

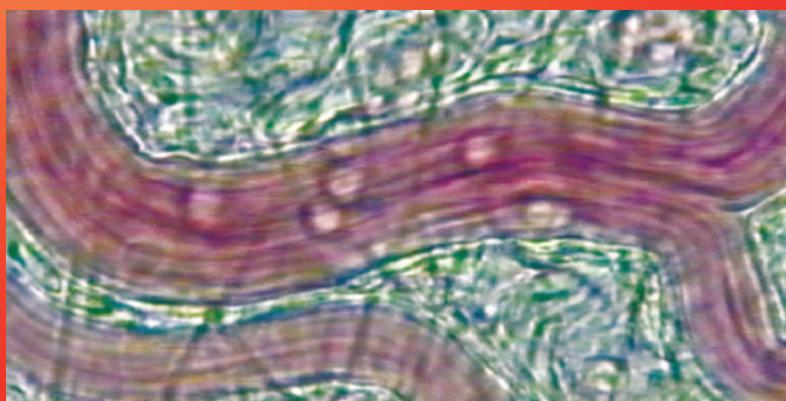


publicação semestral

Julho-Dezembro

vol. 30 n.º 2 2015

BSPHM



www.hemorreologia.com

Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

Bulletin of the Portuguese Society of Hemorheology and Microcirculation

BOLETIM

Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação
Bulletin of the Portuguese Society of Hemorheology and Microcirculation

Editor Principal/Editor-in-Chief: Carlota Saldanha **Editor Associado/Associated Editor:** Henrique Luz Rodrigues **Conselho Editorial Internacional/International Editorial Board:** PORTUGAL: José Pereira Albino, J. M. Braz Nogueira, Victor Oliveira, Luís Mendes Pedro, Fausto J. Pinto, João Martins e Silva | OUTROS PAÍSES: Jean-Frederic Brun (França), Greet Schmid-Schoenbein (EUA), Nadia Antonova (Bulgária), Yukihide Isogai (Japão).
Coordenador Editorial: João Martins e Silva.

Vol. 30 n.º 2 Julho-Dezembro 2015

Sumário / Summary

NOTA DE ABERTURA/EDITORIAL

- **Physics in blood vessels evaluation** 3
- A física na avaliação da função vascular sanguínea
Carlota Saldanha

ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

- **Angiotensin converting enzyme 2 as a new renin-angiotensin system therapeutic target for hypertension control** 5
- Enzima conversora da angiotensina do tipo 2 como um novo alvo terapêutico do sistema renina-angiotensina para controlo da hipertensão
Paulo André Dias Bastos
- **Microparticles and a new cardiovascular continuum – microparticles' transversality in cardiovascular diseases** 14
- Micropartículas e um novo continuum cardiovascular – transversalidade das micropartículas nas doenças cardiovasculares
Paulo André Dias Bastos
- **O potencial terapêutico do sulfeto de hidrogénio na doença vascular** 23
Paulo André Dias Bastos

SÉRIE TEMÁTICA SOBRE HEMORREOLOGIA E MICROCIRCULAÇÃO

- **Tema 9 – Principais factores determinantes da viscosidade sanguínea** 28
J. Martins e Silva

ATUALIZAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS/ARCHIVE

- **Role of high shear rate in thrombosis** 40
- **The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization** 41
- **Biological responses in stented arteries** 42

NOTICIÁRIO/NEWS AND INFORMATION

43

Política Editorial: O “Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação” fica a deter o direito de propriedade sobre todo o material publicado e difundido (artigos ou vídeos), após concordância expressa, por escrito, dos respetivos autores. O material eventualmente recusado não será devolvido.

Publication Policy of Material Presented: The “Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação” has the copyright ownership of all published and diffused material (articles or videos) conveyed, upon expressed and signed agreement of their Authors. The material eventually rejected will not be returned.

Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

Presidente Honorário: Prof. Doutor João Alcindo Martins e Silva

ÓRGÃOS SOCIAIS DA SPHM / BOARDS (2012-2014)

Direção / Executive Committee	Assembleia Geral / General Assembly	Conselho Fiscal / Finance and Audit Committee
<i>Presidente</i> Prof. ^a Doutora Maria Carlota Saldanha Lopes	<i>Presidente</i> Prof. Doutor José Manuel Braz Nogueira	<i>Presidente</i> Prof. Doutor João Eurico Fonseca
<i>Vice-Presidente</i> Dr. José António Pereira Albino	<i>1.º Secretário</i> Prof. Doutor Luís Mendes Pedro	<i>1.º Vogal</i> Dr. ^a Maria Helena Baptista Manso Ribeiro
<i>Secretário-Geral</i> Dr. Flávio Nelson Fernandes Reis	<i>2.º Secretário</i> Prof. Doutor Henrique Sobral do Rosário	<i>2.º Vogal</i> Dr. Carlos Manuel dos Santos Moreira
<i>Tesoureiro</i> Dr. ^a Ana Santos Silva Herdade	<i>1.º Secretário Suplente</i> Dr. Miguel Frederico Leal Galvão	Comissão de Delegados / Committee of Delegates <i>Delegado da Região Norte</i> – Dr. Manuel Campos
<i>Secretários-Adjuntos</i> Prof. ^a Doutora Alice Santos Silva Dr. Jorge Lima Dr. Luís Sargento	<i>2.º Secretário Suplente</i> Dr. Paulo Ferreira da Silva	<i>Delegado da Região Centro</i> – Dr. João Morais <i>Delegado da Região Sul e Regiões Autónomas</i> – Dr. Mário Marques

MEMBROS CONSULTIVOS, HONORÁRIOS E CORRESPONDENTES / / CONSULTIVE, HONORARY AND CORRESPONDENT MEMBERSHIP

Conselho Científico / / Scientific Council

Axel Pries (Alemanha)
David Lominadze (Estados Unidos)
Friedrich Jung (Alemanha)
Gregório Caimi (Itália)
J. Braz Nogueira (Portugal)
J. Fernandes e Fernandes (Portugal)
Jean Frederic Brun (França)
Jerard Nash (Reino Unido)
João Morais (Portugal)
José M. Ferro (Portugal)
Nadia Antonova (Bulgária)

Individualidades / / Distinguished Members

A. Diniz da Gama (Portugal)
A. M. Ehrly (Alemanha)
Carlos Ribeiro (Portugal)
Fernando Lacerda Nobre (Portugal)
Helbert J. Meiselman (EUA)
Helena Saldanha Oliveira (Portugal)
J. Esperança Pina (Portugal)
J.M.G. Toscano Rico (Portugal)
Jean François Stoltz (França)
Joaquim Silva Carvalho (Portugal)
John A. Dormandy (Grã-Bretanha)
John Edward Tooke (Grã-Bretanha)

Luís Providência (Portugal)
LuisTeixeira Diniz (Portugal)
M. Freitas e Costa (Portugal)
Manuel Carrageta (Portugal)
Mário Andreia (Portugal)
Michel Boisseau (França)
Políbio Serra e Silva (Portugal)
Rafael Ferreira (Portugal)
Ricardo Seabra Gomes (Portugal)
Sandro Forconi (Itália)
Yukihide Isogai (Japão)

FILIAÇÃO INTERNACIONAL EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL HEMORHEOLOGY EUROPEAN SOCIETY FOR MICROCIRCULATION

Referência da capa: Vénula pós-capilar (diâmetro aproximado: 30 mm) de rede microvascular em mesentério de rato (*Rattus norvegicus*), observada por microscopia intravital de transluminação. No interior do vaso sanguíneo visualizam-se leucócitos a interagir com a parede vascular. Imagem obtida por Henrique Sobral do Rosário (Instituto de Biopatologia Química – Prof.^a Doutora Carlota Saldanha, Faculdade de Medicina de Lisboa; Unidade de Biopatologia Vasculuar, Instituto de Medicina Molecular)

Esta publicação foi subsidiada por:

FCI: Fundação para a Ciência e Tecnologia (Ministério da Educação e Ciência – Portugal),
ao abrigo do: **Apoio do Programa Operacional Ciência, Tecnologia, Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III.**

O Boletim (ISSN 2182-6005) é publicado semestralmente pela Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação. Isenta de registo no ICS nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 12.º do Decreto Regulamentar n.º 8/99, de 9 de Junho. **Depósito Legal** 30 525/89. **Tiragem** 100 exemplares **Distribuição** sócios, sociedades científicas afins, entidades oficiais e privadas de âmbito médico e áreas de educação da ciência. Todos os direitos estão reservados. **Preço de cada número avulso:** 5 €, a que acresce 2,5 € para portes de correio. **Editor, Proprietário, Administração e Secretariado:** Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação, a/c Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. **Endereço do Secretariado:** Apartado 4098, 1501-001 Lisboa, Portugal. **Telefone** 217 985 136; **Fax:** 217 999 447 **Execução Gráfica:** Publicações Ciência e Vida, Lda. **Telef.:** 214 787 850; **Fax:** 214 020 750. **E-mail:** pub@cienciaevida.pt

PHYSICS IN BLOOD VESSELS EVALUATION

A FÍSICA NA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR SANGUÍNEA

As propriedades hemorreológicas são indissociáveis da composição, tipo e função do segmento da rede vascular, sustentáculo da circulação sanguínea. A “saúde” vascular é, a par do normal funcionamento do coração, imprescindível para a viabilidade hemodinâmica do sistema circulatório, para a manutenção da fluidez sanguínea, da homeostasia vascular nomeadamente no balanço entre os sistemas pró e anti-inflamatórios, e os que constituem a hemostase. O endotélio saudável produz uma variedade de moléculas que regulam o tónus vascular, a adesão aos elementos figurados do sangue e as participantes na formação e na destruição do rolhão de plaquetas. A disfunção vascular é um marcador precoce do desenvolvimento da placa de ateroma que pode originar eventos cardiovasculares. O avanço dos testes clínicos tem ocorrido a par da evolução do conhecimento molecular subjacente à função do endotélio vascular. O grau de disfunção vascular nas várias vertentes fisiopatológicas pode ser avaliado por técnicas invasivas ou não invasivas.

A reactividade vascular na macrocirculação (artérias de condução) e na microcirculação (artérias de resistência e arteríolas) tem sido objecto de grande atenção por parte dos físicos e criadores de tecnologia mecânica e óptica. Exemplificamos neste editorial, de modo não exaustivo, algumas técnicas aplicadas nos equipamentos utilizados na prática clínica

Os determinantes da macrocirculação são a pressão de pulso, o espessamento das grandes artérias e a onda de pulso.

A angiografia coronária quantitativa (QCA) é uma técnica invasiva baseada na medição do diâmetro vascular após injeção de acetilcolina (induz a síntese do vasodilatador monóxido de azoto quando o endotélio está intacto). Nos indivíduos saudáveis com endotelial normal ocorre vasodilatação e hiperemia. No entanto existe o risco de ocorrência de isquemia coronária. Os erros inferidos a este método invasivo estão bem identificados e relatados. No entanto a QCA permite conhecer o grau de progressão e ou regressão da placa de ateroma nas artérias coronárias. A ultra-sonografia intravascular (IVUS) é outra técnica invasiva que avalia também o lúmen vascular de pequenos e grandes vasos coronários. A comparação dos resultados das lesões mínimas nos diâmetros dos lúmens (MLD) das artérias coronárias obtidos por QCA e IVUS concluiu que a utilização da QCA subestima as MDL nos vasos de pequeno calibre e sobrevaloriza-as nos vasos de maior diâmetro.

A técnica da “dilatação mediada pelo fluxo” (“flow mediated dilatation”, FMD) que utiliza ultra-sons quando aplicada na artéria braquial permite testar a dilatação dependente do endotélio. A FMD é o teste aplicado nas artérias periféricas de condução e é baseado na libertação de monóxido de azoto (NO) pela célula endotelial. Quantifica a resposta vasomotora durante a hiperemia reactiva sem fornecer indicação do tónus arterial em repouso. Os estudos efectuados permitem evidenciar a relação entre os valores obtidos com a FMD e o risco cardiovascular total e o grau de aterosclerose.

Posteriormente o desenvolvimento da tomografia computadorizada de emissão de fotão permite obter a imagem nuclear da perfusão do miocárdio em doentes seleccionados para a angiografia invasiva electiva. Os resultados da aplicação deste método demonstraram melhor qualidade do diagnóstico em relação ao obtido na angiografia coronária invasiva e fornecem elementos preditivos da doença obstrutiva arterial coronária e

ou impeditivos da utilização do cateterismo como meio de diagnóstico. A FMD tornou-se muito popular nos estudos clínicos por ser preditiva de eventos cardiovasculares nos casos assintomáticos.

Outra técnica foi elaborada na perspectiva de complementar o valor clínico dos resultados obtidos com a FMD que não fornece informação da resposta vascular aos níveis de repouso da tensão de cisalhamento. Assim para avaliar a resposta vascular em artérias de condução em repouso desenvolveu-se a técnica baseada na constrição em repouso ao decréscimo de fluxo e de tensão de cisalhamento, (“low-flow-mediated constriction”; LMF) que utiliza ultra-sons e ressonância magnética.

Os determinantes da vasculatura na microcirculação são a resistência vascular e a pressão arterial média. A tonometria arterial periférica (peripheral arterial tonometry; PAT) avalia a amplitude da onda de pulso ou seja a resposta à hiperemia proveniente do fluxo lento nas artérias de pequeno calibre. Esta técnica que consiste num plestígrafo aplicado no dedo permite o cálculo da função endotelial na microcirculação e nas artérias de resistência. Há evidência da associação entre a diminuição da amplitude da onda de pulso (como resposta à hiperemia) com a disfunção endotelial da artéria coronária. Também a PAT tem permitido identificar doentes cardíacos com predisposição para eventos adversos.

Poderá acontecer que a cirurgia cardíaca decorra com satisfatória hemodinâmica sistémica mas ter a microcirculação comprometida; se não for intervencionada pode originar danos irreparáveis. A espectroscopia do infravermelho próximo (near- infrared spectroscopy; NIRS) é um método não invasivo que fornece a estimativa da oxigenação tecidual porque contrariamente à luz visível a do infravermelho próximo penetra mais que 1cm na pele sendo fortemente absorvida e desviada pela água. Permite determinar a saturação da hemoglobina em oxigénio (StO₂= hemoglobina oxigenada/ hemoglobina total) na microvasculatura (arteríolas, capilares e vénulas). Estudos efectuados com oclusão acima do cotovelo e avaliação da microcirculação da palma da mão facultam a quantificação dos parâmetros da microcirculação (pressão arterial média, distribuição e consumo do oxigénio ao e pelos tecidos antes e após a oclusão). Verificou-se que há associação com o aumento da perfusão tecidual e recuperação da microcirculação. Noutros estudos o consumo de oxigénio tecidual e a velocidade de reperfusão apresentam valores reduzidos quando aumenta a concentração de lactato circulante. Isto pode ocorrer na síndrome da resposta inflamatória sistémica. Habitualmente utiliza-se a imagem da microcirculação sub-lingual obtida por polarização espectral ortogonal (OPS) que se associa com os níveis elevados de lactato e implica diminuta oxigenação tecidual. Apesar de validada com a capilaroscopia convencional houve necessidade de melhorar as imagens obtidas por OPS e para tal aplicou-se o “sidestream darfield imaging” Este equipamento não invasivo está ao lado da cama do doente e fornece um conjunto de imagens que após análise computacional fornece a morfologia e a quantificação computadorizada dos parâmetros da microcirculação nomeadamente o índice de fluxo microvascular, a densidade de vasos perfundidos e o índice de heterogeneidade vascular.

A fluxometria por laser doppler pertence ao grupo dos métodos não invasivos para estudo da microcirculação a nível da pele. A substituição da análise de Fourier pela análise de tempo-frequência (Wavelet) permitiu recuperar esta técnica e tirar informação sobre os mecanismos de controlo vascular em doentes submetidos a stress térmico. A amplitude do sinal obtido varia com os ciclos respiratório e circulatório e com os intervalos fixos de frequência relacionados com os mecanismos de controlo metabólico, neurogénico e miogénico.

Carlota Saldanha
Presidente da SPHM

REFERÊNCIAS

J Cardiothoracic Vascular Anesthesia 1996; 10:406-418.
Scand J Med Sci in Sports 2001; 11:213-222.
J Am Coll Cardiol 2004; 44: 2137-2141.
Eur Heart J 2010; 31: 1142-1148.

Physics Reports 2010; 488:51-57.
Heart 2010; 96: 141-147.
Intensive Care Med. 2010;36(11):1882

ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME 2 AS A NEW RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM THERAPEUTIC TARGET FOR HYPERTENSION CONTROL

ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA DO TIPO 2 COMO UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA PARA CONTROLO DA HIPERTENSÃO

Paulo André Dias Bastos¹

ABSTRACT

Hypertension is a disease of global dimensions, affecting 30 to 45 % of the population globally and remaining poorly controlled in spite of the currently existing pharmacological therapies. Considering the renin-angiotensin system's importance in cardiovascular diseases, particularly in hypertension, there are still many unknown characteristics of this system that may reveal themselves as potential future targets or therapeutic agents.

A protective system formed by type 2 angiotensin converting enzyme and several mediators with it associated performing protective cardiovascular functions, have been described as playing a role as important as that of the angiotensin converting enzyme classically described in the pathogenesis of hypertension. In this review, the effects of this protective system mediated by type 2 angiotensin converting enzyme in the cardiovascular system and hypertension development are described, as well as its mechanisms of action and its role in current and future pharmacological and cellular therapies.

Keywords: hypertension; high blood pressure; angiotensin converting enzyme 2; ACE2

RESUMO

A hipertensão arterial é uma doença de dimensões globais, afetando 30 a 45% da população a nível mundial e permanecendo mal controlada apesar das terapias farmacológicas atualmente existentes. Considerando da importância do sistema renina-angiotensina nas patologias cardiovasculares, nomeadamente na hipertensão arterial, existem ainda muitas particularidades desconhecidas deste sistema que poderão vir a revelar-se um potencial futuro alvo ou agente terapêutico.

Um sistema protetor formado pela enzima conversora da angiotensina do tipo 2 e de vários mediadores a esta associados com funções protetoras a nível cardiovascular, tem vindo a ser descrito como exercendo um papel tão importante como o da enzima conversora da angiotensina classicamente descrita na patogénese da hipertensão. Nesta revisão, procurou-se demonstrar os efeitos deste sistema protetor mediado pela enzima conversora da angiotensina do tipo 2 no sistema cardiovascular e desenvolvimento da hipertensão arterial, os seus mecanismos de ação e o seu papel nas terapias farmacológicas e celulares atualmente existentes e em desenvolvimento.

Termos-chave: hipertensão; pressão sanguínea elevada; enzima conversora da angiotensina 2; ECA2

¹ Secção Autónoma de Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro, Portugal.
Correspondence e-mail: pauloandrediasbastos@ua.pt.

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma doença de dimensões globais, afetando 30 a 45% da população a nível mundial.¹ Apesar de ser uma doença teoricamente controlável e do largo espectro de terapias farmacológicas e não farmacológicas atualmente existente, a pressão arterial média populacional tem-se mantido constante nas últimas décadas e os indicadores indiretos da hipertensão, como o acidente vascular cerebral, tendem a aumentar nos países europeus.² Na prática, a hipertensão arterial permanece mal controlada, apresentando mais de metade dos indivíduos tratados respostas insuficientes à terapia.³

Atualmente existe uma necessidade crescente de desenvolver terapias inovadoras para o tratamento da hipertensão que sejam capazes de dar resposta às expectativas da medicina. Em contrapartida, a *pipeline* de medicamentos eficazes para tratamento de hipertensão essencial é relativamente reduzida quando comparada com a de medicamentos para a insuficiência cardíaca, anticoagulantes, antiplaquetários e para a hipertensão pulmonar.⁴

A relutância da indústria farmacêutica em investir em moléculas inovadoras para o tratamento da hipertensão deve-se sobretudo à elevada competitividade do mercado, grande número de genéricos e alternativas terapêuticas de custos mais reduzidos para os pacientes.⁴

Como profissionais de saúde, somos confrontados diariamente com a existência de variáveis das quais não temos conhecimento. Nos últimos anos, a enzima conversora da angiotensina do tipo 2 (ECA2) tem-se tornado um exemplo ilustre deste fenómeno, vindo a adicionar uma outra dimensão ao sistema renina-angiotensina (SRA).

Com a descoberta de um SRA com ações protetoras, mediado pela ativação de recetores AT2 da angiotensina II (Ang II) e recetores MAS da ECA2, antevê-se um futuro em que medicamentos inovadores surgirão e passarão a fazer parte do arsenal terapêutico anti-hipertensor.⁵

Sendo um alvo central na regulação da pressão arterial, o SRA deve as suas ações características principalmente ao péptido vasoativo Ang II, com ações fundamentalmente vasopressoras, formado pela enzima conversora da angiotensina (ECA).

A descoberta na última década de uma nova carboxipeptidase, a ECA2, capaz de formar metabolitos com ações antagónicas às da Ang II, adicionou uma nova dimensão ao tradicional SRA e promete revolucionar o arsenal terapêutico e os resultados do combate à hipertensão arterial sanguínea.^{6,7}

De facto, as potencialidades conhecidas da ECA2 são variadas, desde a capacidade de vasodilatação, anti-fibrótica e anti-proliferativa, até ao seu papel como recetor viral e transportador de aminoácidos.⁸

Com a identificação de vários componentes do sistema ECA2/Ang 1-7, surgiu a identificação de vias de sinalização envolvidas nos seus efeitos protetores, nomeadamente as vias de formação do óxido nítrico (NO), prostaglandinas e fosfatases celulares.⁹

Contudo, quando se procuram avaliar os níveis de ECA2, levanta-se um obstáculo: esta enzima trata-se fundamentalmente de uma enzima tecidual, encontrando-se em quantidades reduzidas na circulação. Os seus níveis passam a ser detetáveis apenas quando a sua porção catalítica extracelular é clivada e libertada para a circulação. Desta forma, medições dos níveis circulantes de ECA2 poderão ser marcadores cardiovasculares associados a patologias que promovam a sua libertação.

Em estados patológicos, incluindo complicações vasculares, os seus níveis aparentam encontrar-se aumentados, o que sugere um potencial na sua utilização como marcador cardiovascular.¹⁰

Ainda assim, permanecem por responder questões referentes ao significado dos níveis circulantes de ECA2. Serão estes indicadores de bom ou mau prognóstico? Serão estes os reflexos de um processo patológico subjacente ou o reflexo da ativação de mecanismos protetores?

Apesar de os níveis de ECA2 se encontrarem aumentados em algumas doenças crónicas, como mecanismo de compensatório para atenuar os níveis elevados de Ang II responsáveis por tais doenças, em fases terminais das patologias verifica-se uma deficiência relativa dos níveis de ECA2.¹⁰ Desta forma, a sua avaliação e utilização como marcador torna-se controversa e bastante mais complexa.

Tendo entrado em ensaios clínicos em 2009, a informação acerca da ECA2 é ainda discrepante e a sua utilização na prática clínica corrente encontra-se relativamente distante. A investigação em humanos é escassa; contudo, considerando a vasta literatura re-

ferente a estudos não clínicos com ECA2, o seu potencial terapêutico é considerável e é grande a probabilidade que se venha a tornar um importante agente e alvo terapêutico nos próximos anos.

Procurou-se com este artigo efetuar uma revisão dos principais mecanismos e potencialidades associados à ECA2, bem como do seu papel ativo na eficácia das terapias atualmente empregues para controlo da hipertensão. Efetuou-se ainda um levantamento dos potenciais futuros fármacos atualmente em investigação e das observações resultantes dos últimos estudos efetuados.

ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA E ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA TIPO 2 – UM EQUILÍBRIO DINÂMICO

A Ang II é o principal péptido vasoativo do SRA, exercendo várias funções vasoconstritoras através dos seus recetores AT1. A inibição da sua formação e o bloqueio dos recetores têm sido as terapias de primeira linha no controlo da hipertensão.⁸

A ECA2 apresenta-se como um potencial alvo terapêutico e, apesar da sua similaridade com a ECA, não promove a formação de Ang II (Ang 1-8), nem é comprometida pelos inibidores da ECA.^{8,11}

Apesar de poder atuar no mesmo substrato (a Ang I), os substratos e produtos predominantemente formados pela ECA2 são outros, nomeadamente o péptido Ang 1-9, a partir da Ang I, e o péptido Ang 1-7, a partir da Ang II.^{6,7}

A formação de Ang II (Ang 1-8) inicia-se com a formação de Ang I (Ang 1-10) a partir do angiotensinogénico, pela ação da renina. A Ang I é posteriormente clivada em Ang II, Ang 1-7 ou Ang 1-9, dependendo da ação enzimática. Uma vez formadas, a Ang II e a Ang 1-9 podem ainda ser hidrolisadas a Ang 1-7.^{8,9}

Desta forma, imediatamente se observa que o bloqueio da cinética das reações em qualquer ponto (como o bloqueio da conversão de Ang I a Ang II) do sistema, irá influenciar a cinética das restantes reações. O bloqueio da formação da Ang II e do seu recetor AT1 promove ou redirecionamento do sistema, no sentido da formação de Ang 1-7, o qual promove a formação de ECA2.^{8,9,12}

A Ang II liga-se aos recetores AT1 e estimula as vias de sinalização da cinase MAP e de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). Além disto, atenua ainda a expressão de ECA2. A ECA2 consiste numa proteína transmembranar e a sua porção extracelular catalítica converte a Ang II a Ang 1-7. A Ang 1-7 liga-se aos recetores MAS, que dimerizam com os recetores AT2 e antagonizam as ações da Ang II, através da ativação de fosfatases, síntese de NO e cGMP.⁹

Em condições patológicas a ECA2 é hidrolizada da membrana celular, os níveis de Ang II aumentam e os de Ang 1-7 diminuem.⁹

O recetor ativado pela Ang 1-7, recetor MAS acoplado à proteína G, exhibe reduzida afinidade para a Ang II mas medeia uma variedade de ações da Ang 1-7.¹³

Várias espécies animais expressam anticorpos que reconhecem o recetor MAS, o que tem possibilitado e facilitado os estudos da sua expressão, distribuição e manipulação. Em acréscimo, existem atualmente desenvolvidos alguns agonistas (AVE9971) e antagonistas (A779 e D-Pro7- Ang 1-7) do recetor MAS, o que tem possibilitado estudos da atividade da ECA2.¹³

A Ang II promove, predominantemente a partir do receptor AT1, as seguintes funções: vasoconstrição, hipertrofia, fibrose, proliferação, ativação de metaloproteinases de matriz (MMP), ativação da oxidase NADPH, inflamação, secreção de aldosterona e da glândula pituitária e produção de matriz extracelular.^{8,9}

Em contrapartida, a maioria dos efeitos da Ang 1-7 são opostos aos da Ang II. A Ang 1-7, formada pela ACE2, exerce ações de aumento do NO e prostaglandinas, vasodilatação, proteção vascular, ações anti-fibróticas, anti-proliferativas e anti-inflamatórias.^{8,9}

A infusão aguda de Ang 1-7 aumenta também a taxa de filtração glomerular, através da dilatação da artéria aferente renal, diminuindo o volume sanguíneo e consequentemente a pressão arterial.¹³

Esta vasodilatação é dependente da formação de NO, através da estimulação e fosforilação da eNOS (sintetase do óxido nítrico endotelial). Em simultâneo, verifica-se uma diminuição da atividade da oxidase NADPH e o aumento da produção de prostaglandinas, o que, juntamente com a atividade da eNOS, contribui para diminuir o stress oxidativo.¹³

A ECA2 tem uma afinidade para hidrolizar a Ang II 400 vezes superior à afinidade de hidrólise de Ang I, sendo que a última apenas ocorre significativamente

em estados de Ang I aumentada, como em pacientes com terapia inibidora da ECA, o que demonstra uma ação, ainda que parcial, da ECA2 no sucesso das terapias atualmente existentes.¹²

Os principais locais de expressão da ECA2 foram originalmente descritos como o coração, rins e testículos e posteriormente a distribuição foi alargada para o fígado, pulmão e intestinos.^{7,14} Em detrimento de uma expressão constitutiva de ECA2, a sua produção aparenta ser desencadeada como resposta a situações de stress local e da sua inibição resulta um aumento de MMP, de produção de radicais livres e de citocinas pró-inflamatórias, que levam em parte a um aumento da remodelação tecidual e disfunção locais, mas ativam simultaneamente a formação de mediadores compensadores, como a ECA2.⁸

A ECA2 apresenta uma posição estratégica a nível da membrana celular, apresentando-se na membrana apical, exposta a péptidos vasoativos circulantes.¹⁵ Dos três domínios que constituem a proteína (citossólico, transmembranar e extracelular) é o domínio extracelular que exerce a atividade catalítica enzimática responsável pelo controlo do SRA.¹⁰

A ECA2 tem um papel fundamental na regulação da pressão sanguínea, reduzindo a pressão arterial. Esta redução é demonstrada em modelos hipertensos mas não em normotensos¹⁶ e tal discrepância poderá dever-se ao aumento da sensibilidade do reflexo barorreceptor que se encontra diminuído apenas em indivíduos hipertensos, refletindo o papel da ECA2 a nível central.¹⁷ De facto, tem sido discutido este papel da ECA2 a nível cerebral, nomeadamente o seu envolvimento na regulação central da hipertensão.¹⁸

A regulação central a pressão sanguínea pela Ang II ocorre pela dessensibilização do reflexo barorreceptor, aumento do consumo de água, da vasopressina e da estimulação simpática. A ECA2 promove a formação de metabolitos com ações opostas e os seus níveis encontram-se aumentados (até 40%) em modelos hipertensos, na tentativa de atenuar a hipertensão.¹⁶

Para tal, a expressão aumentada de ECA2 no cérebro atenua a hipertensão arterial pela via de formação do NO e através de melhorias na sensibilidade do reflexo barorreceptor.⁸

Determinados componentes do SRA têm sido identificados em múltiplas áreas cerebrais e envolvidos na regulação da pressão sanguínea, nomeadamente os

núcleos paraventricular, subfornical, medula rostral ventrolateral, área postrema e núcleo do trato solitário.³ Vários estudos defendem um papel do núcleo paraventricular na regulação da pressão arterial. A injeção de Ang II neste núcleo, causa o aumento da pressão arterial e a sua ablação atenua o desenvolvimento de hipertensão. O aumento dos níveis de componentes com ações protetoras vasculares, nomeadamente a ECA2, na medula rostral ventrolateral causa uma também a diminuição da pressão arterial.³

Estes resultados provêm de estudos em que se utilizaram vetores lentivirais com células geneticamente modificadas e não terapias farmacológicas para alcançar tais resultados.

Sabe-se que em pacientes humanos hipertensos, os níveis de ECA2 se encontram diminuídos a nível renal e cardíaco. Esta diminuição deverá ser consequência dos efeitos crónicos da Ang II nos recetores AT1 e a administração de antagonistas dos recetores AT1 causa o aumento dos níveis de ECA2. Este aumento deverá-se ao acumular de Ang II em consequência dos inibidores, a qual é convertida em Ang 1-7 pela ECA2, que por sua vez promove a formação de mais ECA2.⁸

Considerando os fatores de risco cardiovascular classicamente descritos, sabe-se que a aldosterona e a endotelina-1 aparentam também reduzir os níveis de ECA2, pelo menos em células musculares cardíacas,¹⁹ e que a terapia de reposição hormonal com estrogéneos tem demonstrado benefícios cardiovasculares através dos aumentos registados de ACE2.²⁰

Além do referido, dietas com elevado teor de gordura têm também sido associadas a um aumento da expressão de ECA2²¹, o qual poderá, uma vez mais, representar um mecanismo de compensação dos efeitos nefastos de tais fatores de risco.

OBSERVAÇÕES DOS ÚLTIMOS AVANÇOS NA INVESTIGAÇÃO

Em estudos não clínicos, a administração de ECA2 recombinante humana tem sido capaz de reverter a hipertensão associada a níveis elevados de Ang II. Esta diminuição na pressão arterial poderá ser devida quer à degradação de Ang II, quer ao aumento de Ang 1-7.²²

Curiosamente, a administração de Ang 1-7 não é eficaz em reduzir a pressão arterial, apesar dos conhe-

cidos efeitos protetores e vasodilatadores exibidos por este péptido. A redução na pressão arterial esperada para este péptido será, segundo alguns autores, contrabalançada pelo aumento do *output* cardíaco que a Ang 1-7 desencadeia.²² Ainda assim, este aumento do *output* cardíaco verificado com a Ang 1-7, associado ao seu potencial em diminuir a fibrose e remodelação do miocárdio, poderá ainda vir a demonstrar-se terapeuticamente útil para alguns pacientes.^{23,24}

Num estudo realizado para avaliar os efeitos da sobre-expressão de ACE2 a nível hipotalâmico, através da sua administração recorrendo a vetores virais,³ a infusão crónica de Ang II aumentou significativamente a pressão arterial média e reduziu a expressão de ECA2, aumentou a atividade da mesma e diminuiu a expressão de AT1, reduzindo assim a hipertensão mediada pela Ang II, aumentou significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, atenuando a expressão de ECA2, e resultou num aumento de agentes anti-hipertensores (ECA2, recetores MAS e AT2). Os resultados foram consistentes com estudos prévios e demonstram a importância da ECA2 a nível central nos núcleos da regulação cardiovascular e as implicações do SRA no desenvolvimento da hipertensão a nível central.

Nos últimos anos, a diminuição da pressão arterial sanguínea através do aumento dos níveis de ECA2 a nível central tem sido alvo de estudos que apresentam resultados consideráveis.^{16,25} Acrescentando aos resultados do estudo anteriormente referido, foi também demonstrado que esta sobre-expressão de ECA2 é apenas eficaz em reduzir a pressão arterial em indivíduos hipertensos, mas não em normotensos.²⁶

Uma série de outros estudos tem demonstrado evidências de que a hipertensão se trata de uma doença crónica inflamatória. Os resultados do estudo acima referido, demonstrando o aumento de mediadores inflamatórios pela Ang II e a diminuição destes pela ECA2, apoiam esta génese para a hipertensão arterial.

Uma das mais promissoras expectativas da utilização terapêutica de ECA2 prende-se com a possibilidade de terapêuticas dirigidas. O uso a longo prazo de ECA2 recombinante tem sido estudado com a utilização de sistemas de administração virais, produzindo os efeitos desejados a nível local e apresentando ausência de efeitos indesejados sistémicos.

Para além do mais, com a capacidade de transformar a Ang II em Ang 1-7, a sua administração através

de vetores adenovirais em modelos com fibrose hepática foi capaz de reduzir a fibrose, diminuir os níveis de marcadores pró-fibróticos, de Ang II, de oxidase NADPH e de stress oxidativo.²⁷ Como resultado, verificou-se um aumento significativo dos níveis de Ang 1-7 e a normalização do tónus muscular da vasculatura intra-hepática.²⁷

É também bem conhecido o papel da Ang II no processo de disfunção endotelial, assim como o papel da ECA2 em converter a Ang II a Ang 1-7. É assim possível deduzir que tratamentos que promovam a ação da ECA2 poderão estimular a reparação e função endoteliais. Para testar tal suposição, modificaram-se geneticamente células estaminais mesênquimais para sobre-expressar ECA2 através da administração de um gene com recurso a um vetor lentiviral.²⁸ Descobriu-se que a eficiência de transdução do vetor lentiviral atinge os 97.8% e que as células apresentam altos níveis de expressão e secreção para o meio de ECA2 biologicamente ativa.²⁸

Os níveis de Ang II foram reduzidos e os de Ang 1-7 aumentados, tendo as células geneticamente modificadas sido eficazes em restaurar a função endotelial. As células endoteliais da vasculatura apresentaram uma sobrevivência aumentada e alterações positivas nos níveis de mediadores inflamatórios, incluindo ICAM-1, VCAM-1, TNF- α , IL-6, permeabilidade paracelular e caderinas.²⁸ Estes resultados demonstram que a sobre-expressão local de ECA2, em estados de disfunção endotelial, será uma opção viável.

Em paralelo, com a documentação do papel da Ang II na sua redução e disfunção, bem como da capacidade dos inibidores da ECA em prevenir estes efeitos, a ECA2 tem assumido um papel de potencial agente terapêutico no combate à hipertensão e restantes condições vasculares.

Uma série de estudos tem demonstrado os benefícios do aumento da expressão de ECA2 em diferentes tipos de células, substratos moleculares e patologias cardiovasculares. Nos últimos anos, as células progenitoras endoteliais (CPE) emergiram como um elo fundamental na manutenção da homeostasia e regeneração endoteliais. Uma equipa de investigadores recentemente realizou uma série de testes que, não só confirmaram os resultados de estudos anteriores, como também demonstraram que as melhorias na função

endotelial resultantes da sobre-expressão de ECA2 são mediadas por benefícios ao nível das CPE.¹¹

Do aumento da expressão da ECA2, numa primeira fase, resultou um aumento da capacidade de migração e formação vascular por parte das CPE.¹¹ Os resultados do estudo em causa apoiam a crença de que a ECA2 contraria os efeitos da Ang II nas CPE e que as alterações de ECA2 refletem sobretudo elevações de Ang 1-7 e redução dos níveis de Ang II.

Estes dados aparentam englobar outros tipos celulares, nomeadamente miócitos e fibroblastos, os quais apresentaram também reduções de Ang II e aumento Ang 1-7 resultantes do aumento de ECA2.²⁹

O SRA modula a atividade das CPE através da produção de NO e ROS. Da sobre-expressão de ECA2, resultou uma diminuição da oxidase NADPH (diminuindo a produção de ROS) e um aumento da expressão de eNOS (aumentando a produção de NO).¹¹

Os investigadores sabiam também que a expressão elevada de ECA2 poderia atenuar a libertação de mediadores inflamatórios induzidos pela ECA e que fibroblastos cardíacos expostos ao vetor lentiviral com o gene ECA2 apresentam uma atenuação da produção de colagénio e citocinas inflamatórias induzidas pela hipóxia.³⁰

Para confirmar estes resultados, foram realizados testes *in vivo*, avaliando a eficácia da administração de CPE geneticamente modificadas para expressar quantidades superiores de ECA2, em modelos de acidente vascular cerebral isquémico. Os resultados sugerem um aumento do recrutamento de CPE na zona peri-infarto, atenuando os danos cerebrais, diminuindo o volume de infarto e melhorando os défices neurológicos.¹¹

A infusão deste tipo de CPE demonstrou ainda promover a angiogénese, a qual se deverá, segundo os autores, à atividade da ECA2 em catalisar a transformação de Ang II em Ang 1-7.¹¹

Permanecem ainda duas questões resultantes destes estudos: se as CPE se integram fisicamente na vasculatura ou exercem os seus efeitos de forma parácrina e se os resultados positivos da sobre-expressão de ECA2 através da terapia celular podem ser replicados em humanos.

Considerando o papel do sexo de um indivíduo no risco CV, sabe-se o gene codificador da ECA2 se localiza no cromossoma X e a literatura sugere existirem diferenças entre sexos, apresentando indivíduos

do sexo feminino atividade significativamente inferior da ECA2.³¹ Tendo já sido demonstrados os efeitos protetores do estrogéneo (pela diminuição da expressão de AT1 e Ang II) e o facto de os níveis de ECA2 por vezes aumentarem como mecanismo compensador dos altos níveis de Ang II⁹, compreende-se que diferenças entre sexos se possam dever ao facto de as mulheres se encontrarem mais protegidas pelo estrogéneo e, como tal, apresentem menores níveis de ECA2 circulantes (pela reduzida necessidade de atenuar os efeitos da Ang II).

Se as diferenças verificadas se traduzem em diferenças no risco cardiovascular, são o reflexo de um mecanismo compensador de patologias subjacentes ou não possuem qualquer relevância clínica, permanece ainda uma questão por dar resposta.

EFEITOS E HORIZONTES DAS TERAPIAS FARMACOLÓGICAS

A inibição do SRA constitui a terapia de primeira linha anti-hipertensora e cardioprotetora. Os agentes farmacológicos empregues nesta inibição mais utilizados são os inibidores da ECA, inibidores da renina, antagonistas do recetor mineralocorticoide (RM) e do recetor da angiotensina, os β -bloqueadores e os antagonistas da aldosterona.³²

Apesar dos efeitos hipertensores da ECA, Ang II, recetores AT1, aldosterona e RM, o SRA é também constituído por agentes protetores, nomeadamente os recetores AT2 da angiotensina e os recetores MAS da Ang 1-7.^{5,9}

As terapias medicamentosas atualmente utilizadas no controlo da hipertensão arterial, anteriormente referidas, para além dos efeitos diretos nos alvos terapêuticos inicialmente pretendidos, exercem efeitos indiretos mediados pela ECA2, nomeadamente o aumento da formação do péptido vasodilatador e protetor vascular Ang 1-7 que resulta da utilização da utilização de inibidores da ECA ou de antagonista dos recetores AT1.⁹ De facto, da sua utilização resulta um acumular de Ang II ou Ang I, respetivamente. Consequentemente, apesar da inferior afinidade da ECA2 para estes substratos (comparativamente com a ECA), a sua acumulação resulta num aumento da catalização por parte da ECA2 e respetiva conversão em Ang 1-9 e Ang 1-7.⁸

Desta forma se verifica que as terapias farmacológicas existentes se encontram atualmente a usufruir dos benefícios da ECA2, ainda que por mecanismos não inicialmente considerados e que da exploração e otimização destas mesmas terapias, contemplando a ECA2, poderão resultar benefícios terapêuticos inesperados.

Ainda assim, considerando as potencialidades terapêuticas da ECA2, é justificável procurar desenvolver terapias com a ECA2 e o recetor MAS como alvos terapêuticos primários.

Considerando a *pipeline* da indústria farmacêutica descrita em relatórios da PhRMA publicados em 2015 e a base de dados de ensaios clínicos disponível em *clinicaltrials.gov*, listam-se 17 compostos em desenvolvimento para o tratamento da hipertensão, sendo 2 indicados para tratamento de pré-eclampsia, 2 já aprovados na população pediátrica e 6 referentes a combinações de medicamentos já existentes, deixando apenas 7 medicamentos com potencial de vir a representar verdadeiras inovações terapêuticas no tratamento de hipertensão arterial.^{4,33}

Como análogos da Ang 1-7, encontram-se em estudo o ‘*NorLeu-Ang 1-7*’, o ‘*CGEN-856*’ e o cíclico ‘*Pan-Cyte*’. O análogo ‘*CGEN-856*’ apresenta em modelos hipertensos a capacidade de dilatação aórtica, redução de arritmias e da pressão sanguínea.³⁴ Os outros 2 péptidos, sabe-se apenas terem sido testados em condições de hipertensão e outras patologias pulmonares.

O encapsulamento de péptidos Ang 1-7 tem ainda demonstrado aumentar a sua biodisponibilidade oral e permitido reduções na pressão sanguínea, frequência cardíaca e hipertrofia do miocárdio, sendo esperada para breve a entrada de péptidos Ang 1-7 encapsulados em fases de desenvolvimento clínico.³⁵ Os dados para o único agonista não-péptido do recetor MAS, ‘*AVE-0991*’, são bastante promissores, apresentando efeitos na redução da pressão arterial bem como efeitos protetores a nível renal.³⁶

A terapia farmacológica mais viável, contudo, passará pela estimulação da ECA2 endógena, a qual alcança em simultâneo uma diminuição dos níveis de Ang II. A estimulação da ECA2 endógena, pelo ativador ‘*XNT*’, demonstrou ser eficaz em prevenir a acumulação de hidroxiprolina a nível renal e cardíaco, em prevenir o remodelamento vascular pulmonar, hipertrofia cardíaca e fibrose induzida pela hipertensão arterial.⁴

Finalmente, a *Apeiron Biologics* apresentou o ‘*APN01*’, uma ECA2 recombinante, tendo este alcançado a fase I do desenvolvimento clínico e demonstrado redução nos níveis de Ang II e aumento de Ang 1-7.³⁷

Uma ressalva referente às terapias futuras deve contudo ser feita. Talvez surpreendentemente, as terapias apoiadas na utilização de células geneticamente modificadas para expressar níveis superiores de ECA2 encontram-se mais avançadas do que as terapias farmacológicas, o que contrasta com todos os restantes fármacos com ação no SRA, que são terapia de primeira linha.

A terapia farmacológica objetivando a ECA2 poderá trazer benefícios acrescentados às terapias atualmente existentes. A terapia celular, por sua vez, apresenta vantagens clínicas significativas. Contudo, o custo da mesma será certamente considerável.

Demonstrar uma vantagem farmaco-económica que se traduza numa relação benefício-custo positiva, será o último obstáculo a ultrapassar para a utilização de terapias para o controlo da hipertensão com foco na ECA2.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Existe ainda um desconhecimento substancial em relação à hipertensão arterial e o número de moléculas inovadoras em investigação é escasso. Mesmo para anti-hipertensores já estabelecidos no mercado, o conhecimento dos seus mecanismos de ação não é total.

A descoberta de mediadores moleculares entre o SRA com ações protetoras a nível cardiovascular, acrescentou uma outra dimensão ao conhecimento acerca deste sistema e do seu contributo para o desenvolvimento da hipertensão arterial. Com esta descoberta, surgiu o reconhecimento das interações entre estes mediadores e as terapias farmacológicas atualmente existentes, particularmente o seu papel no relativo sucesso destas terapias.

A administração de ECA2 recombinante, a utilização experimental dos seus agonistas e antagonistas e a sua administração através de sistemas virais demonstra resultados bastante promissores, os quais vão para além da diminuição da pressão arterial sanguínea.

Ainda assim, apesar do reconhecimento da ECA2 e dos seus efeitos a nível do sistema cardiovascular,

a sua importância para o surgimento e desenvolvimento da hipertensão não se encontra ainda bem estabelecida, nem a sua significância como marcador, limitações que são o reflexo da sua versatilidade.

A investigação sugere a participação da ECA2 numa vasta constelação de processos e funções metabólicas, mas revela também que as suas ações variam consoante o local de atuação e consoante o mecanismo que promova ou iniba a sua expressão. De facto, quer o seu papel a nível renal, cardíaco, vascular ou central terá uma importância e contributo relativo para a manutenção da pressão arterial e não se sabe ainda em que medida a sua desregulação local afeta todos os outros SRA locais.

Tendo em consideração as evidências respeitantes aos benefícios do aumento da relação ECA2 / ECA, é ainda necessário averiguar níveis ótimos e seguros para este *ratio* bem como quais as melhores alternativas terapêuticas para o alcançar.

Para se retirar o máximo partido deste conhecimento, será necessário desvendar os mecanismos de ação local desta enzima, de que forma o seu comprometimento local afeta o sistema na sua totalidade e o desenvolvimento de sistemas de administração dirigidos para utilização na prática clínica corrente.

O desenvolvimento de terapias baseadas em células geneticamente modificadas aparenta ser o mais promissor, em virtude da sua especificidade. Num sistema ideal, seria possível a replicação viral *in vivo* de uma forma controlada, tirando partido da especificidade viral a nível endotelial ou central e contornando a necessidade de múltiplas administrações farmacológicas.

Não quer isto dizer que as terapias farmacológicas não venham a ocupar o seu lugar de destaque, existindo já moléculas experimentais com ações bem definidas sob a ECA2 apresentando resultados promissores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mancia, G., Fagard R., Narkiewicz, K., *et al.* 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* **31**, 1281–357 (2013).
- Redon, J., Olsen, M., Cooper, R., *et al.* Stroke mortality and trends from 1990 to 2006 in 39 countries from Europe and Central Asia: implications for control of high blood pressure. *Eur. Heart J.* **32**, 1424–31 (2011).
- Sriramula, S., Cardinale, J. P., Lazartigues, E. *et al.* ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc. Res.* **92**, 401–8 (2011).
- Paulis, L., Rajkovicova, R., Simko, F. New developments in the pharmacological treatment of hypertension: dead-end or a glimmer at the horizon? *Curr. Hypertens. Rep.* **17**, 557 (2015).
- Unger, T., Steckelings, U. M., dos Santos, R. A. S. *The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS). The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS)* (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-801364-9.09989-2
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., *et al.* A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ. Res.* **87**, e1–e9 (2000).
- Tipnis, S. R., Hooper, N., Hyde, R., *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33238–43 (2000).
- Clarke, N. E., Turner, A. J. Angiotensin-converting enzyme 2: The first decade. *Int. J. Hypertens.* **2012**, (2012).
- Chappell, M. C., Marshall, A. C., Alzayadneh, E. M., *et al.* Update on the Angiotensin converting enzyme 2-Angiotensin (1-7)-MAS receptor axis: fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 201 (2014).
- Wysocki, J., Baille, D. Reduced plasma ACE2 activity in dialysis patients: another piece in the conundrum of factors involved in hypertension and cardiovascular morbidity? *Nephrol. Dial. Transplant* **28**, 2200–2 (2013).
- Chen, J., Xiao, X., Chen, S., *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 priming enhances the function of endothelial progenitor cells and their therapeutic efficacy. *Hypertension* **61**, 681–9 (2013).
- Ferrario, C. M., Jessup, J., Chappell, M., *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* **111**, 2605–10 (2005).
- Chappell, M. C. *Comprehensive Physiology. Comprehensive Physiology* **2**, (John Wiley & Sons, Inc., 2012).
- Hamming, I., Timens W., Bulthuis, M., *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* **203**, 631–7 (2004).
- Warner, F. J., Lew, R., Smith, A., *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 39353–62 (2005).
- Yamazato, M., Yamazato, Y., Sun, C., *et al.* Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **49**, 926–931 (2007).
- Yamazato, M., Ferreira, A., Yamazato Y., *et al.* Gene transfer of angiotensin-converting enzyme 2 in the nucleus tractus solitarius improves baroreceptor heart rate reflex in spontaneously hypertensive rats. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* **12**, 456–61 (2011).
- Xu, P., Sriramula, S., Lazartigues, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R804–17 (2011).
- Gallagher, P. E., Ferrario, C. M., Tallant, E. A. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H2373–9 (2008).
- Shenoy, V., Grobe, J., Qi, Y., *et al.* 17beta-Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides* **30**, 2309–15 (2009).
- Gupte, M., Boustany-kari, C., Bharadwaj, K., *et al.* ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R781–8 (2008).
- Wysocki, J., Ye, M., Rodriguez, E., *et al.* Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* **55**, 90–8 (2010).

23. Hernández Prada, J. A., Ferreira, A., Katovich, M., *et al.* Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension* **51**, 1312–7 (2008).
24. Huentelman, M. J., Grobe, J., Vazquez, J., *et al.* Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp. Physiol.* **90**, 783–90 (2005).
25. Feng, Y., Yue, X., Xia, H., *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in the subfornical organ prevents the angiotensin II-mediated pressor and drinking responses and is associated with angiotensin II type 1 receptor downregulation. *Circ. Res.* **102**, 729–36 (2008).
26. Feng, Y., Xia, H., Cai, Y., *et al.* Brain-selective overexpression of human Angiotensin-converting enzyme type 2 attenuates neurogenic hypertension. *Circ. Res.* **106**, 373–82 (2010).
27. Mak, K. Y., Chin R., Cunningham, S., *et al.* ACE2 therapy using adeno-associated viral vector inhibits liver fibrosis in mice. *Mol. Ther.* (2015). doi:10.1038/mt.2015.92
28. He, H., Liu, L., Chen, Q., *et al.* MSCs modified with ACE2 restore endothelial function following LPS challenge by inhibiting the activation of RAS. *J. Cell. Physiol.* **230**, 691–701 (2015).
29. Dong, B., Yu, Q., Dai, H., *et al.* Angiotensin-converting enzyme-2 overexpression improves left ventricular remodeling and function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 739–47 (2012).
30. Grobe, J. L., Der Sarkissian, S., Stewart J., *et al.* ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin. Sci. (Lond)*. **113**, 357–64 (2007).
31. Roberts, M. A., Velkoska, E., Ierino, F. L., *et al.* M. Angiotensin-converting enzyme 2 activity in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant* **28**, 2287–94 (2013).
32. Unger, T., Paulis, L., Sica, D. A. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *Eur. Heart J.* **32**, 2739–47 (2011).
33. PhRMA. The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA). 2013 Report: Medicines in Development for Heart Disease and Stroke. In: Medicines in Development. PhRMA. (2015). at <http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/Heart>
34. Savergnini, S. Q., Beiman, M., Lautner, R., *et al.* Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the mas receptor. *Hypertension* **56**, 112–120 (2010).
35. Bertagnolli, M., Casali, K., De Sousa, F., *et al.* An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* **51**, 65–73 (2014).
36. Barroso, L. C., Silveira, K., Lima, C., *et al.* Renoprotective Effects of AVE0991, a Nonpeptide Mas Receptor Agonist, in Experimental Acute Renal Injury. *Int. J. Hypertens.* **2012**, 808726 (2012).
37. Haschke, M., Schuster, M., Poglitsch, M., *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in healthy human subjects. *Clin. Pharmacokinet.* **52**, 783–92 (2013).

MICROPARTICLES AND A NEW CARDIOVASCULAR CONTINUUM – MICROPARTICLES' TRANSVERSALITY IN CARDIOVASCULAR DISEASES

MICROPARTÍCULAS E UM NOVO CONTINUUM CARDIOVASCULAR – TRANSVERSALIDADE DAS MICROPARTÍCULAS NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Paulo André Dias Bastos¹

ABSTRACT

Membrane microparticles are produced and released from virtually all cell types. Playing an active role in physiological processes such as apoptosis, proliferation, coagulation, endothelial dysfunction, angiogenesis, and cellular communication, microparticles have emerged as a likely mediator mediator of several diseases. Literature suggests microparticles as a biomarker strongly predictive of cardiovascular risk and shows its active role on these fundamental metabolic processes' deregulation. In this review, it's hypothesized a cardiovascular continuum in which microparticles are both a cause and a consequence of various diseases. The processes affected by microparticles and how these processes are compromised are still discussed, as well as the implications and therapeutic potentials of such deregulation.

Keywords: 'microparticles', 'cardiovascular', 'endothelial microparticles', 'hypertension'

RESUMO

As micropartículas membranares são produzidas e libertadas por virtualmente todos os tipos de células. Exercendo um papel ativo em processos fisiológicos como a apoptose, proliferação, coagulação, disfunção endotelial, angiogénese e comunicação celular, as micropartículas têm surgido como um provável mediador responsável pelo desenvolvimento de uma vasta constelação de patologias, nomeadamente as cardiovasculares. A literatura sugere as micropartículas como um biomarcador fortemente preditor do risco cardiovascular e demonstra um papel ativo por parte destas na desregulação de processos metabólicos fundamentais. Nesta revisão, hipotetiza-se um continuum cardiovascular em que as micropartículas são tanto uma causa como uma consequência de várias doenças. São ainda discutidos os processos afetados pelas micropartículas e de que forma estes se encontram comprometidos, bem como as implicações e potenciais terapêuticos de tal desregulação.

Termos-chave: 'micropartículas', 'cardiovascular', 'micropartículas endoteliais', 'hipertensão'

¹ Secção Autónoma de Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro, Portugal.
Correspondence e-mail: pauloandrediasbastos@ua.pt.

INTRODUÇÃO

Os mecanismos responsáveis pelo desencadear da hipertensão arterial essencial (HTA) são ainda controversos. Reconhece-se, contudo, o facto de diversos fatores associados à HTA culminarem também na disfunção endotelial (DE), caracterizada pelo comprometimento dos processos de proliferação, inflamação, apoptose, diferenciação, migração, sobrevivência e comunicação celulares. Neste sentido, a DE apresenta-se como um provável candidato etiológico da HTA.¹

Fortemente associada ao surgimento de HTA, a DE resulta de um desequilíbrio entre diversos mediadores vasoconstritores, vasodilatadores, ativadores, inibidores, inflamatórios e coagulantes, resultando nas alterações dos processos acima referidos.^{1,2} Os níveis de tais mediadores e de micropartículas (MP) apresentam forte correlação, tendo já o papel das MP sido descrito no desenvolvimento de uma diversa constelação de patologias, nomeadamente as vasculares.³

Inúmeros estudos têm demonstrado a libertação de MP por células ativadas e apoptóticas em pacientes humanos com patologias cardiovasculares (CV).^{4,5} De destaque, encontra-se a relação entre diversos tipos de MP (incluindo as endoteliais, plaquetárias e eritrocitárias) e alterações do tônus vascular, comprometimento do relaxamento da musculatura lisa vascular, diminuição do óxido nítrico (NO) e aumento do stress oxidativo.¹ Desta forma, é possível hipotetizar um continuum CV iniciado com alterações ao nível das MP, propagado pela DE e culminando na HTA, a qual a longo prazo danifica as paredes arteriais e possivelmente promove a libertação de mais MP e perpetuação do ciclo.

As MP têm sido propostas como novos alvos terapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares, em virtude da sua capacidade de promoção da coagulação e da inflamação⁶, e como novos agentes terapêuticos, em virtude da sua capacidade seletiva de indução proteica de interesse e controlo de processos fundamentais.⁷

Nesta revisão procurou-se elucidar tal continuum CV, que tem sido de diversas formas descrito na literatura e demonstrar o papel das MP numa vasta constelação de outras doenças CV.

CARATERIZAÇÃO E MÉTODOS DE ANÁLISE

As MP referem-se a vesículas de diâmetro igual a 0.1 nm até 1 µm, derivadas de invaginações externas da membrana plasmática, e libertadas por vários tipos de células durante stress físico e químico e por ativação de determinados agentes.^{1,3,4} Contudo, são distintas de exossomas e de corpos apoptóticos. Exossomas são formados pela invaginação interna na membrana celular, apresentam dimensões inferiores (0 a 100 nm) e apresentam capacidade de fusão com lisossomas.^{8,9} Os corpos apoptóticos apresentam dimensões superiores (1 a 5 µm) e são formados exclusivamente nos estágios finais da apoptose.^{8,10}

Dependendo da sua origem e do estímulo e mecanismo de formação, as MP exercem diferentes efeitos biológicos, consoante a sua composição proteica e lipídica variável. A sua composição, contudo, difere entre pacientes saudáveis e pacientes CV, o que poderá tornar vantajosa a sua análise.^{1,4}

As MP representam um potencial biomarcador da DE, coagulação, inflamação e apoptose, entre outros processos patológicos, sendo as MP endoteliais, eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias as que se apresentam como de maior relevância clínica.^{1,8} De facto, as medições do número de MP endoteliais têm representado uma potencial ferramenta de diagnóstico, demonstrando capacidade de prever *outcomes* clínicos, nomeadamente a morte e as readmissões hospitalares.^{11,12}

Esta análise de MP poderá passar a fazer parte da prática corrente de diagnóstico laboratorial de doenças vasculares. Contudo, atualmente, as correlações clínicas são ainda limitadas pela falta de padronização dos métodos praticados.⁶

Até à data, as suas medições são realizadas maioritariamente do plasma sanguíneo.¹³ Contudo, em condições patológicas as MP podem também ser encontradas em níveis mais elevados na urina, secreções pulmonares, fluido sinovial, peritoneal e saliva.⁸ Não surpreendentemente, as MP são também encontradas em altos níveis nas placas ateroscleróticas.^{6,8}

O método mais comum para caracterizar as MP consiste na citometria de fluxo, baseada nas propriedades de dispersão diferencial da luz. Esta técnica permite não só a sua quantificação, mas também a determina-

ção da origem, com recurso à utilização de anticorpos marcados com fluorescência.^{4,6,8}

A citometria de fluxo em conjugação com a marcação imunológica, para além das vantagens de eficácia que apresenta, é também o método mais rápido e de custos mais reduzidos. Em contrapartida, algumas subpopulações de MP poderão não ser detetadas devido às reduzidas dimensões e relativamente elevados limites de deteção e em virtude da incorreta manipulação e centrifugação pré-analíticas.^{4,6,8}

No futuro, outros testes que apesar de apresentarem limitações mais relevantes, terão certamente o seu lugar, nomeadamente na investigação. Compreendem estes testes os ensaios imunológicos e funcionais, a microscopia de força atômica e a análise por nano partículas.⁸

ESTÍMULOS DESENCADEADORES E FORMAÇÃO

A origem das MP engloba virtualmente todos os tipos celulares, tendo a sua formação sido observada em células endoteliais, plaquetárias, leucocitárias e da musculatura lisa vascular, eritrócitos, cardiomiócitos, podócitos, populações de células progenitoras e células malignas.^{8,14-16}

São atualmente reconhecidas duas vias para promoção da libertação das MP: a via da ativação celular e a via apoptótica.^{6,8}

A via de ativação celular centra-se fundamentalmente na ativação plaquetária pela trombina, o colagénio e o ADP, que medeiam o aumento do cálcio intracelular e a degradação das proteínas do citoesqueleto. Na via apoptótica, as caspases exercem um papel essencial, ativando a cinase associada à Rho, que causa a libertação das MP.^{4,6,8} Numa fase inicial, a dinâmica de polimerização dos filamentos de actina e o aumento dos níveis de cálcio intracelulares aparentam ser cruciais e da sua inibição, resulta a diminuição de formação de MP.^{4,8,17,18}

Outros mediadores essenciais, para além do cálcio, envolvidos no processo de formação e libertação das MP, são a cinase Rho, outras caspases e a transglutaminase.^{8,19,20}

A composição membranar das MP é altamente específica, apresentando fosfatidilserina e fosfatidileta-

inolamina nos folhetos internos da membrana e fosfatidilcolina e esfingomiéline nos folhetos externos.⁶

Durante a ativação celular e subsequente aumento do cálcio intracelular, as membranas plasmáticas modificam-se e a sua assimetria é comprometida. De seguida, a exposição de fosfatidilserina fornece uma superfície para a ligação de fatores de coagulação e o citoesqueleto é desarranjado, resultando na libertação de MP para a circulação.^{6,8,21}

Indivíduos com síndrome de Scott, uma condição caracterizada pela incapacidade de coagulação sanguínea e de externalizar a fosfatidilserina, apresentam reduções significativas da libertação de MP. Tal condição demonstra a importância da exposição de fosfatidilserina na libertação de MP.^{8,17,22}

Para além dos estímulos e células descritos, sabe-se também que os cardiomiócitos produzem MP em resposta a TNF- α , as células mesangiais em resposta a altos níveis de glicose e produtos de glicação avançada e as células musculares lisas da vasculatura em resposta ao ligando Fas.⁸

STRESS OXIDATIVO E FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

As MP endoteliais regulam o tónus vascular através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) e prostaciclina pelas células endoteliais. As células endoteliais, por sua vez, libertam MP quando expostas a stress oxidativo, o qual resulta da diminuição do NO.⁶ Desta forma, uma vez mais se verifica um ciclo vicioso no qual se perpetuam os efeitos nefastos das MP.

As MP regulam a produção de ROS, diminuindo o NO e aumentando a produção de mediadores como O₂⁻ e H₂O₂. A produção de ROS mediada pelas MP ocorre sobretudo a nível mitocondrial por ação da oxidase NADPH, xantina oxidase, ciclooxigenase e NOS (sintetase do NO).^{8,23,24} Tais evidências, apoiam o papel das MP endoteliais no desenvolvimento da DE.

Os mecanismos de formação de ROS mediados pelas MP diferem consoante o tipo e origem das MP, apresentando grande heterogeneidade. No entanto, na sua globalidade, as MP apresentam efeitos pró-oxidativos, promovendo a DE e a desregulação do tónus vascular.

INFLAMAÇÃO E FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

O reconhecimento da HTA como uma doença inflamatória tem-se tornado consensual nos últimos anos e sido objeto dos mais variados estudos. Contudo, o mecanismo inicial desencadeador da inflamação permanece desconhecido. As MP endoteliais poderão encontrar-se na gênese da HTA como uma doença inflamatória, em virtude do seu contributo para a produção endotelial de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Estímulos inflamatórios, por sua vez, estimulam a formação de mais MP, as quais promovem a contínua produção de mediadores inflamatórios e o recrutamento de células inflamatórias.²⁵

A formação de interleucinas e outros mediadores da resposta inflamatória em diferentes células é também desencadeada pelas MP, as quais promovem ainda a adesão de leucócitos a células endoteliais.^{8,24} Tem sido demonstrado o papel das MP em estimular a produção e libertação de IL-1 β , IL-6, CCL2, 'intercellular adhesion molecule' (ICAM)-1, 'vascular cell adhesion molecule' (VCAM)-1 e seletina-E, entre outros mediadores.¹ A adesão e recrutamento leucocitários são fenómenos chave no papel inflamatório da aterosclerose e as MP endoteliais têm demonstrado promover o seu recrutamento e de induzir um estado pró-inflamatório e pró-coagulante a nível endotelial.⁶ Juntamente com o stress mecânico causado pelo fluxo turbulento resultando da desregulação do tonus vascular, as MP endoteliais causam o aumento de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias, recrutamento de monócitos e restantes leucócitos.

Neste sentido, as MP poderão ser responsáveis pelo recrutamento celular dos estágios iniciais da aterosclerose e arteriosclerose e, desta forma, contribuir para o surgimento da HTA.

As MP fornecem também um substrato para a secreção de fosfolipase A2 e ácido lisofosfático, um potente pró-inflamatório e ativador plaquetário, o qual pode promover a formação de coágulos intravasculares.^{1,26}

ANGIOGÊNESE E FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

As MP estimulam a angiogênese, promovendo a proliferação, sobrevivência, migração e formação tu-

bular, aumentando a densidade capilar após isquemia do miocárdio e induzindo a diferenciação de células progenitoras endoteliais.^{27,28}

Determinadas MP, nomeadamente as endoteliais, plaquetárias e de origem tumoral, apresentam uma capacidade angiogénica de destaque, mediada pela formação de ROS, metaloproteínases, fatores de crescimento e esfingomiélinea.⁴

O morfogénico Sonic hedgehog tem também sido implicado nos efeitos pró-angiogénicos das MP, induzindo a formação de estruturas capilares e aumentando a expressão de mediadores da adesão celular e de outros fatores pró-angiogénicos.^{8,29}

Assim, a DE e as lesões plexiformes patognomónicas de determinadas patologias vasculares poderão ser o reflexo da capacidade das MP em promover o crescimento celular da vasculatura.¹

APOPTOSE E FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

A apoptose constitui um forte estímulo à formação de MP e é também desencadeada como resultado da sua formação e ativação. Em pacientes hipertensivos, tem sido demonstrada a capacidade das MP em induzir a senescência e apoptose celulares. Esta indução aparenta ser proporcional à dose e mediada pela fagocitose das MP e dos seus componentes pró-apoptóticos, nomeadamente as caspases, a ceramida e o ácido araquidónico.⁸

As MP poderão ser libertadas na tentativa de reverter o processo apoptótico, permitindo à célula eliminar moléculas sinalizadoras pró-apoptóticas, como as caspases.⁴ Alternativamente, as MP poderão ser libertadas de forma a evitar a fagocitose da célula que lhes deu origem, pela perda da fosfatidilserina membranar, que desencadearia a sua fagocitose ou poderão ainda funcionar como um mecanismo de comunicação celular.^{4,30}

COAGULAÇÃO E FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

As doenças tromboembólicas e ateroscleróticas apresentam a trombose como um mecanismo central

e as MP participam ativamente na formação de trombos, por vários mecanismos distintos, sendo a coagulação a propriedade das MP melhor estudada. 1 Como anteriormente referido, as MP formam uma superfície aniônica fosfolipídica que promove a coagulação. A presença de fosfatidilserina fornece tal superfície aniônica, a qual se liga aos domínios catiónicos das proteínas envolvidas na coagulação, resultando na formação de trombina.^{1,8,31}

A presença de fator tecidual é um componente crítico nos estágios iniciais da coagulação e as MP são também ricas neste factor.^{8,17,31}

A coagulação inicia-se pela ação do fator tecidual derivado de MP que se liga às plaquetas circulantes e fatores da cascata da coagulação. Diversos mediadores circulantes e de superfície encontram-se envolvidos na ativação plaquetária pelas MP e na formação de trombos ricos em fibrina.^{1,6,8,17} Desta forma, não só a formação de coágulos, como também a sua estabilização, são promovida pelas MP.

A correlação entre os níveis de MP e o risco de complicações tromboembólicas tem sistematicamente sido demonstrada nos últimos anos e a atividade pró-coagulante das MP pode prontamente ser quantificada pelos testes de geração da trombina. Nestes testes, as MP formam a superfície pró-coagulante e o fator tecidual e o plasma fornecem os fatores de coagulação. A simples adição de cálcio é suficiente para a formação de coágulos, mas a retirada das MP impede esta formação.⁶

Observa-se *in vitro* que as MP possuem uma capacidade de promover a coagulação 50 a 100 vezes superior à das plaquetas ativadas.^{8,32} As MP plaquetárias são as que melhor se correlacionam com os grupos de hipertensão severa e também as mais envolvidas na ativação da coagulação, identificando assim os pacientes com maior risco de lesões hipertensivas vasculares.³³

Tendo em conta a existência de uma sobreposição de marcadores e mediadores entre os diferentes tipos de MP, é provável uma ação sinérgica entre as MP endoteliais e plaquetárias para alcançar uma atividade coagulante máxima.³³ Tal sinergia demonstra que as MP são mais do que marcadores de lesões e ativação endotelial, contribuindo para a patogênese das lesões vasculares em pacientes com hipertensão não controlada.

EFEITOS DO FLUXO SANGUÍNEO TURBULENTO

Regiões arteriais geometricamente irregulares (curvaturas, ramificações e bifurcações) são caracterizadas por stress mecânico superior resultante de um fluxo sanguíneo turbulento, quando comparadas com regiões de fluxo laminar.³⁴ Estas regiões apresentam uma suscetibilidade aumentada para o desenvolvimento de aterosclerose e DE.^{35,36}

Células endoteliais expostas a stress hemodinâmico apresentam um aumento da expressão de genes pró-aterogênicos e do remodelamento vascular e o comprometimento da dilatação mediada pelo endotélio.^{35,37}

A indução deste fluxo turbulento, através da oclusão arterial parcial, promove o aumento da DE e da aterosclerose.^{35,38}

A tensão tangencial é um dos maiores determinantes da apoptose endotelial, enquanto que o fluxo sanguíneo laminar promove a sobrevivência celular endotelial, e manutenção de um fluxo laminar é crucial para a estrutura vascular, promovendo a formação de substâncias anti-coagulantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras.^{39,40}

Em pacientes renais, identifica-se uma forte relação entre o aumento da tensão tangencial e os níveis circulantes de MP endoteliais. É ainda identificada uma forte e independente associação entre os níveis de MP endoteliais e vários indexes de arteriosclerose e dilatação arterial mediada pelo fluxo.^{38,39}

Por sua vez, a diminuição do fluxo laminar promove a produção de MP endoteliais, que afetam a proliferação, apoptose, migração, permeabilidade, remodelamento e expressão genética a nível endotelial.^{39,40}

Distúrbios metabólicos dos quais resultam alterações na viscosidade do sangue, como a anemia, influenciam indiretamente o fluxo sanguíneo e a tensão tangencial, exercendo um papel na alteração nos níveis de MP e consequentemente nos distúrbios vasculares.³⁹

Elegantes estudos realizados para avaliar o efeito do fluxo turbulento sanguíneo nos níveis de MP demonstram que tal fluxo induz a ativação endotelial e a apoptose em humanos, refletindo-se na libertação de MP por células endoteliais ativadas (CD62E+) e apoptóticas (CD31+/CD42b-).³⁵

A literatura sugere que este aumento de MP se origina preferencialmente em segmentos arteriais susce-

tíveis à aterogênese, caracterizados por distúrbios no fluxo. O fluxo sanguíneo turbulento, promove sinais ativadores e pró-apoptóticos nos membros onde a obstrução ao fluxo ocorre, mas não de forma contra lateral, sugerindo uma ação localizada.³⁵

Desta forma, o fluxo turbulento induz a liberação de MP endoteliais, que promovem a DE. A DE, por sua vez, é responsável por um aumento do stress hemodinâmico, o qual irá causar a liberação de mais MP.

Como resultado, estabelece-se um ciclo vicioso, que culmina em lesões vasculares, DE e o surgimento de patologias vasculares. É provável que o possível continuum CV inicialmente referido, ocorra promovendo quantidades crescentes de MP e o risco CV.

CLEARANCE DAS MICROPARTÍCULAS

É escassa a informação acerca dos mecanismos de eliminação de MP, sendo apenas reconhecida a fagocitose como o principal mecanismo para a sua remoção.⁸ A fagocitose das MP ocorre predominantemente a nível esplênico e hepático.¹

Este processo, aparenta ser o resultado da presença de fosfatidilserina na membrana celular das MP, que se liga às células fagocíticas, como os macrófagos.⁴¹ A opsonização pela imunoglobulina IgM poderá também ter uma papel na ligação das MP e sua captação pelas células fagocíticas.^{8,42}

Células endoteliais cerebrais e endoteliais do cordão umbilical demonstram também a capacidade de endocitar MP, sugerindo um papel ativo do endotélio na sua remoção.^{8,43}

TRANSVERSALIDADE DAS MICROPARTÍCULAS E O SEU PAPEL COMO BIOMARCADOR

O aumento de MP têm sido descrito num espectro alargado de doenças, sobretudo as associadas a lesões vasculares, inflamação excessiva e estados pró-trombóticos. Apesar de não ser claro se as MP representam uma causa ou uma consequência das doenças vasculares, a literatura sugere ambos os papéis para as MP.

É certo que o seu contributo para a promoção da inflamação e da coagulação estendem a severidade

das doenças, ainda que algumas das suas ações possam ter efeitos benéficos a curto prazo.^{6,8}

A maioria da investigação tem se centrado no papel das MP nas doenças cardiovasculares, com evidências para o seu aumento nestas condições patológicas.

Considerando a HTA, as MP mais frequentemente descritas são as de origem endotelial e plaquetária.⁶ Os efeitos da pressão arterial extremamente elevada (pressão diastólica > 120 mmHg e/ou pressão sistólica > 220mmHg) sob os níveis de MP endoteliais e plaquetárias foram recentemente avaliados. Os níveis de MP endoteliais encontraram-se elevados nos grupos de pressão arterial mais elevada, apresentando uma correlação positiva com os níveis de pressão sistólica e diastólica, ativação plaquetária e endotelial.^{33,44}

Comparativamente com os marcadores classicamente utilizados, como VCAM-1, ICAM-1 e vWF, as MP apresentaram correlações significativamente mais fortes.^{33,44,45} Estes clássicos marcadores dependem mais fortemente de fatores metabólicos, enquanto que as MP se relacionam melhor com a pressão arterial e a função endotelial.^{33,44} Os dados sugerem que as MP endoteliais aparentam ser os marcadores de risco mais fortes existentes.

Tem também sido demonstrado que os níveis plasmáticos de MP endoteliais refletem diretamente o grau de DE, se correlacionam diretamente com a espessura das paredes arteriais e inversamente com a amplitude da dilatação mediada pelo fluxo.⁴ Num estudo prospetivo com 500 pacientes com síndromes coronárias agudas, as MP demonstraram capacidade para prever infarto do miocárdio secundário e mortalidade, e num estudo com 200 pacientes assintomáticos, as MP preveem a aterosclerose assintomática nas artérias carótidas, aorta abdominal e femoral.⁴

O espectro de patologias que apresentam números elevados de MP inclui a hipertensão severa, acidente vascular cerebral, insuficiência renal, doenças coronárias, hipertensão pulmonar, diabetes mellitus e síndrome metabólico.³⁵

Para além no largo espectro de MP na generalidade correlacionado com a HTA e DE, na diabetes mellitus 46 e na hipertensão pulmonar 47 são também descritos níveis aumentados de MP endoteliais, plquetárias e leucocitárias e pacientes com doenças renais crónicas apresentam altos níveis de MP endoteliais.^{8,48} Doenças como a pré-eclampsia⁴⁹, aterosclerose, ap-

neia do sono⁵⁰ e hipertensão essencial⁵¹ estão também associadas a MP de várias origens, as quais se correlacionam positivamente com a DE e outcomes clínicos desfavoráveis.⁸ Neste sentido, as MP têm sido capazes de prever a mortalidade e morbidade resultantes de doenças como a insuficiência cardíaca, aterosclerose, hipertensão pulmonar e doenças renais em fase terminal.⁸

As MP encontram-se aumentadas também nas doenças inflamatórias, sobretudo em indivíduos com psoríase, esclerose múltipla, lúpus sistêmico eritematoso, vasculite, rejeição de transplantes, artrite reumatoide e doenças inflamatórias do intestino. O tratamento destas patologias reflete-se na diminuição de MP, realçando a sua importância como possível marcador na monitorização terapêutica.⁸

Em estados hipercoagulativos, verifica-se uma vez mais o aumento de MP (o oposto se verifica em indivíduos com síndrome de Scott), aumento este diretamente correlacionado com o de conhecidos promotores da coagulação.^{8,17}

Os desequilíbrios hormonais aparentam também afetar os níveis de MP. Avaliações de mulheres com síndrome do ovário policístico e aumento de testosterona ou de mulheres na menopausa descrevem níveis aumentados de MP, possivelmente resultantes da diminuição do estrogênio.^{8,52} Em contrapartida, a terapia de reposição hormonal poderá encontrar-se associada ao aumento de MP.

As variações quantitativas de MP no decorrer das doenças poderão ainda ser úteis na estratificação do risco em diversas patologias e desta estratificação resultar um melhor direcionamento terapêutico e alocação de recursos.

POTENCIAL DA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

Para além das evidências anteriormente descritas resultantes da intervenção sobre as MP, nomeadamente do bloqueio do cálcio e da reorganização do citoesqueleto, outros fármacos têm sido estudados em diversos pontos de sinalização das MP.

Um inibidor seletivo da fosfodiesterase AMP cíclica e agente anti-plaquetário, o cilostazol, diminui os níveis de MP plaquetárias. O losartan, a combina-

ção de losartan com simvastatina e a ticlopidina, diminuem significativamente os níveis de MP derivadas de monócitos.⁶ As estatinas aparentam diminuir a formação de MP endoteliais e os medicamentos ticlopidina, abciximab e cilostazol diminuem os níveis de MP plaquetárias.^{4,53}

Em pacientes hipertensivos, o eprosartan diminui a pressão arterial em paralelo com a diminuição de MP.⁶

Antioxidantes como a vitamina C e o carvedilol reduzem os níveis de MP circulantes em pacientes com insuficiência cardíaca e melhoram a função endotelial.^{4,6,54,55}

Os ‘peroxisome proliferator-activated receptors’ (PPAR), inibindo a inflamação e DE, apresentam funções protetoras a nível cardiovascular, sendo a pioglitazona eficaz em reduzir o número de MP em pacientes com síndrome metabólica.⁶

As MP podem ser manipuladas para sobre-expressar diferentes proteínas de interesse, como o factor Sonic hedgehog (Shh).⁷ Quando se pretendeu avaliar a capacidade da expressão de Shh em MP na redução da hipertensão arterial induzida pela Ang II, verificou-se que as MP são significativamente eficazes, aumentando a produção de NO e reduzindo o stress oxidativo.⁵⁶ Os resultados demonstram o potente efeito das MP como agente anti-hipertensor, revogando por completo os efeitos da Ang II na indução de hipertensão.⁵⁶

A expressão de Shh em MP apresenta ainda capacidade antioxidante pelo seu conteúdo enzimático e pela promoção da expressão de enzimas noutras células e propriedades angiogénicas após isquemia e reperfusão.^{57,58}

Em último lugar, a administração de epoprostenol demonstrou recentemente inibir as MP plaquetárias e formação de coágulos.¹

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

As MP são agentes complexos, exibindo um largo espectro de mediadores moleculares e ações reguladoras de processos metabólicos fundamentais no surgimento de patologias cardiovasculares. Fazem parte destes processos a apoptose, proliferação, coagulação, disfunção endotelial, angiogénese e comunicação celulares.

Dependendo do contexto da sua formação, dos mecanismos desencadeadores e do local de formação, as MP expressam diferente composição e efeitos nas células alvo.

O comprometimento dos mecanismos acima referidos, característicos de patologias como a HTA, doenças coronárias e aterosclerose, são responsáveis pela DE. A DE, por sua vez, é um provável responsável pelo surgimento e perpetuação de tais condições vasculares. As lesões vasculares causadas pela HTA a longo prazo, contudo, poderão promover a liberação de mais MP, resultando num perpetuar dos efeitos nefastos das mesmas. A literatura sugere as MP como causa e consequência de várias patologias, sobretudo as CV. Estabelece-se assim um continuum CV, sob a forma de um ciclo com o perpetuar das patologias CV.

O elucidar das interações entre os mecanismos de formação e atuação das MP e um diverso arsenal de fármacos permitirá no futuro atenuar os efeitos da ativação exagerada de MP. Destes fármacos, os mais

promissores são os que apresentam como alvos a regulação intracelular de cálcio e a expressão superficial de fosfatidilserina.

A compreensão do papel das MP em processos como a inflamação, a angiogênese e a apoptose celular, poderá permitir o surgimento de terapias dirigidas a doenças de caráter inflamatório, maligno e resultantes da DE, como a HTA.

A utilização das MP como agente terapêutico poderá também vir a demonstrar-se vantajosa na promoção da expressão de proteínas de interesse em células alvo. Ainda assim, esta realidade encontrar-se relativamente mais distante devido à sobreposição de marcadores entre os diferentes subtipos de MP.

Para utilização das MP como biomarcador e para estratificação do risco CV, será necessária uma distinção mais clara entre os mecanismos que governam e diferenciam os diferentes subtipos de MP e o desvendar da significância clínica de alterações nas mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amabile, N. et al. Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 42, 272–9 (2013).
2. Morrell, N. W. et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S20–31 (2009).
3. Diamant, M., Tushuizen, M. E., Sturk, A. & Nieuwland, R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.* 34, 392–401 (2004).
4. Boulanger, C. M., Amabile, N. & Tedgui, A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 48, 180–6 (2006).
5. Amabile, N., Rautou, P.-E., Tedgui, A. & Boulanger, C. M. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 36, 907–16 (2010).
6. Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., Muscari, S. & Muscari, A. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Can. J. Cardiol.* 26, 140–5 (2010).
7. Martinez, M. C. & Andriantsitohaina, R. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ. Res.* 109, 110–9 (2011).
8. Burger, D. et al. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci. (Lond.)* 124, 423–41 (2013).
9. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–20 (2010).
10. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516 (2007).
11. Nozaki, T. et al. Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 12, 1223–8 (2010).
12. Sinning, J.-M. et al. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur. Heart J.* 32, 2034–41 (2011).
13. Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M. & Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 15–26 (2011).
14. Rautou, P.-E. et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res.* 109, 593–606 (2011).
15. Tissot, J.-D., Rubin, O. & Canellini, G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 571–7 (2010).
16. Zahra, S., Anderson, J. A. M., Stirling, D. & Ludlam, C. A. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol.* 152, 688–700 (2011).
17. Boulanger, C. M. & Dignat-George, F. Microparticles: an introduction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2–3 (2011).
18. Cauwenberghs, S. et al. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 580, 5313–20 (2006).
19. Sapet, C. et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 108, 1868–76 (2006).
20. Van den Akker, J. et al. Transglutaminase 2 is secreted from smooth muscle cells by transamidation-dependent microparticle formation. *Amino Acids* 42, 961–73 (2012).
21. Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W. & Zwaal, R. F. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 317–30 (1999).
22. Toti, F., Satta, N., Fressinaud, E., Meyer, D. & Freyssinet, J. M. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* 87, 1409–15 (1996).
23. Burger, D. et al. Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence. *J. Am. Heart Assoc.* 1, e001842 (2012).
24. Burger, D. et al. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1898–907 (2011).
25. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 826–37 (2010).
26. Wang, J.-G. et al. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood* 118, 2366–74 (2011).

27. Brill, A., Dashevsky, O., Rivo, J., Gozal, Y. & Varon, D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc. Res.* 67, 30–8 (2005).
28. Radziwon-Balicka, A., Moncada de la Rosa, C. & Jurasz, P. Platelet-associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 679–88 (2012).
29. Soleti, R. & Martínez, M. C. Microparticles harbouring Sonic Hedgehog: role in angiogenesis regulation. *Cell Adh. Migr.* 3, 293–5 (2009).
30. Jy, W. et al. Agonist-Induced Capping of Adhesion Proteins and Microparticle Shedding in Cultures of Human Renal Microvascular Endothelial Cells. (2009). at <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10623320213632?journalCode=gend>>
31. Owens, A. P. & Mackman, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 108, 1284–97 (2011).
32. Sinauridze, E. I. et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 97, 425–34 (2007).
33. Preston, R. A. et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 41, 211–7 (2003).
34. Chatzizisis, Y. S. et al. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 2379–93 (2007).
35. Jenkins, N. T. et al. Disturbed blood flow acutely induces activation and apoptosis of the human vascular endothelium. *Hypertension* 61, 615–21 (2013).
36. CARO, C. G., FITZ-GERALD, J. M. & SCHROTER, R. C. Arterial Wall Shear and Distribution of Early Atheroma in Man. *Nature* 223, 1159–1161 (1969).
37. Davies, P. F., Remuzzi, A., Gordon, E. J., Dewey, C. F. & Gimbrone, M. A. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 2114–7 (1986).
38. Amabile, N. et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3381–8 (2005).
39. Boulanger, C. M. et al. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* 49, 902–8 (2007).
40. Tricot, O. et al. Relation Between Endothelial Cell Apoptosis and Blood Flow Direction in Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 101, 2450–2453 (2000).
41. Willekens, F. L. A. et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 105, 2141–5 (2005).
42. Litvack, M. L., Post, M. & Palaniyar, N. IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS One* 6, e17223 (2011).
43. Faille, D. et al. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 1731–8 (2012).
44. Preston, R. A. et al. Effects of severe, uncontrolled hypertension on endothelial activation: soluble vascular cell adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor. *J. Hypertens.* 20, 871–7 (2002).
45. Horstman, L. L., Jy, W., Jimenez, J. J. & Ahn, Y. S. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front. Biosci.* 9, 1118–35 (2004).
46. Tramontano, A. F. et al. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2010, 250476 (2010).
47. Diehl, P. et al. Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J. Thromb. Thrombolysis* 31, 173–9 (2011).
48. Dursun, I. et al. The relationship between circulating endothelial microparticles and arterial stiffness and atherosclerosis in children with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant* 24, 2511–8 (2009).
49. González-Quintero, V. H. et al. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189, 589–93 (2003).
50. Yun, C.-H. et al. Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J. Clin. Neuro.* 6, 89–98 (2010).
51. Wang, J.-M. et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients. *J. Hum. Hypertens.* 23, 307–15 (2009).
52. Koiou, E. et al. Circulating platelet-derived microparticles are elevated in women with polycystic ovary syndrome diagnosed with the 1990 criteria and correlate with serum testosterone levels. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 63–8 (2011).
53. Tramontano, A. F. et al. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 34–8 (2004).
54. Rössig, L. et al. Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 2081–2089 (2000).
55. Rössig, L. et al. Vitamin C Inhibits Endothelial Cell Apoptosis in Congestive Heart Failure. *Circulation* 104, 2182–2187 (2001).
56. Marrachelli, V. G. et al. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in mice. *PLoS One* 8, e72861 (2013).
57. Soleti, R., Lauret, E., Andriantsitohaina, R. & Carmen Martínez, M. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2159–70 (2012).
58. Agouni, A. et al. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* 21, 2735–41 (2007).

O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO SULFETO DE HIDROGÉNIO NA DOENÇA VASCULAR

Paulo Bastos¹

RESUMO

A deficiência de sulfeto de hidrogénio encontra-se fortemente associada a diversas patologias vasculares. Atuando como um modulador protetor da função endotelial, o sulfeto de hidrogénio é responsável pela regulação dos processos de adesão, inflamação, oxidação/redução, vasodilatação, apoptose, angiogénese, hiperplasia e coagulação. Como demonstrado em estudos experimentais em animais, o sulfeto de hidrogénio é capaz de atenuar e reverter determinadas condições patológicas, sugerindo ser um inovador e promissor agente terapêutico no combate à doença vascular. Nesta revisão são descritos a formação e metabolismo de sulfeto de hidrogénio, os seus mecanismos de ação e vias de sinalização correspondentes e a eficácia demonstrada nos estudos *in vivo* até à data realizados.

Palavras-chave: H₂S; hydrogen sulfide; cardiovascular; atherosclerosis; endothelial dysfunction

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Vários estudos descrevem a deficiência de sulfeto de hidrogénio (H₂S) em diversas doenças cardiovasculares e o seu papel protetor contra a aterosclerose.^{1,2} Na concentração de 50 a 150 µM, o H₂S funciona como um modulador protetor da função endotelial, à semelhança do óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO).²

O H₂S representa o novo elemento da família de gasotransmissores (H₂S, NO e CO) no organismo humano e, à semelhança do NO e CO, apresenta efeitos protetores na vasculatura.³

Tem também sido demonstrado em diversos estudos o papel preventivo do H₂S no surgimento da aterosclerose, inibindo a modificação e captação do colesterol LDL, a adesão de monócitos e macrófagos, a inflamação e hiperplasia vasculares e a trombogénese.³ O seu efeito protetor contra as doenças vasculares,

sobretudo a aterosclerose, é também atribuído à capacidade de redução dos níveis de homocisteína e promoção dos níveis de NO.

A suplementação com moléculas capazes de gerar H₂S no organismo humano (como os doadores NaHS e GYY4137) tem demonstrado resultados benéficos num número crescente de estudos.³ Dado o seu potencial terapêutico e a necessidade no desenvolvimento de inovadores agentes contra as doenças cardiovasculares, estes mesmos agentes merecem ser explorados, não existindo ainda dados significativos relativos à sua segurança e eficácia gerados em humanos.

Ainda assim, sabe-se que tanto a diminuição da produção endógena de H₂S por deleções genéticas, como a sua supressão por agentes exógenos (como a propargilglicina), promovem o desenvolvimento de aterosclerose.³ Desta forma, prevê-se que a indução e promoção do H₂S venham a demonstrar-se eficazes no combate às doenças vasculares.

¹ Secção Autónoma de Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro, Portugal.
E-mail de correspondência: pauloandreasbastos@ua.pt

Para tal ser tornar uma realidade na prática clínica, é ainda necessária a completa elucidação dos mecanismos pelos quais o H_2S atua, o conhecimento dos seus diferentes efeitos nos preferenciais tecidos e órgãos alvo e a realização de estudos que averiguem a sua segurança em humanos.

Nesta revisão procurou-se avaliar a eficácia do H_2S nos estudos até à data realizados, bem como os mecanismos pelos quais o mesmo exerce um efeito benéfico ao nível da vasculatura.

METODOLOGIA

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica com base em artigos publicados nas bases de dados Medline e Cochrane Library, referentes a estudos epidemiológicos e experimentais publicados nos últimos 5 anos. Analisaram-se artigos que apresentassem associações entre a diminuição do H_2S e as patologias vasculares e artigos que demonstrassem os mecanismos e vias de sinalização pelos quais o H_2S atua a nível da vasculatura. Foram utilizados os termos MeSH “ H_2S ”; “hydrogen sulfide”; “cardiovascular”; “atherosclerosis” e “endothelial dysfunction” em ambas as bases de dados.

METABOLISMO DO H_2S E INTERAÇÃO COM A FORMAÇÃO DE NO

A produção endógena de H_2S ocorre por vias enzimáticas e não enzimáticas, sendo a última a menos importante.⁴ Quando não enzimaticamente catalisada, a formação de H_2S ocorre espontaneamente a partir de glucose, polissulfetos orgânicos e inorgânicos, glutatona e enxofre elementar.⁵

A via enzimática depende da ação das enzimas cistationina beta-sintase (CBS) e cistationina gama-liase (CSE), que dependem do piridoxal-5'-fosfato (PLP) e utilizam como substrato a L-cisteína ou a homocisteína e a L-cisteína em conjunto.⁶ Alternativamente, o H_2S pode ser formado por ação da enzima (não dependente de PLP) 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3-MST), que utiliza o 3-mercaptopiruvato como substrato.

Na vasculatura, a CSE é a enzima predominante, ainda que a produção por ação da 3-MST seja também

considerável.⁴ Após a sua produção, o H_2S pode ser imediatamente libertado na circulação ou armazenado em compostos de enxofre. Além do referido, o H_2S apresenta, à semelhança do NO e do CO, alta afinidade para a hemoglobina, da qual resulta o seu sequestro.⁴

Uma vez desprotonado, o H_2S é rapidamente oxidado a tiosulfato na mitocôndria e posteriormente convertido não enzimaticamente a sulfetos e sulfatos.^{4,7} Enzimaticamente, o H_2S pode também ser metilado a dimetilsulfeto e metanetiol, ou reagir com a meteglobina e formar sulfemoglobina.

É consensualmente reconhecida a ação sinérgica entre o H_2S e a expressão de NO no sistema cardiovascular.⁸ Apesar de ambos poderem exercer ações citoprotetoras de forma independente, evidências recentes sugerem também uma relação de dependência entre estes mediadores.⁹

A enzima responsável pela formação de NO a nível endotelial (eNOS), é regulada por fosforilação mediada pelo H_2S . O H_2S promove a sua ativação e consequente formação de NO.⁹

Modelos animais com deficiência de CSE apresentam reduções significativas de BH4 (tetrahydrobipterina), um cofator essencial à atividade da eNOS. Esta deficiência é responsável pelo comprometimento da oxidação da L-arginina (precursor do NO).⁹⁻¹¹ Além do referido, a reduzida atividade da CSE compromete também a conversão da homocisteína a cistationina.

Desta forma, a deficiência de CSE e consequente redução do H_2S é responsável pela diminuição do NO e pela acumulação de homocisteína, contribuindo fortemente para o stress oxidativo, disfunção endotelial e surgimento de patologias vasculares. Contudo, a reposição com precursores do H_2S é capaz de compensar esta deficiência e restaurar a atividade a eNOS, pelo menos em modelos animais.⁹

Atualmente existem vários compostos capazes de libertar efetivamente H_2S *in vivo*. Os sais de sulfeto têm sido os mais utilizados (hidrossulfeto de sódio, sulfeto de sódio e sulfeto de cálcio); contudo, atingem a concentração máxima em segundos e são muito rapidamente degradados.¹² A suplementação com H_2S não é ainda ideal, devido aos efeitos tóxicos do mesmo em elevadas concentrações e à dificuldade de um controlo preciso, sendo bastante volátil e difusível através das membranas celulares.¹²

Compostos de liberação prolongada têm sido desenvolvidos para aumentar a eficácia de atuação, mas a sua administração em humanos encontra-se ainda por investigar.

MECANISMOS DE AÇÃO, VIAS DE SINALIZAÇÃO E POTENCIALIDADES DO H₂S NA DOENÇA VASCULAR

O H₂S representa um forte protetor contra a aterosclerose e restantes doenças vasculares, sendo um potente anti-inflamatório, pró-angiogénico e antioxidante e um modesto vasodilatador.^{4,13}

A inflamação é um fenómeno chave na patogénese da disfunção endotelial.^{14,15} As propriedades anti-inflamatórias do H₂S devem-se à capacidade de inibir a expressão de moléculas de adesão e o recrutamento leucocitário, através da ativação dos canais de K⁺ e consequente hiperpolarização celular.¹⁶

Característica-chave da inflamação e aterosclerose, a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão celular, é responsável por muitos dos fenómenos verificados na disfunção endotelial e progressão de várias doenças vasculares.^{14,15}

Os efeitos da inflamação a nível endotelial são mediados sobretudo pela ativação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e do *nuclear factor-kB* (NF-kB), sendo a formação destes promovida por ação do *tumor necrosis factor-α* (TNF-α).^{17,18}

A diminuição da expressão de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), P-selectina, E-selectina e da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), previne a adesão de monócitos e macrófagos, a qual é necessária para dar início ao desenvolvimento da aterosclerose. A heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima com um papel fulcral na degradação de grupos heme e participa na regulação da inflamação através dos seus produtos de degradação bilirrubina e monóxido de carbono, exercendo um efeito anti-inflamatório e antiagregante.^{15,19,20}

Após administração de precursores exógenos de H₂S, verifica-se a atenuação da disfunção endotelial desencadeada pelo TNF-α a nível das células endoteliais, suprimindo a ativação do NF-kB e a produção de ROS e aumentando a expressão de HO-1.¹⁵ Desta

forma, o H₂S representa um promissor agente no tratamento da inflamação e disfunção endoteliais.

No que diz respeito ao seu potencial anti-hipertensor, a hiperpolarização celular no músculo liso da vasculatura, resultante da abertura dos canais de K⁺, poderá também ser um dos fatores responsáveis. Alternativamente, a sua ação vasodilatadora poderá dever-se à ativação da formação de NO.

Contudo, na literatura são descritos efeitos vasodilatadores e vasoconstritores. Estes resultados paradoxais dever-se-ão à concentração alcançada e ao tecido alvo. Em quantidades mínimas e nos tecidos com baixa pressão parcial de oxigénio (30mmHg), o H₂S possui um efeito vasodilatador, o qual é perdido em concentrações superiores e em tecidos com pressão parcial de oxigénio muito elevada (150mmHg).²¹

Sabe-se também que o H₂S promove a proliferação e migração das células endoteliais, estimulando a reparação endotelial e o crescimento de novos vasos.^{22,23} As vias de sinalização pelas quais o H₂S promove a angiogénese, passam pela ativação da *protein kinase B* (PKB), da MAPK e do p38, resultando no aumento da expressão do *vascular endothelial growth factor* (VEGF).^{22,23}

A nível mitocondrial, o H₂S exerce um efeito citoprotetor, estimulando a respiração celular e produção de energia sobretudo em estados de hipoxia ou de stress oxidativo. Uma vez mais, os efeitos benéficos verificam-se em concentrações mais reduzidas (10 a 100nM), tornando-se tóxico e inibindo o funcionamento mitocondrial em concentrações muito elevadas.²⁴ Os seus efeitos a nível mitocondrial são também responsáveis, pelo menos parcialmente, por uma ação antiapoptótica e antinecrótica.²⁵

Podendo atuar como um forte antioxidante, o H₂S aumenta os níveis de glutatona e a expressão do fator de transcrição NrF2, promovendo a expressão de enzimas antioxidantes como a HO-1, a superóxido dismutase-1 e a catalase.^{4,26,27}

EVIDÊNCIAS DO ENVOLVIMENTO DO H₂S EM PATOLOGIAS VASCULARES

Os níveis de CSE e H₂S encontram-se diminuídos em macrófagos presentes nas placas ateroscleróticas, como consequência da acumulação de colesterol LDL

oxidado.²⁸ Nestas células, a suplementação com NaHS e Na₂S (doadores de H₂S) e cisteína (substrato preferencial da CSE) diminui a produção de mediadores responsáveis pela resposta ao stress físico e oxidativo, como o TNF- α , ICAM-1 e *c-jun N-terminal kinase* (JNK).²⁸ Estes mediadores participam ativamente no processo de aterogênese e o seu aumento, resultante da diminuição de H₂S, demonstra o papel preventivo do H₂S no surgimento da aterosclerose.²⁸

A hiper-homocisteinemia é responsável pela disfunção endotelial através da promoção do stress oxidativo e comprometimento mitocondrial, encontrando-se associada a diversas patologias cardiovasculares. Nas patologias associadas à hiper-homocisteinemia, o H₂S é capaz de epigeneticamente reverter os efeitos deletérios da homocisteína, promovendo a funcionalidade mitocondrial e endotelial.²⁹

Recentemente, Zong et al. demonstraram pela primeira vez o papel protetor do H₂S no surgimento de disfunção endotelial induzida pelo aumento da concentração extracelular de NaCl.³⁰ A diminuição de H₂S resultante da inibição da enzima CSE, culminou no aumento da apoptose em células endoteliais do cordão umbilical humano. A apoptose celular verificada foi mediada pelo aumento da libertação de citocromo-c mitocondrial, das caspases-3 e -9 e da formação de ROS, particularmente anião superóxido.³⁰

Quando os autores recorreram à suplementação celular com um doador de H₂S, a apoptose foi acentuadamente inibida, sugerindo que os efeitos deletérios na vasculatura do aumento da concentração sanguínea de NaCl se devem à diminuição do potencial protetor do H₂S.³⁰

Estes resultados são apoiados por diversos estudos que demonstram o papel do consumo elevado de NaCl no surgimento da hipertensão arterial e o papel da disfunção endotelial no surgimento de uma variedade de doenças cardiovasculares.^{30,31}

Reconhece-se atualmente que dietas ricas em NaCl aumentam a produção de ROS, induzem o stress oxidativo e promovem a formação de fatores de coagulação.^{32,33} Existem também evidências de que a suplementação com precursores de H₂S poderá reduzir significativamente a pressão arterial.^{33,34}

Este estudo revelou que o excesso de NaCl é responsável pela disfunção endotelial, mediada pelo comprometimento do H₂S, e conseqüente aumento do

stress oxidativo, reforçando o conhecido papel do H₂S na redução da pressão arterial e reversão do remodelamento vascular.

A reperfusão pós-isquemia representa mais uma condição patológica com forte probabilidade de beneficiar da suplementação com H₂S, sendo caracterizada pela privação da perfusão sanguínea a um órgão ou tecido, seguida da restauração e reoxigenação local.^{12,35}

Este fenómeno é responsável pelo desencadear de vários mecanismos patológicos ainda por resolver na prática clínica, os quais incluem a ativação dos sistemas de complemento e imunitário, stress oxidativo, sobrecarga de cálcio, comprometimento da fosforilação oxidativa, necrose, apoptose e disfunção endotelial.^{12,35}

O H₂S tem surgido como um agente capaz de atenuar as lesões resultantes da reperfusão pós-isquemia de diversas formas, as quais incluem a vasodilatação, a redução da inflamação e apoptose, a proteção contra a oxidação excessiva, a inibição da coagulação e a cardioproteção.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A disfunção endotelial encontra-se associada a várias doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose e a hipertensão. Vários estudos demonstram as propriedades anti-inflamatórias, antiapoptóticas e antioxidantes do H₂S, bem como a sua capacidade de promover a angiogênese e o relaxamento vascular, contribuindo para a regeneração endotelial e a redução da pressão arterial.

A deficiência de H₂S contribui para a disfunção endotelial e patogênese da aterosclerose, podendo a reposição exógena de H₂S antagonizar a progressão da doença vascular.

Apesar de o potencial protetor do H₂S na vasculatura se encontrar bem estabelecido, os mecanismos pelos quais atua não se encontram ainda bem delineados. É necessário definir estes mecanismos de forma a se poder usufruir seguramente dos benefícios máximos e desenvolver inovadoras terapias contra as doenças vasculares. A sua eficácia terapêutica não foi ainda testada clinicamente com sucesso, mas os resultados pré-clínicos são extremamente promissores.

De modo a aumentar a duração da biodisponibilidade de H₂S, desenvolveram-se vários agentes doadores de H₂S de libertação lenta com eficácia comprova-

da *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Contudo, não existem ainda terapias dirigidas aos tecidos alvo e o controle da concentração sanguínea é ainda uma limitação.

Os diferentes compostos disponíveis para liberação de H₂S apresentam distintos efeitos e durações terapêuticos, sendo necessário avaliar os mesmos clinicamente com o intuito de se estabelecerem possíveis regimes terapêuticos.

A conjugação de medicamentos anti-hipertensores, antiapoptóticos, antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-tumorais e antidislipidêmicos com precursores de H₂S em formulações que alcancem efetivamente os tecidos alvo e apresentem uma resposta estável, poderá ser uma realidade muito promissora, permitindo o controle das doenças cardiovasculares de diversos modos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wang, Y. *et al.* Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 173–179 (2009).
- Szabó, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 917–935 (2007).
- Xu, S., Liu, Z. & Liu, P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *Int. J. Cardiol.* **172**, 313–7 (2014).
- Polhemus, D. J. & Lefer, D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **114**, 730–7 (2014).
- Kimura, H. Production and Physiological Effects of Hydrogen Sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* **00**, 1–11 (2013).
- Kimura, H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* 1–7 (2014). doi:10.1016/j.niox.2014.01.002
- Łowicka, E. & Bętkowski, J. Hydrogen sulfide (H₂S) – The third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports* **59**, 4–24 (2007).
- Kondo, K. *et al.* H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **127**, 1116–1127 (2013).
- King, A. L. *et al.* Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3182–7 (2014).
- Alp, N. J. & Channon, K. M. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 413–420 (2004).
- Takimoto, E. *et al.* Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J. Clin. Invest.* **115**, 1221–1231 (2005).
- Wu, D. *et al.* Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 186908 (2015).
- Wang, Z. T. *et al.* Vasorelaxant effects of cardamonin and alpinetin from *Alpinia henryi* K. Schum. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **37**, 596–606 (2001).
- Ross, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
- Pan, L.-L., Liu, X.-H., Gong, Q.-H., Wu, D. & Zhu, Y.-Z. Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- α -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells. *PLoS One* **6**, e19766 (2011).
- Zanardo, R. C. O. *et al.* Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J.* **20**, 2118–2120 (2006).
- Li, J.-M., Fan, L. M., Christie, M. R. & Shah, A. M. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2320–2330 (2005).
- Sasaki, M. *et al.* TNF- α -induced endothelial cell adhesion molecule expression is cytochrome P-450 monooxygenase dependent. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C422–C428 (2003).
- Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R. & Immenschuh, S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology* **80**, 1895–1903 (2010).
- Lin, S.-J. *et al.* Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor- α in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 334–340 (2005).
- Koenitzer, J. R. *et al.* Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H1953–H1960 (2007).
- Szabó, C. & Papapetropoulos, A. Hydrogen sulphide and angiogenesis: Mechanisms and applications. *British Journal of Pharmacology* **164**, 853–865 (2011).
- Papapetropoulos, A. *et al.* Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21972–21977 (2009).
- Módis, K., Coletta, C., Erdélyi, K., Papapetropoulos, A. & Szabo, C. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB J.* **27**, 601–611 (2013).
- Murphy, E. & Steenbergen, C. Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 51–67 (2007).
- Fisher, C. D. *et al.* Induction of drug-metabolizing enzymes by garlic and allyl sulfide compounds via activation of constitutive androstane receptor and nuclear factor E2-related factor 2. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 995–1000 (2007).
- Motohashi, H. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine* **10**, 549–557 (2004).
- Wang, X.-H. *et al.* Dysregulation of cystathionine γ -lyase (CSE)/hydrogen sulfide pathway contributes to ox-LDL-induced inflammation in macrophage. *Cell. Signal.* **25**, 2255–62 (2013).
- Kamat, P. K., Kalani, A., Tyagi, S. C. & Tyagi, N. Hydrogen Sulfide Epigenetically Attenuates Homocysteine-Induced Mitochondrial Toxicity Mediated through NMDA Receptor in Mouse Brain Endothelial (bEnd3) Cells. *J. Cell. Physiol.* (2014). doi:10.1002/jcp.24722
- Zong, Y. *et al.* Downregulation of Endogenous Hydrogen Sulfide Pathway Is Involved in Mitochondrion-Related Endothelial Cell Apoptosis Induced by High Salt. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 754670 (2015).
- Mudau, M., Genis, A., Lochner, A. & Strijdom, H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa* **23**, 222–231 (2012).
- Dmitrieva, N. I. & Burg, M. B. Secretion of von Willebrand factor by endothelial cells links sodium to hypercoagulability and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, 1–6 (2014).
- Lenda, D. M., Sauls, B. A. & Boegehold, M. A. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H7–H14 (2000).
- Kimura, Y. & Kimura, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* **18**, 1165–7 (2004).
- Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine* **17**, 1391–1401 (2011).

CONCEITOS SOBRE HEMORREOLOGIA E MICROCIRCULAÇÃO HUMANAS

J. Martins e Silva¹

TEMA 9 – PRINCIPAIS FACTORES DETERMINANTES DA VISCOSIDADE SANGUÍNEA

A viscosidade sanguínea que, *in vivo*, é uma das principais condicionantes do fluxo circulatório, não obedece aos conceitos vigentes da mecânica contínua. A viscosidade aparente do sangue (Tema 5) reflete as variações extremas em circulação que resultam da quantidade e variabilidade de resposta dos componentes sanguíneos ao impacto das forças inconstantes que o impulsionam num continente vascular também muito variável (ver Temas 5 e 8). Na realidade, a viscoelasticidade sanguínea depende de um conjunto de fatores, uns relativos ao sangue (fatores intrínsecos), e outros consistindo em influências exteriores (fatores extrínsecos), (Quadro I).

Quadro I. Principais fatores determinantes da viscosidade sanguínea

Intrínsecos	Extrínsecos
Hematócrito	Tensão de cisalhamento
Viscosidade plasmática	Diâmetro tubular ou vascular
Agregação eritrocitária	Temperatura
Deformabilidade eritrocitária	

FATORES INTRÍNSECOS

Os fatores intrínsecos justificam que o sangue evidencie, *in vivo*, um comportamento *não-Newtoniano* semelhante ao de um meio viscoelástico, representado por elementos elásticos (os componentes celulares, sobretudo eritrócitos) dispersos num meio viscoso (o plasma).

Hematócrito

Esta variável define o conteúdo globular em dado volume sanguíneo. Atendendo a que os eritrócitos são os elementos celulares predominantes no meio sanguíneo (cerca de 99,9%), é natural que a sua concentração, relativa à do plasma, seja um dos fatores mais influentes na viscosidade sanguínea, a valores baixos ou altos da relação de cisalhamento. O aumento da massa eritrocitária ou a diminuição do volume plasmático ocasionam, em geral, um aumento do hematócrito, enquanto, a sua redução poderá dever-se a uma menor massa eritrocitária ou aumento do conteúdo plasmático no sangue. Por conseguinte, a observação dos efeitos induzidos pelos outros fatores da viscosidade sanguínea requer a eliminação dos que são causados pelo hematócrito, através de dois processos alternativos: (a) reconstituindo as amostras a determinar para um *hematócrito-padrão* (em geral, 45%, também considerado o valor médio normal), ou (b) através do cálculo da viscosidade a determinados valores de hematócrito.

Por outro lado, além do hematócrito, é sabido (Tema 8) que a viscosidade sanguínea varia em função da tensão e da relação de cisalhamento coexistentes. Porém, aquelas variáveis não mantêm a mesma constante de proporcionalidade no sangue fluente; no sistema vascular humano há, a cada instante de fluxo, um número infinito de valores da relação de cisalhamento (ex., os valores mais elevados da relação de cisalhamento ocorrem nos principais vasos, enquanto os menores, inferiores a 100 s^{-1}) são registados na arteríolas e vénulas. No conjunto, a viscosidade sanguínea aumenta quando a tensão é maior ou a relação de cisalhamento diminui (fluxo mais lento), ou, vice-

¹ Professor catedrático aposentado, ex-diretor do Instituto de Bioquímica/Biopatologia Química e da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Sócio fundador e 1º presidente da SPHM

-versa, diminui quando a tensão é reduzida ou aumenta a relação de cisalhamento (Quadro II). Esta variabilidade justifica que viscosidade sanguínea seja preferencialmente medida por viscosímetros a determinados valores da relação de cisalhamento.

Quadro II. Variação da viscosidade sanguínea *in vivo*

Aumento	Diminuição
Aumento da tensão de cisalhamento ou Diminuição da relação de cisalhamento	Diminuição da tensão de cisalhamento ou Aumento da relação de cisalhamento

O hematócrito é o principal determinante da viscosidade sanguínea na macro circulação. Valores crescentes de hematócrito tendem a afetar as características laminares do fluxo, reduzindo-lhe a fluidez. Esta inter-relação justifica que o aumento linear do hematócrito (dentro dos limites fisiológicos) induza um aumento logarítmico da viscosidade sanguínea, independentemente da relação de cisalhamento. A proporcionalidade referida atenua-se quando o hematócrito atinge valores muito reduzidos ou elevados; explica-se assim que a viscosidade sanguínea diminua exageradamente quando o hematócrito é inferior a 35%, verificando-se o oposto com hematócrito superior a 50%. Por exemplo, com valores elevados da relação de cisalhamento, próprios da corrente arterial, um sangue com hematócrito de 55% é três vezes mais viscoso do que se tiver 30%. Nas policitemias graves, em que o hematócrito pode atingir valores de 70-80%, a viscosidade sanguínea tende a aumentar até níveis múltiplos do normal.

Como foi referido, a viscosidade aumenta a valores baixos da relação de cisalhamento e, vice-versa, diminui quando esta relação se eleva, qualquer que seja o hematócrito. Este comportamento resulta da adaptação microestrutural do sangue à relação de cisalhamento; quando esta aumenta, os eritrócitos tendem a deformar-se em elipsoides orientados no sentido do fluxo, com subsequente redução da viscosidade sanguínea; pelo contrário, a diminuição da relação de cisalhamento para valores equivalentes aos do trajeto venoso acentua a viscosidade sanguínea, devido a uma maior tendência para a aglutinação local dos eritrócitos.

Viscosidade plasmática

A *viscosidade do plasma* é largamente influenciada pela concentração proteica e temperatura do meio. Daqui resulta que a viscosidade do plasma varie diretamente com a concentração (e viscosidade intrínseca) das proteínas de elevado peso molecular que contém e, em relação inversa, com a temperatura (à semelhança do que sucede com o sangue total e outros líquidos). Entre as proteínas, sobressaem as que apresentam elevado peso molecular e assimetria estrutural, como é o caso do fibrinogénio e algumas globulinas, como a α_2 -macroglobulina e as imunoglobulinas; pelo contrário, é quase irrelevante o contributo de proteínas globulares de dimensões reduzidas, como a albumina, para o valor da viscosidade plasmática. Por via das particularidades referidas, o aumento linear da concentração proteica induz a elevação logarítmica da viscosidade plasmática (assim como a do sangue total).

A viscosidade plasmática é, na generalidade, independente da tensão de cisalhamento, comportando-se como um líquido *Newtoniano*. Esta característica poderá perder-se nalguns tipos de doenças sanguíneas em que há aumento exagerado da concentração celular ou de macroglobulinas; nestas situações, em que o plasma adquire características de líquido não-*Newtoniano*, a viscosidade tende a aumentar ou diminuir inversamente à relação de cisalhamento.

Deformabilidade eritrocitária

Os eritrócitos têm a capacidade de mudar de forma em resposta a dada força deformante (força por unidade de área) proveniente do exterior ou do interior globular. Esta característica, designada por *deformabilidade eritrocitária*, contribui para a normalidade do fluxo circulatório em condições fisiológicas. Pelo contrário, uma redução relevante da deformabilidade tende a dificultar a circulação dos eritrócitos pela rede capilar, com inerente perturbação no fornecimento de nutrientes, trocas gasosas e remoção de produtos formados nos sectores afetados.

A deformabilidade eritrocitária, que pode envolver alterações da curvatura globular, expansão de área ou deformação uniaxial, depende de fatores globulares e externos (Quadro III). Entre os fatores

globulares mais influentes na deformabilidade, destacam-se a geometria e a resistência (elástica e viscosa) à deformação, a que acresce a interação (friccional ou adesiva) dos glóbulos com o revestimento endotelial vascular.

Quadro III. Fatores determinantes da deformabilidade eritrocitária

Globulares	Externos
Geometria Conteúdo e viscosidade Composição e propriedades viscoelásticas da membrana	Tensão de cisalhamento

1. Fatores globulares determinantes da deformabilidade

A deformabilidade eritrocitária é influenciada por diversas propriedades globulares, designadamente: (a) geometria, (b) conteúdo e viscosidade, e (c) propriedades reológicas da membrana globular. Estão descritas numerosas anomalias patológicas, de origem genética ou adquirida, que comprometem a estrutura, propriedades e, consequentemente, as propriedades elásticas e mecânicas dos glóbulos vermelhos, designadamente, a sua deformabilidade.

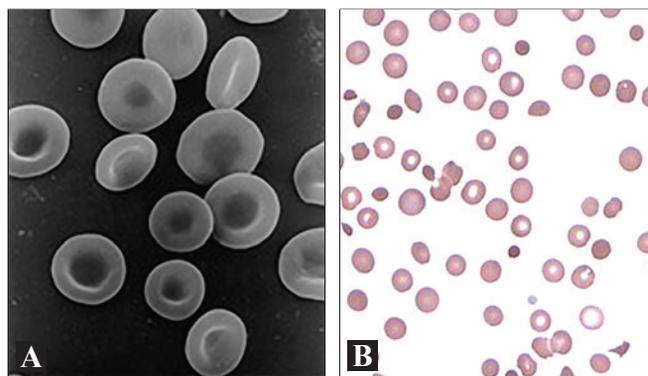


Figura 1. (A) Eritrócitos normais com forma discoide, com 6 a 8 μm de diâmetro, observados por fotomicrografia eletrônica de varrimento; (B) Esferócitos, observados em esfregaço. Cortesia Wikimedia Commons, domínio público.

Aquelas anomalias podem resultar de (i) alteração de forma globular, em que, por redução da superfície globular, os eritrócitos bicôncavos e discoides se convertem em esferócitos (Fig.1), (ii) modulação por sinais bioquímicos (com origem intra- ou extra-eritrocitária) incidentes na estrutura, comportamento mecânico e ou funções globulares, modificação da concentração de hemoglobina e viscosidade eritrocitária, e (iii) modificação da estrutura lípido-proteica membranar (Fig.2), induzida por *stress* oxidativo ou alterações na composição lipídica e ou proteica.

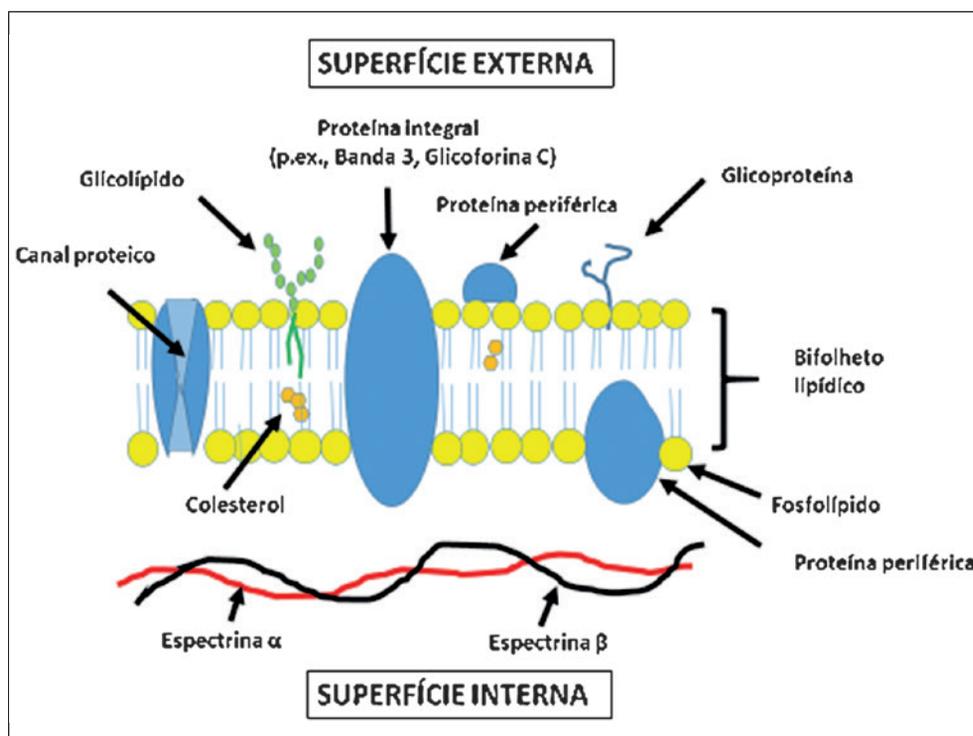


Figura 2.

Esquema de membrana eritrocitária. Assemelha-se, estrutural e funcionalmente à da generalidade das membranas plasmáticas eucariotas, embora com algumas particularidades. No citoesqueleto, a matriz proteica que reveste a face citoplásmica globular, destaca-se a espectrina (dois dímeros, cada um com duas cadeias polipeptídicas, α e β , de que resulta a formação de uma estrutura tetramérica) e diversas outras proteínas, intervenientes em três pontes que asseguram a união dos tetrâmeros de espectrina ao bifolheto lipídico membranar: (a) banda 3-anquirina- β espectrina (regula a coesão da membrana), (b) glicoforina C-proteína 4.1- β espectrina (a sua rutura afeta pouco a estabilidade de membrana), e (c) banda 3-ADCINA-espectrina, que une o complexo da espectrina, actina, proteína 4.1 ao bifolheto lipídico (a sua rutura provoca a fragmentação da membrana).

(a) Geometria globular

Entre as *características geométricas* destacam-se a relação área superficial/volume, da qual depende a forma discoide dos eritrócitos normais maduros em repouso (Fig. 1); nestas condições, o maior diâmetro eritrocitário é cerca de 8 μm (ou 10^{-6} m), o volume médio é de 90 fl (ou 10^{-15} L), e a área superficial aproximadamente igual a $140\ \mu\text{m}^2$. Deste modo, a área excede largamente a que seria necessária ($97\ \mu\text{m}^2$) para o volume globular indicado; justifica-se assim a forma discoide dos eritrócitos em repouso (Fig.1) e a capacidade para estes se deformarem rapidamente ao longo de um eixo, tomando a forma de elipsoides (Fig. 3), sem alteração de volume nem de área superficial, ao ficarem expostos às múltiplas constrições da circulação cardiovascular; entre estas, destacam-se segmentos capilares e fendas com menos de $14\ \mu\text{m}$ de extensão e até $0,5\ \mu\text{m}$ de diâmetro, localizados no endotélio que, no tecido hematopoiético medular e na polpa vermelha do baço, separa os cordões sanguíneos dos espaços sinusoides.

Os glóbulos vermelhos normais atravessam sem dificuldade canais como diâmetro até $2,9\ \mu\text{m}$ de diâmetro; abaixo deste valor, os eritrócitos perdem a capacidade de se deformarem, o que os impede de atravessarem, intactos, as limitações vasculares mais estreitas da microcirculação, a menos que o volume globular diminua ou aumente a sua área superficial. Glóbulos vermelhos com deformabilidade reduzida, presentes em numerosas situações patológicas, têm dificuldade acrescida em passarem pela microcirculação.

Por via das suas características microvasculares próprias, o baço é o órgão onde o sangue tende a estagnar mais tempo, o que, ao contribuir para uma redução do pH local (até cerca de 6,8 de pH), também diminui a deformabilidade eritrocitária. Em consequência destas restrições, o fluxo sanguíneo na microcirculação torna-se mais lento. Adicionalmente, as dificuldades e obstáculos microcirculatórios enfrentados pelos eritrócitos acarretam na perda sucessiva

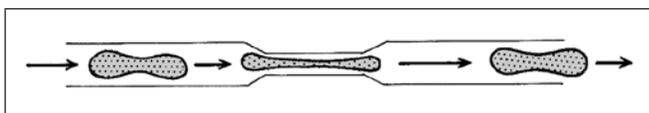


Figura 3. Representação esquemática da mudança de forma dos eritrócitos, que da forma discoide na circulação arterial (A) se deformam para atravessarem a rede capilar, após o que regressam à forma discoide quando entram na vertente venosa (V).

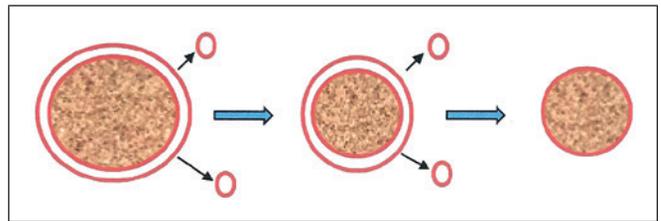


Figura 4. Representação da perda progressiva de componentes membranares durante o tempo de vida-média dos eritrócitos na circulação humana. Daqui resultam alterações da forma e diminuição progressiva da deformabilidade globular; além da área superficial, diminuem o volume, diâmetro globular e a proteção anti-oxidativa dos componentes membranares e da hemoglobina; as interações lípido/proteínas e ou proteínas/proteínas da membrana modificam-se, com reflexo na dinâmica estrutural do citoesqueleto; aumenta a viscosidade da membrana e do citoplasma globular; o aparecimento de novos sítios antigénicos nas sialoglicoproteínas e ou banda 3, contribui para o reconhecimento e fagocitose dos eritrócitos envelhecidos pelo sistema retículo endotelial.

de superfície membranares durante os 100 a 120 dias de idade eritrocitária. Desta alteração, resulta uma modificação progressiva da geometria eritrocitária, em que a forma discoide evolui para a de esferócito (Fig. 4); enquanto os glóbulos jovens têm maior volume e área superficial, estes valores diminuem com o seu envelhecimento.

(b) Conteúdo e viscosidade interna

(i) Conteúdo

Os eritrócitos, além de transportarem oxigénio indispensável ao metabolismo tecidual aeróbio, contêm outras substâncias (p.ex., CO_2 , monóxido de azoto iões, fosfatos orgânicos), que direta (através do estado de oxigenação da hemoglobina) ou indiretamente (reologia sanguínea, perfusão sanguínea, metabolismo) contribuem para aquela função. No sentido inverso, as propriedades da membrana, metabolismo e comportamento da hemoglobina eritrocitária podem ser afetados por diversos fatores e sinais metabólicos em circulação, gerados pós-oxigenação tecidual. Destacam-se, seguidamente, alguns dos componentes mais relevantes nesses mecanismos.

Varição osmolar – A osmolalidade do meio de suspensão (sangue ou experimental) pode condicionar a deformabilidade eritrocitária:

– Em hiper-osmolalidade, a difusão da água intraglobular para o meio exterior induz a diminuição do

volume (com área superficial constante), a par do aumento da CMHG e, conseqüentemente, da viscosidade do conteúdo eritrocitário; porém, enquanto a redução do volume favorece o fluxo eritrocitário através de canaliculos e fendas com diâmetros mais reduzidos, o acréscimo da CMHG induz o da viscosidade intraglobular (η_i) e, ainda, potencia a interação da hemoglobina com a face interna da membrana globular, diminuindo a respectiva deformabilidade; – A hipo-osmolalidade, ao provocar o aumento do volume globular e redução da η_i , conduz também a efeitos opostos na deformabilidade eritrocitária;

No conjunto, enquanto a hiper-osmolalidade tende a facilitar a passagem naquelas vias, sucede o oposto em hipo-osmolalidade que, ao atingir o ponto crítico, provoca a lise eritrocitária (Fig.5).

Cálcio e Magnésio – Os catiões bivalentes indu-

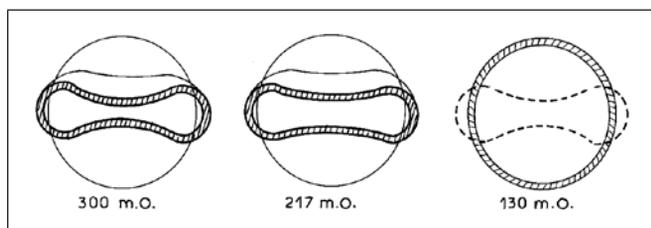


Figura 5. Aumento do volume globular com a diminuição da osmolalidade do meio de suspensão, em que a forma discoide se distende em esfera até um ponto crítico, que precede a hemólise.

zem a ligação da hemoglobina à membrana eritrocitária, causando a sua rigidificação e, conseqüentemente, reduzindo a deformabilidade globular.

A membrana eritrocitária possui vários tipos de canais de cálcio (Ca^{2+}), um dependente do potencial de membrana, outro para transporte ativo dependente da calmodulina, além de canais mecano-ativados para catiões, em que o principal é o Ca^{2+} .

A membrana globular torna-se particularmente rígida quando fixa iões de Ca^{2+} no citoesqueleto proteico; esta interação altera o arranjo espacial ou o estado físico do citoesqueleto, de que pode resultar uma contração da dupla camada lipídica com transformação equinocítica dos glóbulos.

Por conseguinte, a acumulação intraglobular de Ca^{2+} , além de originar a uma desidratação relativa e, subsequente aumento da viscosidade interna (η_i),

está na origem de menor deformabilidade e eventual redução do VGM, sobretudo na fração populacional mais envelhecida; esta particularidade será devida à deterioração do sistema de homeostasia eritrocitária do Ca^{2+} .

Aparentemente, a hipercalcemia intraglobular também reduz o tempo de recuperação elástica, a qual tende a normalizar quando diminuem as perdas de potássio e água intracelular Ca^{2+} -dependentes.

Outra particularidade por explicar é a decuplicação da concentração de Ca^{2+} (de 0,1 μ M para 1 μ M) em apenas 30% dos eritrócitos que atravessam capilares com 3 a 5 μ m, enquanto os 70% restantes mantêm os níveis iniciais.

Entre outras funções, o magnésio (Mg^{2+}) participa na regulação de diversas reações intraglobulares, mediadas por proteína-cinases e fosfatases. As variações de concentração do Mg^{2+} associadas ao processo de oxigenação-desoxigenação podem estar na origem de modificações da plasticidade eritrocitária dependentes do oxigênio. Por si, o Mg^{2+} aumenta a estabilidade eritrocitária.

Fosfatos orgânicos – Enquanto a concentração de ATP atua como modulador da forma e deformabilidade eritrocitária, os efeitos do 2,3-DPG naquelas características continuam pouco esclarecidos e contraditórios, ainda que a espectrina disponha de centros de fixação para ambos os fosfatos orgânicos.

A depleção de ATP eritrocitário, verificada naturalmente durante o envelhecimento, induz a transformação da forma discoide em esférica, com redução da deformabilidade globular; estas alterações eritrocitárias, acompanhadas por perda de potássio (K^+) e acumulação de sódio (Na^+) e Ca^{2+} , derivam, aparentemente, de uma adaptação estrutural do citoesqueleto eritrocitário à depleção de ATP, com subsequente aumento do módulo elástico de cisalhamento. A redução do ATP globular repercute-se também numa maior fragilidade membranar e mudança progressiva de forma, observadas em eritrócitos conservados para transfusão nas condições-padrão de bancos de sangue. Experimentalmente, a depleção de ATP, assim como a forma e deformabilidade globular podem ser revertidas pela junção de adenosina ao meio.

A depleção de ATP em diversas deficiências congénitas da glicólise eritrocitária contribui para o encurtamento da vida média globular nas anemias hemolíticas que lhes estão associadas. O aumento da percentagem de hemoglobina desoxigenada (desoxiHb) globular a nível da perfusão circulatória em territórios de estagnação sanguínea ou de menor tensão tecidual de oxigénio, predispõe a uma maior fixação de ATP à desoxiHb e à previsível redução da deformabilidade eritrocitária.

Monóxido de azoto (NO) – O NO presente nos eritrócitos (que se admitia ter origem endotelial), era, até recentemente, relacionado com o estado de oxigenação da hemoglobina; a captação do NO pela oxi-hemoglobina era cerca de mil vezes mais rápida do que pela desoxi-hemoglobina, o que se deveria a ser maior a permeabilidade da membrana dos glóbulos com hemoglobina desoxigenada ao NO. A demonstração (na face interna da membrana eritrocitária e citoplasma) de uma isoforma endotelial da NO sintase (NOS), com funcionalidade própria nos eritrócitos, permitiu associar o seu produto a duas ações importantes: além de poder difundir para o plasma envolvente (aparentemente através da proteína banda 3) e contribuir para aumentar o fluxo sanguíneo nas arteríolas pré-capilares, o NO regula as atividades mecânicas globulares, com incidência na forma, deformabilidade e agregação de eritrócitos, modulando também as funções de leucócitos e plaquetas. À semelhança da isoforma endotelial, a atividade da NOS eritrocitária depende diretamente da concentração de Ca^{2+} e da sua fosforilação.

A modulação do comportamento reológico dos eritrócitos pelo NO, embora não completamente compreendido, parece depender do estado de oxigenação da hemoglobina; as transições oxigenação/desoxigenação podem afetar a reorganização da espectrina e dar origem a sinais de ativação/desativação com diversos efeitos a esclarecer, mas em que não se exclui o comportamento reológico globular; de facto, a deformabilidade globular, não só é favorecida pelo NO como é maior nos eritrócitos oxigenados do que

nos desoxigenados do mesmo dador, enquanto a oxi-hemoglobina afeta a interação com a membrana, a atividade enzimática e a concentração iónica intraglobular.

A desoxi-hemoglobina une-se ao domínio citoplásmico da proteína banda 3 transportadora aniónica, ligada ao citoesqueleto; por sua vez, esta proteína membrana intervém no mecanismo de ação da oxi-hemoglobina em várias funções eritrocitárias. Entre outros possíveis mecanismos, o NO poderá também interagir com o citoesqueleto membrana ou atuar indiretamente por oxidação de proteínas globulares.

(ii) Viscosidade

A *viscosidade intraglobular*, desprovida de comportamento elástico, é atribuível, essencialmente, à concentração e propriedades físico-químicas da hemoglobina. A concentração e estado da hemoglobina influenciam a deformabilidade eritrocitária, quer através de alterações da viscosidade interna, forma globular e ou formação de corpos de Heinz.

Cerca de 36 g/dL da CMHG* presentes nos eritrócitos normais correspondem aproximadamente à viscosidade de 7 mPas (mili-Pascal-segundo); o valor da η_i aumenta não-linearmente com a CMHG, quadruplicando a cerca de 40 g/dL.

Entre as alterações do citoplasma globular mais frequentes em patologia humana são de referir as que incidem no estado da hemoglobina, quer no seu todo ou em parte. Em determinadas hemoglobinopatias, como na drepanocitose, caracterizada pela presença de hemoglobina S (HbS), ou na doença homozigótica da hemoglobina C (HbC), a hemoglobina anormal tende a mudar para o estado gel ou a cristalizar, respetivamente, com aumento da rigidez globular, da viscosidade interna e menor vida média em circulação; em ambos os casos, a anomalia genética deriva da substituição, na posição 6 das cadeias de β -globina, de um único aminoácido (o ácido glutâmico pela valina na HbS, ou pela lisina, na HbC). Na drepanocitose, a hipoxia induz a conversão sol-gel das moléculas de HbS, que ao polimerizarem em fibras rígidas, provocam o estiramento dos glóbulos em formas semelhantes a foices, que lhe confere a designação de

* Concentração média de hemoglobina globular

anemia de células falciformes; o grande aumento da rigidez eritrocitária daí resultante é causa frequente (com particular relevância nos portadores homocigotos) de trombozes venosas e obstrução ou hemólise fácil nos trajetos mais estreitos da circulação sanguínea. Pelo contrário, na doença por HbC, não há polimerização da hemoglobina nos territórios vasculares em hipoxia, pelo que, apesar da menor deformabilidade eritrocitária e aumento da viscosidade interna (com CMHG mais elevada e formação de cristais), a hemólise e a anemia são discretas, decorrendo a doença sem episódios oclusivos periféricos associados.

Alterações heterogêneas da hemoglobina, presentes em outros tipos de hemoglobinopatia (talassémias e hemoglobinas instáveis) ou devidas a uma menor capacidade redutora intraglobular, também induzem menor deformabilidade e destruição prematura eritrocitária. Em qualquer das situações referidas, a integridade globular é afetada pela formação de precipitados de hemoglobina desnaturada (corpos de Heinz) (Fig.6) que, além de reduzirem a deformabilidade eritrocitária, tendem a aderir à superfície interna da membrana, onde criam zonas de rigidez suscetíveis a lise prematura nos sectores mais restritivos da circulação sanguínea.



Figura 6. Corpos de Heinz (condensações de cor carmim) em três dos eritrócitos de gato observados. Cortesia Wikimedia Commons (domínio público).

(c) Composição e propriedades viscoelásticas da membrana

As *propriedades reológicas* da membrana eritrocitária baseiam-se na estrutura, composição e propriedades biofísicas membranares. A membrana eritrocitária tem dois componentes principais: a dupla camada lipídica e o citoesqueleto; a parte lipídica forma uma estrutura bidimensional essencialmente composta por fosfolípidos, não compressível, muito resistente (viscosidade significativa) a alterações da sua área (local ou global) e baixa elasticidade de cisalhamento; a matriz proteica submembranar, que constitui o citoesqueleto contribui para a resistência elástica da membrana. Há evidência experimental de que a malha de espectrina que reveste a face interna da membrana eritrocitária é um dos principais determinantes da forma, integridade e deformabilidade globular. No conjunto eritrocitário, a membrana comporta-se como um sólido viscoelástico que delimita um líquido viscoso.

As alterações membranares conducentes a alterações da forma e deformabilidade eritrocitárias, comuns em numerosas situações patológicas, genéticas e adquiridas, incidem nas (i) proteínas (com particular incidência na redução ou polimerização de diversas componentes proteicas do citoesqueleto, reguladores, bombas iónicas e canais), (ii) lípidos (em que sobressai a perda de fluidez lipídica, sobretudo por modificação da relação colesterol/fosfolípidos ou redução da quantidade de ácidos gordos insaturados da fração fosfolipídica), e (iii) interações lípido-proteicas, que muito contribuem para o aumento da rigidez e perda da deformabilidade eritrocitária; diversos sinais intracelulares regulam as interações proteicas e as propriedades mecânicas membranares; a deformabilidade eritrocitária poderá ser também regulada pelo mecanismo enzimático de fosforilação/desfosforilação de diversas proteínas do citoesqueleto membranar

Aparentemente, a viscosidade interna globular e ou as interações da hemoglobina com as proteínas membranares têm maior importância na rigidificação e dificuldade do fluxo dos eritrócitos na rede capilar do que, somente, as alterações de membrana.

2. Factores externos determinantes da deformabilidade eritrocitária

A extensão, rapidez e modo de deformação dependem da grandeza, rapidez e direção do *vetor deformante*, numa inter-relação complexa e difícil de analisar somente por um parâmetro.

De acordo com observações em modelos experimentais, a resistência à curvatura afigura-se importante nas pequenas deformações, em particular no estado de repouso, enquanto a deformação uniaxial em eritrócitos com área superficial constante depende do seu módulo elástico. As alterações da forma eritrocitária que ocorrem em circulação são condicionadas pela relação entre a viscosidade da membrana e o módulo de cisalhamento (ou de rigidez), em que esta variável representa a razão entre a tensão de cisalhamento aplicada à membrana e a sua deformação específica. A resistência à extensão (rigidez dinâmica) é devida ao citoesqueleto. Como a resistência à curvatura oferece menos oposição à deformação do que a rigidez de extensão, os eritrócitos deformam-se facilmente e penetram nos pequenos capilares com uma pequena extensão da sua superfície membranar. Situações extremas de deformação globular próximas de pré-rotura globular são analisadas por outras variáveis de viscoelasticidade.

A forma globular representa um equilíbrio entre as forças viscosas externas (dependentes da velocidade de fluxo) e o comportamento elástico da membrana, ou seja, a forma depende da velocidade do fluxo; por sua vez, as modificações da forma globular alteram a resistência ao fluxo.

Na ausência de forças deformantes externas, o glóbulo vermelho evidenciam forma bicôncava (discoide) simétrica com um eixo; todavia, não se pode excluir que a forma esteja sujeita a forças deformantes intraglobulares. Na circulação capilar, os eritrócitos apresentam-se coaxiais e com alguma assimetria; nos capilares de diâmetro inferior a $7\mu\text{m}$, os capilares dispõem-se em fila única, enquanto nos capilares com diâmetro superior podem dispor-se em sobreposição relativa; em qualquer dos casos, os glóbulos apresentam-se, no sentido do fluxo sanguíneo, com formas semelhantes a paraquedas com a convexidade para diante e uma concavidade terminal (exceto nos capilares com $3\mu\text{m}$, em que se apresenta convexa); à me-

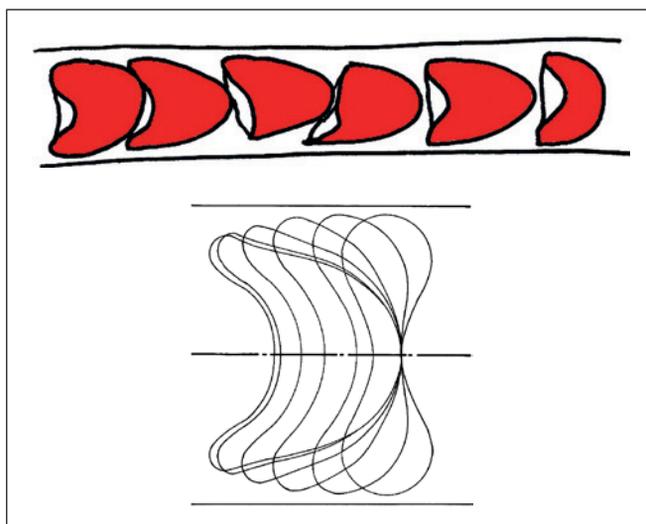


Figura 7. (A) Representação esquemática do trânsito eritrocitário num capilar com diâmetro inferior a $7\mu\text{m}$, baseada em fotomicrografias de Skalak e Branemark; (B) Perfil da deformação globular à medida que diminui o diâmetro capilar no sentido do fluxo (seta), de acordo com Gaegtgens e Cols (1980) e Secomb (1991).

didada que o diâmetro tubular fica mais estreito, a forma globular alonga-se progressivamente, assemelhando-se à de uma bala (Fig. 7). A assimetria globular não influencia significativamente a resistência ao fluxo.

Os glóbulos vermelhos exibem dois tipos de comportamento cinemático no fluxo sanguíneo: (a) comportamento de corpo rígido, em movimentação casual ou rotação, e ou (b) orientação estável e comportamento semelhante ao de uma gota líquida, com movimentação da membrana em torno do conteúdo globular (Fig.8); a mudança do primeiro estado para o segundo depende da rigidez eritrocitária coexistente, pelo que a tensão de cisalhamento incidente na superfície globular tem de exceder a resistência elástica da membrana para que a deformação elipsoide ocorra. Acima do limiar requerido para a tensão de cisalhamento (superior a $1,0\text{ Pa}$, o que se verifica em vasos de grandes e pequenas dimensões, com diâmetro aproximadamente igual ou superior a $11\mu\text{m}$) começa o movimento rotativo da membrana; esta rotação transmite-se ao conteúdo globular, em que se inclui o movimento de corpos de Heinz inclusos que não estejam aderentes à membrana, a par com progressivo alongamento elipsoide dos eritrócitos, ambos proporcionais ao cisalhamento aplicado. A deformação, orientação e rotação de membrana globular observam-se igualmente em capilares com 4 a $14\mu\text{m}$. Contudo,

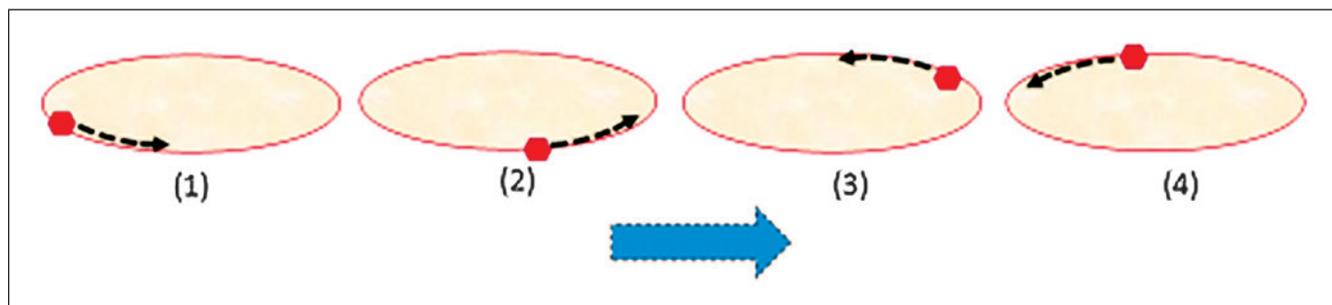


Figura 8. Esquema de um único eritrócito na corrente sanguínea (a seta indica o sentido do fluxo), sob determinada relação de cisalhamento, que lhe induz deformação elipsoide, alongamento e orientação axial, analisados em 4 períodos sucessivos (1 a 4). A condensação a vermelho posiciona um dado ponto da superfície externa da membrana que, em cada tempo muda de posição, simulando um movimento de rotação (indicado por setas a tracejado) semelhante ao da corrente de um trator. (Segundo as observações de H. Schmid-Schonbein, 1980).

não parece que a rotação da membrana influencie significativamente a resistência ao fluxo de uma coluna simples ou dupla de eritrócitos em capilares com 5 a 7 μm de diâmetro.

A deformação elipsoide provocada em cada glóbulo, particularmente evidente em vasos com diâmetro inferior a 300 μm , é não só uma função da relação de cisalhamento como, também, da viscosidade externa do meio (η_0). Numa solução celular concentrada, a relação de cisalhamento em cada superfície globular difere da que se verifica em toda a suspensão, pois que a concentração impede a participação do interior globular naquela variável; o aumento da viscosidade do meio externo induz um efeito muito maior na deformabilidade globular do que o produzido pelo acréscimo da relação de cisalhamento, porque, ao induzir a rotação da membrana eritrocitária, o interior globular comporta-se mais como um fluido com maior participação no fluxo, ou seja, a viscosidade aparente diminui. Em concentrações globulares muito concentradas, a interação intercelular equivale a um aumento da η_0 , com subsequente indução de deformabilidade eritrocitária. Pelo exposto, conclui-se que a eficácia da força de cisalhamento deformante é condicionada pela concentração eritrocitária e pela viscosidade do meio.

A tensão mecânica exercida nos glóbulos pode provocar a disrupção membranar e favorecer fluxos iônicos transmembranares; em níveis fisiológicos, a tensão incidente aumenta a permeabilidade membranar para os cátions monovalentes e Ca^{2+} . A repercussão da tensão mecânica nos eritrócitos tende a ser protegida por sinais celulares mediados por mecanismos dependentes do NO e Ca^{2+} e da fosforilação de resíduos de tirosina.

Agregação eritrocitária

Além de comportamento próprio em circulação, os eritrócitos, assim como os leucócitos e plaquetas, também participam em *reações de agregação e adesão* que podem afetar a circulação sanguínea. A *agregação* pode depender de causas intrínsecas e extrínsecas (meio de suspensão); se refletir unicamente efeitos globulares é designada por *agregabilidade*; quer a agregação quer a agregabilidade tendem a aumentar em numerosas situações patológicas.

A agregação eritrocitária acontece quando a força agregante que resulta a união entre eritrócitos adjacentes excede as forças desagregantes, representadas por cargas electrostáticas repulsivas entre os glóbulos e pela tensão de cisalhamento a que estão submetidos. Embora estejam descritas várias hipóteses, o mecanismo molecular da agregação eritrocitária ainda não está completamente esclarecido. Atualmente são conhecidos dois modelos opostos, um baseado na formação de pontes de união entre os eritrócitos, mediadas por macroproteínas plasmáticas (modelo mais seguido), enquanto o outro (modelo de depleção) propõe o contrário, ou seja, a atracção entre os eritrócitos dever-se-ia à exclusão de macromoléculas proteicas próximas da superfície de glóbulos adjacentes, dando lugar, por depleção, a gradiente osmótico e forças atrativas. Este modelo não será aqui considerado.

DE acordo com o modelo de pontes de união os eritrócitos normais agregam-se entre si sob a forma de rolhões lineares e reversíveis, semelhantes a pilhas de moedas (Fig.9), desde que a tensão de cisalhamento seja inferior a 0,05 Pa e, em particular, na presença de fibrinogénio e de outras macroproteínas fibrosas

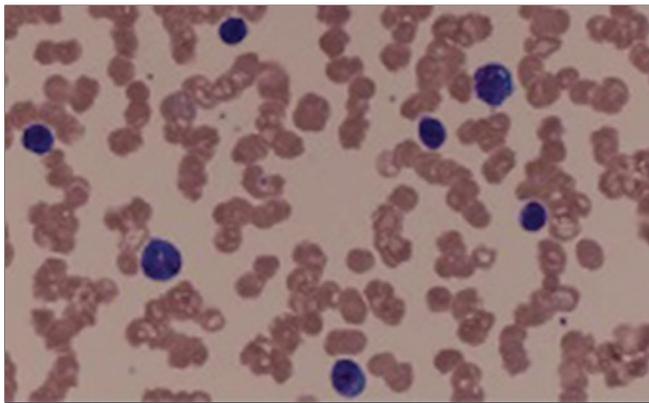


Figura 9. Rolhões eritrocitários e um linfócito, em esfregaço de sangue periférico. Cortesia de Michail Charakidis, David Joseph Russell, Wikimedia Commons.

do plasma, como a α_2 -macroglobulina e as imunoglobulina G e M. Nestas condições, a par da redução da rotação de membrana e do aumento da viscosidade de sanguínea, a dispersão globular fluida (que é habitual no fluxo sanguíneo sob valores elevados da pressão de perfusão) torna-se concentrada e, por vezes, reticulada, devido à adsorção e pontes de união molecular fracas que se estabelecem entre as macromoléculas proteicas plasmáticas e os eritrócitos; neste mecanismo, mais aceite, as macromoléculas proteicas têm de ser suficientemente extensas para que uma das suas extremidades seja adsorvida na superfície de um dos eritrócitos, enquanto a outra extremidade se liga a um eritrócito adjacente; a distância da ligação deve ser suficientemente longa para minimizar a repulsão electrostática entre as cargas negativas, atribuíveis aos resíduos de ácido siálico de glicoproteínas membranares, nos eritrócitos em contacto; adicionalmente, as ligações estabelecidas tendem a aproximar as áreas adjacentes dos eritrócitos unidos, possibilitando a formação de pontes adicionais numa área de contacto alargada; admite-se a possibilidade de a agregação eritrocitária incluir a participação adicional de proteínas de baixo peso molecular (p. ex., albumina, que se fixam à membrana globular mas não estabelecem pontes de união com eritrócitos adjacentes, ainda que possam acelerar, inibir ou estabilizar a formação de pontes pelas macromoléculas.

A energia total da agregação será maior quando a área de contacto entre os eritrócitos é máxima, como sucede quando os glóbulos atingem o limite possível da deformabilidade favorável ao contacto inter-eritro-

citário pela superfície mais extensa. Se a energia de adesão superar a da absorção das macromoléculas, induzindo grandes deformações eritrocitárias que minimizam o seu contacto face-face, prevalece a formação de agregados eritrocitários simétricos e persistentes, característicos de numerosas situações patológicas e que explicam o aumento da velocidade de sedimentação globular evidenciada. A agregação eritrocitária, é tanto mais acentuada quanto maior for o hematócrito e a concentração de macroglobulinas no plasma, sendo particularmente importante em situações que produzem reagentes de fase aguda, como em doenças inflamatórias crónicas, cancerosas e circulatórias diversas.

A agregação eritrocitária induz um aumento da viscosidade sanguínea sob tensão baixa de cisalhamento, mas não provoca praticamente nenhum efeito a valores elevados.

Devida à reversibilidade que os caracteriza, quando o fluxo sanguíneo aumenta os rolhões eritrocitários desagregam-se e, vice-versa, regeneram-se quando a pressão de perfusão diminui. Em vasos sanguíneos ou em tubos com 30 a 100 μm de diâmetro, os rolhões e outros eritrócitos tendem a migrar para o centro, afastando-se das paredes, ao mesmo tempo que induzem a exclusão das plaquetas e leucócitos (em particular, os granulócitos) do centro para a periferia tubular. A acumulação axial de eritrócitos na microcirculação reduz o hematócrito e a viscosidade junto às paredes vasculares, do que resulta uma *menor resistência ao fluxo de perfusão*. Este fenómeno representa o principal mecanismo do designado *efeito Fahraeus* (redução do hematócrito tubular ou vascular quando o respetivo diâmetro diminui abaixo de 500 μm). A marginação leucocitária é particularmente importante para a sua adesão às paredes vasculares e subsequente migração para os tecidos envolventes. Por sua vez, a exposição das plaquetas à relação de cisalhamento elevada adjacente às paredes vasculares, aumenta a sua ativação; havendo maior tendência para a formação de rolhões eritrocitários, torna-se maior, também, risco de coagulação local.

Todavia, a agregação eritrocitária na microcirculação pode piorar a perfusão sanguínea local. Assim, a formação de agregados eritrocitários na vertente arterial da circulação requer que sejam previamente desagregados de modo a que os eritrócitos isolados

atravessem os capilares; o custo energético adicional daquela desagregação contribui para *aumentar a resistência ao fluxo na microcirculação*. Nos territórios de baixa pressão, a formação de agregados eritrocitários não só acentua a viscosidade sanguínea como pode agravar as condições circulatórias a jusante, justificando episódios de maior lentidão circulatória, estase sanguínea e formação local de coágulos e trombos, em particular nas bolsas valvulares venosas. A formação de agregados eritrocitários nas vénulas pós-capilares, ao induzir a queda da pressão venosa associa-se à dissipação da energia na vertente venosa.

Ainda que em circunstâncias fisiológicas os eventuais obstáculos à circulação sanguínea criados pelos agregados eritrocitários sejam ultrapassados pelo aumento da pressão de perfusão e pela regulação da resistência periférica (a nível do tónus dos vasos de resistência e do número de vasos perfundidos), o mesmo poderá não suceder quando existem limitações circulatórias. Nestas condições, a manutenção de um fluxo lento local, acentuará a formação de rolhões e, em consequência, também o valor da viscosidade sanguínea, instalando um

círculo vicioso de agravamento progressivo. Ainda que seja admissível a existência de um vínculo causal entre a agregação eritrocitária e as complicações à circulação, não se pode excluir que estas também contribuam para uma maior formação dos rolhões globulares.

O aumento da agregação eritrocitária pode ainda predispor para alterações da função endotelial, incluindo a depressão da síntese da NO, com subsequente aumento do risco trombótico.

Embora com algumas limitações (forma esferocítica, menor deformabilidade e manutenção da carga superficial negativa), os eritrócitos envelhecidos têm maior força agregante, atribuível a uma progressiva modificação da composição e estrutura membranar que se reflete na formação de rolhões extensos.

Além dos rolhões, os eritrócitos podem formar outros tipos de agregados através de ligações mais fortes com constituintes específicos de outras substâncias em circulação (p.ex., anticorpos e adesinas bacterianas). A dimensão, simetria e rigidez destes agregados, assim como a viscosidade sanguínea, tendem a aumentar com o tempo de cisalhamento.

REFERÊNCIAS

- Barshtein G¹, Ben-Ami R, Yedgar S. Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5:743-52.
- Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell. Physiol. Biochem* 2005;15:1–18.
- Baskurt OK, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;53:23-37
- Baskurt OK¹, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29:435-50.
- Bor-Kucukatay M¹, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H1577-84.
- Brain MC, Pihl C, Robertson L, Brown CB. Evidence for a mechanosensitive calcium influx into red cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2004; 32:349-52.
- Brooks DE, Evans EA. Rheology of blood cells. In: “Clinical Hemorheology”, S. Chien, J. Dormandy, E. Ernst, A. Matrai (Eds) Dordrecht- Boston – Lancaster: Martinus Nighoff Pubs, 1987, pp.73-96.
- Chien S, Sung LP. Molecular basis of red cell membrane rheology. Part 1. *Biorheology.* 1990;27:327-44.
- Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:177-92.
- Cokelet GR, Goldsmith HL. Decreased hydrodynamic resistance in the two phase flow through small vertical tubes at low flow rates. *Circ Res.* 1991;68: 1-17.
- Cokelet G. “Hemorheology and Hemodynamics”. *Colloquium Series of Integrated Systems Physiology: From Molecules to Function.* D. Neil Granger, <http://www.morganclaypool.com/page/granger> (Series Eds), New Jersey : Morgan and Claypool, Pubs, 2011; 3:1-140.
- Evans EA. Structure and deformation properties of red blood cells: concepts and quantitative methods. *Methods Enzymol.* 1989;173:3-35.
- Fedosov DA, Noguchi H, Gompper G. Multiscale modeling of blood flow: from single cells to blood rheology. *Biomech Model Mechanobiol.* 2014;13:239-58.
- Forconi S, Gori T. Endothelium and hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;53:3-10.
- Gaegtens P, Dührssen C, Albrecht KH. Motion, deformation, and interaction of blood cells and plasma during flow through narrow capillary tubes. *Blood Cells.* 1980;6:799-817.
- Goldsmith HI, Marlo J. Flow behaviour of erythrocytes. I. Rotation and deformation in dilute suspensions. *Proc Roy Soc Lond B.* 1971; 182: 351-84.
- Harkness J. The viscosity of human blood plasma: its measurement in health and disease. *Bioreology* 1971; 8: 171-193.
- Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyan B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 2006;107:2943-51.
- Kretschman JM, Rogers BS. Erythrocyte shape transformation associated with calcium accumulation. *Am J Med Technol.* 1981;47:561-6.
- Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 2005;12:5-15.
- Maeda N, Shiga T. Red cell aggregation, due to interactions with plasma. *J Blood Rheology.* 1993; 7:3-12.

- Marikovsky Y. The cytoskeleton in ATP-depleted erythrocytes: the effect of shape transformation. *Mech Ageing Dev.* 1996; 86:137-44.
- Mesquita R, Pires I, Saldanha C, Martins-Silva J. Effects of acetylcholine and spermineNONOate on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2001;25:153-63.
- Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, Shohet SB. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J Clin Invest.* 1980;66:563-73.
- Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1994;23:787-818.
- Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol.* 2014;5:84-90.
- Muravyov A, Tikhomirova I. Role Ca²⁺ in mechanisms of the red blood cells microrheological changes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:1017-38.
- Pries AR, Secomb TW, Gaetgens P. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996;32:654-67.
- Rampling MW. Red cell aggregation as a risk factor for thrombosis. *Rev Port Hemorreol.* 1991; 5: 39-47.
- Schmid-Schonbein H, Testel P, Kiesewetter H, Wetter TH. Towards a unified theory in Hemorheology. In: "Hemorheology and Diseases", First European Conference on Clinical Hemorheology, JF Stoltz, P Drouin (eds), Nancy, 17-19 Oct., 1979. Paris: Doin Editeurs, 1980.
- Schmid-Schonbein H. Blood rheology and physiology of microcirculation. *Ric Clin Lab.* 1981;11 Suppl 1:13-33.
- Secomb TW. Red blood cell mechanics and capillary rheology. *Cell Biophys* 199; 18: 231-51.
- Simmonds MJ, Meiselman HJ, Baskurt OK. Blood rheology and aging. *J Geriatr Cardiol.* 2013;10:291-301.
- Simmonds MJ, Detterich JA, Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology.* 2014;51:121-34.
- Skalak R, Branemark PI. Deformation of red blood cells in capillaries. *Science.* 1969;164:717-9.
- Soldati, L., Spaventa, R., Vezzoli, G., Zerbi, S., Adamo, D., Caumo, A., Rivera, R., Bianchi, G. Characterization of voltage-dependent calcium influx in human erythrocytes by fura-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;236: 549-54.
- Svetina S. Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure. *Cell Mol Biol Lett.* 2012;17:171-81.
- Thurston GB. Effects of hematocrit on blood viscoelasticity and in establishing normal values. *Biorheology* 1978; 15: 239-49.
- Thurston GB. Viscoelastic properties of blood and blood analogs. In: "Avances in Haemodynamics and Haemorheology", Vol. I, TV How (ed), Greenwich, Connecticut: JAI Press Inc, 1996; pp. 1-34.
- Uyklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide. *Nitric Oxide.* 2009;21:20-6.
- Weed RI. The importance of erythrocyte deformability. *Am J Med.* 1970; 49:147-50.
- Wells RE Jr, Merrill EW. Influence of flow properties of blood upon viscosity-hematocrit relationships. *J Clin Invest.* 1962;41:1591-8.
- Whittaker SR, Winton FR. The apparent viscosity of blood flowing in the isolated hindlimb of the dog, and its variation with corpuscular concentration. *J Physiol.* 1933;78:339-69.
- Viallat A, Abkarian M. Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *Int J Lab Hematol.* 2014 ;36:237-43.

ROLE OF HIGH SHEAR RATE IN THROMBOSIS

Casa LD*, Deaton DH, Ku DN

Abstract

Acute arterial occlusions occur in high shear rate hemodynamic conditions. Arterial thrombi are platelet-rich when examined histologically compared with red blood cells in venous thrombi. Prior studies of platelet biology were not capable of accounting for the rapid kinetics and bond strengths necessary to produce occlusive thrombus under these conditions where the stasis condition of the Virchow triad is so noticeably absent. Recent experiments elucidate the unique pathway and kinetics of platelet aggregation that produce arterial occlusion. Large thrombi form from local release and conformational changes in von Willebrand factor under very high shear rates. The effect of high shear hemodynamics on thrombus growth has profound implications for the understanding of all acute thrombotic cardiovascular events as well as for vascular reconstructive techniques and vascular device design, testing, and clinical performance. [**J Vasc Surg.** 2015 Apr;61(4):1068-80.] PMID: 25704412

* George W. Woodruff School of Mechanical Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Ga; Endologix, Inc, Irvine, Calif.; david.ku@me.gatech.edu.

THE EFFECTS OF ARTERIAL FLOW ON PLATELET ACTIVATION, THROMBUS GROWTH, AND STABILIZATION

Cosemans JM*, Angelillo-Scherrer A, Mattheij NJ, Heemskerk JW

Abstract

Injury of an arterial vessel wall acutely triggers a multifaceted process of thrombus formation, which is dictated by the high-shear flow conditions in the artery. In this overview, we describe how the classical concept of arterial thrombus formation and vascular occlusion, driven by platelet activation and fibrin formation, can be extended and fine-tuned. This has become possible because of recent insight into the mechanisms of: (i) platelet-vessel wall and platelet-platelet communication, (ii) autocrine platelet activation, and (iii) platelet-coagulation interactions, in relation to blood flow dynamics. We list over 40 studies with genetically modified mice showing a role of platelet and plasma proteins in the control of thrombus stability after vascular injury. These include multiple platelet adhesive receptors and other junctional molecules, components of the ADP receptor signalling cascade to integrin activation, proteins controlling platelet shape, and autocrine activation processes, as well as multiple plasma proteins binding to platelets and proteins of the intrinsic coagulation cascade. Regulatory roles herein of the endothelium and other blood cells are recapitulated as well. Patient studies support the contribution of platelet- and coagulation activation in the regulation of thrombus stability. Analysis of the factors determining flow-dependent thrombus stabilization and embolus formation in mice will help to understand the regulation of this process in human arterial disease [**Cardiovasc Res. 2013 Jul 15;99(2):342-52**]. PMID: 23667186

* Department of Biochemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht , Maastricht University, PO Box 616, Maastricht 6200 MD, The Netherlands.

BIOLOGICAL RESPONSES IN STENTED ARTERIES

Chaabane C*, Otsuka F, Virmani R, Bochaton-Piallat ML

Abstract

Vascular walls change their dimension and mechanical properties in response to injury such as balloon angioplasty and endovascular stent implantation. Placement of bare metal stents induces neointimal proliferation/restenosis which progresses through different phases of repair with time involving a cascade of cellular reactions. These phases just like wound healing comprise distinct steps consisting of thrombosis, inflammation, proliferation, and migration followed by remodelling. It is noteworthy that animals show a rapid progression of healing after stent deployment compared with man. During stenting, endothelial cells are partially to completely destroyed or crushed along with medial wall injury and stretching promoting activation of platelets, and thrombus formation accompanied by inflammatory reaction. Macrophages and platelets play a central role through the release of cytokines and growth factors that induce vascular smooth muscle cell accumulation within the intima. Smooth muscle cells undergo complex phenotypic changes including migration and proliferation from the media towards the intima, and transition from a contractile to a synthetic phenotype; the molecular mechanisms responsible for this change are highlighted in this review. Since studies in animals and man show that smooth muscle cells play a dominant role in restenosis, drugs like rapamycin and paclitaxel have been coated on stent with polymers to allow local slow release of drugs, which have resulted in dramatic reduction of restenosis that was once the Achilles' heel of interventional cardiologists. [Cardiovasc Res. 2013 Jul 15;99(2):353-63] PMID: 23667187

* Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Geneva, Rue Michel Servet -1, 1211 Geneva 4, Switzerland.



5th Eurosummer School on Biorheology &
Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and System
Varna, Bulgaria, September 1st - September 5th, 2015



■ Realizou-se em Varna na Bulgária de 1 a 5 de Setembro o “5th EuroSummer School on Biorheology & Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cell, Tissues and System “. Carlota Saldanha integrou a “International Advisory Committee”. Apresentou a lição intitulada “Hemorheology and Microcirculation” e co-moderou a Session 6. “Cell interaction and adhesion”.

“Hemorheology and Inflammation”

Carlota Saldanha¹, Ana Silva-Herdade¹

¹ Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina Universidade de Lisboa
Av. Professor Egas Moniz 1649-028
carlotasaldanha@fm.ul.pt

Abstract

A review about (i) blood and vessels composition, properties and functions, (ii) hemorheology meaning (iii) microcirculation network properties and functions will be present.

The role of endothelial cell in physiological conditions and its participation in inflammation will be described.

Inflammatory mediators, namely pro and anti-inflammatory one will be mentioned in its interaction with erythrocyte, leukocytes and platelets. Erythrocyte as a source and a target of inflammation through oxygen and nitrogen reactive species will be highlight

Clinical evidence between the interplay of hemorheology and inflammation will be review.

■ Realizou-se em Lisboa de 9 a 12 de Setembro o “Liac Meeting on Vascular Research”. Carlota Saldanha apresentou a comunicação intitulada “Hemorheology and Vascular Diseases”

“Hemorheology and Vascular Diseases”

Carlota Saldanha¹, Ana Silva-Herdade¹, Patricia Napoleão¹

¹ Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina Universidade de Lisboa
Av. Professor Egas Moniz 1649-028
carlotasaldanha@fm.ul.pt

Abstract

A review about (i) blood and vessels composition, properties and functions, (ii) hemorheology and (iii) inflammation meaning will be present.

Clinical evidence between the interplay of hemorheology and micro and macro vascular diseases will be review.

Nota: O conteúdo destas Notícias teve o apoio
da Fundação para a Ciência e Tecnologia

FCT
Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

CONVITE

A Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação (SPHM) aceita para publicação no seu BOLETIM artigos de curta extensão. O Boletim é editado duas vezes por ano em formato electrónico (www.hemorreologia.com).

INSTRUÇÕES

1. Todos os textos enviados para publicação estão sujeitos a apreciação editorial e aprovação. A decisão é baseada no mérito científico e cultural dos trabalhos.
 2. São aceites somente os trabalhos preparados em versão *PDF* ou *Microsoft Word*.
 3. Os textos devem ser redigidos em Português ou Inglês.
 4. Os manuscritos com o pedido de publicação devem ser enviados por *e-mail* ao Editor (carlotasaldanha@fm.ul.pt).
- Comunicações Originais (artigos curtos) – Os textos serão considerado para publicação rápida, com a seguinte estrutura: Sumário (50-70 palavras), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões. O(s) autor(es) são estimulados a englobar em conjunto os resultados, discussão e conclusões.
(Extensão máxima do texto: 5 a 6 páginas a um espaço (letra de corpo 11), incluindo figuras, tabelas e quadros (e respetivas legendas), agradecimentos e até 30 referências bibliográficas).
 - Artigos de Revisão – O BOLETIM terá a maior satisfação em acolher curtas revisões sobre assuntos de particular interesse, no âmbito da Hemorreologia, Microcirculação ou assuntos de âmbito médico ou de outras áreas científicas afins, que sejam submetidos diretamente para publicação ou mediante convite especial do Editor.
(Extensão máxima do texto: 8 a 10 páginas (letra de corpo 11) incluindo figuras, tabelas, quadros, fotos (e respetivas legendas), agradecimentos e até 60 referências bibliográficas).

INVITATION

The Portuguese Society on Hemorheology and Microcirculation (Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação, SPHM) is pleased to welcome short papers for publication in its BOLETIM. This online publication (www.hemorreologia.com), is distributed two times a year.

INSTRUCTIONS

1. All submitted manuscripts are subjected to editorial review and approval. The decision to publish is dependent on the scientific and cultural merit of the papers.
 2. Only contributions prepared and submitted as *PDF* or *Microsoft Word* will be accepted.
 3. Texts must be written in Portuguese or in English.
 4. All scientific contributions, including manuscript submission and further correspondence should be addressed by *email* to the Editor (carlotasaldanha@fm.ul.pt)
- Original Communications – Manuscripts may be considered for rapid processing as short communications. All manuscripts should be arranged in the following sections: Abstract (50-70 words), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. The author(s) may combine some of the sections normally included in a full paper, namely the results, discussion and conclusions.
(Maximum communication length – 5-6 single spaced typed pages, including figures, tables, legends, acknowledgments and up to 30 references).
 - Short Reviews – The BOLETIM will publish reviews on subjects of particular interest in its field, either following a special invitation or a submission by the author, and in the latter case only after approval by an Editorial Board member. Further information can be obtained from the editor.
(Maximum review length – 8-10 full pages, including figures, tables, photos, legends, acknowledgments and up to 60 references)



CIÊNCIA&VIDA
P U B L I C A Ç Õ E S

29 ANOS

A PUBLICAR O QUE A CIÊNCIA NOS DITA

Centro Empresarial de Famões, Fracção BO 1685 - 253 Famões
Tel. 21 478 78 50 Fax 21 478 78 59 E-mail: pubcienciaevida@sapo.pt