



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**IMPLICACIÓN DE LAS NADPH OXIDASAS EN
LA PATOGÉNESIS DE ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES: PERSPECTIVAS
TERAPÉUTICAS**

Autor: Claudia Rodríguez Prados

Tutor: Dolores Prieto Ocejo

Convocatoria: 23/06/2016

RESUMEN

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno o ROS y el estrés oxidativo están implicados en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión y las complicaciones vasculares en la obesidad y la diabetes mellitus. Una de las fuentes más importante de ROS a nivel vascular es la NADPH oxidasa o Nox. En condiciones fisiológicas, esta enzima productora de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) regula funciones vasculares clave como el tono vascular, el crecimiento, la diferenciación, la migración y la proliferación mediante la activación de vías de señalización sensibles a redox. Sin embargo, en presencia de factores de riesgo cardiovascular aumenta su actividad y la producción de ROS, contribuyendo a crear una situación de estrés oxidativo, que altera la función normal del endotelio y disminuye la producción de óxido nítrico (NO), vasodilatador y protector vascular. La activación de las vías de señalización de la pared vascular por ROS conduce a la producción de fibrosis, remodelación vascular e inflamación que aceleran el daño vascular. Además, la sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$ por las Nox produce la disfunción de otras enzimas vasculares, que van a aumentar aún más la generación de ROS y el estrés oxidativo en los vasos sanguíneos.

Los avances en la comprensión de la complejidad del estrés oxidativo en la fisiología y la patología y la señalización redox en el sistema vascular han aumentado el interés en relación con las posibilidades terapéuticas dirigidas a disminuir la producción de las ROS. Tras el fracaso de las terapias antioxidantes en la práctica clínica, las NADPH oxidasas se han convertido en importantes dianas terapéuticas para el desarrollo de inhibidores selectivos enzimáticos que frenen el estrés oxidativo y disminuyan la producción de ROS y así prevenir eventos cardiovasculares.

Palabras clave: estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno, NADPH oxidasas, disfunción endotelial, hipertensión, diabetes, obesidad, antioxidantes, inhibidores selectivos de Nox

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El oxígeno (O_2) es una molécula abundante en los sistemas biológicos. Las células vasculares obtienen energía mediante reacciones acopladas de oxidación-reducción (redox), en el proceso de reducción de oxígeno a agua (H_2O) durante la respiración aeróbica. En este proceso el O_2 es el responsable de la formación de **especies reactivas de oxígeno o ROS**, intermediarios de alta reactividad con un electrón desapareado.¹ El O_2 en su estado fundamental se reduce a $O_2^{\cdot-}$ al captar

un electrón, formando un radical muy inestable y de una semivida muy corta, que es reducido rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), más estable y fácilmente difusible a través de las membranas celulares por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) al captar otro electrón y dos hidrógenos. El H_2O_2 al captar otro electrón forma el radical hidróxilo ($\cdot OH$) altamente reactivo, que se reduce a H_2O . Las ROS más importantes se pueden dividir en dos grupos: 1) Radicales libres (con electrones desapareados) muy reactivos e inestables con una semivida corta como el $O_2^{\cdot-}$; OH y el NO , 2) Especies no radicalarias más estables, menos reactivas y con una semivida más larga como el oxígeno singlete (1O_2), H_2O_2 , ácido hipocloroso ($HClO$), peroxinitrito ($ONOO^-$) e hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$).¹ Para neutralizar estas especies reactivas de oxígeno y mantener el equilibrio redox, las células tienen dos **mecanismos antioxidantes**: 1) enzimáticos (la SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ para formar H_2O_2 ; la catalasa cataliza la reacción de H_2O_2 a H_2O y O_2 y la glutatión peroxidasa reduce el H_2O_2 y los peróxidos de los lípidos de las membranas a H_2O y alcohol lipídico respectivamente); 2) no enzimáticos (glutatión, ascorbato, y α -tocoferol)⁶

A concentraciones fisiológicas, las ROS actúan como segundos mensajeros y modulan vías de señalización sensibles a redox para regular diferentes funciones vasculares.¹ También intervienen en muchos procesos fisiológicos, como la defensa del huésped, la biosíntesis de hormonas y la respiración.⁹ Los factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus, la obesidad y el tabaquismo estimulan la producción de ROS en la pared vascular. En estas circunstancias fisiopatológicas, se produce un exceso de ROS que puede desbordar la capacidad de eliminación de los sistemas antioxidantes de las células⁶ y alterar las vías de señalización celular, produciendo daños vasculares.⁷

Este desequilibrio entre los mecanismos generadores de ROS y los sistemas antioxidantes defensivos es lo que se conoce como **estrés oxidativo**. Una de sus principales consecuencias a nivel vascular es la disfunción endotelial y la disminución de la biodisponibilidad de NO .¹⁰ Además de producir daño directo a lípidos, proteínas y ADN, proliferación celular incontrolada, apoptosis, muerte celular, inflamación y remodelación vascular. Por ello, el estrés oxidativo juega un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y es importante desarrollar estrategias terapéuticas para minimizar la producción excesiva de ROS y/o reforzar los sistemas de defensa antioxidantes que mantengan el equilibrio redox con el fin de prevenir y/o tratar estas enfermedades.⁷

Existen **tres enzimas productoras de ROS** que contribuyen de una manera importante en el estrés oxidativo a nivel vascular y en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares: NADPH oxidasa,

xantina oxidasa (XO) y óxido nítrico sintasa endotelial desacoplada (eNOS).¹ Estas enzimas promueven la producción de ROS de forma considerable y están implicadas en el desarrollo de la disfunción endotelial y el daño vascular. De todas ellas, la NADPH oxidasa es la principal fuente de ROS a nivel vascular y se ha demostrado que es la responsable de la disfunción de la eNOS y la XO, que van a aumentar aún más la generación de ROS y el estrés oxidativo en los vasos (círculo vicioso del estrés oxidativo).¹²

La **NADPH oxidasa** es una enzima generadora de ROS que cataliza la reacción de reducción del O_2 a $O_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 utilizando como donante de electrones el NADPH. Se identificó por primera vez en las células fagocíticas de la respuesta inmune innata y participa en la “explosión respiratoria”, generando grandes cantidades de $O_2^{\cdot-}$ para destruir a los patógenos invasores. Hasta hace unos años no se ha descubierto que las NADPH oxidasas están presentes en otros tipos de células no fagocíticas, a las que se les ha denominado NADPH oxidasas no fagocíticas o **familia NOX**. Esta familia está formada por siete isoformas aunque solamente la **Nox1**, **Nox2**, **Nox4** y **Nox5** se encuentran a nivel vascular en las células endoteliales, músculo liso y fibroblastos.¹ Estas isoformas juegan un papel crítico en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, hipertensión y complicaciones vasculares en diabéticos¹ aunque también regulan funciones fisiológicas vasculares clave como el tono vascular, el crecimiento, la diferenciación, la migración y la proliferación, como se verá más adelante.

El resto de isoformas de la familia NOX intervienen en otros procesos fisiológicos y no están relacionadas con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La Nox3 se encuentra en el oído interno y se encarga de la función vestibular y DUOX1 y 2 están implicadas en la biosíntesis de la hormona tiroidea.

En situaciones fisiológicas normales, las NADPH oxidasas presentan una actividad baja. Sin embargo, en respuesta a la acción de diferentes estímulos de forma crónica (angiotensina II, endotelina-1, citoquinas inflamatorias, *shear stress* (fuerzas de cizallamiento ejercidas por el flujo sanguíneo en el endotelio vascular), factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, LDL oxidadas, hiperglucemia y tabaco) se rompe la homeostasis vascular y se produce una sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$. Esta situación va a llevar al aumento de la producción de ROS por la XO, el desacoplamiento de la eNOS y la disminución de la biodisponibilidad de NO en el endotelio, lo que va a empeorar el estrés oxidativo y la función endotelial.

La **eNOS** es la enzima responsable de la producción de NO en el endotelio,¹ en respuesta a la acetilcolina, la bradicinina, la histamina, la sustancia P y el *shear stress*. El NO tiene un papel protector vascular, ya que disminuye la agregación plaquetaria y presenta propiedades

antitrombóticas y antiaterogénicas, además de ser un potente vasodilatador, al activar la guanilato ciclasa y aumentar los niveles de GMPc, lo que produce la relajación del músculo liso vascular.² La disminución de los niveles de NO está relacionada con la disfunción endotelial y enfermedades cardiovasculares.² La eNOS es un homodímero que cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH a la FAD y FMN del dominio reductasa hasta el hemo-férrico del dominio oxigenasa, que se reduce y forma hemo-ferroso, que se une al O₂. La L-arginina se oxida formando L-arginina hidroxilada. La BH₄ dona un segundo electrón y la L-arginina hidroxilada se oxida a L-citulina y •NO.^{17,18} La BH₄ queda oxidada y se forma el radical (BH₃•). Durante la función catalítica normal, la eNOS se encarga de regenerar la forma oxidada de BH₄.¹⁷

Sin embargo, cuando se produce un aumento de la actividad de la NADPH oxidasa, se generan grandes cantidades de O₂^{-•} que reaccionan con el •NO, disminuyendo su biodisponibilidad y su efecto vasodilatador y produciéndose peroxinitrito (ONOO⁻). Este es altamente reactivo y oxida a la BH₄ generando productos biológicamente inactivos que no se pueden regenerar (radical BH₃•).^{17,18} Debido a esto el flujo de electrones se altera, la transferencia de electrones se desvía al O₂ en lugar de a la L-arginina. y se produce el **desacoplamiento de la eNOS**, proceso por el cual la enzima pasa de generar NO a producir radicales O₂^{-•}. Esta transformación de la eNOS de una enzima protectora a ser contribuyente del estrés oxidativo se ha observado en pacientes con hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensión esencial, hipertensión pulmonar, enfermedades renales crónicas, fumadores crónicos, aterosclerosis y disfunción endotelial.¹⁷

Otra enzima que se va a ver afectada por la sobreproducción de O₂^{-•} de la NADPH oxidasa es la **xantina oxidasa**, una enzima importante en el catabolismo de las purinas al catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y esta en ácido úrico. Esta enzima es una xantina oxidoreductasa (XOR)

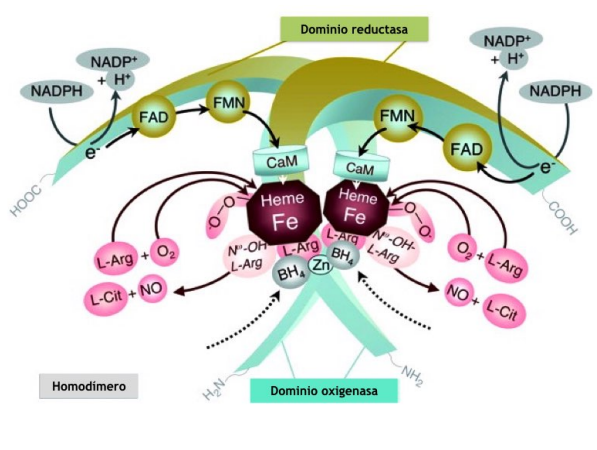


Figura 1: estructura de la eNOS y mecanismo catalítico. Adaptado de: Förstermann U, Münzel T, 2006

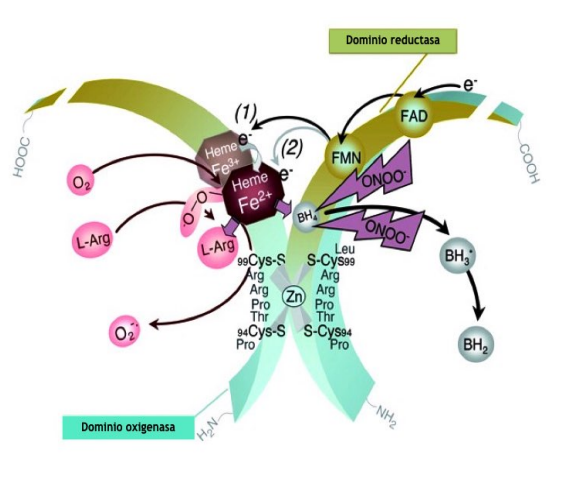


Figura 2: desacoplamiento de eNOS. Adaptado de: Förstermann U, Münzel T, 2006

con dos subunidades que albergan un cofactor de molibdeno, dos centros de $\text{Fe}_2\text{-S}_2$, que intervienen en la transferencia de electrones y una FAD. La XOR contiene dos formas funcionalmente distintas: la xantina deshidrogenasa (XDH) que utiliza NAD^+ y produce NADH y la xantina oxidasa (XO) que emplea el O_2 como aceptor de electrones y produce ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$ principalmente).¹ La sobreproducción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por las Nox, transforma a la XDH en XO por procesos de oxidación de los grupos tiol del centro activo de la enzima y posterior modificación proteolítica irreversible. De esta forma, la actividad de la XO predomina sobre la XDH y se producen altas cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que reaccionan con $\cdot\text{NO}$ formando ONOO^- , que contribuye junto con las Nox y la eNOS desacoplada al desarrollo de la disfunción endotelial.¹²

El **endotelio vascular** es una monocapa de células, que se encuentra en la cara interna de los vasos sanguíneos, que sintetiza sustancias vasoactivas (vasodilatadoras como el NO y la PGI_2 o vasoconstrictoras como el tromboxano A_2 y endotelina-1) en respuesta a diferentes estímulos como factores paracrinos, hormonas circulantes, *shear stress* y la hipoxia. En condiciones fisiológicas, tiene un papel protector al regular el tono vascular y presentar una actividad antitrombótica, anticoagulante y antiagregante, importante para mantener la homeostasis vascular. Esta función endotelial se ve afectada por la sobreproducción de ROS generada por la NADPH oxidasa, XO y eNOS desacoplada, que daña las células endoteliales y produce una pérdida de la función normal del endotelio vascular o **disfunción endotelial**. Esta se caracteriza por: 1) la disminución de la biodisponibilidad del NO al reaccionar con el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ y formar ONOO^- ; 2) la alteración de la vasodilatación mediada por el endotelio (menor respuesta a la acetilcolina); 3) el aumento de la secreción de endotelina-1 y otros vasoconstrictores; 4) mayor expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y síntesis de factores proinflamatorios y quimiotácticos para macrófagos y linfocitos; 5) modificación de la superficie endotelial y transformación en proagregante y procoagulante; 6) el aumento de la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos y migración de monocitos; 7) mayor formación de trombos; 8) aumento de la producción de factores de crecimiento de las células del músculo liso vascular (PDFG). Por lo tanto, el estrés oxidativo provoca que el endotelio pierda su papel protector y se convierta en una fuente de vasoconstrictores y mediadores proagregantes y aterogénicos. La disfunción endotelial es una característica común de muchas enfermedades cardiovasculares.

Debido a que las NADPH oxidasas son la principal fuente de ROS en los vasos y son las causantes de la disfunción de la eNOS y la XO, que aumentan aún más la producción de ROS y el estrés oxidativo y con ello el desarrollo de la disfunción endotelial y enfermedades cardiovasculares, el interés en desarrollar inhibidores selectivos de las Nox ha aumentado en los últimos años y más aún

tras el fracaso de los antioxidantes en la práctica clínica¹². Para el desarrollo de estas nuevas terapias, es importante entender la estructura, el mecanismo de activación, las funciones vasculares, las vías de señalización de ROS y la implicación en la patología de las NADPH oxidadas.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre:

1. Las funciones vasculares de las NADPH oxidadas y su implicación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y las complicaciones vasculares en la diabetes.
2. Los últimos avances en investigación en el desarrollo de inhibidores selectivos de Nox como alternativa a las terapias antioxidantes, para frenar la producción de ROS y el daño endotelial.

METODOLOGÍA

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed de los artículos científicos publicados en los últimos cinco años para obtener la información más reciente relativa a las funciones de las NADPH oxidadas a nivel fisiológico y patológico y los últimos avances en investigación relativos a las terapias frente al estrés oxidativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estructura y mecanismo de activación de las principales isoformas de Nox a nivel vascular

Existen 4 isoformas de la familia Nox, presentes a nivel vascular, en las células endoteliales, músculo liso y fibroblastos: **Nox 1, 2, 4 y 5**. Todas ellas son proteínas transmembrana con estructuras muy parecidas, aunque mecanismos de activación diferentes.

La Nox1 y Nox2 necesitan la asociación de las subunidades citosólicas con las subunidades de la membrana para ser activa y producir O_2^- . La p47phox (NOXO1 en Nox1) es fosforilada por la PKC y forma un complejo con p67phox (NOXA1 en Nox1) y p40phox (ausente en Nox1). Esta fosforilación produce un cambio conformacional que le permite unirse a la subunidad p22phox transmembrana. La proteína Rac GTPasa se mueve a la membrana y se une a todo el complejo para la activación.³

La actividad de Nox 1 y 2 es estimulada por la acción de agonistas específicos acoplados a proteínas G (angiotensina II, endotelina-1), citoquinas (TNF α , IL-6), factores de crecimiento

(PDGF, EFG, TGF- β), factores metabólicos (hiperglucemia, hiperinsulinemia, LDL-oxidada, ácidos grasos libres, productos avanzados de la glicosilación o AGE...) y por estímulos mecánicos (fuerzas de cizallamiento).¹ Por lo tanto, todos estos agonistas llevan a la activación de la Rac o de la PKC, que a su vez activa a Nox.¹² Por ejemplo, la estimulación del receptor AT1 por la angiotensina II activa a la fosfolipasa C (PLC), que produce diacilglicerol (DAG) y trifosfato de inositol (IP3) y aumenta la liberación de calcio y activa a la PKC.¹²

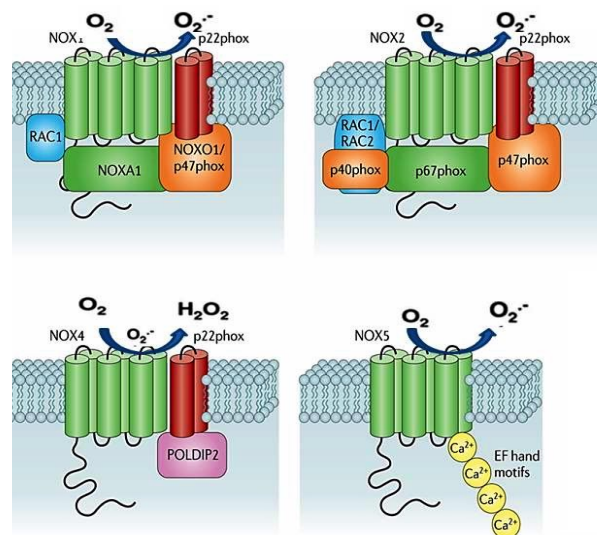


Figura 3: Estructura y activación de las isoformas de Nox presentes a nivel vascular. Adaptado de: Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, 2011

La Nox4 es activa de forma constitutiva, no necesita de la unión de las subunidades citosólicas a la membrana y produce predominantemente H₂O₂ a diferencia del resto de las isoformas que producen O₂⁻. Se cree que en su estructura hay un tercer bucle citosólico adicional que le da tiempo a la enzima para generar una segunda molécula de O₂⁻ y su posterior dismutación formando H₂O₂. El H₂O₂ es un importante vasodilatador, que promueve la relajación dependiente del endotelio y reduce la presión arterial, por lo que se cree que esta isoforma tiene un papel protector. La Nox5 está regulada por la unión de calcio a su extremo N-terminal-calmodulina y se activa al aumentar las concentraciones de calcio intracelular para producir radicales O₂⁻.⁸

Vías de señalización sensibles a redox activadas por ROS

Las ROS producidas por Nox juegan un papel fisiológico en la regulación de la función endotelial y el tono vascular y un papel fisiopatológico en la disfunción endotelial por inactivación del NO, la inflamación, la hipertrofia, la apoptosis, la migración, la fibrosis, la angiogénesis, la remodelación vascular y la reorganización de la matriz extracelular.⁹

Todos estos procesos fisiológicos y patológicos están mediados a través de vías de señalización sensibles a redox y segundos mensajeros, como las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos: ERKs, JNKs y p38), MMPs (matriz metaloproteinasas), tirosina quinasas, tirosinas fosfatasa, genes proinflamatorios, canales iónicos y calcio.⁹

El O_2^- y el H_2O_2 producidos por Nox oxidan los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína presentes en muchas enzimas como quinasas (PKC, MAPKs, Akt...), fosfatasa, fosfolipasas (fosfolipasa A2), pequeñas GTPasas (Rac, Rho), factores de transcripción (NF-kB, AP-1 y HIF-1) y canales iónicos (calcio y potasio). Esta oxidación inducida por ROS produce enlaces disulfuro intra e intermoleculares, que altera la conformación de las proteínas, la actividad enzimática y la unión al ADN¹

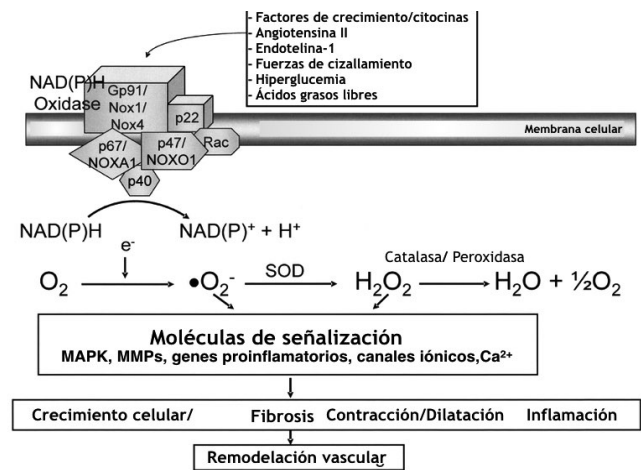


Figura 4: vías de señalización sensibles a redox activadas por ROS. Adaptado de: Paravicini TM, Touyz RM, 2008

Las ROS al oxidar los residuos de cisteína del centro activo de las tirosinas fosfatasa, las inactivan y esto conduce a la fosforilación y activación de proteínas quinasas como las MAPKs, PKC, caspasa-3 y PI3K/Akt. Las ROS tiene múltiples vías de interacción con procesos unidos a varios sistemas de fosforilación-desfosforilación. Las ROS también regulan factores de transcripción a través de la formación de enlaces disulfuro entre aminoácidos críticos de los dominios de unión al ADN¹² y están implicadas en la activación de factores de transcripción como la proteína activadora-1 (AP-1), que regula la expresión de genes que intervienen en la diferenciación, proliferación y apoptosis, y factores de transcripción proinflamatorios como el NFkB, que produce la expresión de genes pro-inflamatorios, citoquinas y quimioquinas y promueve la inflamación y la remodelación vascular. El aumento de la expresión de $TNF\alpha$ e interleucinas, hace que se active aún más las Nox y con ello la producción de ROS. Además, el NF-kB está implicado en la expresión de la E-selectina y moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) causando la adhesión de monocitos a las células endoteliales y aumentando la agregación plaquetaria, que favorece el desarrollo de aterosclerosis. La inflamación y el estrés oxidativo son dos procesos que están implicados en la patogénesis de muchas enfermedades y se encuentran en una interacción constante en la pared del vaso.^{3, 4}

Por último, las ROS están implicadas en la activación de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que producen la remodelación vascular (degradación de colágeno y ruptura de placas de ateroma)¹² Las ROS producen daño oxidativo a macromoléculas (proteínas, lípidos, ADN), inactivan al NO y promueven la disfunción endotelial. Además a través de estos mecanismos moleculares, oxidan proteínas quinasas y fosfatasa claves en la señalización celular, activan el factor de transcripción

proinflamatorio NF- κ B promoviendo la inflamación y la remodelación vascular, aumentan la expresión de moléculas de adhesión y la agregación plaquetaria y la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular (CMLV), regulan y favorecen la apoptosis y la diferenciación y activan a metaloproteinasas de la matriz para la remodelación vascular. Muchas de estos procesos están asociadas con cambios patológicos observados en las enfermedades cardiovasculares.³ Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes en estos procesos es un primer paso en el desarrollo de nuevos tratamientos contra la aterosclerosis, la disfunción vascular y otras enfermedades cardiovasculares.¹³

Funciones vasculares fisiológicas y patofisiológicas de Nox

En condiciones normales, las isoformas de Nox generan cantidades de ROS pequeñas, que regulan vías de señalización sensibles al estado redox e intervienen en el mantenimiento de la función vascular en procesos como el control del tono vasomotor, la regulación de la matriz extracelular y la modulación fenotípica de las células del músculo liso vascular, la proliferación, la migración y la diferenciación celular.

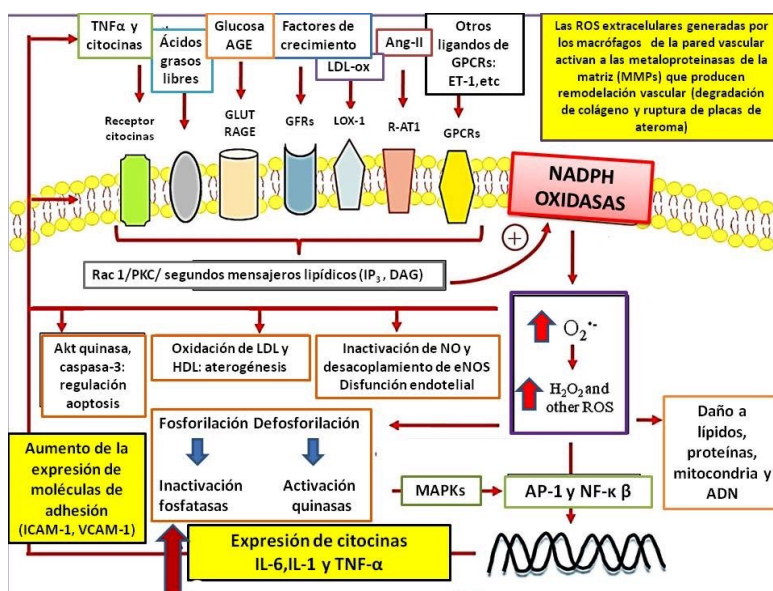


Figura 5: regulación de NADPH oxidasas y vías de señalización intracelulares activadas por ROS. Adaptado de: Schramm A, Mausig P, Osmenda G, Guzik TJ, 2012

¹² Sin embargo, en condiciones patológicas y en presencia de factores de riesgo cardiovascular, la actividad y la expresión de las Nox en los vasos se incrementa y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por Nox, eNOS desacoplada y xantina oxidasa en las células endoteliales y músculo liso vascular producen daño vascular.

- Regulación del tono vascular

Los efectos sobre el tono vascular dependen del tipo de ROS. La **Nox 4** es productora de H₂O₂, potente vasodilatador que actúa como un EDHF (factor hiperpolarizante derivado del endotelio) y aumenta la expresión de eNOS.¹³ La **Nox 1** y **Nox 2** son fuentes importantes de O₂⁻ que reaccionan

rápidamente con el NO y forman ONOO⁻, que produce el desacoplamiento de la eNOS e inhibe a la prostaciclina sintasa y a la superóxido dismutasa (SOD). Por lo tanto, el O₂⁻ disminuye la biodisponibilidad y el efecto vasodilatador del NO y actúa como un vasoconstrictor.³

- Remodelación vascular y reorganización de la matriz extracelular

La remodelación vascular es la modificación que se produce en el diámetro y el grosor de la pared del vaso por la acción crónica de angiotensina II y ROS. Cuando el vaso está sometido a una alta presión, el grosor de la pared aumenta y se produce la acumulación de colágeno y fibronectina en la matriz extracelular (remodelación hipertrófica). Esta remodelación vascular implica la degradación y la reorganización de las proteínas de la matriz extracelular. La enzima más importante implicada en este proceso es la metaloproteínasa de matriz (MMP-2 y MMP-9), que degrada el colágeno y la fibronectina y contribuyen a la desestabilización y ruptura de las placas de ateroma. Las ROS producidas por las Nox aumentan la expresión y la activación de estas enzimas en las células del músculo liso vascular (CMLV) y la reorganización de las proteínas de la matriz extracelular. Estas MMPs participan también en la angiogénesis y la metástasis.^{3,4}

- Proliferación y diferenciación de células de músculo liso vascular

Las células del músculo liso vascular expresan proteínas contráctiles como la alfa-actina, calponina y la cadena larga de miosina, que tienen una actividad proliferativa muy baja. En patologías cardiovasculares, las CMLV cambian su capacidad de síntesis (fenotipo sintético) y aumenta la proliferación y migración y la producción de matriz extracelular, predisponiendo a una hipertrofia vascular y la formación de una lesión. Los factores de crecimiento como el TGF-β o PDGF, aumentan la producción de ROS por la **Nox1** y **Nox 4**, que conducen a la activación de vías de señalización sensibles a redox, que a su vez activan a MAPKs (ERK1/2, p38MAPK, JNK, Akt...) aumentando la expresión de genes implicados en el crecimiento, proliferación y diferenciación de las CMLV. La **Nox2** contribuye a la proliferación celular por un mecanismo que implica p38 MAPK y Akt en las células endoteliales.^{3,4,14}

- Migración

La migración es un proceso celular natural y es parte integral del desarrollo vascular, así como la respuesta de curación después de una lesión vascular (cicatrización). En condiciones normales, el NO inhibe la migración de las CMLV. La producción de O₂⁻ a través de **Nox 1** y **Nox 4** es crítica para la migración de las CMLV de la capa media a la íntima, proceso importante en la formación de la placa fibrosa y es estimulada por Ang II, LDL oxidadas, hipoxia, PDGF e hiperglucemia^{3,4}

- Apoptosis y autofagia

La generación de ROS de manera prolongada, produce daño oxidativo y muerte celular programada de células endoteliales y CMLV, ya que las ROS regulan vías de señalización pro-apoptótica como p38MAPK y JNK. La apoptosis es inducida por homocisteína, TNF α , altas concentraciones de glucosa y LDL-ox y las isoformas de Nox implicadas son la **Nox 2 y Nox 4**.^{3,4}

La importancia biológica de **Nox 5** a nivel vascular es desconocida, aunque se conoce que está implicada en la proliferación celular, la angiogénesis y la migración y en el daño oxidativo en la aterosclerosis,^{3,4,10} se necesita trabajo adicional para caracterizar sus papeles fisiológicos y patológicos en la pared arterial.¹³

Implicación de las Nox en el desarrollo de algunas enfermedades cardiovasculares: hipertensión arterial y complicaciones cardiovasculares en diabetes mellitus.

1. HIPERTENSIÓN

La hipertensión fue una de las primeras patologías en las que se descubrió la implicación de las NADPH oxidasas en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares.³ La etiología exacta de la hipertensión es difícil de determinar (sólo en el 5% de los pacientes hipertensos se sabe con exactitud la causa). El estrés oxidativo no es la única causa de la hipertensión pero es un factor contribuyente importante en el aumento de la presión arterial, junto con otros factores pro-hipertensivos como el excesivo consumo de sal, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la hiperactividad simpática.¹⁰

La inhibición de Nox y los antioxidantes disminuyen la producción de O₂⁻ y reducen la presión sanguínea, mientras que los pro-oxidantes aumentan la presión arterial, por ello las ROS se asocian de forma casual con la hipertensión al menos en modelos animales.¹⁰ Todavía no está claro si el estrés oxidativo provoca hipertensión en los seres humanos, lo que sí se sabe es que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en los mecanismos moleculares asociados con las lesiones cardiovasculares y renales en la hipertensión.¹⁰ Además existe evidencia de que el estrés oxidativo está incrementado en pacientes con hipertensión esencial (aumento de biomarcadores de estrés oxidativo).⁹

La regulación del tono vascular y la presión arterial es un proceso complejo en la que intervienen mecanismos intrínsecos o locales como la factores paracrinos derivados del endotelio vascular y del metabolismo celular y mecanismos extrínsecos como el control nervioso (simpático, parasimpático,

reflejo barorreceptor, quimiorreceptor) y el control humoral (catecolaminas circulantes, la angiotensina II del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la vasopresina y el péptido natriurético aurícula).⁶

La **angiotensina II** es un potente vasoconstrictor que se forma por la acción de la renina liberada de las células yuxtaglomerulares del riñón a la circulación cuando disminuye la presión arterial y la presión de perfusión renal, los niveles de sodio o por estimulación simpática del receptor β_1 . La renina actúa sobre el angiotensinógeno hepático para producir angiotensina I, que por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) del endotelio vascular se convierte en angiotensina II. Esta actúa sobre los **receptores AT1** en las arterias y produce: 1) vasoconstricción; 2) aumento de la actividad adrenérgica simpática y liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas, que al unirse a los receptores α_1 producen vasoconstricción; 3) aumento de la liberación de aldosterona de la corteza adrenal y de la vasopresina de la neurohipófisis, que aumentan el volumen sanguíneo y la presión arterial.⁶

Este receptor AT1 es un receptor acoplado a proteínas Gq, al unirse la angiotensina II se activa la fosfolipasa C (PLC) generando inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 se une a receptores intracelulares liberando calcio. El DAG y el incremento del Ca^{2+} , activan la PKC, desencadenando la estimulación de una amplia red de señales, como por ejemplo: 1) MAPKs (proteína-quinasas activadas por mitógenos), 2) activación de fosfolipasa A₂ y liberación de ácido araquidónico y compuestos derivados del mismo, 3) activación de factores de transcripción, que aumentan la expresión de genes que regulan el crecimiento celular y la síntesis de matriz extracelular, 4) estimulación de la NADPH oxidasa unida a la membrana por fosforilación de la subunidad p47phox, que tiene un rol primordial en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de vías relacionadas a las MAPK.⁶

Por lo tanto, la Ang II modula la hipertensión a través de la estimulación de los receptores AT1 en la pared vascular, que conduce a la activación de NADPH oxidasas en las células vasculares, de forma indirecta (como se ha visto anteriormente al fosforilar la p47phox) o de forma directa (la Ang II al unirse al receptor AT1 activa a la Rac GTPasa y se transloca a la membrana).⁶

La activación de las NADPH oxidasas (**Nox 1** y **Nox 2**) por la angiotensina II conduce a una sobreproducción de ROS. Como se ha visto anteriormente, las ROS activan vías de señalización redox sensibles implicadas en procesos que producen un daño en el vaso (por ejemplo, la remodelación vascular). Además, la sobreproducción de O_2^- reacciona con el NO produciendo ONOO^- , implicado en el desacoplamiento de la eNOS y en la disminución de la biodisponibilidad

del NO. Todo ello, lleva a una reducción de los efectos vasodilatadores del NO que conduce a una disfunción endotelial y un aumento de la presión arterial.

Hay que destacar que la **Nox 4** en el endotelio mejora la relajación dependiente del endotelio, debido a la acción vasodilatadora de H_2O_2 (factor hiperpolarizante) y una disminución de la presión arterial, por lo que esta isoforma tendría un papel protector frente a la hipertensión.

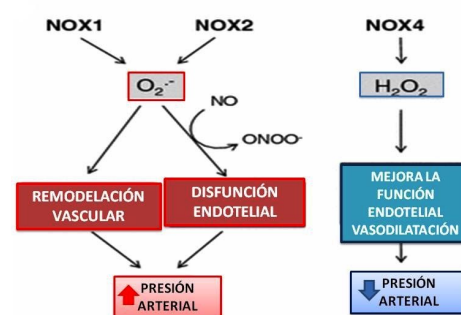


Figura 6: efectos de las ROS producidas por Nox en la presión arterial. Adaptado de: Sirker A, Zhang M, Shah AM, 2011

2. DIABETES MELLITUS Y OBESIDAD

Las complicaciones cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en pacientes diabéticos.³ El estrés oxidativo y la obesidad juegan un papel importante en el desarrollo de la disfunción endotelial, la inflamación crónica de los tejidos y las complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la diabetes mellitus.

La insulina se une al receptor tirosina quinasa en el músculo esquelético y tejido adiposo para facilitar la translocación del transportador GLUT4 a la membrana celular y suprimir la producción de glucosa hepática (glucogenolisis y gluconeogénesis) y así regular los niveles de glucosa en sangre.⁵ En las células endoteliales, la insulina activa dos vías de señalización: 1) la **vía PI3K/Akt**, que produce la fosforilación y activación de la eNOS y con ello la producción de NO vasodilatador y también favorece la captación de glucosa por GLUT4 y la síntesis de glucógeno al inactivar la GSK3 por fosforilación (enzima encargada de inhibir a la glucógeno sintasa); 2) la **vía Ras-Raf-MAPK**, que activa la transcripción de genes implicados en la proliferación y diferenciación y promueven la producción de endotelina-1 (vasoconstrictora) y la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio.⁵

El tejido adiposo inflamado en individuos obesos produce citocinas proinflamatorias y ácidos grasos libres, que son responsables de la inflamación, el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la resistencia a la insulina (IR) en las células endoteliales.⁵ Los ácidos grasos libres activan a la PKC, que fosforila e inhibe la vía de señalización PI3K/Akt, disminuyendo la producción de NO y la translocación de GLUT4; y activan la vía MAPK aumentando la producción de endotelina-1 y moléculas de adhesión, lo que desencadena una disfunción endotelial y una situación de resistencia a la insulina e hiperglucemia. En estados de resistencia a la insulina, el páncreas intenta compensar produciendo más insulina (hiperinsulinemia) que acentúa aún más la disfunción endotelial (más activación de la vía MAPK que de la PI3K/Akt). Además los ácidos grasos libres, activan a la

NADPH oxidasa y aumenta la producción de ROS, que empeoran aún más la función del endotelio (al disminuir la biodisponibilidad del NO) y activan al NF-kB, que aumenta la producción de citoquinas (TNF α e IL-6), que a su vez activan a las Nox y favorecen el estrés oxidativo y la inflamación.⁵ Los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en sangre también están implicadas en el desarrollo de resistencia a la insulina, ya que aumenta la actividad Ser-Thr quinasa del receptor insulínico.^{3,4} También el exceso de ácidos grasos libres promueve el desarrollo de la dislipidemia, al aumentar la producción hepática de triglicéridos y disminuir los niveles de HDL. Debido al estrés oxidativo y la hiperglucemia, aumentan los niveles de LDL oxidadas y glicosiladas. Este perfil facilita el desarrollo de la aterosclerosis¹¹ y complicaciones más graves como angina de pecho e infarto de miocardio.^{3,4}

Los tejidos que dependen de la concentración de glucosa en sangre, en situaciones de hiperglucemia aumentan la captación y metabolismo a través de la glucólisis, lo que aumenta el transporte de electrones a través de la cadena mitocondrial y el estrés oxidativo. Las altas concentraciones de glucosa activan a las NADPH oxidasas y al NF-kB.¹¹

Por lo tanto, la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo, el aumento de ácidos grasos libres (AGL), la obesidad, el aumento de citocinas proinflamatorias y protrombóticas y la disfunción endotelial son procesos que promueven la aterosclerosis en la diabetes tipo 2 y las complicaciones vasculares.

Perspectivas terapéuticas para frenar el estrés oxidativo y complicaciones cardiovasculares: inhibidores selectivos de Nox

Como se ha visto las NADPH oxidasas vasculares son la fuente principal de ROS (estrés oxidativo) y contribuyen de una forma importante al desarrollo de la disfunción endotelial y otros daños vasculares que se producen en las enfermedades cardiovasculares. Actualmente, los tratamientos frente a estas enfermedades reducen el perfil de riesgo cardiovascular del paciente, actúan como antioxidantes indirectos como los IECAs o los ARA-II, etc¹ para retrasar el desarrollo de las complicaciones vasculares. Sin embargo, la mayoría de estas terapias no son totalmente eficaces para frenar y disminuir la progresión de enfermedades vasculares. Por ello, es necesario desarrollar terapias dirigidas directamente a las enzimas productoras de ROS para disminuir la producción de ROS, aumentar la biodisponibilidad del NO, mejorar la función endotelial y prevenir eventos cardiovasculares.¹²

La implicación de las NADPH oxidasas en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, las convierte en unas interesantes dianas terapéuticas.¹³ En general, hay dos formas de eliminar los radicales libres: 1) la administración de antioxidantes o la estimulación de los sistemas antioxidantes endógenos; 2) la inhibición de las enzimas que generan ROS (más complejo, pero interfiere con la causa del estrés oxidativo).

Se ha demostrado que las vitaminas E, C y A tienen propiedades antioxidantes y efectos beneficiosos tanto *in vitro* como en investigación con animales, pero no se ha podido demostrar su eficacia clínica en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.¹³ El fracaso de los antioxidantes (ROS-scavengers o captadores de radicales) se debe a que no eliminan la sobreproducción de ROS y permiten la progresión de todo el proceso patogénico. Además, reaccionan con los aniones $O_2^{\cdot -}$ mil millones de veces más lento que éste con el NO, por lo que la reacción del radical $O_2^{\cdot -}$ con el NO está favorecida y es más rápida, lo que lleva a una pérdida de biodisponibilidad de NO (disfunción endotelial).¹² Para que el antioxidante pudiese reaccionar con el $O_2^{\cdot -}$ tendría que estar a una concentración superior a la del NO en la pared del vaso (rango nanomolar) en un millón de veces. Esto requeriría una concentración de antioxidante en el rango milimolar, que es poco probable que se alcance incluso con los niveles de ingesta más altos. Por lo tanto, el desarrollo de terapias con inhibidores selectivos de la principal enzima productora de ROS (NADPH oxidasa) es probable que sean más eficaces para frenar el estrés oxidativo y la progresión de enfermedades cardiovasculares que las terapias antioxidantes convencionales, aunque estos últimos no hay que omitirlos de la terapéutica, ya que se podrían combinar con los inhibidores enzimáticos para lograr mejores resultados.

La **Nox1** y **Nox2** son las isoformas de NADPH oxidasas que más contribuyen al estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular, por lo que son las principales dianas terapéuticas.¹³ Es importante tener en cuenta que las estrategias no tienen como objetivo inhibir todas las oxidasas al mismo tiempo, sino más bien inhibir isoformas específicas de NADPH oxidasas.¹² Un inhibidor selectivo para la Nox1 y Nox2 no interfiere sobre la acción de las otras isoformas (por ejemplo: equilibrio postural en Nox3; síntesis de hormona tiroidea en DUOX1 y DUOX2), por lo que se evitan efectos secundarios no deseados y se alcanza una mayor eficacia terapéutica.¹³ También hay que tener en cuenta que los inhibidores selectivos inhiben parcialmente la actividad de las NADPH oxidasas, así se evitan las posibles consecuencias que tendría la inhibición de los efectos extravasculares de la Nox1 y Nox2, como la afectación de la función inmune del paciente a largo plazo (la Nox 2 está

presente en las células fagocíticas y tiene un papel crucial en la respuesta inmune innata a patógenos invasores) y la afectación de las vías de señalización de procesos fisiológicos esenciales¹³

- Diseño racional de inhibidores selectivos de Nox 1 y Nox 2

Para diseñar un inhibidor selectivo de Nox 1 y Nox 2 hay que conocer las interacciones entre las subunidades que son comunes a la Nox 1 y Nox 2, pero que no existen en otras isoformas. Varias de las subunidades reguladoras de Nox1 y Nox2 como p22phox, NOXA1, NOXO1 y Rac 1 también se encuentran en otras isoformas como la Nox 3 y la Nox 4.¹³ La **p47phox** es la única subunidad que es utilizada específicamente por Nox 2 y Nox 1 y es la necesaria para activar completamente a la enzima, aunque se puede activar en su ausencia pero con menor eficacia. Como es importante mantener al menos un poco de actividad para que la función inmune y otras funciones fisiológicas extravasculares no se vean afectadas, la p47phox representa un objetivo clínicamente más seguro que otras subunidades que son absolutamente necesarios para la actividad enzimática.¹³ La p47phox es la subunidad encargada de unir las subunidades activadoras p67phox de la Nox2 y la NOXA1 de la Nox1 a los dominios catalíticos de la membrana. Para hacer esto tiene varios dominios funcionales que le permiten interactuar simultáneamente con p67phox o NOXA1, p22phox de la membrana y otras subunidades catalíticas (Rac1 y p40phox). Una mayor comprensión de la estructura molecular de la p47phox y sus interacciones con otras subunidades de la NADPH oxidasa y fosfolípidos de la membrana facilita el desarrollo de los inhibidores selectivos¹³

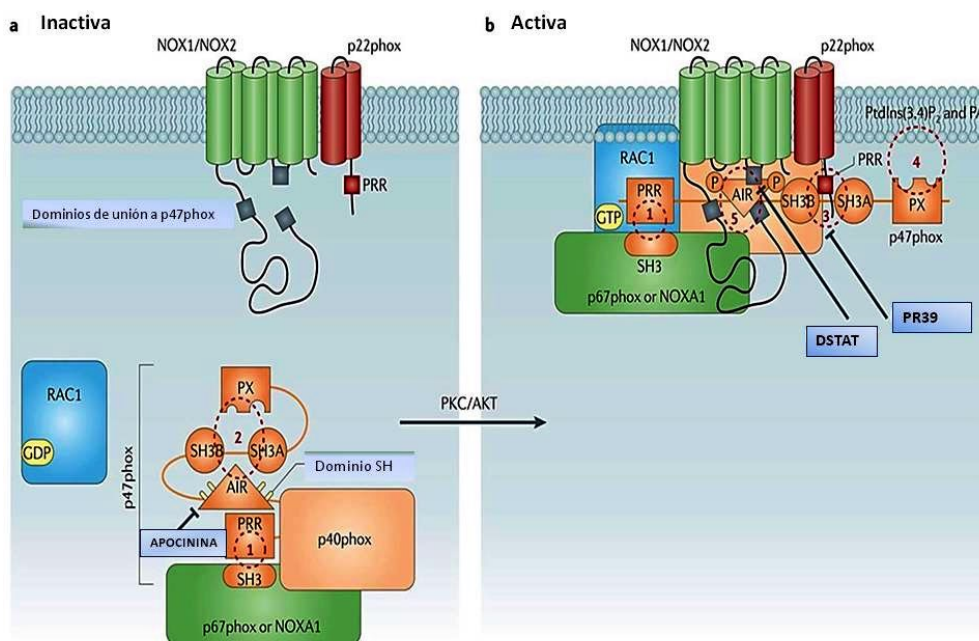
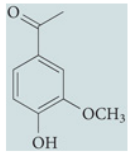
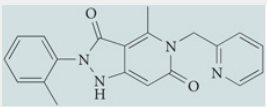


Figura 7: estructura molecular de la subunidad p47phox e interacciones con otras subunidades de la Nox1 y Nox2 en su activación. Mecanismo de acción de algunos inhibidores de las Nox: apocinina, DSTAT y PR39. Adaptado de: Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG, 2011

En su forma inactiva, la p47phox de la Nox 1 y Nox 2 interacciona con el dominio SH3 de la p67phox/NOXA1 a través de una región rica en prolina (PRR). Esta interacción p47phox-PRR con p67phox/NOXA1-SH3 es importante para unirse a las subunidades de la membrana y se puede bloquear con inhibidores peptídicos que imiten la región de prolina de la p47phox (paso 1). En estado de reposo, la p47phox tiene una conformación cerrada debido a las interacciones entre la región autoinhibitoria (AIR), el dominio PX y el dominio bis-SH3 (paso 2). La activación de la p47phox se produce cuando los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína de AIR son fosforilados por la PKC o la PI3K/Akt. Esto desestabiliza la interacción del AIR con el dominio SH3-bis y la p47phox adopta una conformación abierta, por lo que el dominio bis-SH3 y PX quedan libres para interactuar con la región rica en prolina de la p22phox y con los fosfolípidos de membrana, respectivamente (paso 3 y 4). Si se inhibe la fosforilación de AIR, la p47phox se quedaría bloqueada en su conformación cerrada y no podría interactuar con los componentes de la membrana, por lo que la Nox no se activaría. Esto se conseguiría al inhibir la actividad de la PKC. Por ejemplo, el inhibidor selectivo de la PKC- β **LY333531** (mesilato de ruboxistaurina) provoca una disminución de la producción de O_2^- y de la disfunción endotelial inducida por la hiperglucemia. La asociación del complejo citosólico con las subunidades de membrana se estabiliza adicionalmente por interacciones proteína-proteína directas entre p47phox y otros dominios de unión de la Nox 1 y Nox 2 (paso 5).

• Posibles mecanismos de acción de algunos inhibidores de Nox

Nombre del inhibidor	Estructura química	Mecanismo de acción	Ventajas/Desventajas
<p>Apocinina (inhibidor aislado de la <i>Picrorhiza kurroa</i>, planta medicinal hepatoprotectora de la India, Nepal, Tíbet y Pakistán) Inhibidor no selectivo</p>	 <p>4-hidroxi-3-metoxi-acetofenona</p>	<p>Profármaco vía oral. Se activa por oxidación por acción de peroxidasas vasculares que forman dímeros activos Modificación química directa de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína del AIR e inhibición de la unión de la p47phox al resto del complejo de la membrana</p>	<p>Pocos efectos secundarios. Buen perfil de seguridad en estudios con animales Administración vía oral</p>
<p>GK-136901</p>	 <p>Pirazolopiridina</p>	<p>Inhibidor de Nox1 y Nox 4 Mecanismo no muy claro. Se cree que por su estructura similar al NADPH podrá actuar como un antagonista competitivo</p>	<p>Buen perfil de seguridad Buena biodisponibilidad vía oral</p>

Nombre del inhibidor	Estructura química	Mecanismo de acción	Ventajas/Desventajas
PR39 (inhibidor peptídico selectivo)	RRRPRPPYLPRRPPPPFF PPRLPPRIPPGFPPRFPPR FP Péptido de 39 aminoácidos, rico en prolina y en arginina aislado del intestino de cerdo	Imita la región aminoacídica proximal de la PRR-p22phox y se une a los dominios SH3 de la subunidad p47phox impidiendo la translocación y unión a la membrana.	No es completamente selectiva, ya que puede unirse a otras proteínas que posean el dominio SH3. No se administra por vía oral por su carácter peptídico. No se ha probado su seguridad y eficacia en humanos
gp91ds-tat (inhibidor peptídico selectivo)	[H]- RKKRRQRRCSTRIRRQ L-NH2 Péptido sintético compuesto por nueve aminoácidos de la capa proteica del VIH (fracción tat, le permite entrar en la célula) y nueve aminoácidos de la gp91phox.	Se une a la subunidad p47phox y evita su interacción con gp91phox, por lo que inhibe a la Nox1 y Nox2, pero no a la Nox4 (es p47phox-independiente)	Poco estable No se administra por vía oral por su carácter peptídico. No se ha probado su seguridad y eficacia en humanos

CONCLUSIONES

Las NADPH oxidasas son las principales enzimas productoras de O_2^- y/o H_2O_2 a nivel vascular. En condiciones normales, regulan funciones fisiológicas como el control del tono vasomotor, la proliferación y la migración, entre otros procesos, a través de vías de señalización sensibles al estado redox. Sin embargo, en presencia de diversos factores de riesgo como el aumento de los niveles de angiotensina II en la hipertensión o la hiperglucemia y los niveles elevados de ácidos grasos libres en la diabetes mellitus y la obesidad, la expresión y la actividad de estas enzimas aumenta. Esto conduce a una sobreproducción de O_2^- , que produce la disfunción de otras enzimas vasculares (eNOS y XO), que aumentan aún más la generación de O_2^- y el estrés oxidativo en los vasos. Esta situación facilita la producción de una serie de procesos patológicos a nivel vascular dependientes de vías de señalización como la inflamación, la apoptosis, la agregación plaquetaria y la remodelación vascular, entre otros. Además esta sobreproducción de ROS, altera la función normal del endotelio al disminuir la biodisponibilidad de óxido nítrico (vasodilatador y protector vascular). Esta disfunción endotelial es común a muchas enfermedades cardiovasculares y las NADPH oxidasas, principalmente las isoformas Nox 1 y 2, están implicadas de forma importante en su desarrollo. Tras el fracaso de los antioxidantes en la clínica, ha surgido la búsqueda de inhibidores selectivos de Nox1/2 que actúan sobre la subunidad p47phox, para disminuir la producción de ROS, aumentar la biodisponibilidad del NO y mejorar la función endotelial. El siguiente paso sería desarrollar biomarcadores sensibles y específicos que evalúen el grado de estrés oxidativo de los pacientes y probar la eficacia y la seguridad de estos inhibidores en humanos, lo

que supondría un nuevo enfoque terapéutico para abordar el estrés oxidativo y el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Weswler AR, Bast A. Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments. *Current Hypertens Reports*, 2010 (12):154-161.
2. Flammer AJ, Lüscher TF. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pluggers Archiv- European Journal of Physiology*, 2010 (459):1005-10133.
3. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzil M, Guzik TJ. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2014 20(17): 2794–2814.
4. Amanso AM, Griendling KK. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012 (4): 1044-1064.
5. Prieto D, Contreras C, Sánchez A. Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance. *Current Vascular Pharmacology*, 2014 (12): 412-426.
6. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005 (25): 29-38.
7. He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2015 (11): 27770-27780.
8. Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Research in Cardiology*, 2011 (5): 735- 747.
9. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 2008 (31):170-180.
10. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Research*, 2011 (34): 5-14.
11. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction: A major mediator of diabetic vascular disease. *BBA-Molecular Basis of Disease*, 2013 (1832): 2216-2231.
12. Schramm A, Mausig P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular Pharmacology*, 2012 (56): 216-231.
13. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovey*, 2011 (6): 453-471.
14. Lassegue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, Physiology and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 2012 (10): 1364-1390.
15. Muñoz M, Sánchez A, Martínez MP, Benedito S, López-Oliva ME, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. Cox-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interrogar arterias from obese Zucker rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015 (84): 77-90.
16. Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Nakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM, Tsao PS. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015 (10): 25234-25263.
17. Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Circulation*, 2006 (113): 1708-1714.
18. Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function: Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2012 (110): 87-94.
19. Rodio-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, Rapoeiras Roubín S, González JR. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag*, 2013 (9): 401–428.