smooth muscle for regulating blood pressure and other parameters / physiological functions of the cardiovascular

system, the present study aims to highlight the potential damage caused by stress oxidative on vascular beds.

KEYWORDS: Oxidative stress, vascular endothelium, ROS, vascular smooth muscle.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fisiologia da Função endotelial

Inicialmente considerava-se que o papel do endotélio era de mera barreira seletiva para a difusão de macromoléculas da luz dos vasos sanguíneos em direção ao espaço intersticial. Posteriormente, foram descobertas muitas outras funções endoteliais como regulação do tônus vagal, modulação da resposta inflamatória, promoção e inibição do crescimento neovascular e modulação da agregação plaquetária e da coagulação.

Mais recentemente, foi possível dizer que o endotélio vascular libera várias substâncias autócrinas e parácrinas com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover adesão celular e com ações vasoativas, regulando o tônus vascular, ou provocando alterações funcionais adaptativas através da liberação de vários mediadores com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover a adesão de moléculas, e com ações vasoativas; a homeostase vascular é o resultado da regulação dinâmica dessas funções²⁰.

À reatividade vascular já descrita anteriormente somaram-se as evidências de Furchgott & Zawadzki (1980)^x comprovando que o endotélio vascular

participava ativamente do processo de relaxamento vascular pela liberação de óxido nítrico (NO) em resposta à acetilcolina. A partir de então, o NO passou a ser conhecido como o principal dos três fatores de relaxamento dependente do endotélio (EDRF) – os EDRFs são: NO, prostaglandina, e o EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio).

A biodisponibilidade do NO depende de três fatores globais: a síntese de NO, a sensibilidade dos tecidos-alvo e a sua manutenção, com base em seu tempo de meia-vida. Cada um desses fatores está envolvido em um complexo multifacetado com sinalização celular e múltiplas funções intermediárias reguladoras²¹.

O NO é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase endotelial (eNOs). Além da sua ação vasodilatadora, o NO inibe a adesão e a agregação plaquetária, impede a proliferação do músculo liso vascular, limita o recrutamento vascular de leucócitos e inibe a produção do fator tecidual que é um determinante crítico na geração do trombo. Entretanto, dada a importância fisiológica da liberação do NO pelo endotélio vascular, a perda da atividade biológica do NO, denominada de disfunção endotelial, cujas causas são multifatoriais, pode ser o evento desencadeante da doença aterosclerótica vascular em humanos.

É possível afirmar que o endotélio contribui com a homeostase vascular por promover alterações funcionais adaptativas, pois em indivíduos saudáveis, há tônus vasodilatador moderado e constante, modulado pelo NO que ao ser liberado do endotélio se difunde em direção às células da musculatura lisa vascular. Desta forma, a menor produção de NO, independentemente de sua causa, leva a redução do tônus vascular de relaxamento parcial, com predomínio da modulação contrátil. Relacionando-se com os efeitos sobre o tônus vascular, a baixa formação de NO, que leva à redução da perfusão tecidual, promove a formação de trombos, com repercussões clínicas em várias doenças vasculares¹⁹.

Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (shear stress), levando à ativação da e-NOS presente nestas células e à consequente produção de NO. A e-NOS está estrategicamente ancorada à membrana da célula endotelial, o que favorece a presença de grandes quantidades de NO próximo à camada muscular do vaso e às células sanguíneas circulantes. Em resposta a agonistas como a bradicina, ocorre a fosforilação da eNOS, determinando sua translocação para o citosol.

Este mecanismo provavelmente tem um papel na regulação da produção de NO *in situ* e na sua atividade biológica. O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas.

1.2 Músculo liso

A estrutura do vaso sanguíneo não é estática. Ela se remodela continuamente para se adaptar ao seu ambiente biomecânico. Assim, o calibre vascular é controlado pela quantidade, composição e organização da matriz extracelular, como também pelas unidades contráteis das células musculares lisas. Além disso, a organização e o acoplamento mecânico entre as células musculares lisas com a matriz extracelular determina as propriedades mecânicas da parede do vaso¹⁹.

Células musculares lisas vasculares normalmente não operam em sua total ativação. Pelo contrário, estas células têm um tônus. Consequentemente, o tônus inalterado em sua plasticidade contrátil e de citoesqueleto resulta em diâmetros alterados.

Na musculatura lisa, numerosos miofilamentos, principalmente de filamentos de miosina e actina, são orientados no eixo longitudinal da célula, formando as unidades contráteis. A força mecânica gerada na célula muscular lisa deriva-se do deslizamento das extremidades livres dos filamentos de actina sobre os de miosinas, em direções opostas. A conexão da matriz com os filamentos de actina estão vinculados a corpos densos, que correspondem os discos de Z dos músculos esqueléticos, e em placas densas na membrana da célula. Estas placas densas servem como âncoras que transmitem a força entre o aparato contrátil e a matriz extracelular.

Durante a contração, unidades contráteis encurtam enquanto puxam as placas densas produzindo o encurtamento da célula. A força gerada é em seguida transmitida ao longo da célula e através dos filamentos de actina e a matriz extracelular via integrinas, resultando na constrição vascular ou, na geração de tensão isométrica.

Os íons Ca^{2+} desempenham importante papel no controle do tônus vascular. Como a musculatura lisa não possui a troponina, proteína reguladora presente no músculo esquelético, que é ativada pelos íons Ca^{2+} para promover a contração muscular, a contração da musculatura lisa ocorre devido à combinação entre o cálcio e a calmodulina. Essa combinação ativa uma enzima fosforilativa, a miosina quinase, que tem a função de fosforilar as cadeias leves da miosina, adquirindo a capacidade de se fixar ao filamento de

actina e realizar a contração muscular. Dessa forma, a diminuição da concentração de Ca^{2+} impediria a combinação cálcio/calmodulina, gerando um relaxamento da musculatura lisa vascular e a consequente vasodilatação²⁶

A ativação da NOS e a consequente síntese de NO pelas células endoteliais ocorre a partir de estímulos que podem ser químicos ou físicos. Os estímulos químicos são originados da interação de agonistas endógenos/exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como, por exemplo, a acetilcolina, o ATP, e a bradicinina. A interação agonista-receptor, na célula endotelial, promove a formação de inositol trifosfato (IP3) que, por sua vez, induz a liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático, eleva os níveis de Ca^{2+} intracelular, formando o complexo cálcio-calmodulina, ativando a enzima NOS que irá atuar na L-arginina, gerando a formação do NO pelo endotélio²⁶. Mediando a vasodilatação, o NO gerado no endotélio difunde-se em direção às células subjacentes a fim de provocar o relaxamento do músculo liso vascular, diminuição da resistência vascular com o consequente aumento do fluxo sanguíneo. No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato-ciclase, causando a alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina-trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina-monofosfato-cíclica (GMPc). O sistema GC-GMPc parece ter uma importância central para a ação fisiológica do NO sobre o relaxamento do músculo liso vascular, de modo que o aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento vascular²¹.

1.3 Relação entre as Espécies Reativas de Oxigênio e Doenças Cardiovasculares

Evidências mostram que a superprodução crônica e aguda de espécies reativas de oxigênio (EROs) em condições fisiopatológicas é um fator predisponente importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV)¹².

Sob condições fisiológicas, grande parte das EROs são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial e podem funcionar como sinalização de processos celulares como por exemplo: crescimento, apoptose, migração, entre outros, controle de funções vasculares e, ainda constituir-se como respostas à expressão gênica.

Contudo, cerca de 3-5% dos elétrons são utilizados para produção de radicais livres (RL)^{13,15}. Adicionalmente, as EROs como também outros oxidantes, são gerados em excesso em outros processos bioquímicos da célula, como por exemplo, durante a inflamação; no catabolismo de ácidos graxos e na auto-

oxidação, podendo assim, causar danos celulares a diversas proteínas, lipídios e até ao DNA celular, acarretando um somatório de disfunções ou até apoptose^{13,14,15}.

Quando o estresse oxidativo, gera uma grande produção de RL e, isso for maior que a capacidade celular de neutralizá-lo, ocorrerá danos celulares que contribuem para muitos fatores de riscos associados as DCV^{12,13}.

Diante disso, as principais fontes de RL na parede vascular inflamada, com grande relevância fisiológica nas DCV, são: NAD(P)H oxidase, óxido-nítrico-sintetase endotelial (eNOS) desacoplada, óxido-nítrico-sintetase induzível (iNOS), mieloperoxidase, xantina oxidase (XO), lipoxigenase/ ciclooxigenase e cadeia respiratória/ fosforilação oxidativa¹³.

Considerando-se a importância funcional já conhecida do endotélio vascular, bem como do músculo liso vascular para a regulação da pressão arterial e de outros parâmetros/ funções fisiológicas do sistema cardiovascular, o presente estudo tem por objetivo evidenciar o potencial prejuízo causado pelo estresse oxidativo sobre, o os leitos vasculares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento desta revisão integrativa optamos pela proposta de Ganong (1987)¹¹, obedecendo-se às seguintes etapas: 1) identificação da questão norteadora, seguida pela busca dos descritores ou palavras-chaves; 2) determinação dos critérios de inclusão ou exclusão da pesquisa em bases de dados online; 3) categorização dos estudos, sumarizando e organizando as informações relevantes; 4) avaliação dos estudos pela análise crítica dos dados extraídos; 5) discussão e interpretação dos resultados examinados, contextualizando o conhecimento teórico e avaliando quanto sua aplicabilidade; 6) apresentação da revisão integrativa e síntese do conhecimento de cada artigo revisado de maneira sucinta e sistematizada.

No presente estudo a questão norteadora da revisão integrativa foi: qual o potencial prejuízo causado pelo estresse oxidativo sobre o os leitos vasculares?

Foram consultadas as bases de dados LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), a biblioteca SciELO (*Scientific Electronic Library on Line*) e PubMed (*National Center for Biotechnology Information - NCBI, U.S. National Library of Medicine*), Google Acadêmico, incluindo-se os estudos que abordaram a temática do PRP, publicados desde 1996 até 2012, independente do idioma de publicação. Foram utilizados os seguintes descritores controlados para a busca e também utilizados como palavras-chave: estresse oxidativo (oxidative stress), EROS (ROS), endotélio vascular (vascular

endothelium), músculo liso vascular (vascular smooth muscle).

3. DESENVOLVIMENTO

Mecanismo de formação da placa aterosclerótica

A resposta inflamatória na aterogênese é mediada através de mudanças funcionais em células endoteliais, linfócitos T, macrófagos derivados de monócitos e células do músculo liso vascular (túnica íntima)⁹.

A ativação destas células desencadeia a elaboração e interação de um extenso espectro de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, acúmulo de lipídios e proliferação de células do músculo liso. Somando-se a isso, a resposta inflamatória pode ser induzida pelo estresse oxidativo, principalmente à oxidação de LDL (proteínas carreadoras de lipídios de baixa densidade)⁷.

Essas interações resultam em expressão e seleção de vários mediadores potenciais na gênese da lesão vascular, tais como fatores de crescimento de endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), a interleucina-1 (IL-1) e os fatores de transformação – e – (TGF- α , TGF- β). A IL-1, e os TGF- α e TGF- β , podem inibir a proliferação endotelial e induzir a expressão genética secundária pelo endotélio de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP) e outros mediadores potenciais da formação de lesão vascular⁹. O TGF- β também induz a síntese de tecido conjuntivo pelo endotélio. Além disso, as células endoteliais produzem fatores estimulantes de colônias de macrófagos (M-CSF), fatores estimulantes de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e LDL-ox, que são mitogênicos, e fatores ativadores dos macrófagos adjacentes ao local da lesão. As células endoteliais também fornecem fatores quimiotáticos potentes que afetam a quimiotaxia dos leucócitos, incluindo a LDL-ox e a proteína-1 quimiotática dos monócitos (MCP-1), além de modular o tônus vasomotor através da formação de NO, prostaciclina (PGI₂) e endotelinas⁹. Esses últimos fatores estão diretamente relacionados com as reações químicas que modulam o estresse oxidativo, uma vez que são produtos das mesmas⁶. A consequência é que devido à menor disponibilidade de NO, uma vez que esse é capturado pelo ânion radical superóxido (O₂^{•-}), favorece-se, a maior atividade da Endotelina-1 (ET-1) ou fator de contração derivado do endotélio (*Endothelium-Derived Contracting Factor* - EDCF), o que promove crescimento das células endoteliais, assim como todo o processo inflamatório envolvido na formação da placa aterosclerótica, conseqüentemente levando a vasoconstrição de artérias e arteríolas, fatores determinantes também para a hipertensão arterial sistêmica (HAS)⁶.

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser iniciado a partir da produção do NO, um produto gasoso instável e altamente difusível, que é um intermediário químico capaz de exercer efeitos na transdução de sinais biológicos específicos de maneira autócrinas (na própria célula de origem) ou parácrinas (em células contíguas).

A síntese de NO, envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinosda L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O₂) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH₄) são utilizados como cofatores na reação. Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina(L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS. Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para i-NOS.

A óxido-nítrico-sintase endotelial (eNOS) é a enzima responsável pela síntese de NO no endotélio, tendo sido identificadas três isoformas distintas: NOS neuronal (tipo I), NOS induzível (tipo II) e NOS endotelial (tipo III)¹³. As isoformas de NOS catalisam a oxidação dos elétrons da L-arginina para NO e L-citrulina. A síntese de NO é influenciada por vários cofatores como tetraidrobiopterina, inibidor da NOS endógena – dimetil arginina assimétrica (ADMA) e da disponibilidade do substrato.

As isoformas ditas constitutiva compreende a nNOS e a eNOS. As NOS constitutivas (c-NOS) produzem pequenas quantidades de NO - da ordem de nano ou picomols - e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que por sua vez, é controlada pelos níveis de Ca⁺². A i-NOS como já dito, não é expressa sob condições normais, sendo induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas. Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a c-NOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os cofatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular.

Existem outras moléculas ativas formadas a partir do NO e denominadas espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs). A produção de EROs é usualmente um

processo enzimático, estimulado por agonistas específicos, cujos níveis estão anormais em condições patológicas. O radical superóxido, uma das principais EROs de interesse biológico, reage de modo rápido e favorável com o NO, inibindo sua bioatividade e gerando espécies reativas oxidantes secundárias, como o peroxinitrito (ONOO⁻), um potente oxidante capaz de oxidar moléculas de LDL, causar disfunção vascular e nitrificar os resíduos de tirosina das proteínas.

O estresse oxidativo pode ser amplificado por um ciclo contínuo de estresse metabólico, dano tecidual e morte celular, levando ao aumento da produção de radicais livres e, os sistemas de radicais livres comprometidos inibitórios e limpador, que agravam ainda mais o estresse oxidativo.

A utilização de oxigênio pelas células de organismos (aeróbios), em condições normais, produz metabólitos de EROs com um poder nocivo significativo. Esse dano aumenta na medida em que o organismo envelhece, sendo um fator importante para determinar idade senil. Isso porque, a super expressão de enzimas antioxidantes diminui de forma importante a relação da idade com o dano oxidativo. A relação inversa da produção mitocondrial de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio também servem de suporte para a teoria oxidativa. Esse contexto mostra que a cronicidade de estresse oxidativo celular ocorre devido ao desequilíbrio de agentes oxidantes e desoxidantes.

O estresse oxidativo contribui para danos em tecidos biológicos após irradiação e hiperóxia. O aumento da ingestão calórica aumenta os níveis de equilíbrio do estresse oxidativo, acelerando mudanças relacionadas à idade e, desta forma, retarda o tempo de vida no ser humano.

Os antioxidantes detêm o poder de interceptar radicais livres gerados tanto pelo metabolismo celular quanto por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A (principais utilizados também na clínica), os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. Da mesma forma que tais vitaminas possuem efeito no ser humano, o mesmo pode ser notado com outras espécies animais.

Além disso, e sobretudo, a principal consequência do estresse oxidativo se concentra na forte relação causal com a hipertensão arterial sistêmica (HAS)⁶. A (HAS) é uma condição caracterizada por disfunção endotelial, cujo papel central reside no impedimento da vasodilatação causada pela menor bioatividade do óxido nítrico (NO•) na parede vascular, em decorrência do estresse oxidativo, o que representa a hipótese oxidativa

da hipertensão. Tal estresse resulta do desequilíbrio entre os sistemas antioxidante e pró-oxidante, prevalecendo a ação deletéria de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERN) sobre células, tecidos e órgãos. Neste contexto destaca-se a superprodução do ânion radical superóxido (O₂•⁻), o qual inibe a atividade do NO, em virtude da reação direta entre ambos, para formar o peroxinitrito (ONOO⁻) (equação 1). Esse último, é um intermediário (equação 2) reativo particularmente lesivo, uma vez que é capaz de gerar o radical hidroxila (•OH), independentemente da presença de metal de transição. A superprodução endotelial de EROs e ERN ocorre: (1) por via enzimática [NAD(P)H oxidase – NAD(P) Hox, xantina oxidase – XO, lipoxigenase – LOX, cicloxigenase – COX e óxido nítrico-sintase-endotelial (eNOS)] e (2) por via não-enzimática, pela participação de forças mecânicas do vaso, o *shearstress* do fluxo sanguíneo turbulento e o estiramento em consequência da maior pressão no lúmen vascular. A presença de tais espécies reativas diminui a disponibilidade de NO• e favorece maior atividade de endotelina de modo que no estresse oxidativo vascular da HAS, fatores vasoconstritores estariam em preponderância em relação aos fatores vasodilatadores⁶.



Contudo, o NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. No entanto, o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante²³. O efeito antioxidante do NO se deve ao fato que, uma vez produzido pela e-NOS, que induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O₂⁻ disponível e, conseqüentemente, a produção de ONOO⁻.

NAD(P)H oxidase:

A NAD(P)H oxidase é uma enzima que catalisa a transferência de elétrons da NADPH para O₂ formando superóxido. É a maior fonte de produção de EROs em muitas células fagocíticas. A NAD(P)H oxidase é formada por subunidades de membrana, como gp91phox, p22phox e subunidades citosólicas, como p47phox e p67phox^{13,15}. A NAD(P)H oxidase precisa ser ativada para a produção de O₂. Esse processo se inicia com a fosforilação do p47phox à sua associação com o citocromo B558. Uma vez ativada corretamente, as células fagocíticas produzem grande quantidade de O₂.

Há evidências que o NAD(P)H oxidase representa uma importante fonte de EROs no sistema vascular. Porém, há controvérsias sobre a localização dessa enzima. Enquanto, nos fagócitos, os elétrons são transferidos através da membrana, em células do músculo liso vascular; o O₂ e H₂O₂ parecem ser produzidos predominantemente dentro da célula. Também há diferenças nos componentes da proteína NAD(P)H oxidase vascular. Ela não possui gp91phox e gp67phox. No lugar, nessas células contém um homólogo de gp91phox, cuja expressão aumenta a produção de O₂ celular. Semelhante aos fagócitos, NAD(P)H oxidase nas células vasculares também pode ser ativado por estímulos, como por exemplo angiotensina II, trombina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de necrose tumoral, interleucina-1.¹²

Enzima Óxido-Nítrico-Sintetase:

A Óxido-nítrico-sintetase (NOS) é uma família de enzimas que catalisam a oxidação de L-arginina à L-citrulina, cujo papel é de ser um potente vasodilatador. No sistema vascular a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS) são as enzimas de maior importância.¹²

As NOS (óxido nítrico sintetase) foram identificadas principalmente em vasos sanguíneos, com importante papel nos processos vasculares fisiológicos e patológicos.¹⁸

No sistema vascular e na aterosclerose, a isoforma endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS) são as mais importantes. A eNOS é um homodímero, onde cada monômero consiste em um redutase (contendo os sítios de ligação para NADPH, FAD e FMN) e um domínio oxigenase (contendo Zn, tetrahydrobiopterina (BH₄), um grupo heme e de L-arginina) que estão ligados por uma região à calmodulina. A isoforma iNOS esta presente nas células musculares lisas vasculares e macrófagos ativados encontrados dentro de lesões ateroscleróticas. Dessa forma, a expressão da iNOS é induzida por endotoxinas microbianas ou por estimulação via citocinas. A atividade da eNOS, em oposição à da iNOS, é regulada pela concentração de cálcio (Ca⁺²) intracelular. Embora fortes evidências sugerem que a eNOS possua um papel importante na proteção da parede do vaso durante a aterosclerose. Contudo, o papel de iNOS na doença vascular é variável e ainda não está bem definido.¹²

Mieloperoxidase:

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima intensamente expressa na ativação leucocitária, que catalisa a formação de várias espécies reativas oxidantes. Além de integrante da resposta imune inata, estudos têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante a inflamação. A MPO participa de

atividades biológicas com múltiplas ações aterogênicas, incluindo a oxidação do colesterol (LDL) e, relacionada à instabilização da placa aterosclerótica. É preditora de eventos adversos em indivíduos saudáveis, coronariopatas ou em investigação de dor torácica.

A MPO, pela reação com peróxido de hidrogênio, forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana, porém também promove dano oxidativo no tecido do hospedeiro, por exercer efeitos pleiotrópicos na vasculatura com potencial impacto no desenvolvimento de aterosclerose, disfunção endotelial, instabilidade de placa e resposta no remodelamento ventricular após injúria isquêmica.

Na aterosclerose, a MPO está envolvida na oxidação da fração lipoprotéica de baixa densidade do colesterol (LDL-c)^{17,18} e na ativação de metaloproteinases, participando da instabilização e da ruptura da placa, interferindo na biodisponibilidade do óxido nítrico derivado do endotélio, alterando, assim, o tônus vasomotor e certas propriedades antiinflamatórias.

A modificação oxidativa da LDL leva ao aumento de sua recaptação e degradação por macrófagos, resultando em depósito de colesterol e formação de células espumosas, a marca celular das estrias gordurosas.

Recentemente, demonstrou-se que a HDL também é suscetível a modificações oxidativas, mediadas por mieloperoxidase, por nitratação ou halogenação de resíduos de tirosina na apolipoproteína AI (apo AI). Essas prejudicam a habilidade da proteína de promover o transporte reverso de colesterol dependente de ABCA-1, contribuindo para a formação de lesões ateroscleróticas.^{16,17}

Antioxidantes

De modo simplificado é possível dizer que o estresse oxidativo fundamenta-se no desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante. A célula, unidade básica da vida, é uma verdadeira usina de tais sistemas pró e antioxidantes.²⁹

Define-se antioxidante como sendo "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com a de um oxidável substrato, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato significativamente"³⁰

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não-enzimático, conforme a estrutura do agente antioxidante. De acordo com a ação sobre os radicais livres, ele ainda pode ser classificado como 'scavenger', quando transforma um radical livre em outro menos reativo, ou 'quencher' quando consegue neutralizar completamente o radical livre.

O antioxidante enzimático é o primeiro a agir evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Destacam-se a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion

radical superóxido ($O_2\bullet$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 ; a catalase (CAT), que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O ; e a glutatiónaperoxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutatióna como cofator.

Em contrapartida, o sistema antioxidante não-enzimático, é formado por muitas substâncias endógenas como: glutatióna restaurado; Ubiquinol; Cisteína, N-acetilcisteína; Carnitina; Colina; Ácido Lipóico³¹. Há também os antioxidantes não-enzimáticos exógenos como: Vitamina E; Vitamina C; Carotenóides; Flavonóides; Compostos de Selênio; N-acetilcisteína.

Estas substâncias podem ainda ser classificadas em hidro (vitamina C e glutatióna) e lipossolúveis (vitamina E, probucol e beta-caroteno).

Propõe-se ainda como terapia antioxidante a utilização de: mexidol, mexicar, hypoxen, kudesan, carnitina, noben, theagal, epolyoxidonium³², com a intenção de se obter algum efeito profilático ou inexorável efeito oxidativo²⁸. Neste rol de produtos farmacêuticos, destacam-se a glutatióna (GSH), principal composto antioxidante intracelular (Figura 2), os tocoferóis (Figura 3), ascorbato, ácido úrico e o β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina²⁹).

Há indícios de que os inibidores da ECA, os bloqueadores do receptor de angiotensina e as estatinas³³ poderiam inibir a geração de EROS na sua origem.

Por fim, a ocorrência de um estresse oxidativo moderado, pode ser acompanhado de um aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, contudo a produção de uma quantidade elevada de radicais livres pode causar danos e morte celular. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos³⁷.

Os antioxidantes parecem ser mais eficazes na prevenção de doença aterosclerótica precoce. Seus efeitos estão mais ligados a parede vascular do que com o efeito sistêmico. Eles atuam impedindo a oxidação do LDL, mas também são capazes de melhorar a função endotelial vasomotora, como também tem efeitos antiproliferativo, inibem a adesão celular e atuam de diferentes maneiras no mecanismo hemostáticos. Estudos recentes demonstram que os antioxidantes podem reduzir a frequência e as complicações causadas pela angioplastia e outros processos invasivos coronários^{35,36}.

Para aumentar os efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, pode ser feito a adição de uma dieta rica nesses ou também uso de algumas drogas^{35,37}. A importância do desempenho dos antioxidantes *in vivo*

depende de alguns fatores como tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados esses radicais, análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção.

4. CONCLUSÕES

Assim, com base nos estudos analisados é possível verificar que a utilização de agentes antioxidantes pode representar uma nova abordagem na inibição dos danos provocados pelo excesso de radicais livres. Porém, a aplicação farmacológica desses agentes pode interferir em alguns mecanismos celulares, incluindo as alterações na atividade enzimática e na estrutura das membranas.

Alternativamente, o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livre, embora alguns estudos indiquem que a suplementação de vitaminas anti-oxidantes possam auxiliar na prevenção de doenças crônicas-degenerativas. Nos dias de hoje ainda há dúvidas sobre a possibilidade de os nutrientes antioxidantes vir ou não a ser suplementos medicamentosos ou se bastaria o a concentração adquirida pelo consumo de uma dieta rica e variada de frutas e demais vegetais²⁸.

REFERÊNCIAS

- [1]. Bahia L. Endotélio e Aterosclerose. Rev da SOCERJ. 2004;17(1):26-32
- [2]. Pinho R. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. Arq Bras Cardiol. 2010; 94(4): 549-55.
- [3]. Briasoulis A. The Oxidative Stress Menace to Coronary Vasculature: Any Place for Antioxidants? Current Pharmaceutical Design. 2009; 15:3078-3090
- [4]. Simon S. Altered DNA repair, oxidative stress and antioxidant status in coronary artery disease. J. Biosci. June 2013; 38(2): 385-389
- [5]. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980; 27:288(5789):373-6.
- [6]. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Silva MAM. Anelise Gomes ACM. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirevisão; Oxidative hypothesis of hypertension: a mini-review. Rev Bras Hipertens. 2007; 14(4):269-74.
- [7]. Moon HD, Rinehart JF. Histogenesis of Coronary Arteriosclerosis. American Heart association: Circulation. 1952;6:481-8.
- [8]. Dohi T, Miyauchi K, Ohkawa R, Nakamura K, Thuboi S, Ogita M, Miyazaki T, Nishino A, Yokoyama K, Kurata T, *et al.* Higher lipoprotein-associated phospholipase A2 levels are associated with coronary atherosclerosis documented by coronary angiography. Annals of Clinical Biochemistry. 2012; 49:527-33.
- [9]. Paul M. Vanhoutte, MD. Endothelial Dysfunction The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. Circulation Journal. 2009; 73:595-601.

- [10]. Bianchi mlp, Antunes LMG. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev. Nutr.*, Campinas. 1999; 12(2):123-30.
- [11]. Gao J, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Nguyen BT, Mamauag RE. *Aquaculture Nutrition*. 2013; 19(1): 35-44.
- [12]. Singh U, Jiala I. Oxidative stress and atherosclerosis. Laboratory for Atherosclerosis and Metabolic Research, UC Davis Medical Center, Sacramento, CA, United States 2006.
- [13]. Pinho RA, Araújo MC, Ghisi GLM, Benetti M. Doença Arterial Coronariana, Exercício Físico e Estresse Oxidativo; Coronary Heart Disease, Physical Exercise and Oxidative Stress. Universidade do Extremo Sul Catarinense1; Universidade do Estado de Santa Catarina2, Criciúma, SC – Brasil Revista? Ano? Volume? Páginas?
- [14]. Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, Yu LG. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin.
- [15]. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Machado JAN. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação (NPPG) (JSR, CAV, RTM, JANM); Centro de Pesquisa em Endocrinologia (JSR, SP); da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG.
- [16]. Roberto Esporcattel, Helena Cramer Veiga Rey1, Fernando Oswaldo Dias Rangell, Ricardo Mourilhe Rocha1, Hugo Tannus Furtado de Mendonça Filho1, Hans Fernando Rocha Dohmann1, Francisco Manes Albanesi Filho2. Valor Preditivo da Mieloperoxidase na Identificação de Pacientes de Alto Risco Admitidos por Dor Torácica Aguda; Predictive value of myelo peroxidase to identify high risk patients admitted to the hospital with acute chest pain. Hospital Pró-Cardíaco1, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro2 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil. Raquel Melchior Roman1,4, Andrea Elisabet Wendland2,4, Carisi Anne Polanczyk3,4 Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. Myeloperoxidase and Coronary Arterial Disease: From Research to Clinical Practice
- [17]. Viant DF, Fonseca CJ, Rodríguez REG, Anglada PFM. Óxido nítrico: importância biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan* 1998; 2(3):45-53.
- [18]. Pinho AR. Doença Arterial Coronariana, Exercício Físico e Estresse Oxidativo. *Arq Bras Cardiol*. 2010; 94(4):549-55.
- [19]. Carvalho M. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8:76-88.
- [20]. Rush J. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2007; 37:185–92.
- [21]. Lacchini S. Óxido Nítrico: perspectivas clínicas na função endotelial. *Ver. da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*, 2004; 03.
- [22]. Dusse L. Revisão sobre óxido nítrico. Rio de Janeiro. 2003; 39(4):343-50.
- [23]. Jiang F. Suppression of Oxidative Stress in the Endothelium and Vascular Wall. *Endothelium*, Taylor & Francis Inc. 2004; 11:79–88.
- [24]. Costa-Hong V. Estresse oxidativo e Disfunção endotelial na Doença renal Crônica. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 92(5):413-18.
- [25]. Fortes ZB, Tacla M. Efeito antagônico sobre a contração da musculatura lisa intestinal. *Arq Méd. ABC*. 1981; 4(1):14-6, 1981.
- [26]. Zago AS, Zanesco A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. *Arq. Bras. Cardiol*. 2006; 87(6).
- [27]. Broinizi PRb, *et al.* Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. *Rev Bras Cienc Farm*. São Paulo, 44(4):773-81, Dec. 2008
- [28]. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*. 2007; 30(5):1323-38.
- [29]. 30-Heine H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997; 82:291-5.
- [30]. Yiannakopoulou E. Does Pharmacodynamic Interaction of Nonenzymatic Antioxidants Modify Response to Antioxidant Therapy in the Process of Atherosclerosis?. *J of Cardiovasc Pharmacol and Therap*. 2012; 17(4):366-72.
- [31]. Boris V. The Issues of Antioxidant Therapy. *Am J Biomed Sci*. 2013; 5(2):80-108.
- [32]. Schulz E. Oxidative Stress, Antioxidants, and Endothelial Function. *Current Medicinal Chemistry*. 2004; 11:1093-104.
- [33]. Schwedhelm E. Clinical Pharmacokinetics of Antioxidants and Their Impact on Systemic Oxidative Stress. *Clin Pharmacokinet*. 2003; 42(5):437-59.
- [34]. Briasoulis A. The Oxidative Stress Menace to Coronary Vasculature: Any Place for Antioxidants? *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15:3078-090.
- [35]. Páramo J. Papel de los antioxidantes en la prevención de La enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc)*. 2001; 116:629-35.
- [36]. Bianchi M. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr. Campinas*. 1999; 12(2):123-30.

