

Óxido Nítrico: perspectivas clínicas na função endotelial

Dra. Silvia Lacchini

Departamento de Anatomia – Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) – Universidade de São Paulo (USP).

Endereço para Correspondência:

Avenida Prof. Lineu Prestes, 2415 – ICB III,
Cidade Universitária.
CEP 05508-900
São Paulo, SP.

Na época da importante publicação de Furchgott e Zawadzki, em 1980, sobre uma substância lábil vasodilatadora e derivada do endotélio (chamada de fator de relaxamento derivado do endotélio, do inglês EDRF), não se imaginava que tal substância pudesse ser responsável por uma gama tão ampla de funções as quais lhe são hoje atribuídas. Alguns anos depois, em 1987, o grupo de Salvador Moncada demonstrou que o EDRF era o gás extremamente lábil e reativo óxido nítrico¹. Desta data, decorreu-se um tempo relativamente curto até a premiação de alguns pesquisadores com o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1998, entregue a Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad. O impacto e a importância do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia cardiovascular são hoje óbvios para todos. Além do fato de que o NO é o componente terapêutico da nitroglicerina, tornando este um dos mais antigos agentes terapêuticos efetivos, o futuro reserva muitas novas aplicações clínicas que resultarão de novos entendimentos do papel fisiológico e patológico do NO. Estes novos estudos reforçam a idéia de que, embora diversas funções tenham sido relacionadas ao NO, há muito a se estudar e sua relevância não pode ser esquecida. Existem diversas classes de drogas relacionadas à potenciação das ações do NO, incluindo antioxidantes e inibidores da fosfodiesterase. Além disso, novas estratégias na liberação local ou sistêmica do próprio NO provêm novos agentes terapêuticos para desordens tão diversas como hipertensão pulmonar, restenose arterial e resistência à insulina².

Características Biológicas do NO

O óxido nítrico é um gás extremamente reativo, sintetizado por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintases, a partir da quebra do aminoácido L-arginina, produzindo L-citrulina e óxido nítrico^{3,4}. Foram identificados três tipos de óxido nítrico sintases (NOS), sendo duas isoformas chamadas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), assim denominadas por terem sido identificadas inicialmente naqueles tipos celulares. A expressão destas enzimas é constitutiva, e a síntese de NO (dependente da presença de cálcio) se dá com o propósito básico de sinalização celular⁵. Além destas, uma terceira isoforma foi identificada em condições especialmente relacionadas a reações de defesa contra organismos estranhos e na resposta inflamatória. Esta enzima, ao ser sintetizada sob indução, produz grande quantidade de NO (independentemente de cálcio). Por tal característica, foi denominada de NOS induzível (iNOS)⁶.

Sabe-se hoje que as NO sintases são expressas por diversos outros tipos celulares, como miócitos cardíacos, células pancreáticas, células renais e neurônios, tendo importante atuação no controle sobre diversas funções cardiovasculares⁷. As ações biológicas do NO são basicamente mediadas por ação sobre uma enzima chamada guanilato ciclase, ativando-a, e, em consequência elevando a concentração de seu produto, o GMP cíclico (GMPc). O GMPc é o

principal mecanismo de transdução de sinal pelo qual o NO determina seus efeitos fisiológicos em mamíferos⁸. Hoje são conhecidas e estudadas diversas ações biológicas do NO, estando entre as principais ações a vasodilatação, a inibição da agregação plaquetária, a inibição da proliferação e migração de células musculares lisas dos vasos, a inibição da quimiotaxia de leucócitos e o crescimento endotelial, como apresentado na figura 1^{9,7}.

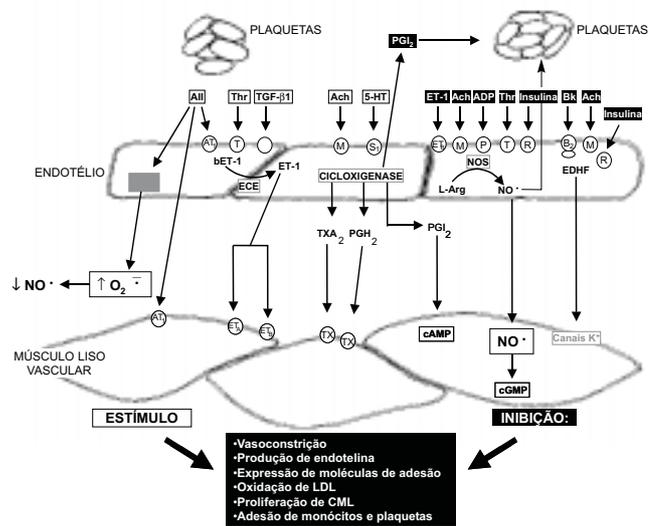


Figura 1 – Principais mecanismos regulatórios mediados pelo endotélio envolvendo diretamente a produção de óxido nítrico.

Todas estas ações do NO têm sido estudadas em modelos experimentais e em humanos e os mecanismos de ação são relativamente bem conhecidos. Contudo, embora a via prevalente de ação do NO ocorra por intermédio do GMPc, recentemente foi descrito um mecanismo de ação do NO de modo direto sobre uma enzima mitocondrial, a citocromo oxidase. A ligação do NO no mesmo sítio de ligação do oxigênio (O₂) impede a reação de respiração celular nas mitocôndrias, indicando que este composto deve atuar como regulador fisiológico da respiração celular⁹. Tal fato leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, altamente lesivas à célula, acionando mecanismos celulares de sobrevivência ou apoptose, dependendo do tipo ou fisiologia celular^{5,10}. Esta pode ser uma nova função envolvida com diversas patologias, não só relacionadas ao

sistema cardiovascular, como também aos processos desencadeados pelos estados de isquemia-reperusão.

Aplicações Clínicas

Como comentado, são conhecidas diversas ações fisiológicas do NO, correlacionando seu excesso ou falta a diversos estados patológicos conhecidos. Considerando esta gama de possibilidades, quais são as mais promissoras áreas envolvidas com a pesquisa de NO? Sabemos que lacunas ficaram no conhecimento e que, quando preenchidas, poderão prover novos meios terapêuticos para as doenças cardiovasculares humanas.

Estudo da Função Endotelial

Estudos iniciais da doença vascular em modelos animais com hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão estabeleceram que a alteração da ação do NO é uma das principais conseqüências de fatores de risco cardiovascular e está de modo potencial relacionada à progressão da aterosclerose¹¹. Além disso, avaliações feitas em humanos também demonstraram a redução na resposta vasodilatadora de coronárias e vasos do antebraço a infusões de acetilcolina ou metacolina, mostrando que esta anormalidade se estende à microvasculatura de humanos com estes fatores de risco. Enquanto a infusão de agonistas endotélio-dependentes requer estudos invasivos, o reconhecimento de que a força de cisalhamento, exercida pelo fluxo sanguíneo, é um estímulo fisiológico para a dilatação dependente do endotélio, forneceu um teste rápido e eficiente da função do NO em humanos. Este teste se baseia na medida do aumento do diâmetro da artéria braquial, seguida à hiperemia causada pela isquemia do antebraço provocada por rápida oclusão da artéria braquial. Como o estudo requer um tempo reduzido, se tornou factível para grande número de pacientes e permite comparar resultados da função endotelial normal e em patologias em humanos¹². Esta técnica ainda provê um importante elo de ligação entre estudos básicos em vasos isolados e a pesquisa clínica. A capacidade vasodilatadora ou inibidora da agregação plaquetária é reconhecida no NO, sendo já associadas algumas variantes estruturais (polimorfismos) do gene a diferenças no funcionamento da NOS. Alguns estudos haviam antes associado o polimorfismo G894T a alguns aspectos funcionais vasculares¹³. Hoje, foi detectado um novo polimorfismo associado à expressão da NOS endotelial, reduzindo sua capacidade vasodilatadora e fortemente associado à estenose de veias safenas após cirurgia de revascularização cardíaca¹⁴. Além disso, novos estudos estão mostrando a importância da síntese de NO na regulação do crescimento celular vascular cerebral, podendo influir de forma importante na sua arquitetura¹⁵. Estes dados parecem ser correlacionados de modo estreito a eventos vasculares cerebrais. Isso mostra a importância da associação entre estudos genéticos e funcionais, a partir dos quais tem-se encontrado importantes mecanismos envolvendo o NO.

Controle da Atividade Nervosa Simpática

Enquanto o significado fisiológico do NO não pode ser predito a partir dos estudos iniciais sobre o efeito de vasodilatadores dependentes do endotélio em vasos isolados, parece que a influência do NO sobre o sistema nervoso simpático é talvez um de seus mais importantes papéis¹⁶. Tal interação foi sugerida inicialmente pela demonstração de que inibidores da NOS aumentam a resistência vascular regional e a pressão arterial¹⁷. Os estudos de lida¹⁸, relacionados aos níveis de integração neural entre NO e a vasoconstrição periférica mediada pelo sistema nervoso simpático, demonstraram a complexidade desta integração para diferentes leitos vasculares. Uma razão para esta complexidade está no fato do NO modular a neurotransmissão simpática em vários níveis, além do mesmo ser considerado um neurotransmissor. Não somente o NO suprime o tônus vascular como também inibe a liberação de noradrenalina na junção neuroefetora simpática¹⁹. Além disso, sabe-se que o NO participa da modulação central do reflexo pressorreceptor²⁰. Assim, o NO pode modular a vasoconstrição simpática em níveis pré e pós-ganglionares, além das vias regulatórias centrais simpáticas e parassimpáticas. Um outro mecanismo regulatório mediado pelo NO ocorre sobre a variabilidade da pressão arterial²⁰, mecanismo que reconhecidamente leva ao desenvolvimento de lesão de órgãos-alvo cardiovasculares como coração, pulmões e rins²¹.

Uma área clínica sob grande impacto da pesquisa sobre a

interação entre NO e sistema nervoso simpático é a hipertensão. O principal mecanismo pelo qual drogas anti-hipertensivas, em particular inibidores da ECA, reduzem a pressão arterial pode se dar pelo aumento da ação do NO²¹. Ainda, os estudos de lida¹⁸ sugerem que, se a ação do NO é bloqueada, como no caso de diabetes, hiperlipidemia ou hipertensão *per se*, a droga, que orginarmente inibe a descarga simpática, pode tornar-se menos efetiva. Estudos clínicos prospectivos podem examinar esta questão determinando se a efetividade dos agentes anti-hipertensivos varia em diferentes pacientes de forma dependente ou independente da disponibilidade de NO. Ainda, o aumento da biodisponibilidade de NO pode aumentar a resposta terapêutica a vários agentes anti-hipertensivos.

Modulação do Metabolismo da Glicose

Apesar dos anos de pesquisa, uma das últimas áreas compreendidas na função vascular é sua relação com o metabolismo. Apenas em tempo recente tornou-se evidente quão potentes são hormônios envolvidos com o metabolismo na regulação do NO e na função vascular. Schroeder e colaboradores²³ mostraram que a insulina, em concentrações fisiológicas, influencia o tônus de arteríolas musculares isoladas. Corroborando estes estudos, mostrou-se que a insulina estimula a liberação de NO²⁴, sendo este evento endotélio-dependente e inibido por bloqueadores da NOS. Uma vasoconstrição residual induzida pela insulina permanece sem explicação, mas mostra que níveis fisiológicos de insulina apresentam efeitos vasculares múltiplos que precisam ser explorados. Em adição a estes efeitos dependentes do endotélio, concentrações fisiológicas de insulina podem inibir a ação de vasoconstritores sobre células musculares lisas pelo aumento do NO²⁵. É interessante observar que a vasodilatação dependente de NO mediada pela insulina foi demonstrada em humanos como relacionada de modo estrito a uma ação metabólica da insulina, de modo a aumentar a captação de glicose, encontrando-se reduzida em pacientes com resistência à insulina²⁶. A implicação de que a resistência à insulina pode representar em parte uma perda da função NO pode ser explorada em pacientes pelo exame da vasodilatação dependente de NO, determinada ou não pela insulina. Estudos de resistência à insulina podem ser tratados indiretamente pelo aumento da biodisponibilidade de NO.

Modulação do Estresse Oxidativo e Lesão Cardiovascular

Um dos principais mecanismos reguladores da ação do NO é sua reação química, com conseqüente inativação, pelo ânion superóxido. Enquanto a importância fisiológica do NO é reconhecida de modo amplo, o papel do ânion superóxido vascular é escassamente estudado. Contudo, como a atividade biológica do NO depende de níveis suficientemente baixos de ânion superóxido, o NO poderá ser a ponta de um iceberg¹⁶, onde encontra-se, por trás, uma grande cascata de reações RedOx (Oxidação-Redução). Corroborando com achados anteriores em aorta de coelhos e artérias coronárias bovinas²⁷, Wambi-Kiesse e Katusic²⁸ mostraram que o relaxamento de artérias cerebrais mediado pelo NO se encontra reduzido quando é feito o bloqueio da enzima superóxido dismutase (SOD). Esta enzima retira o ânion superóxido produzido por reações de oxidação, e sua inibição resulta num aumento deste ânion no meio vascular. Como este é um chamado radical livre e tem alta afinidade pelo NO, ao reagir com este, inibe sua ação²⁹, reduzindo a assim chamada biodisponibilidade do NO. Este fato significa que uma determinada patologia, como o diabetes mellitus, pode levar à falta aparente de NO, mesmo que a sua produção esteja normal. Neste caso, o NO produzido é "seqüestrado" por radicais livres produzidos em grande quantidade nesta patologia¹⁵, impedindo que o NO exerça seus efeitos benéficos (Figura 2). Esta é referida como uma das principais causas da alta incidência de aterosclerose em indivíduos diabéticos, se comparados aos não-diabéticos³⁰. Além disso, sabe-se que o estado diabético pode incrementar o efeito da hiperglicemia no rim, aumentando marcadores inflamatórios e, em conseqüência, contribuindo para o desenvolvimento de lesões renais bem descritas no diabetes³¹. De fato, o aumento do estado inflamatório (pelo próprio TGF- β 1) e a hiperglicemia per se determinam aumento local da formação de espécies reativas de oxigênio, elevando o estresse oxidativo.

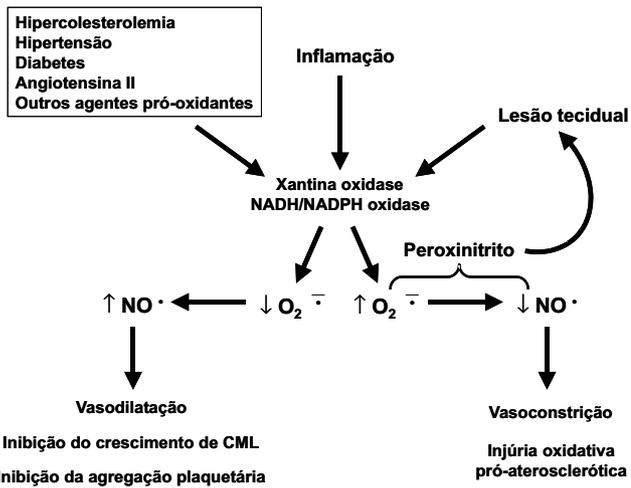


Figura 2 – Representação esquemática dos diversos estímulos para a produção de ânion superóxido e o efeitos deste sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico.

A Figura 2 apresenta fontes potenciais conhecidas de ânion superóxido, incluindo enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, xantina oxidase ou NAD(P)H oxidase. Estudada de maneira mais extensa apenas em neutrófilos, esta última enzima recentemente foi localizada em células vasculares normais, onde é constitutivamente ativa^{27,32} e parece ter importante papel na regulação do NO. Embora os inibidores disponíveis desta enzima não sejam específicos, parece que a NAD(P)H oxidase é a maior responsável pela sua produção¹⁶. É interessante observar que os níveis de ânion superóxido são maiores na adventícia da aorta normal, exato onde se encontram as subunidades das proteínas de NAD(P)H oxidase. O ânion superóxido, cujos níveis são normalmente reduzidos pela ação da SOD, quando aumentado nestes locais inativa o NO³². A redução da atividade da SOD vascular tem papel claro no remodelamento após injúria, promovendo a redução da biodisponibilidade de NO e participando da resposta constritiva do vaso³³. O reconhecimento de que enzimas endógenas aumentam a quantidade de radicais livres derivados de oxigênio necessita de uma distinção entre antioxidantes que opõem seus efeitos, já que existem antioxidantes e, de modo mais específico, antioxidantes inibidores de enzimas que também geram radicais livres¹⁶.

Perspectivas Clínicas Associadas ao Estresse Oxidativo

A relevância da NAD(P)H oxidase nas patologias vasculares tornou-se evidente. A atividade desta enzima encontra-se aumentada na hipertensão induzida por angiotensina II³⁴ e na tolerância a nitratos³⁵, sendo ambas as patologias melhoradas pela administração de captadores de ânion superóxido ou antioxidantes. O ânion superóxido gerado por esta enzima pode não apenas reduzir o relaxamento vascular endotélio-dependente, mas também contribuir para a produção de outros derivados de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, associado à hipertrofia vascular³⁶. Levando a importância da NAD(P)H oxidase ao nível clínico, o polimorfismo em p22phox, uma subunidade da enzima que confere ligação à membrana plasmática, foi recentemente associado à alteração no risco cardiovascular³⁷. Embora os estudos com a NAD(P)H oxidase se encontrem em estágios iniciais, está claro que a inativação do NO pelo aumento dos níveis de ânion superóxido ocorre numa ampla variedade de patologias vasculares, incluindo diabetes mellitus e aterosclerose³⁸.

A reação química entre NO e ânion superóxido é extremamente rápida, sendo que o peroxinitrito gerado é um intermediário altamente reativo, de potencial importância clínica¹⁶. Como o peroxinitrito reage com grupamentos tirosina das proteínas, sua produção pode ser detectada por marcação imunohistoquímica de nitrotirosina nos tecidos³⁹. A importância clínica é reforçada pela marcação de nitrotirosina encontrada em placas ateroscleróticas, e doenças neurológicas degenerativas⁴⁰. O estudo desenvolvido por Thom e colaboradores⁴¹ expôs a conseqüente complexidade e a relevância

nesta área, sugerindo que o aumento nos níveis ambientais de monóxido de carbono aumenta tanto os níveis de NO como a formação de peroxinitrito. Somando-se a isto, sabemos que o estresse oxidativo induzido pelo monóxido de carbono está associado a uma resposta inflamatória que é prevenida por inibidores da NOS. Como o NO *per se* inibe os mecanismos de adesão leucocitária no endotélio, tal observação sugere que a formação de peroxinitrito pode estimular a inflamação.

A importância de radicais livres de oxigênio na perda da regulação da atividade do sistema gerador de NO ou no aumento da formação de peroxinitrito pode também prover uma alternativa em longo prazo pelo uso terapêutico racional de antioxidantes associado à doença vascular. Existe uma visão clínico-investigativa que se confronta com o possível uso de um coquetel antioxidante que pode ser adicionado à prescrição de vitaminas C e E. Deve-se ter especial cuidado com esta prática, sendo que a pesquisa atual e estudos futuros podem prover suporte a uma terapia antioxidante adequada¹⁶. A primeira observação científica sobre o benefício clínico da vitamina E em pacientes com doença coronária mostrou que os antioxidantes representam um campo especialmente rico entre a pesquisa básica cardiovascular e a medicina clínica⁴². Um fato importante que deve ser considerado na função endotelial vascular anormal, em pacientes com disfunção endotelial crônica, é sua reversibilidade. Neste sentido, a vasodilatação dependente do endotélio reduzida em pacientes com diabetes crônica pode ser revertida por vitamina C⁴³. Contudo, não podemos esquecer que os efeitos crônicos de um fator de risco como o diabetes podem ser produzidos com eficácia em artérias isoladas⁴⁴ ou no antebraço⁴⁵ por breves exposições à glicose elevada. Assim, a disfunção endotelial em humanos pode representar um efeito cumulativo de insultos diários múltiplos sobre a vasculatura por fatores de risco cardiovascular descontrolados. Além disso, o aumento dos triglicerídeos plasmáticos, em decorrência de uma única refeição rica em gordura, reduz a dilatação dependente do endotélio na artéria braquial, sendo esta revertida por administração oral de vitaminas E e C⁴⁶.

A sensibilidade aparente da vasculatura a rápidas exposições a fatores de risco cardiovascular pode representar uma realidade sombria a todos nós. Contudo, a pesquisa atual e futura pode prover os meios para prevenir os efeitos danosos destes fatores de risco sobre os vasos e, potencialmente, suas conseqüências clínicas em longo prazo, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral.

Referências Bibliográficas:

- 1- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987, 327: 524-526.
- 2- Keefer LK. Nitric oxide-releasing compounds: from basic research to promising drugs. *Modern Drug Discovery*. 1998, 1:20-30.
- 3- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988, 333:664-666.
- 4- Palacios M, Knowles RG, Palmer RMJ, Moncada S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989, 165:802-809.
- 5- Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature Revs*. 2002, 3:214-220.
- 6- Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Revs*. 1997, 49:137-142.
- 7- Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg*. 2004, 40:187-193.
- 8- Ignarro LJ. The unique role of nitric oxide as a signaling molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide*. 2004, 11:25-30.
- 9- Irigoyen MC, Lacchini S, De Angelis K, Michelini LC. Fisiopatologia da Hipertensão: o que avançamos? *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2003;1:20-45

- 10- Monteiro HP, Silva EF, Stern A. Nitric oxide: a potential inducer of adhesion-related apoptosis-anoikis. *Nitric Oxide*. 2004, 10:1-10.
- 11- Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovas Dis*. 1995, 38:105-128.
- 12- Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994, 24:1468-1474.
- 13- Luscher TF, Corti R. Flow: the signal of life. *Circ Res*. 2004, 95(8):749-51.
- 14- Cattaruzza M, Guzik TJ, Slodowski W, Pelvan A, Becker J, Halle M, Buchwald AB, Channon KM, Hecker M. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res*. 2004, 95(8):841-7.
- 15- Baumgartl H-J, Standl E. The atherosclerosis process and its exacerbation by diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001, 109:S487-S492.
- 16- Cohen RA. The potential clinical impact of 20 years of nitric oxide research. *Am J Physiology*. 1999, 276:H1404-1407.
- 17- Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci*. 1989, 86:3375-3378.
- 18- Iida N. Nitric oxide mediates sympathetic vasoconstriction at supraspinal, spinal, and synaptic levels. *Am J Physiol*. 1999, 276: H918-H925.
- 19- Cohen RA, Tesfamariam B, Weisbrod RM. Endothelium inhibits adrenergic neurotransmission. In: *Endothelium-Derived Vasoactive Factors*, Ed by GM Rubanyi and PM Vanhoutte. New York: Karger, 1990, p. 206-212.
- 20- Lacchini S, Ferlin EL, Moraes RS, Ribeiro JP, Irigoyen MC. Contribution of nitric oxide to arterial pressure and heart rate variability in rats submitted to high-sodium intake. *Hypertension*. 2001, 38(3):326-31.
- 21- Berni V, Fiorino P, Irigoyen MC, Lacchini S. End-organ damage and cardiac dysfunction in sinoaortic denervation-induced AP lability in rats. *J Hypertension*. 2004, 22: 27S-27S.
- 22- Anderson IK, Drew GM. Investigation of the inhibitory effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on the antihypertensive effect of the angiotensin AT1 receptor antagonist, GR138950. *Br J Pharmacol*. 1997, 122:1385-1394.
- 23- Schroeder CA Jr, Chen Y-L, Messina EJ. Inhibition of NO synthesis or endothelium removal reveals a vasoconstrictor effect of insulin on isolated arterioles. *Am J Physiol*. 1999, 276:H815-H820.
- 24- Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. *J Clin Invest*. 1996, 98:894-898.
- 25- Kahn AM, Husid A, Allen JC, Seidel CL, Song T. Insulin acutely inhibits cultured vascular smooth muscle cell contraction by a nitric oxide synthase-dependent pathway. *Hypertension*. 1997, 30:928-933.
- 26- Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. *J Clin Invest*. 1996, 97:2601-2610.
- 27- Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1994, 266:H2568-H2572.
- 28- Wambi-Kie'sse' CO, Katusic ZS. Inhibition of copper/zinc superoxide dismutase impairs NO-mediated endothelium dependent relaxations. *Am J Physiol*. 1999, 276:H1043-H1048.
- 29- Cohen RA, Pagano PJ. Other factors in endothelial cell dysfunction in hypertension and diabetes. In: *Endothelial Function in Hypertension*, Ed by P Vallance and D Webb. Berlin: Springer Verlag, 1997, p. 39-51.
- 30- Haffner SM. Diabetes, hyperlipidemia, and coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1999, 83:17F-21F.
- 31- D'Agord Schaan B, Lacchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H. Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm Metab Res*. 2001, 33:664-9.
- 32- Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, Cohen RA. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res*. 1998, 82:810-818.
- 33- Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP, Laurindo FR. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003, 23:2197-202.
- 34- Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers IV Q, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997, 80:45-51.
- 35- Munzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Thoenes M, Berrington WR, Thompson JA, Freeman BA, Harrison DG. Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. *J Clin Invest*. 1996, 98:1465-1470.
- 36- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998, 32:488-495.
- 37- Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1998, 97:135-137.
- 38- Leite PF, Liberman M, Sandoli de Brito F, Laurindo FR. Redox processes underlying the vascular repair reaction. *World J Surg*. 2004, 28:331-6.
- 39- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1998, 83:1271-1278.
- 40- Ye YZ, Strong M, Huang ZQ, Beckman JS. Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods Enzymol*. 1996, 269:201-209.
- 41- Thom SR, Fisher D, Xu YA, Garner S, Ischiropoulos H. Role of nitric oxide-derived oxidants in vascular injury from carbon monoxide in the rat. *Am J Physiol*. 1999, 276:H984-H992.
- 42- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease. *Lancet*. 1996, 347:781-786.
- 43- Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1996, 97:22-28.
- 44- Cohen RA. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation* 1993, 87:V67-V76.
- 45- Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998, 97:1695-1701.
- 46- Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single highfat meal. *JAMA*. 1997, 278:1682-1686.