

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

HELENA CORDEIRO BARROSO

INFLUÊNCIA DO NEBIVOLOL SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES HIPERTENSOS

ARAÇATUBA

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

HELENA CORDEIRO BARROSO

INFLUÊNCIA DO NEBIVOLOL SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES HIPERTENSOS

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Professora Dr^a Cristina Antoniali Silva

ARAÇATUBA

2017

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B277i Barroso, Helena Cordeiro.
Influência do Nebivolol sobre o estresse oxidativo em
pacientes hipertensos / Helena Cordeiro Barroso. - Araçatuba,
2017
72 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Nebivolol 2. Estresse oxidativo 3. Hipertensão 4. Huma-
nos I. Título

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 21 de maio de 1963

Filiação: Maria Maura Cordeiro Barroso
Euclides Barroso Filho

1981-1986: Curso de Graduação em Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – MG.

1987-1988: Residência em Clínica Médica pela UFJF- MG.

1989-1990: Residência em Cardiologia pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) São Paulo – SP.

1991: Residência em Eletrofisiologia Cardíaca pelo IDPC.

2014-2015: Especialização em Eletrocardiografia Avançada pelo Instituto Internacional de Cardiologia de la Universidad Católica San Antonio de Murcia – Espanha.

2015-2016: Especialização em Preceptoria de Residência Médica pelo SUS pelo Instituto Sírio Libanês de Ensino e Pesquisa, São Paulo – SP.

2015-2017: Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Modalidade Mestrado Acadêmico, pelo Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, pela Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedico este trabalho aos meus pais, Euclides e Maura, aos meus irmãos Helder e Marcelo, ao meu companheiro de vida e melhor amigo Anderson, aos meus filhos, fonte de inspiração, Lais, Vinicius e Igor, por sempre serem a minha base e o meu conforto, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem, e a minhas irmãs de fé, Débora e Ivete, por serem os meus braços e torcerem por mim sempre. Amo vocês eternamente, minha família!

AGRADECIMENTOS

A Deus que é a minha força maior, sou eternamente grata por todas as bênçãos alcançadas.

A professora Cristina Antoniali Silva, minha orientadora, e muitas vezes mais do que isso, minha amiga, minha irmã. Agradeço imensamente pela orientação, incentivo, dedicação, paciência e principalmente pela amizade.

Ao grupo de pesquisa da professora Cristina: Simone Potje, Murilo Graton, Jéssica Troiano, Luiz Natali e Priscila Vieira.

A professora Ana Cláudia Nakamune e a Mestranda Lilian Xavier.

Aos professores do departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, Sandra, Bedran, Ana Cláudia, Rita, Antônio, João e Dóris pela ajuda, colaboração e aprendizado durante esta jornada.

Aos funcionários da FOA-UNESP, pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FOA, Ana Claudia, Ana Paula, Maria Claudia, Denise e Luiz.

As funcionárias da seção de pós-graduação, Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro à pesquisa (proc. no. 2012/20398-6) .

A UNESP (Universidade Estadual Paulista) pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado.

Aos amigos e colegas do Departamento de Ciências Básicas: Simone, Murilo, Jéssica e Lilian.

Aos professores Dr Francisco Leydson Formiga Feitosa e Dra Silmeia Garcia Zanati Bazan que, de forma carinhosa, profissional e meticulosa, transformaram a atmosfera do dia “D”, em algo grandioso, espetacular...

Respeitosamente agradeço a cada paciente que, pelo bem da ciência e senso de fraternidade, participou desta pesquisa clínica. Sem a ação voluntária destes seres humanos abnegados, não atingiríamos o progresso científico que atualmente vislumbramos.

.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Endotélio Vascular	20
1.2	Disfunção endotelial.....	20
1.3	Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	22
1.4	Tratamento da HAS: Antagonistas de receptores β -adrenérgicos	23
1.5	O Nebivolol.....	24
2	HIPÓTESE.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Classificação dos grupos: pacientes não tratados e tratados com NEB	34
4.2	Medidas de IMC e CA	35
4.3	Medidas de PA.....	35
4.4	Medida dos parâmetros eletrocardiográficos	36
4.5	Medidas de parâmetros bioquímicos plasmáticos.....	36
4.6	Coleta das amostras de saliva	36
4.7	Processamento das amostras de saliva dos pacientes.....	37
4.8	Análise da Capacidade Antioxidante Total (CAT) pelo Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) na saliva dos pacientes	37
4.9	Análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) na saliva dos pacientes.....	37
4.10	Dosagem de ácido úrico na saliva dos pacientes	38
4.11	Análise estatística	38
5	RESULTADOS	40
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

% – porcentagem

°C – graus Celsius

μ – micro

μg – micrograma

μL – microlitro

μmol/L – micromol por litro

ACh – acetilcolina, clorato de acetilcolina

ABESO – Associação Brasileira para Estudos da Obesidade

ADMA – dimetilarginina assimétrica

Ang II – angiotensina II

ATP – Trifosfato de adenosina

AU – ácido úrico

AVC – Acidente vascular cerebral

BH₄ – Tetrahidrobiopterina

bpm – batimentos por minuto

CA – circunferência abdominal

Ca²⁺ – íon cálcio

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CaCl₂ – cloreto de cálcio

Ca-M – calmodulina

CAT – catalase

CCV – Continuum Cardiovascular

CEP – Conselho de ética em pesquisa

CIMS – Canais iônicos mecanossensíveis

cm – centímetro

COX – ciclooxigenase

CRM – Conselho Regional de Medicina de Estado de São Paulo

CT – Colesterol total

DE – disfunção endotelial

DCV – doença cardiovascular

DNA – ácido dextrorribonucléico
DM – diabetes mellitus
D-nebivolol – isômero dextrógiro
ECG – eletrocardiograma de repouso
EDCF – endothelium derived contractiling factor
EDRF – Endotelium derived relaxing factor
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial ou isoforma III (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*)
EO – estresse oxidativo
EPM – erro padrão da média
ERN – espécies reativas de nitrogênio
ERO – espécies reativas de oxigênio
ET1 – endotelina 1
FAD - flavina adenina dinucleotídeo
FC – frequência cardíaca
Fe – ferro
Fe⁺³TPTZ – complexo férrico tripidiltriazina
FeCl₃.H₂O – cloreto de ferro hidratado
FMN - flavina adenina mononucleotídeo
FRAP – Ferric reducing antioxidant power
GCs – guanilato ciclase solúvel
GMPc – guanosina monofosfato cíclico
GPx – glutathione peroxidase
h – hora
HAS – hipertensão arterial sistêmica
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCB – Helena Cordeiro Barroso
HDL- Colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade
HCl – ácido clorídrico
HW – Heartware
IAM - infarto agudo do miocárdio
IDF – International Diabetes Federation
IMC – índice de massa corporal
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

Kg – quilograma
LDL - colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade
L-nebivolol – isômero levógiro (L-nebivolol)
mg – miligrama
mL – mililitro
MLV – músculo liso vascular
mm – milímetro
mmHg – milímetros de mercúrio
mmol/L – milimol por litro
mol/L – mol por litro
ms- milissegundos
Neb – nebivolol (alfa, alfa-[iminodimethylene] bis[6-fluoro-2-chrommethanol])
nmol/L – nanomol por litro
NO – óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)
NOS – sintase de óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide synthase*)
NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase não fagocítica
NT – pacientes não tratados
 O_2^- – ânion superóxido
 O_2 – oxigênio molecular
OH – radical hidroxila
 $ONOO^-$ - peroxinitrito
PA – pressão arterial
PAD – pressão arterial diastólica
PAM – pressão arterial média
PAS – pressão arterial sistólica
 PGH_2 – prostaglandina H_2
 PGI_2 – prostaciclina
pH – potencial hidrogeniônico
RA – receptores adrenérgicos
rpm – rotações por minutos
SNS – sistema nervoso simpático
SOD – superóxido dismutase
T – pacientes tratados

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive species*)

Tempol – 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil

TG – triglicérides

U – unidade

UE – unidades enzimáticas

α – alfa

β – beta

β B – β -bloqueador

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Possível mecanismo de aumento da biodisponibilidade de NO causado pelo Nebivolol. 25
- Figura 2 - Valores, em mmHg, de pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 42
- Figura 3 – Valores, em batimentos por minuto (bpm), de Frequência cardíaca total (A), maior ou igual a 80 (B) e menor a 80 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 43
- Figura 4 - Valores, em mg/dL, de Creatinina (A), maior ou igual a 1 (B) e menor a 1 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 45
- Figura 5 - Valores, em mg/dL, de Glicemia (A), maior ou igual a 100 (B) e menor a 100 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 46
- Figura 6 – Valores, em mg/dL, de Colesterol total (A), maior ou igual a 200 (B) e menor a 200 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 47

- Figura 7 – Valores, em mg/dL, de LDL (colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade) (A), maior a 100 (B) e menor ou igual a 100 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 48
- Figura 8 – Valores, em mg/dL, de Ácido úrico (A), maior a ou igual 6 (B) e menor a 6 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 49
- Figura 9 – Valores, em mg/dL, de Triglicérides (A), maior a 150 (B) e menor ou igual a 150 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 50
- Figura 10 – Valores, em mg/dL, de HDL (colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade) (A), maior ou igual a 40 (B) e menor a 40 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 51
- Figura 11 – Valores, em milissegundos, do Intervalo PR do exame eletrocardiográfico de repouso (A), maior ou igual a 160 (B) e menor a 160 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 53
- Figura 12 – Valores, em milissegundos, do Intervalo QT do exame eletrocardiográfico de repouso (A), maior ou igual a 380 (B) e menor a 380 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 54

- Figura 13 – Valores, em milissegundos, da duração do complexo QRS do exame eletrocardiográfico de repouso (A), maior ou igual a 100 (B) e menor a 100 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 55
- Figura 14 – Capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*), em $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 , em saliva dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 56
- Figura 15 – Atividade da enzima superóxido dismutase expressa em UE/mg de proteína (A) ou em UE (B) em saliva dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 57
- Figura 16 – Valores, em mg/dL, de Ácido úrico, em saliva dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 58
- Figura 17 – Ação do Nebivolol no continuum das doenças cardiovasculares. IAM (infarto agudo do miocárdio), AVC (acidente vascular encefálico). Adaptado de Dzau et al. 2006, com permissão de Elsevier. 62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Circunferência abdominal, em centímetros, dos pacientes ,do sexo masculino e feminino, antes (Não Tratado) e após (Tratado) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 39
- Tabela 2 – Parâmetros clínicos, bioquímicos e eletrocardiográficos em pacientes antes (Não Tratado) e após (Tratado) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. 40

BARROSO H. C. **Influência do Nebivolol sobre o estresse oxidativo em pacientes hipertensos.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

O Nebivolol (Neb) é um antagonista dos receptores β 1-Adrenérgicos (β 1-RA) de terceira geração que causa vasodilatação efeito mediado pelo óxido nítrico e redução do estresse oxidativo (EO) em modelos pré-clínicos e estudos clínicos de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS). Este estudo avaliou os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e atividade de sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos na saliva de pacientes hipertensos antes e após o tratamento com doses terapêuticas anti-hipertensivas de Neb. Vinte e quatro pacientes hipertensos foram tratados com 5 mg/dia de Neb por oito semanas consecutivas. Amostras de saliva não estimulada foram coletadas de pacientes com idade entre 25 a 70 anos para análise da capacidade antioxidante total (CAT), a qual foi medida pelo Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e quantificação do ácido úrico (AU) antes (NT, grupo não tratado) e após tratamento (T, grupo tratado) com Neb. Adicionalmente, parâmetros clínicos, bioquímicos e eletrocardiográficos foram avaliados em ambos os grupos. Os grupos foram comparados pelo teste t de Student, pareado ($p < 0,05$). Neb não alterou os valores de CAT (NT: $1,697 \pm 0,433$ versus T: $1,674 \pm 0,092$ mmol/L, $p = 0,8454$), ou a atividade da SOD (EA- NT: $66,56 \pm 4,977$ versus T: $60,66 \pm 6,376$ UE/mL, $p = 0,4886$) na saliva. No entanto, o tratamento com Neb aumentou a concentração do AU em pacientes tratados (NT: $24,64 \pm 1,686$ versus T: $35,56 \pm 2,014$ mg/mL, $p = 0,0002$). Os parâmetros clínicos, bioquímicos e eletrocardiográficos foram positivamente alterados com o tratamento com Neb. Nosso estudo demonstrou que o tratamento com Neb aumentou o AU na saliva de pacientes hipertensos em contexto de prática clínica real, aumentando a atividade do sistema antioxidante não-enzimático na saliva de pacientes que foram tratados com Neb. Nossos dados sugerem que o Neb pode estender seu potencial terapêutico, elevando a proteção cardiovascular contra o estresse oxidativo em adição ao seu efeito anti-hipertensivo.

Palavras-chave: Nebivolol, Estresse Oxidativo, Hipertensão, Humanos.

BARROSO H. C. **Influence of Nebivolol on oxidative stress in hypertensive patients.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Nebivolol (Neb) is third-generation selective β 1-adrenergic receptor antagonist which causes vasodilation (by nitric oxide release) and has been shown to reduce oxidative stress (OS) in pre-clinical models and clinical studies. This study aimed to evaluate the OS levels and the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in saliva of patients with ESH before and after anti-hypertensive therapeutic doses of Neb. Twenty-four essential hypertensive patients were treated with 5 mg Neb once daily for a total of 8 weeks. Unstimulated saliva samples were collected from 25 to 70 years-old patients for evaluation of total antioxidant capacity (TAC), which were measured by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, as well as to assess the activity of enzymatic (superoxide dismutase, SOD) and non-enzymatic (uric acid, UA) antioxidant systems, respectively before (C, control group) and after treatment (T, treated group) with Neb. Additionally, clinical, biochemical and electrocardiographic parameters were evaluated in both groups. Data were analyzed by paired Student's t-test ($p < 0.05$). Neb did not alter TAC values (UT: $1,697 \pm 0,433$ versus T: $1,674 \pm 0,092$ mmol/L, $p=0,8454$), or SOD activity (EA-UT: $66,56 \pm 4,977$ versus T: $60,66 \pm 6,376$ UE/mL, $p=0,4886$) in saliva. However, Neb treatment increased salivary UA activity in treated patients (UT: $24,64 \pm 1,686$ versus T: $35,56 \pm 2,014$ mg/mL, $p=0,0002$). Clinical, electrocardiographic and biochemical parameters were positively changed with Neb treatment. Our study showed that Neb increased UA, an OS biomarker, in saliva of hypertensive patients in a context of real clinical practice. Therefore this compound could extend its therapeutic potential, providing cardiovascular protection in addition to its β 1-antagonist effect.

Key-words: Nebivolol, Oxidative stress, Hypertension, Human beings.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Endotélio Vascular

O endotélio vascular é um dos maiores órgãos do corpo humano, interagindo intimamente com cada sistema orgânico e participando, quando alterado, da fisiopatologia de doenças que envolvem o cérebro, os rins, o fígado, os vasos sanguíneos periféricos e de forma singular o coração (WIDMER; LERMAN, 2014). O conhecimento sobre a função do endotélio evolui constantemente e devemos considerá-lo uma estrutura celular dinâmica e interativa. Esta camada única de células reveste internamente os vasos sanguíneos e não se constitui simplesmente em interface ativa entre o conteúdo interno e externo dos vasos sanguíneos, mas exerce funções ímpares na manutenção da homeostase orgânica. Como um grande maestro, atua como sensor de alterações hemodinâmicas, produz mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte celular, transmite sinais recebidos de células e da matriz extracelular e mantém as alterações adaptativas para que estas se adequem às exigências circulatórias (RADENKOVIC et al., 2013).

No endotélio vascular há a produção de várias substâncias endógenas como os fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE ou EDRF, do termo em inglês, endothelium derived relaxing factor), como o óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI_2) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCF) como prostaglandina H_2 (PGH_2), tromboxane A_2 , angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1) e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (RADDINO et al., 2007)

1.2 Disfunção endotelial

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a liberação destes fatores vasoativos, com preponderância na produção de EDRF. Entretanto, em certos estados mórbidos, este equilíbrio se rompe com atenuação dos efeitos vasodilatadores do endotélio. À situação clínica de redução do relaxamento vascular dependente do endotélio reservamos a nomenclatura de disfunção endotelial (DE) (RADDINO et al., 2007). A DE se revela como uma condição sistêmica caracterizada

pela redução na biodisponibilidade de EDRF, essencialmente o NO e pela produção excessiva de EDCF, por exemplo, de ERO (TOBLLI et al., 2014).

O mais expressivo mecanismo envolvido na patogênese da DE é a redução da biodisponibilidade do NO que é uma molécula produzida pelas células endoteliais a partir da conversão da L-arginina, na presença de cofatores como tetrahydrobiopterina (BH₄). Sua biossíntese é efetivada pela sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), uma enzima constitutiva, ativada por um aumento na concentração intracelular de Ca⁺² o qual é induzido por agonistas como acetilcolina, catecolaminas, trifosfato de adenosina (ATP), Ang II, serotonina, bradicinina, adiponectina ou por estímulos físicos como a força de cisalhamento (shear stress) (RADDINO et al., 2007; VANHOUTTE et al., 2016). O relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pelo NO envolve ativação da guanilato ciclase e consequentemente, aumento na produção de GMP-cíclico (TOBLLI et al., 2014; VANHOUTTE et al., 2016).

Os efeitos do NO sobre o sistema cardiovascular também se fazem pela inibição da proliferação de células musculares lisas, da adesão de leucócitos às células endoteliais, da adesão e agregação plaquetária, da expressão de moléculas inflamatórias e da liberação de ET-1 (RADDINO et al., 2007; VANHOUTTE et al., 2016).

Evidências recentes sugerem que alterações sistêmicas como o estresse oxidativo (EO) estariam diretamente associadas à fisiopatologia cardiovascular, revelando que pacientes com aumento de EO nos vasos sanguíneos apresentam pior prognóstico (MUNZEL; GORI, 2006). O EO se refere ao desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e a atividade de sistemas antioxidantes. Reflete-se basicamente pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), incluindo radicais livres, como superóxido (O₂⁻), peroxinitrito (ONOO⁻) e hidroxila (OH⁻), e não radicais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que são produtos do metabolismo orgânico. As ERO e ERN atuam elevando a concentração intracelular de Ca⁺² e desencadeando danos ao DNA proteico e aos lipídeos, culminando em injúria celular grave e citotoxicidade (SITI; KAMISAH; KAMISAH, 2015). No organismo humano existem várias fontes produtoras de ERO, como as enzimas xantina oxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS desacoplada, peroxidases e NADPH oxidase (NOX). Em contrapartida, nosso corpo possui sistemas antioxidantes de defesa capazes de adaptações que proporcionam

um balanço protetivo, que incluem enzimas como superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase e catalases e moléculas não enzimáticas como albumina, ácido úrico, bilirrubina, micronutrientes e vitaminas (MONTEZANO; TOUYZ, 2014).

1.3 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

A HAS é doença crônica de alta prevalência na população mundial, funcionando como fator de risco para as doenças cardiovasculares (DCV). No Brasil, a HAS atinge 32,5% da população adulta, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015).

Apresentando-se como entidade mórbida multifatorial e complexa, a HAS engloba mecanismos diversos em sua fisiopatologia, destacando-se: a disfunção endotelial (DE), a ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e o incremento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (TZEMOS; LIM; MACDONALD, 2001). Inúmeras evidências destacam a correlação entre atividade dos receptores adrenérgicos (RA), EO vascular e biodisponibilidade de NO. Tem sido sugerida uma possível interferência entre NO e marcadores do EO na adaptação e função endotelial e no controle do tônus simpático. Um aumento do EO e uma redução da biodisponibilidade de NO destrói o equilíbrio causando elevação da resposta adrenérgica observada na HAS (CONTI et al., 2013).

O SNS desempenha importante papel no controle da PA, especialmente em situações patológicas como a HAS. O músculo liso vascular, das artérias de resistência, é innervado por fibras do SNS e as catecolaminas regulam processos fisiológicos pela ativação de RA específicos localizados na membrana celular. Estes RA foram classificados em α e β . A vasoconstrição simpática resulta de um balanço entre o efeito vasoconstritor direto sobre os α_1 -RA no músculo liso e ação vasodilatadora causada por estímulo dos β_2 e β_3 -RA no músculo liso vascular (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006).

Os β -RA foram inicialmente classificados em β_1 (prevalente no miocárdio e responsável pelo inotropismo e cronotropismo positivos) e β_2 (prevalente nos músculos lisos e esqueléticos, onde gera relaxamento e contração muscular respectivamente e nos pulmões onde tem ação broncodilatadora). A clonagem do terceiro subtipo de RA, após o isolamento do gene humano responsável por codificá-

lo, conseguiu elucidar os efeitos das catecolaminas não-dependentes dos receptores classicamente descritos (β_1 e β_2). Os β_3 -RA foram detectados em vários tecidos como o tecido adiposo, o gastrointestinal, a musculatura lisa brônquica e o músculo cardíaco humano (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006). Recentemente foi sugerida a participação de β_3 -RA no relaxamento do músculo liso vascular (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006; VANHOUTTE; GAO, 2013). Nas células endoteliais, os β_2 -RA e β_3 -RA são capazes de ativar o influxo e a liberação de estoques intracelulares de Ca^{+2} , favorecendo a ativação da eNOS e consequente produção de NO. Desta forma o endotélio pode ter uma importante função na modulação da vasodilatação via ativação de β -RA. Os chamados β_4 -RA não se configuraram como receptores diferenciados e representam um estado conformacional do β_1 -RA de baixa afinidade por agonistas e antagonistas adrenérgicos (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006).

1.4 Tratamento da HAS: Antagonistas de receptores β -adrenérgicos

O bloqueio do β -RA se revela alvo-terapêutico de excelência no tratamento da HAS, insuficiência cardíaca congestiva e arritmias cardíacas (VANHOUTTE; GAO, 2013). O primeiro antagonista dos β -RA (β bloqueador - βB), o Dicloroisoproterenol, foi sintetizado em 1958, e o Propranolol, pioneiro em ações clínicas relevantes, foi desenvolvido em 1962, por Sir James W. Black. Hoje dispomos de três classes heterogêneas de βB que evoluíram de uma primeira geração de agentes não-cardiosseletivos como o Propranolol para os de segunda geração cardiosseletivos (com ação predominante sobre os β_1 -RA como Atenolol, Metoprolol e Bisoprolol). Os βB de terceira geração são aqueles que, cardiosseletivos ou não, como Carvedilol e Nebivolol (Neb), apresentam ação vasodilatadora expressiva e propriedades antioxidantes comprovadas (FONGEMIE; GETZIK, 2015).

Agentes terapêuticos com atividade bloqueadora dos β -RA cuja ação vasodilatadora envolve aumento na produção de NO e redução do EO se impõem como fármacos protetores do endotélio, estabelecendo ação simultânea na prevenção de comorbidades como diabetes, doença arterial coronária, doença vascular cerebral e periférica e insuficiência renal crônica (MUNZEL; GORI, 2009;

FONGEMIE; GETZIK, 2015). Portanto uma terapêutica protetiva cardiovascular deve visar elevação dos níveis de NO e também redução de O_2^- e $ONOO^-$ nos vasos. Por este motivo, drogas que liberam NO, mas aumentam a produção de O_2^- e $ONOO^-$, como os nitratos orgânicos, podem piorar a DE (MUNZEL; GORI, 2009).

1.5 O Nebivolol

O Neb (alfa, alfa'-[iminodimethylene] bis[6-fluoro-2-chrommethanol]) é um antagonista β -adrenérgico de terceira geração com efeito bastante diferenciado dentre os agentes desta classe terapêutica, devido a sua ação vasodilatadora e por seu efeito antioxidante sobre os vasos sanguíneos e o coração (MUNZEL; GORI, 2009). A estrutura química ativa do Neb é composta por uma mistura racêmica de dois enantiômeros (levo-nebivolol e dextro-nebivolol), o que lhe permite duplo mecanismo de ação farmacológica. O enantiômero dextrógiro (D-nebivolol) é responsável pelo efeito de bloqueio seletivo do receptor adrenérgico β_1 , conferindo a este fármaco a maior cardiosseletividade e uma ordem de potência cronotrópica negativa inferior ao Carvedilol e ao Metoprolol. Porém, o isômero levógiro (L-nebivolol) promove vasodilatação endotélio-dependente via síntese de NO e redução de ERO (EVANGELISTA et al., 2007).

Aprovado como droga anti-hipertensiva pelas Diretrizes Brasileiras (MALACHIAS et al., 2016), Americanas (JAMES et al., 2014) e Europeias (MANCIA et al., 2013), o Neb age também como agonista dos β_2 -RA (de forma menos expressiva) e β_3 -RA sendo altamente lipofílico e desprovido de atividade simpaticomimética intrínseca (por não exercer efeito expressivo sobre os alfa-receptores como outros β_B vasodilatadores de terceira geração, Carvedilol e Labetalol) (HOWLETT et al., 2014).

O Neb é rapidamente absorvido por via oral e apresenta extensa metabolização hepática (envolvendo oxidação pela citocromo P450 2D6 oxidase) (LEFEBVRE et al., 2016). Apresenta relação vale-pico (relação entre a maior redução de pressão arterial durante o dia e o que resta desse efeito depois de 24 horas da ingestão do comprimido, no dia seguinte) elevada, em torno de 90%, possibilitando posologia cômoda de uma dose diária de 5mg (VAN NUETEN et al., 1997).

O Neb apresenta baixa incidência de efeitos adversos (notadamente os relacionados à disfunção erétil e ao broncoespasmo), comparáveis ao da Losartana potássica (VAN BORTEL; BULPITT; FICI, 2005). Influencia de forma positiva o perfil glico-lipídico, reduzindo a glicose sérica, a insulinemia, o colesterol total, o LDL-colesterol e Apolipoproteína B, melhorando a sensibilidade à insulina e aumentando os níveis séricos de adiponectina (OZYILDIZ et al., 2016; CELIK et al., 2006). Este β B promoveu redução da placa aterosclerótica em animais experimentais (DE NIGRIS et al., 2008) e tem boa relação custo-benefício. Estas características favorecem melhor aderência terapêutica e efeito anti-hipertensivo ao Neb (TOBLLI et al., 2014; VAN NUETEN et al., 1997).

Sobre a dinâmica cardiovascular, o Neb reduz a frequência cardíaca de repouso e esforço (melhora o desempenho aos esforços físicos), diminui a contratilidade miocárdica e as pressões arteriais sistólica e diastólica (também apresenta efeitos benéficos na pressão aórtica central quando comparado com outros β B) (FONGEMIE; GETZIK, 2015). Através da redução da resistência vascular periférica e do aumento do volume sistólico / fração de ejeção, com o uso de NEB teremos manutenção do débito cardíaco e melhor enchimento coronariano (GAO; VANHOUTTE, 2012). A ação expressiva do Neb sobre a eletrofisiologia cardíaca confere-lhe propriedades antiarrítmicas supraventriculares (redução da dispersão da onda P com menor risco de fibrilação atrial) e ventriculares (aumento do limiar de fibrilação ventricular e atenuação da dispersão do intervalo QT) (MUNZEL; GORI, 2009).

O Neb favorece a função vascular atuando possivelmente em diferentes mecanismos, conforme observado na Figura 1:

1) No endotélio vascular, o Neb ativa β 2-RA e β 3-RA (de forma muito expressiva), aumentando assim a atividade da eNOS, e evitando o desacoplamento desta enzima (LI; FORSTERMANN, 2013; MASON et al., 2006; MASON et al., 2005). O Neb não somente estimula de forma aguda a atividade da eNOS, mas também aumenta sua expressão quando cronicamente administrado (VANHOUTTE; GAO, 2013);

2) Ao ativar os β 2-RA e β 3-RA, o Neb inibe a atividade da NOX impedindo a produção de O_2^- . Havendo menor disponibilidade de O_2^- haverá, conseqüentemente, menor reação entre NO e O_2^- e redução da formação de peroxinitrito ($ONOO^-$). A

NOX é uma das principais fontes de ânions superóxido na parede vascular (GAO; VANHOUTTE, 2012; MASON et al., 2005; WANG et al., 2013). Vale ressaltar ainda que a atividade da NOX, sob ação de EO elevado, promove oxidação de BH_4 , um cofator da eNOS. Com a deficiência de BH_4 , a eNOS passa a produzir O_2^- (VANHOUTTE et al., 2016). O Neb inibindo a NOX reduz assim, a biodisponibilidade de ERO;

3) O Neb tem efeito direto na remoção de radicais livres nas células endoteliais, por interação direta com estes radicais livres e rompendo cadeias por meio da doação de prótons e estabilização de elétrons (TOBBLI et al., 2012; PASINI et al., 2005);

4) O Neb pode indiretamente aumentar a atividade da eNOS ao reduzir os níveis de seu inibidor endógeno dimetilarginina assimétrica (ADMA) (PASINI et al., 2008);

5) Em adição a sua ação sobre os RA, o Neb libera adicionalmente NO por meio da interação em receptores purinérgicos (P2Y), por intermédio de canais iônicos mecanossensíveis (CIMS), serotoninérgicos (5-HT1A) e estrogênicos ($ER\beta$) (VANHOUTTE; GAO, 2013)

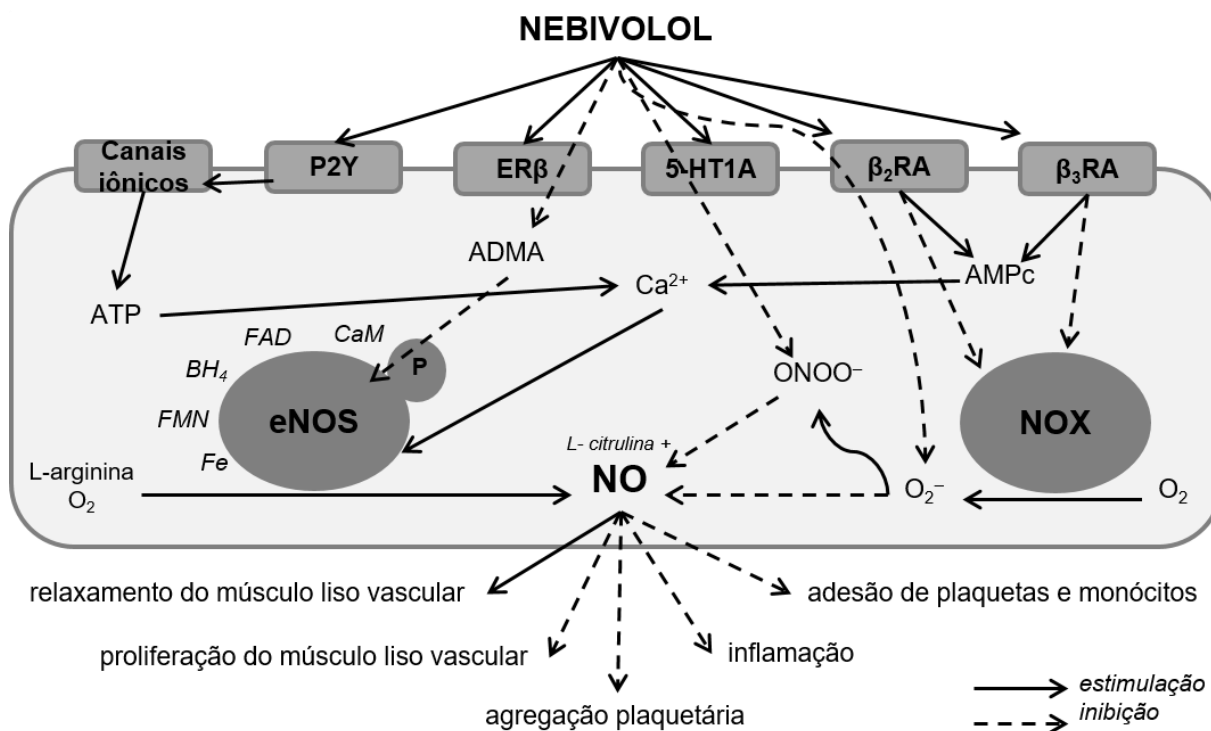


Figura 1 – Possíveis mecanismos de aumento da biodisponibilidade de NO causado pelo Nebivolol por Helena Cordeiro Barroso.

Os estudos com Neb ocupam lugar expressivo na literatura científica internacional. Estes estudos mostram o efeito antioxidante do Neb associado a indivíduos saudáveis, portadores de HAS e em comorbidades a ela associadas. Existem publicações referentes aos efeitos do Neb em experimentos *in vivo* ou *in vitro* com animais (MASON et al., 2006; MASON et al., 2005; PASINI et al., 2008; TROOST et al., 2000; TRAN et al., 1997; WHALEY-CONNELL et al., 2009; VARAGIC et al., 2012). Outros estudos avaliaram o efeito do Neb *in vitro* em células endoteliais humanas (WANG et al., 2013) e em pacientes tratados com este agente terapêutico (ZEPEDA et al., 2012; ARABACAK; DOGA; BAS, 2015; TANEJA et al., 2014; HAYEK et al., 2015; MERCHANT et al., 2009; ERDAMAR et al., 2009; WEISS et al., 2006). Cinco estudos avaliaram o papel antioxidante do Neb em pacientes hipertensos (OZYILDIZ et al., 2016; CELIK et al., 2006; MASON et al., 2005; PASINI et al., 2005; ZEPEDA et al., 2012) com ou sem outras comorbidades e os biomarcadores de EO na urina e sangue destes pacientes, no entanto, os resultados apresentados foram discordantes. Não foram encontrados na literatura resultados referentes ao efeito do tratamento com Neb sobre os biomarcadores de EO na saliva de pacientes. A alteração de biomarcadores de EO na saliva de humanos tem sido associada a doenças bucais e sistêmicas (SILVA et al., 2016, MADI, M. et al., 2016). Coletada por um método não-invasivo e indolor, a saliva tem sido considerada meio viável para diagnóstico de várias doenças e quantificação da biodisponibilidade de doses terapêuticas.

Neste estudo, pretende-se avaliar o papel antioxidante do Neb em pacientes hipertensos e com isto fornecer subsídio para esclarecimento deste conflito estabelecido. Com a avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo na saliva de pacientes hipertensos em tratamento com Neb (PHTN), pretendemos fortalecer as evidências favoráveis ao efeito do Neb como agente antioxidante, em um cenário de prática clínica real.

Se o Neb se mostrar benéfico como agente antioxidante, em mais este estudo clínico, aumentar-se-ão as evidências favoráveis ao seu uso em situações de HAS isolada e associada a condições clínicas com disfunção endotelial expressiva como diabetes mellitus, insuficiência coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal entre outras. Conhecendo este efeito, poder-se-á sugerir que este agente terapêutico será droga de grande valia para simultaneamente tratar a HA e prevenir

ou retardar a evolução da aterosclerose, como já demonstrado em animais experimentais (DE NIGRIS et al., 2008), funcionando como redutor de morbimortalidade por doenças cardiovasculares

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Baseando-se nas evidências anteriormente descritas, levanta-se a hipótese que o tratamento com Neb, em um cenário de prática clínica real, aumenta a atividade de sistemas antioxidantes na saliva de pacientes hipertensos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se existe correlação entre o tratamento clínico e a atividade antioxidante do Neb em pacientes hipertensos. Para isto, serão avaliados os efeitos do Neb sobre os biomarcadores de EO na saliva de pacientes com hipertensão arterial sistêmica essencial.

3.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos deste trabalho:

- 1) Padronizar os métodos FRAP, Atividade de SOD e dosagem de ácido úrico como determinação de biomarcadores de EO em saliva de humanos;
- 2) Avaliar os parâmetros clínicos, eletrocardiográficos e bioquímicos em pacientes hipertensos não tratados e tratados com Neb;
- 3) Estabelecer correlação entre os resultados obtidos e a eficácia simultânea do Neb na terapêutica da HAS.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Os métodos empregados neste projeto foram conduzidos de acordo com avaliação da Comissão de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP-Humanos) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP (CAAE 53192116.4.0000.5420). Todos os pacientes participantes deste estudo foram devidamente esclarecidos com relação à finalidade deste e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados colhidos no estudo foram mantidos em sigilo absoluto e os pacientes foram identificados por números de 0 a 24.

4.1 Classificação dos grupos: pacientes não tratados e tratados com Neb

Este foi um estudo prospectivo de coorte envolvendo 24 pacientes (12 do gênero masculino e 12 do gênero feminino), sendo 22 de raça branca e dois de raça amarela, com idade média de 51.0 ± 2.3 anos, atendidos no período de maio a setembro de 2016, em clínica cardiológica privada, da cidade de Araçatuba- SP. Ainda em relação à faixa etária, 14 pacientes tinham idade ≥ 50 anos ($59,0 \pm 1,45$) e 10 apresentavam idade abaixo de $39,9 \pm 2.0$.

Estes pacientes selecionados eram portadores de HAS isolada (níveis de PAS menores que 180 mmHg e PAD menor que 110 mmHg no início do estudo, em uso ou não de outros agentes anti-hipertensivos) ou associada a comorbidades (Diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade, depressão menor, gota úrica, ponte miocárdica, insuficiência vascular periférica crônica e doença coronariana aterosclerótica, com diagnóstico realizado por dados clínicos e complementares), em uso crônico de medicações para as doenças diagnosticadas (as doses de medicamentos previamente prescritos foram mantidas durante todo o período de estudo e não houve acréscimo de nenhuma medicação adicional neste intervalo de oito semanas), em manutenção de atividade física moderada (caminhada em plano, 30 minutos, três a quatro vezes por semana) e dieta habitual (hipossódica e não houve mudança expressiva de padrão dietético durante o estudo).

Neste estudo, foram excluídos os pacientes com: níveis pressóricos acima de 180/110 mmHg, portadores de HAS secundária, fibrilação atrial e marcapasso

cardíaco (comando cardíaco artificial), tabagistas e etilistas crônicos, mulheres no climatério em uso de terapia de reposição hormonal, pacientes em uso de vitamina A, C e E bem como aqueles que possuísem contraindicações clássicas ao uso de β - bloqueadores ou patologias da cavidade bucal (excluídas por inspeção direta). Estas avaliações foram feitas pela cardiologista HCB (CRM:63505).

O tratamento da hipertensão foi iniciado nos pacientes selecionados após avaliação de parâmetros clínicos, eletrocardiográficos e bioquímicos necessários. O tratamento foi feito com Neb (Cloridrato de nebivolol, Nebilet, Laboratórios Biolab Sanus- Brasil) na dose de 5 mg/dia por 08 semanas consecutivas. Ao final do período de tratamento, os parâmetros clínicos, eletrocardiográficos e bioquímicos necessários foram novamente avaliados. O Neb foi acrescentado a um esquema medicamentoso prévio visando atingir meta terapêutica (PAS < 140x90 mmHg), como droga substituta de um anti-hipertensivo anterior (em caso de efeitos adversos onde o Neb teria melhor tolerabilidade) ou como terapêutica anti-hipertensiva inicial.

Os pacientes foram identificados antes (Não Tratado ou NT) e após (Tratado ou T) o tratamento com Neb 5mg/dia durante 8 semanas consecutivas. Estes pacientes receberam identificação numérica em prontuário preparado para acompanhamento durante o desenvolvimento do projeto. Neste prontuário foram registrados o nome, o sexo, o peso corporal (quilogramas), a altura (metros), o índice de massa corpórea (IMC, Kg/m² de superfície corporal), a medida da circunferência abdominal (CA, centímetros) a pressão arterial (PA, mmHg), os dados eletrocardiográficos (milissegundos e batimentos por minuto), a bioquímica sanguínea (mg/dL) e outros pré-requisitos necessários que foram incluídos durante a execução do projeto (medicamentos em uso prévio, dose e comorbidades associadas).

4.2 Medidas de IMC e CA

A circunferência abdominal e IMC foram medidos e calculados conforme diretrizes da International Diabetes Federation (IDF) (2016).

4.3 Medidas de PA

A PA foi aferida com esfigmomanômetro aneróide (modelo Tycos, previamente validado e calibrado pelo INMETRO). Foram feitas três medidas nos braços direito e esquerdo, com intervalo de 1 minuto, em posição sentada, após 3 a 5 minutos de repouso, utilizando a média dos resultados obtidos em cada paciente (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial).

4.4 Medida dos parâmetros eletrocardiográficos

Os valores dos intervalos PR e QT, da duração do complexo QRS e da frequência cardíaca (FC) nos eletrocardiogramas de repouso com 12 derivações (Software ECG6 HW) foram averiguados de forma digital e conferidos manualmente. O Intervalo QT foi corrigido pela FC basal usando a fórmula de Bazett ($QTc = QT \text{ medido} / \sqrt{RR}$).

4.5 Medidas de parâmetros bioquímicos plasmáticos

As coletas de sangue foram feitas após período de jejum, em laboratório de análises clínicas, para determinar os níveis de glicose (G), colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (HDL), lipoproteína de alta densidade (LDL), triglicérides (TG), AU e creatinina(C) séricos, seguindo metodologia de rotina.

4.6 Coleta das amostras de saliva

A coleta de uma amostra de saliva dos pacientes foi feita mediante posicionamento da compressa de algodão na região sublingual antes (pacientes não tratados (NT), (n= 24) e após 08 semanas de tratamento com Neb (pacientes tratados (T) (n=24). A coleta da saliva foi realizada com dispositivo próprio para esta finalidade denominado Salivette® (Genese Diagnose). Esta forma de coleta é indolor, não invasiva e de acesso fácil e rápido, possuindo uma boa aceitação pelos pacientes. No dia da coleta, os pacientes foram orientados a fazer jejum de duas horas, bem como realizar a higienização da cavidade oral até duas horas antes do atendimento, sem uso de creme dental, apenas com escova dental e água. A coleta

foi realizada no período de 8 às 13 horas. O tempo médio de coleta de saliva foi de 10 minutos.

4.7 Processamento das amostras de saliva dos pacientes

Após a coleta, as amostras de saliva foram mantidas em gelo até serem processadas. O Salivette® foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, como descrito previamente (CUNHA-CORREIA et al., 2014). As amostras de saliva foram separadas em volumes específicos (300 µL), devidamente identificadas, e permaneceram congeladas em freezer a -80 °C até o dia do experimento.

4.8 Análise da Capacidade Antioxidante Total (CAT) pelo Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) na saliva dos pacientes

A CAT foi avaliada como descrito por Benzie e Strain 1996, através de metodologia baseada na capacidade de redução do complexo férrico tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) a forma Fe^{2+} por agentes redutores, em meio ácido. Um volume de 18 µL da alíquota de saliva foi adicionado ao meio de reação contendo tampão acetato 300 mmol/L (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) 10 mmol/L em HCl 40 mmol/L e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mmol/L (10:1:1, respectivamente). A absorbância foi estimada em 595 nm, em leitora Power Wave 340-Biotek. Os resultados foram expressos em mmol/g proteína de saliva, utilizando-se curva padrão de sulfato ferroso e foram comparados entre os grupos.

4.9 Análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) na saliva dos pacientes

A atividade da SOD foi avaliada conforme descrito anteriormente (CUNHA-CORREIA et al., 2014) seguindo o método de Maklund (1985) que se baseia na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado por auto-oxidação do pirogalol em meio básico e a SOD compete por este radical com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol foi determinada por espectrofotometria em 420 nm, em 20 µL de saliva. O meio de reação continha tampão Tris 50 mmol/L

(pH 8,2) e 24 mmol/L de pirogalol. A quantidade de enzima necessária para promover 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol é considerada como uma unidade de atividade enzimática. A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína salivar.

4.10 Dosagem de ácido úrico na saliva dos pacientes

O ácido úrico foi determinado em saliva usando kit comercial (Intertec, Katal Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda, MG, Brasil) baseado no método enzimático Trinder, seguindo as instruções do fabricante.

4.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados, expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e comparados entre os grupos (Teste t de Student, pareado). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Todas as análises e confecção de gráficos foram realizadas utilizando o programa GraphPad, versão 3.0.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os vinte e quatro pacientes selecionados para este trabalho completaram o tratamento após oito semanas. É relevante ressaltar que metade da população feminina participante já havia apresentado menopausa fisiológica ou cirúrgica e não fazia uso de terapia de reposição hormonal. Não houve referência a efeitos colaterais importantes que motivassem suspensão da terapêutica prescrita (excelente tolerabilidade do Neb). Cefaleia foi referida em apenas um dos participantes (4,16%), de rápida duração e aliviada com analgésicos habituais.

Entre os participantes, somente 04 apresentavam HAS isolada com 70,83% apresentando comorbidades diversas associadas (17 apresentavam dislipidemia e 6,66% eram portadores de diabetes mellitus tipo 2).

Da população estudada, 12,5% dos pacientes apresentavam peso ideal (03 pacientes), e 87,5% dos pacientes exibiram sobrepeso e obesidade de graus variados. Após tratamento com Neb, a taxa de indivíduos com peso acima do normal caiu para 75%. A circunferência abdominal (CA) apresentava-se aumentada em 93,4% dos pacientes. Houve redução significativa da circunferência abdominal nos pacientes do sexo masculino ao término de oito semanas de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Circunferência abdominal, em centímetros, dos pacientes estudados. Os dados estão representados como média ± EPM.

Sexo	Masculino (n=12)		Feminino (n=12)	
	Não Tratado	Tratado	Não Tratado	Tratado
Grupos				
Circunferência abdominal (cm)	107,3 ± 2,9	103,8 ± 2,9*	94,1 ± 3,9	91,3 ± 3,9

* p=0.003 entre pacientes não tratados e tratados do grupo masculino

Os valores dos parâmetros clínicos, bioquímicos e eletrocardiográficos estão sintetizados na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros clínicos, bioquímicos e eletrocardiográficos em pacientes antes (Não Tratado) e após (Tratado) tratamento com nebivolol 5 mg/dia após 8 semanas. Os dados estão representados como média ± EPM e n representa o número de pacientes. *diferença significativa quando $p < 0,05$

Variável		Não tratado Média ± EPM, n	Tratado Média ± EPM, n	P valor
Pressão arterial sistólica (mmHg)		142,5 ± 2,6, 24	125,4 ± 1,2, 24	<0,0001*
Pressão arterial diastólica (mmHg)		93,9 ± 1,5, 24	80,4 ± 0,7, 24	<0,0001*
Frequência cardíaca (bpm)	Total	76,3 ± 1,4, 24	67,0 ± 1,3, 24	<0,0001*
	≥ 80	84,0 ± 1,5, 9	72,2 ± 2,3, 9	0,0008*
	< 80	71,8 ± 1,0, 15	63,8 ± 1,0, 15	<0,0001*
Creatinina (mg/dL)	Total	0,92 ± 0,05, 24	0,86 ± 0,04, 24	0,0042*
	≥ 1	1,2 ± 0,09, 8	1,10 ± 0,06, 8	0,0073*
	< 1	0,76 ± 0,02, 16	0,74 ± 0,02, 16	0,1092
Glicemia (mg/dL)	Total	95,7 ± 3,9, 24	89,5 ± 2,0, 24	0,0406*
	≥ 100	141,0 ± 8,8, 3	100,0 ± 8,5, 3	0,0035*
	< 100	89,2 ± 1,5, 21	88,0 ± 1,8, 21	0,2993
Colesterol total (mg/dL)	Total	193,3 ± 7,9, 24	181 ± 6,8, 24	0,0032*
	> 200	236,7 ± 7,1, 9	214,0 ± 6,0, 9	0,0025*
	≤ 200	167,3 ± 4,5, 15	161,6 ± 6,1, 15	0,1265
LDL (mg/dL)	Total	116,1 ± 7,4, 24	102,1 ± 6,8, 24	0,0011*
	> 100	133,4 ± 7,9, 16	117,3 ± 7,6, 16	0,0044*
	≤ 100	81,5 ± 5,2, 8	71,7 ± 3,9, 8	0,0742
Ácido úrico (mg/dL)	Total	6,1 ± 0,36, 24	5,5 ± 0,03, 24	0,0043*
	≥ 6	7,5 ± 0,3, 13	6,7, 0,3, 13	0,0156*
	< 6	4,4 ± 0,2, 9	4,0 ± 0,2, 9	0,1303

Triglicérides (mg/dL)	Total	156,7 ± 14,5, 24	152,2 ± 13,0, 24	0,3530
	> 150	221,9 ± 14,5, 11	193,5 ± 20,2, 11	0,1071
	≤ 150	101,5 ± 6,9, 13	117,2 ± 9,6, 13	0,0568
HDL (mg/dL)	Total	44,38 ± 2,3, 24	45,46 ± 2,4, 24	0,2232
	< 40	35,2 ± 0,9, 10	36,5 ± 1,4, 10	0,1717
	≥ 40	50,9 ± 2,9, 14	51,8 ± 3,0, 14	0,3437
Intervalo PR (ms)	Total	155,0 ± 4,0, 24	165,8 ± 4,4, 24	0,0045*
	≥ 160	174,5 ± 2,8, 11	178,2 ± 6,8, 11	0,2942
	< 160	138,5 ± 1,5, 13	155,4 ± 4,0, 13	0,0004*
Intervalo QT (ms)	Total	384,6 ± 3,3, 24	395,0 ± 3,5, 24	0,0109*
	≥ 380	391,1 ± 2,5, 19	395,8 ± 3,6, 19	0,1128
	< 380	360,0 ± 0,0, 5	392,0 ± 10,2, 5	0,0175*
Duração QRS (ms)	Total	92,5 ± 2,0, 24	97,0 ± 2,9, 24	0,0024*
	≥ 100	103,3 ± 1,6, 9	111,1 ± 4,2, 9	0,0116*
	< 100	86,0 ± 1,3, 15	88,6 ± 1,6, 15	0,0519

Incluir FRAP, SOD e AU na tabela

Observa-se uma redução significativa da pressão arterial sistólica (PAS NT: 142,50 *versus* T: 125,41 mmHg, $p < 0,0001$) e da pressão arterial diastólica (PAD NT: 93,95 *versus* T: 80,41 mmHg, $p < 0,0001$), revelando a importância desta medicação como droga anti-hipertensiva em dose única diária (Figura 2).

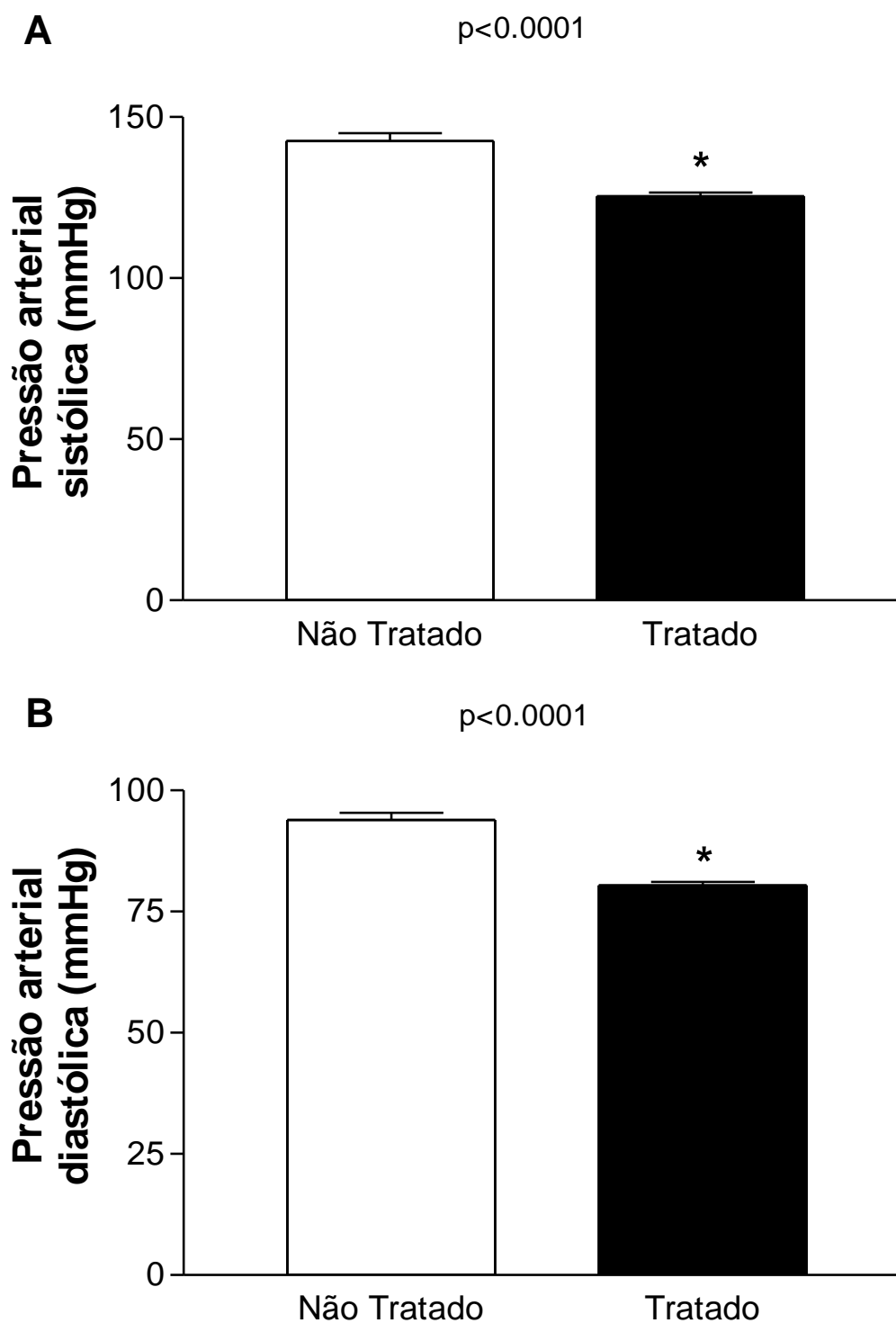


Figura 2 – Valores, em mmHg, de pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados, $n = 24$. * $p < 0,05$ Tratado versus Não Tratado.

Houve redução significativa dos valores da frequência cardíaca (NT: $76,380 \pm 1,494$ versus T: $67,000 \pm 1,371$ bpm) após uso do Neb, revelando seu efeito cronotrópico negativo benéfico, sem ocasionar bradicardia importante (Figura 3).

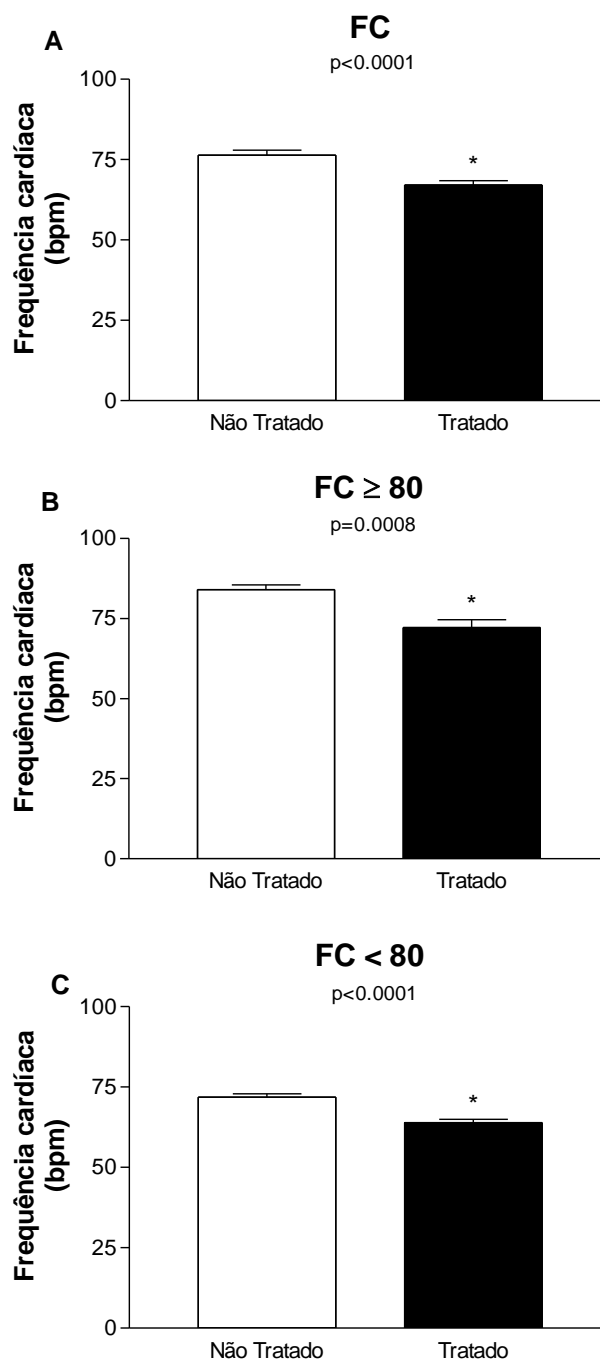


Figura 3 – Valores, em bpm, de Frequência cardíaca total (A), maior ou igual a 80 (B) e menor a 80 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. *p<0,05 Tratado versus Não Tratado.

A análise dos parâmetros bioquímicos mostrou redução significativa dos níveis séricos de creatinina (Figura 4), glicemia (Figura 5), colesterol total (Figura 6), LDL (Figura 7), ácido úrico (Figura 8) após oito semanas de tratamento com Neb.

A redução destes parâmetros bioquímicos foi mais expressiva em pacientes tratados que exibiam antes do tratamento com Neb valores de creatinina, glicemia, colesterol total, LDL e ácido úrico maiores ou iguais a 1,0, 100, 200, 100 e 6,0 mg/dl respectivamente (Figuras 4 – 8).

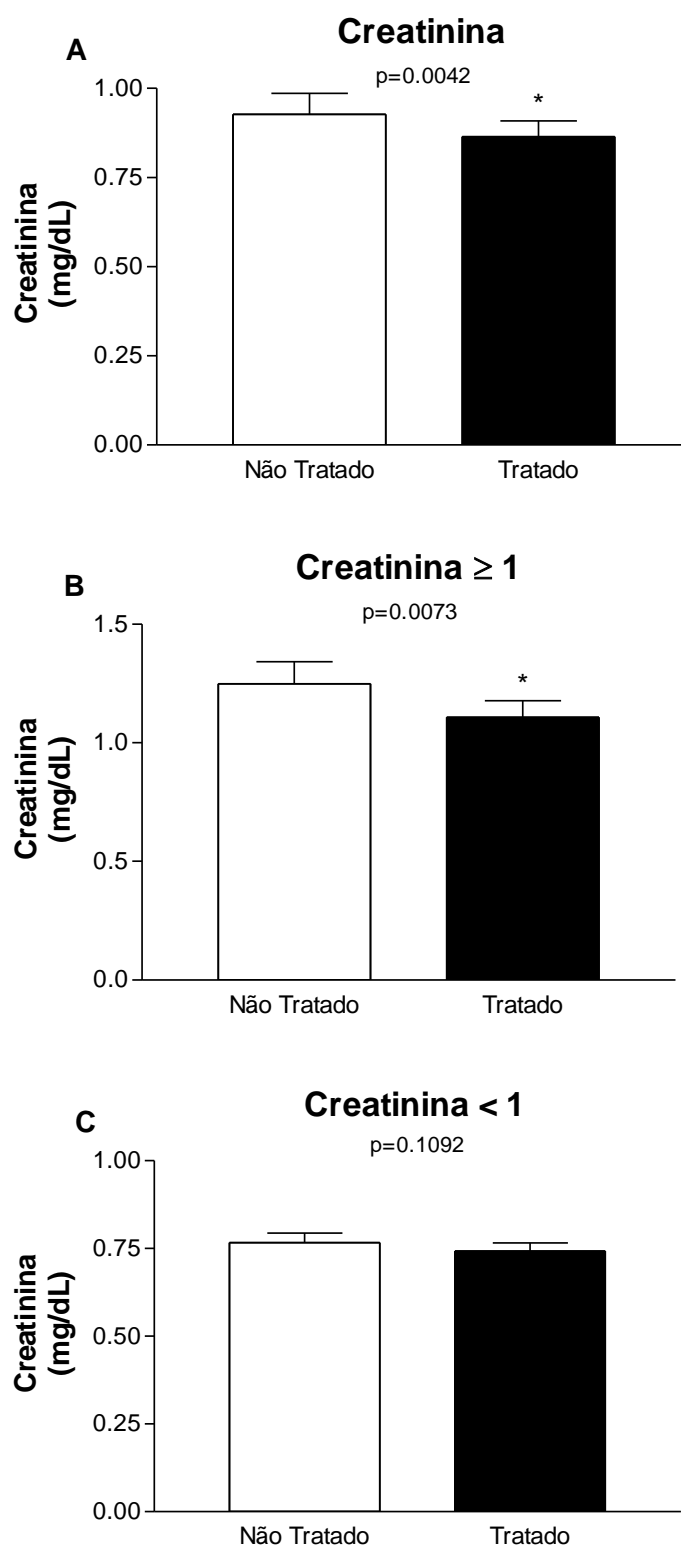


Figura 4 – Valores, em mg/dL, de Creatinina (A), maior ou igual a 1 (B) e menor a 1 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado versus Não Tratado.

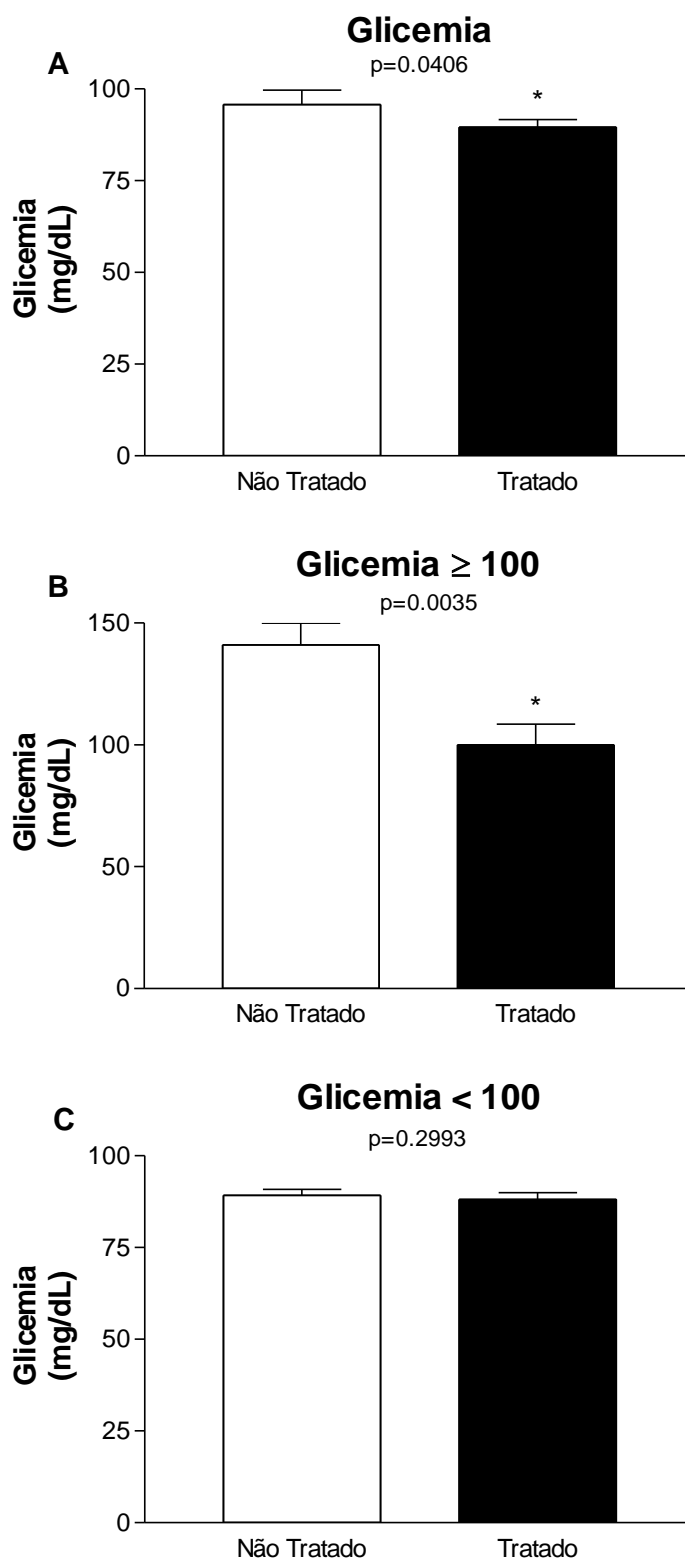


Figura 5 – Valores, em mg/dL, de Glicemia (A), maior ou igual a 100 (B) e menor a 100 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado *versus* Não Tratado.

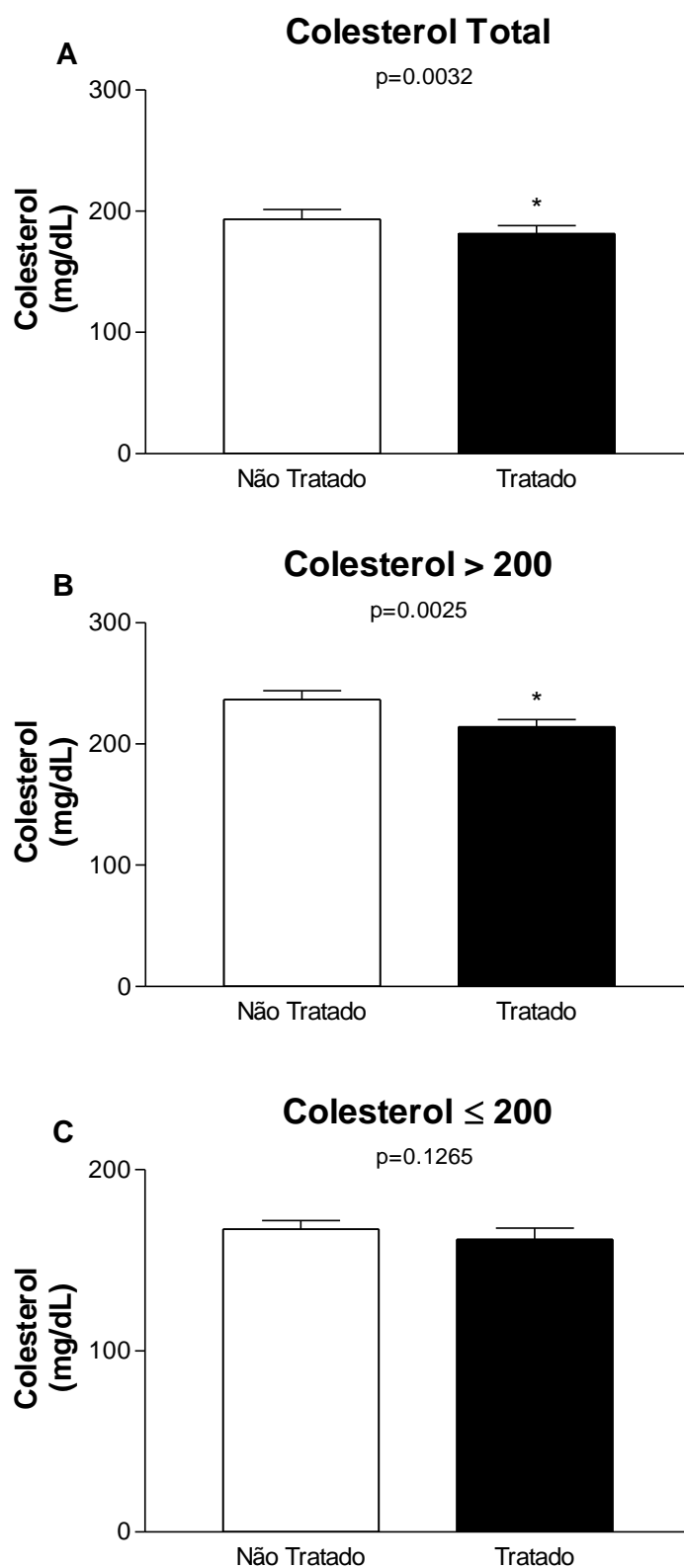


Figura 6 – Valores, em mg/dL, de Colesterol total (A), maior ou igual a 200 (B) e menor a 200 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado versus Não Tratado.

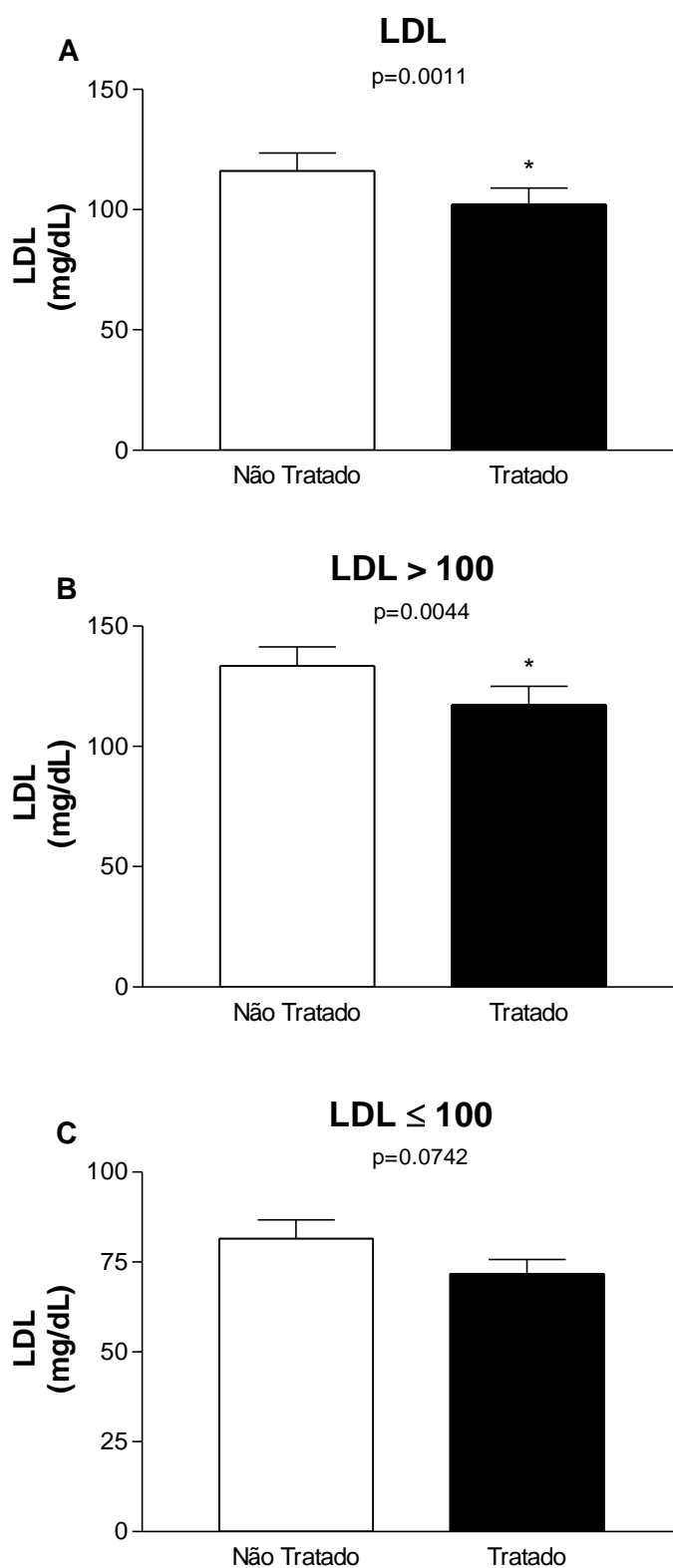


Figura 7 – Valores, em mg/dL, de LDL (lipoproteína de baixa densidade) (A), maior a 100 (B) e menor ou igual a 100 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média ± EPM dos resultados. *p<0,05 Tratado versus Não Tratado.

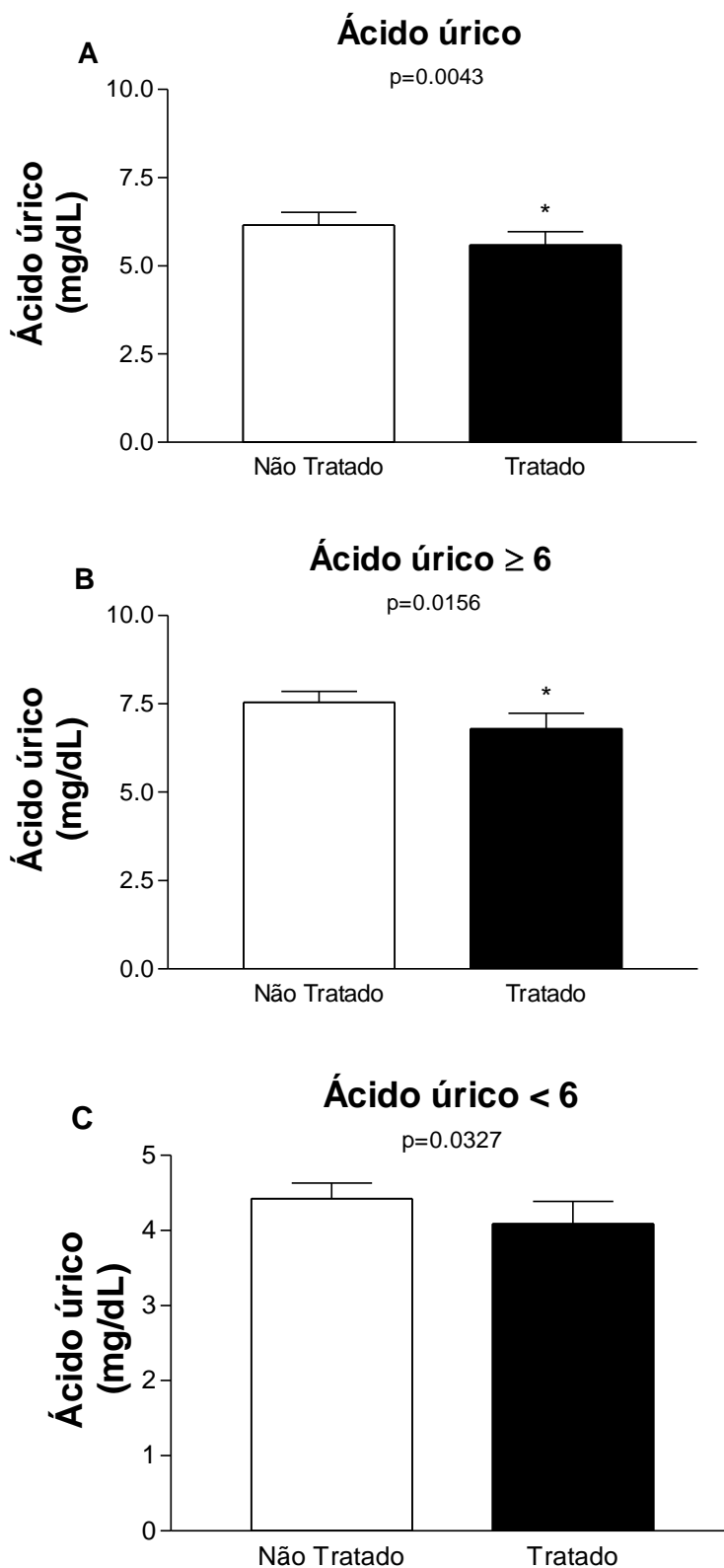


Figura 8 – Valores, em mg/dL, de Ácido úrico (A), maior a ou igual 6 (B) e menor a 6 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado versus Não Tratado.

Entretanto, os valores de triglicerídeos (Figura 9) e HDL (Figura 10) não foram significativamente alterados pelo tratamento com Neb.

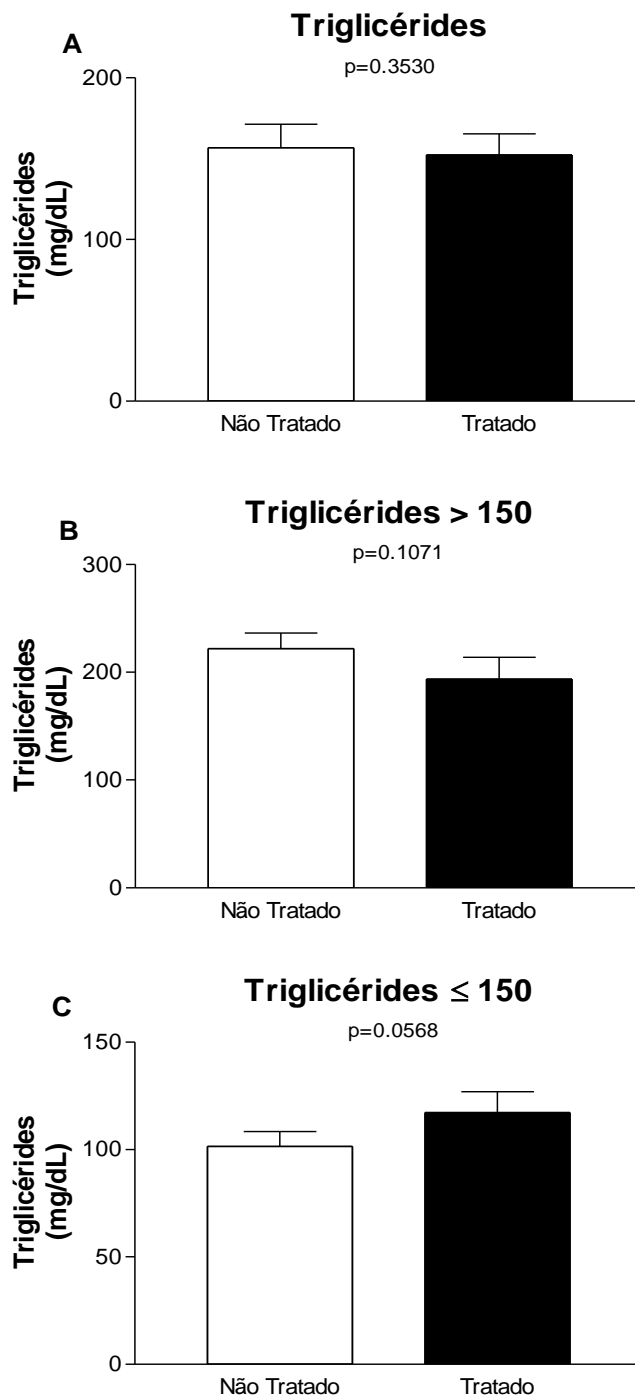


Figura 9 – Valores, em mg/dL, de Triglicérides (A), maior a 150 (B) e menor ou igual a 150 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média ± EPM dos resultados. *p<0,05 Tratado versus Não Tratado.

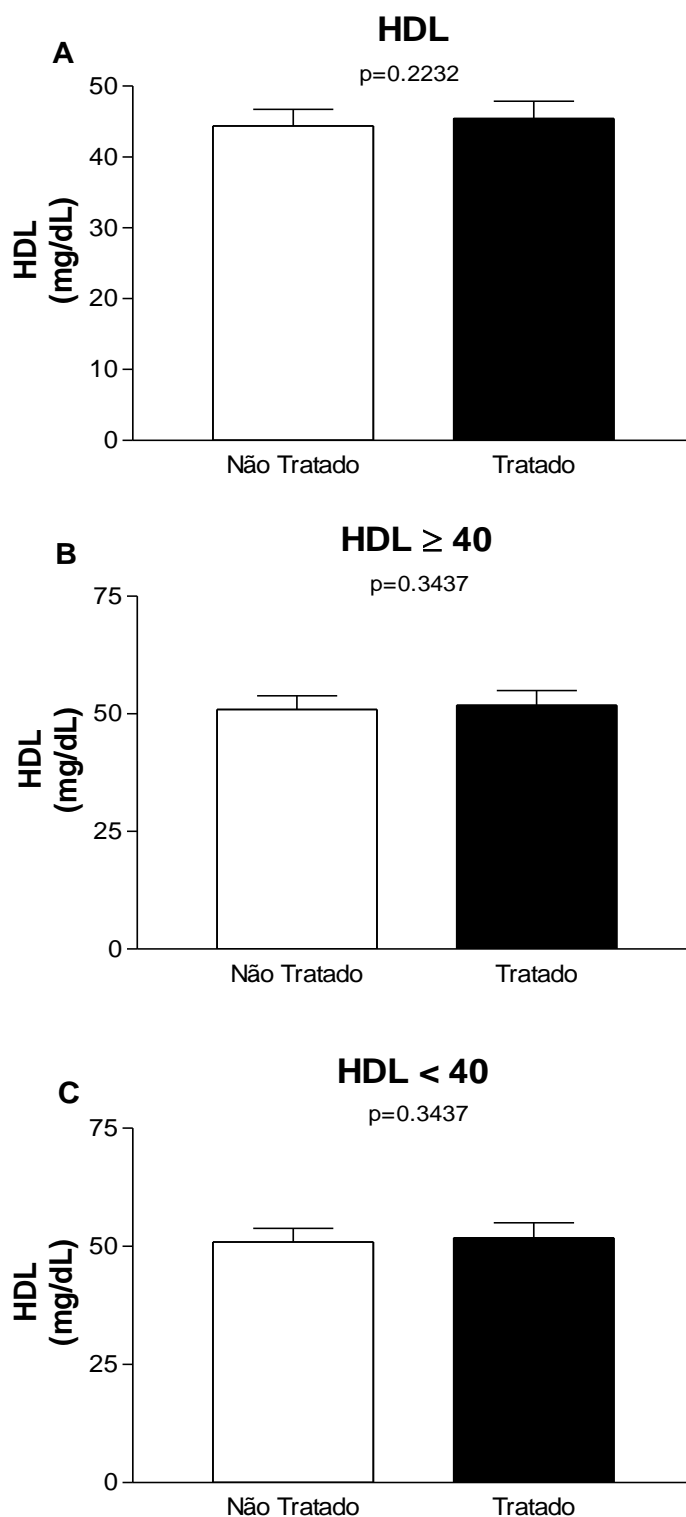


Figura 10 – Valores, em mg/dL, de HDL (lipoproteína de alta densidade) (A), maior ou igual a 40 (B) e menor a 40 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado versus Não Tratado.

Os eletrocardiogramas de repouso dos pacientes voluntários deste estudo demonstraram aumento do intervalo PR (Figura 11), intervalo QT (Figura 12) e duração do complexo QRS (Figura 13), de significância estatística, mas estes valores permaneceram dentro dos limites da normalidade com o tratamento estabelecido, revelando ser este medicamento benéfico à eletrofisiologia cardíaca com baixos riscos de pró-arritmia.

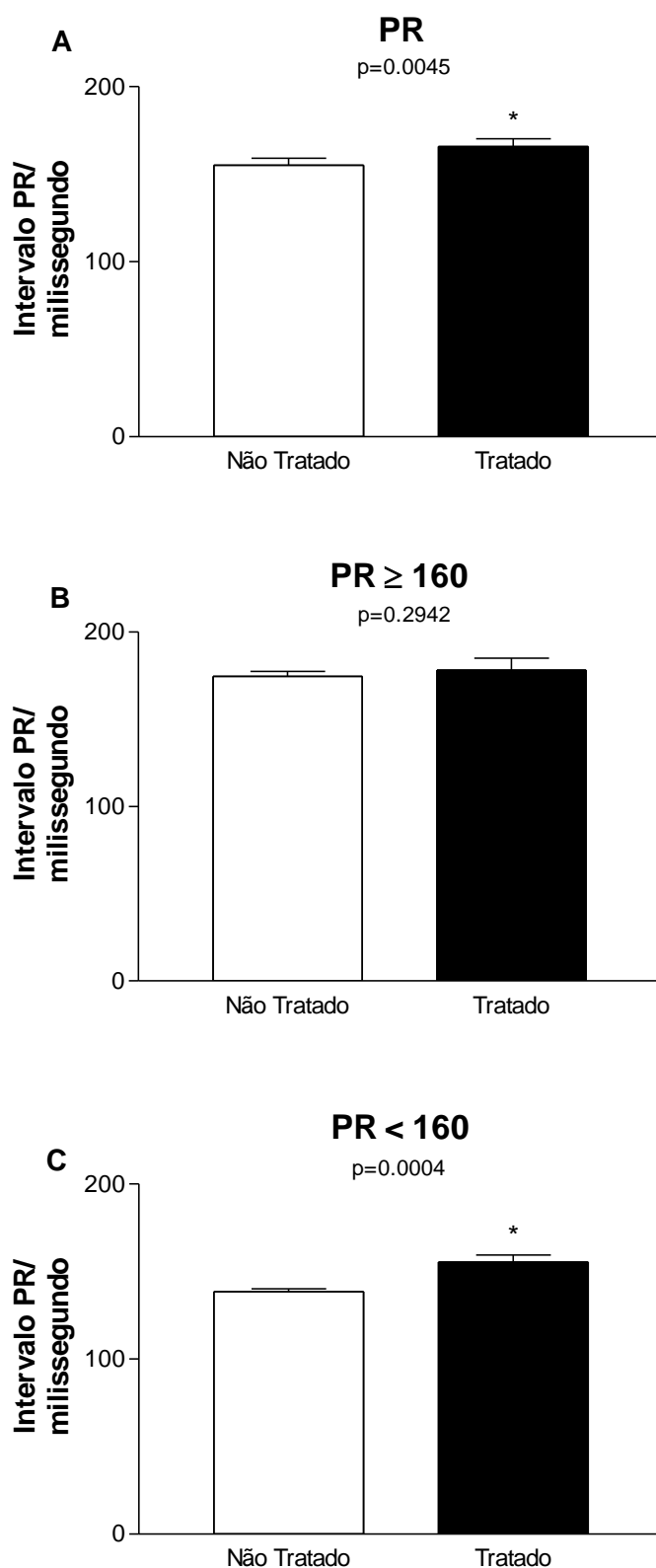


Figura 11 – Valores, em milissegundos, do Intervalo PR do exame eletrocardiográfico de repouso (A), maior ou igual a 160 (B) e menor a 160 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado *versus* Não Tratado.

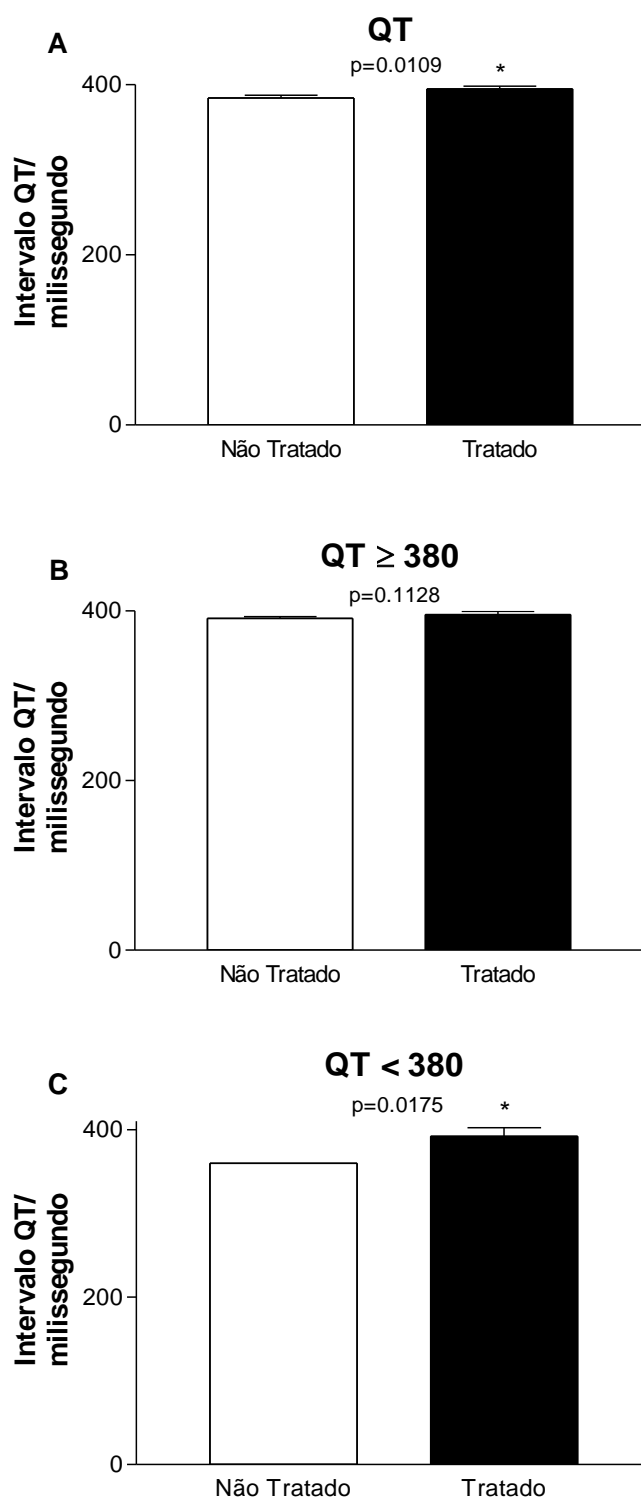


Figura 12 – Valores, em milissegundos, do Intervalo QT do exame eletrocardiográfico de repouso (A), maior ou igual a 380 (B) e menor a 380 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado *versus* Não Tratado.

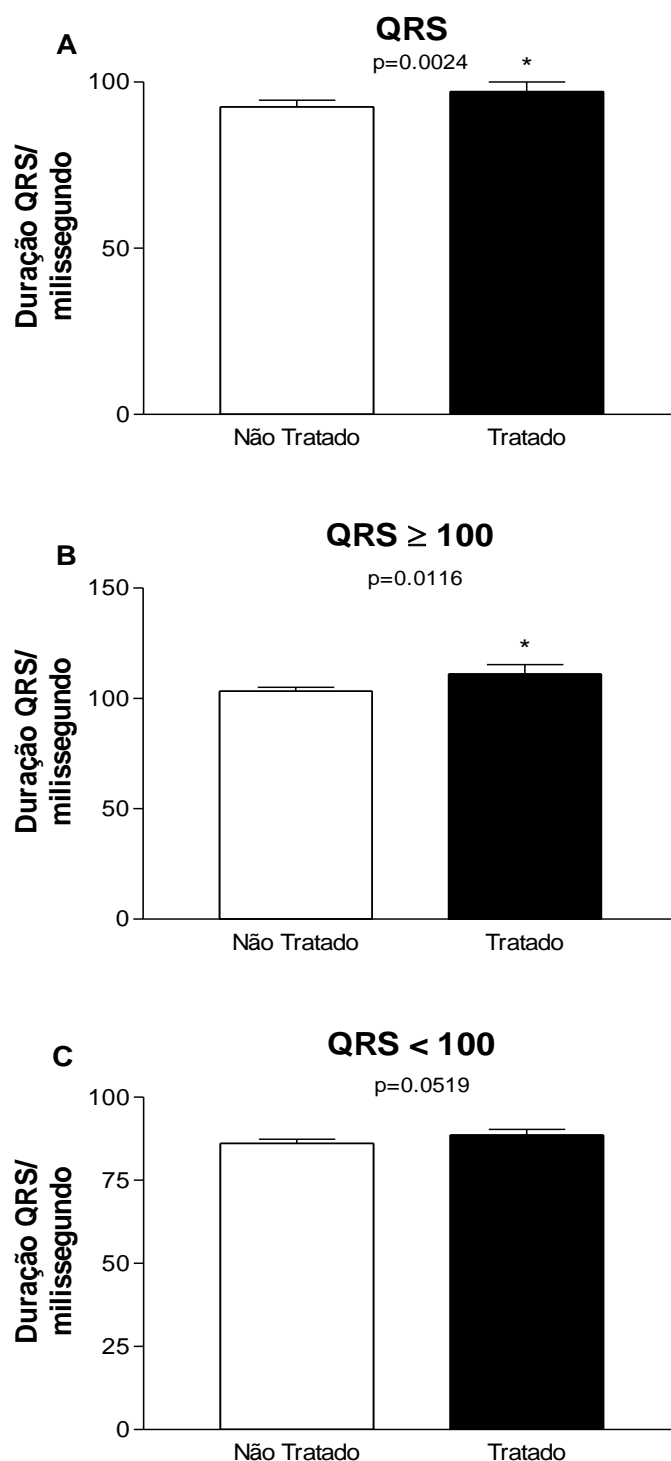


Figura 13 – Valores, em milissegundos, da duração do complexo QRS do exame eletrocardiográfico de repouso (A), maior ou igual a 100 (B) e menor a 100 (C) dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado *versus* Não Tratado.

A capacidade antioxidante total salivar não exibiu alteração nos pacientes antes (NT: $1,697 \pm 0,4334$) e após o tratamento com Neb (T: $1,674 \pm 0,09285$ mmol/L, $p=0,8454$) (Figura 14).

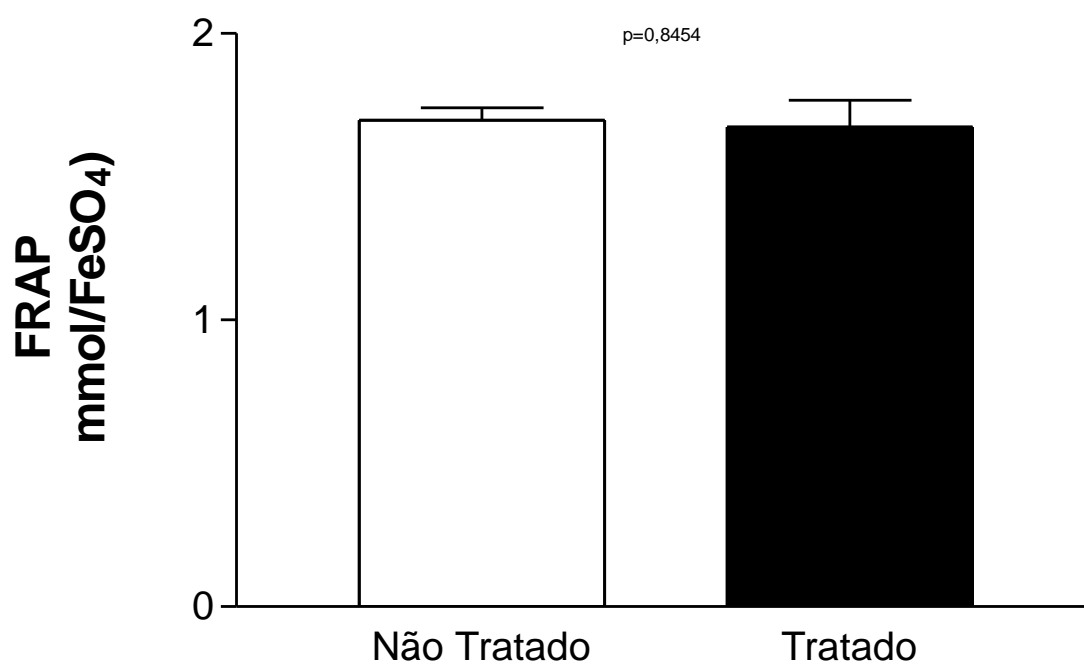


Figura 14 – Capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*), em $\mu\text{mol/L FeSO}_4$, em saliva dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p<0,05$ Tratado versus Não Tratado.

Os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) não foram alterados pelo tratamento com Neb (NT: $66,55 \pm 4,97$; T: $60,66 \pm 6,37$, $p=0,4886$) (Figura 15A). Entretanto, os níveis de SOD em unidades enzimáticas foram reduzidos pelo tratamento com Neb ($66,17 \pm 7,87$) quando comparados ao grupo antes do tratamento ($89,32 \pm 4,87$, $p=0,0439$) (Figura 15B).

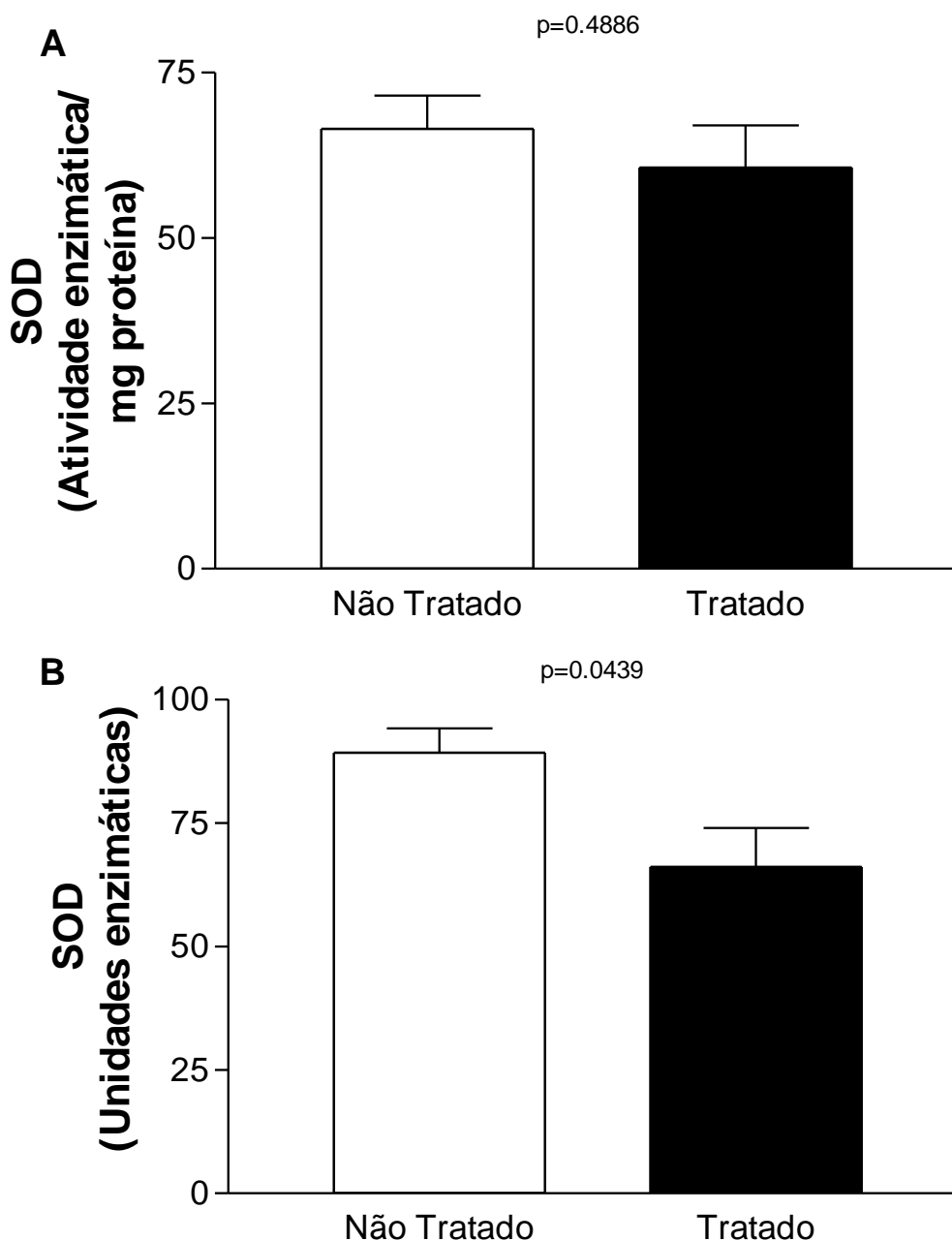


Figura 15 – Atividade da enzima superóxido dismutase expressa em UE/mg de proteína (A) ou em UE (B) em saliva dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado versus Não Tratado.

No entanto, os valores de AU estavam aumentados na saliva dos pacientes após oito semanas de tratamento com Neb (NT: $24,6 \pm 1,686$; T: $35,56 \pm 2,014$ mg/mL, $p=0,0002$) (Figura 16).

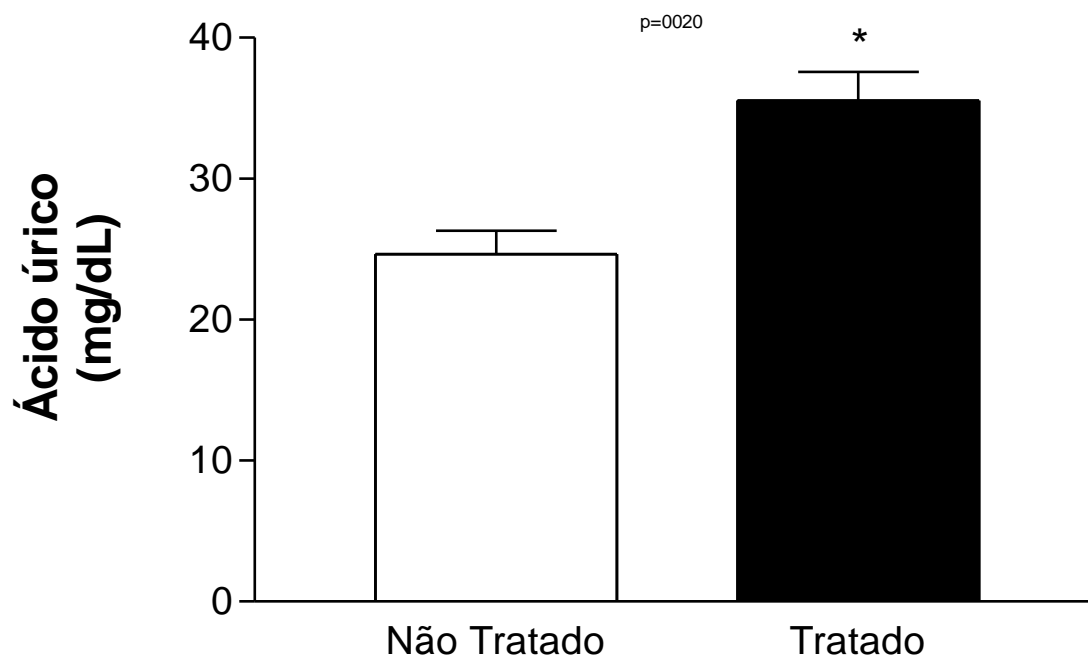


Figura 16 – Valores, em mg/dL, de Ácido úrico, em saliva dos pacientes antes (Não Tratado, barras brancas) e após o tratamento (Tratado, barras pretas) com Nebivolol 5 mg/dia por 8 semanas. Valores representam a média \pm EPM dos resultados. * $p < 0,05$ Tratado versus Não Tratado.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelaram de forma pioneira que biomarcadores de estresse oxidativo podem ser quantificados na saliva de pacientes hipertensos não tratados e tratados com Neb. Os estudos anteriores avaliaram os biomarcadores de EO no sangue (plasma ou eritrócitos) e na urina (OZYILDIZ et al., 2016; CELIK et al., 2006; MASSON et al., 2005; PASINI et al., 2005; ZEPEDA et al., 2012) de pacientes tratados com Neb. Os resultados demonstraram que o tratamento com Neb aumentou significativamente os valores de AU salivar, sugerindo que o Neb aumenta a atividade do sistema antioxidante não enzimático. A comprovação do poder antioxidante do Neb avaliada na saliva foi obtida em contexto de prática clínica real.

Neste estudo, avaliamos pacientes hipertensos de ambos os sexos, predominantemente de raça branca, com sobrepeso e obesidade, com prevalência de gordura abdominal e em sua maioria com níveis elevados de colesterol e triglicérides e níveis reduzidos do HDL. Participaram também deste estudo portadores de diabetes mellitus tipo 2, de doença vascular periférica e coronariana, de insuficiência renal crônica (IRC, com níveis de creatinina menores 2,5 mg/dl), de depressão menor, de gota úrica entre outras doenças frequentemente associadas a níveis pressóricos elevados e disfunção endotelial evidente. Este ambiente clínico diversificado difere notoriamente daqueles incluídos nos trabalhos previamente publicados (OZYILDIZ et al., 2016; CELIK et al., 2006; MASSON et al., 2005; PASINI et al., 2005; ZEPEDA et al., 2012), nos quais, foram selecionados pacientes de grupos raciais isolados (negros ou brancos), sem comorbidades associadas, com peso ideal ou obesos já definidos, utilizando Neb como droga isolada e por período de tempo de 4 a 16 semanas, com um número de pacientes variando entre 12 a 43.

O Neb foi utilizado como terapêutica única ou adicional e revelou ser droga anti-hipertensiva, cronotrópica e dromotrópica negativa eficaz (redução da PAS, PAD, FC, PR), bem tolerada (incidência de efeitos adversos menores e semelhante a placebo) com posologia cômoda de dose única diária.

Em concordância com estudos anteriormente já publicados, nosso estudo demonstrou que o tratamento com Neb reduziu de forma significativa os níveis de glicemia, colesterol total e LDL séricos, mas não alterou os níveis de triglicérides e

HDL, se diferenciando de forma ímpar de β -bloqueadores tradicionais (de primeira e segunda geração) que exibem performance neutra ou deletéria sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos (OZYILDIZ et al., 2016; CELIK et al., 2006; DE NIGRIS et al., 2008).

Observa-se também que o Neb interferiu positivamente no IMC, corroborando estudo prévio que mostrou que o tratamento com Neb aumenta os níveis de adiponectina em pacientes (DE NIGRIS et al., 2008). Além disto, observamos que o Neb reduziu os níveis de creatinina séricos, sugerindo que este tratamento melhora a função renal, principalmente em paciente com IRC associada.

Os pacientes tratados com Neb apresentaram valores de ácido úrico reduzidos no plasma. Associando este efeito à queda dos níveis de creatinina, podemos sugerir um efeito uricosúrico adicional do Neb que seria semelhante ao efeito da losartana potássica. Se confirmada por outros estudos futuros, esta ação uricosúrica do Neb seria mais uma vantagem associada ao tratamento anti-hipertensivo com este medicamento.

O tratamento com Neb não alterou a capacidade antioxidante total salivar ou a atividade da SOD salivar em pacientes. Entretanto, os níveis salivares de ácido úrico estavam aumentados na saliva de pacientes tratados com Neb.

Este estudo reforça o poder do Neb como medicamento antioxidante no tratamento da hipertensão arterial sistêmica, padroniza os métodos FRAP, atividade de SOD e dosagem de ácido úrico que foram utilizados de forma pioneira no território nacional, para determinação, direta e indireta, de biomarcadores de EO em saliva de humanos hipertensos e avalia positivamente os parâmetros clínicos, eletrocardiográficos e bioquímicos em pacientes tratados com Neb.

Em um panorama atual, onde a incidência de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 cresce de forma alarmante (BAYAR et al., 2013) e as doenças cardiovasculares são a principal causa de morbimortalidade (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015), tratar a HAS com drogas que melhoram o perfil glico-lipídico, que reduzem o estresse oxidativo e conseqüentemente a disfunção endotelial, e que tem boa tolerabilidade com boa relação custo-benefício, é altamente atrativo.

O Neb merece estudos clínicos mais expressivos para caracterização como droga anti-hipertensiva (visando comprovar redução de morbimortalidade não evidenciada com outros bloqueadores β -adrenérgicos tradicionais), antianginosa, já que age de forma tão positiva sobre a disfunção endotelial, a placa aterosclerótica, a

dinâmica cardiovascular e o perfil glico-lipídico, e protetora do miocárdio, pois a droga apresenta poder antioxidante nos vasos sanguíneos e no coração.

Estudos bem elaborados em andamento, e outros ainda a serem idealizados, podem alçar o Neb ao patamar de droga anti-hipertensiva de primeira escolha pelas diretrizes americanas (JAMES et al, 2014), como β -bloqueador ideal no manejo da insuficiência coronariana e cardíaca, para pacientes com alta predisposição ao desenvolvimento de diabetes, portadores de insuficiência renal, negros e idosos, mulheres no climatério, tabagistas e obesos.

Dispomos em nosso arsenal terapêutico de arma potente que controla intimamente a maioria dos fatores de risco do *continuum* cardiovascular, apresentando a habilidade de funcionar como um freio potente à cardiopatia terminal (DZAU et al., 2006) (Figura 17).

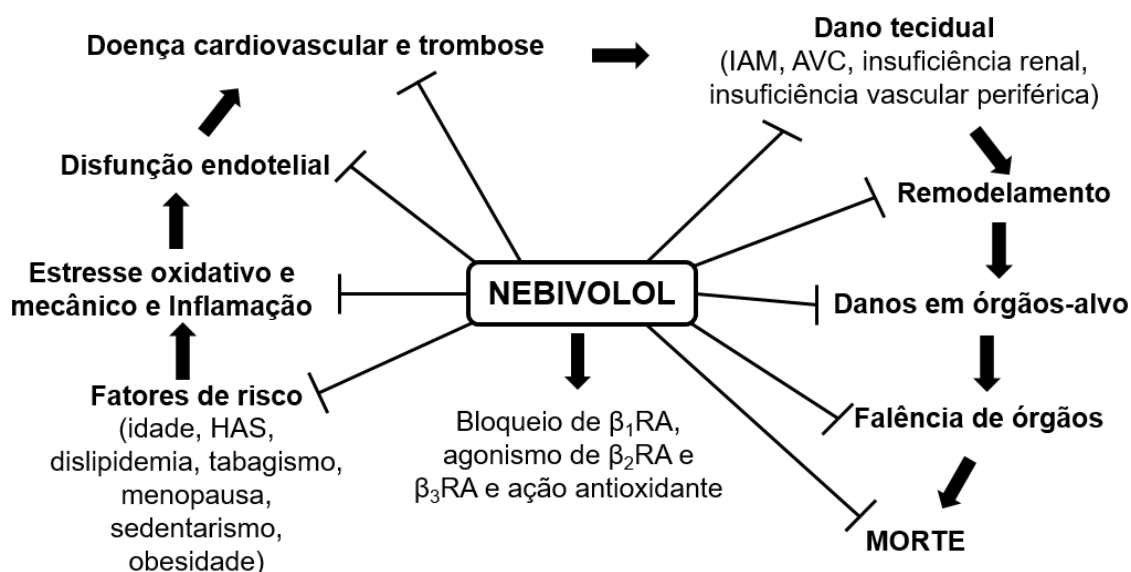


Figura 17 – Ação do Nebivolol no continuum das doenças cardiovasculares. IAM (infarto agudo do miocárdio), AVC (acidente vascular encefálico). Adaptado de Dzau et al. 2006.

Este novo agente β -bloqueador agonista dos receptores adrenérgicos β_2 e β_3 , pode estender seu potencial terapêutico, promovendo proteção cardiovascular ampliada, independentemente de sua ação antagônica sobre os β_1 , e funcionar como terapêutica na prevenção e tratamento da doença aterosclerótica.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O tratamento com Neb aumentou significativamente os valores de ácido úrico salivar, sugerindo que o Neb aumenta o sistema antioxidante não enzimático salivar. Esta comprovação do poder antioxidante do Neb na saliva foi obtida em contexto de prática clínica real, se mostra vantajosa em relação à avaliação plasmática, por ser de coleta indolor e rápida e de baixo custo;

Neste estudo a determinação da capacidade antioxidante total (pelo método de FRAP), da capacidade antioxidante enzimática (pela atividade da enzima superóxido dismutase) e da capacidade antioxidante não enzimática (pela dosagem de ácido úrico) foram padronizadas e realizadas de forma pioneira em saliva de pacientes hipertensos.

A administração de Neb promove, de forma efetiva, redução da pressão arterial sistólica e diastólica de pacientes hipertensos em seguimento de oito semanas;

O uso de Neb reduziu os níveis plasmáticos de creatinina, glicose, ácido úrico, colesterol total e colesterol LDL notadamente em pacientes hipertensos dislipêmicos, disglicêmicos e com níveis mais elevados de creatinina e ácido úrico séricos. Esta medicação anti-hipertensiva se mostra alternativa importante para tratar pacientes hipertensos com comorbidades associadas;

Os efeitos do Neb sobre os parâmetros eletrocardiográficos destacam seu papel antiarrítmico com menor chance de promover efeitos pró-arrítmicos.

REFERÊNCIAS

REFERENCIAS

ARABACAK, M.; DOGA, A.; BAS, H. A. The effects of carvedilol and nebivolol on oxidative stress status in patients with non-ischemic heart failure. **Kardiol. Pol.**, v. 73, p. 201-205, 2015.

BADAR, V. A. et al. Comparison of Nebivolol and Atenolol on blood pressure blood sugar and lipid profile in patients with essential Hypertension. **Indian J. Pharmacol.**, v. 43, n. 4, p. 437-440, 2011.

BAYAR, E. et al: The Effect of Different B-Blockers on Vascular Graft Nitric Oxide Leves: Comparison of Nebivolol Versus Metoprolol. **Eur. J. Vasc. Endovasc.**, v. 11, p. 204-208, 2013.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J.. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, p. 70–76, 1996.

CELIK, T. et al. Comparative effects of nebivolol and metoprolol on oxidative stress , insulin resistance, plasma adiponectin and soluble P-selectin levels in hypertensive patients. **J. Hypertens.**, v. 24, p. 591-596, 2006.

CONTI, V. et al. Adrenoreceptors and Nitric Oxide in the Cardiovascular System. **Front. Physiol.**, v. 4, p.1-11, 2013.

CUNHA-CORREIA, A. S. et al. Enteral nutrition feeding alters antioxidant activity in unstimulated whole saliva composition of patients with neurological disorders. **Res. Dev. Disabil.**, v. 35, p. 1209–1215, 2014.

DE NIGRIS, F. et al: Therapeutic dose of nebivolol, a nitric oxide-releasing beta-blocker, reduces atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 1, p. 57-63, Aug. 2008.

DZAU, J. V. et al. The Cardiovascular Disease Continuum Validated: Clinical Evidence of Improved Patient Outcomes Part I: Pathophysiology and Clinical Trial Evidence. **Circulation**, v. 114, n. 25, p. 2850-2870, 2006.

ERDAMAR, H. et al. The effect of Nebivolol on oxidative stress and antioxidant status in patients with cardiac syndrome-x. **Coron. Artery Dis.**, v. 20, n. 3, p. 238-244, May 2009.

EVANGELISTA, S. et al. Effect of dl—Nebivolol, its enantiomers and metabolites on the intracellular production of superoxide and nitric oxide in human endothelial cells. **Pharmacol. Res.**, v. 55, n. 4, p. 303-309, 2007.

FONGEMIE, J.; GETZIK, E. F. A review of Nebivolol pharmacology and clinical evidence. **Drugs**, v. 75, p. 1349-1371, 2015.

GAO, Y.; VANHOUTTE, P. M. Nebivolol: An Endothelium-Friendly Selective Beta-1 adrenoceptor blocker. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 59, p. 16-21, 2012.

HAYEK, S. S. et al. Differential effects of nebivolol and metoprolol on arterial stiffness, circulating progenitor cells and oxidative stress. **J. Am. Soc. Hypertens.**, v. 9, n. 5, p. 206-213, 2015.

HOWLETT, J. Nebivolol: Vasodilator Properties and Evidence for Relevance in Treatment of Cardiovascular Disease. **Can. J. Cardiol.**, v. 30, p. 29-37, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – IDF. The IDF consensus worldwide definition of metabolic syndrome. P.16, 2016. Disponível em: http://www.idf.org/webdata/docs/MetSyndrome_FINAL.pdf. Acesso em: 31/05/2017.

JAMES, P. A. et al. Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, v. 311, n. 5, p. 507-520, 2014.

LEFEBVRE, J. et al. The influence of CYP2D6 phenotype on the clinical response of nebivolol in patients with essential hypertension. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 6, p. 575-582, 2006.

LI, H.; FORSTERMANN, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 13, p. 161-167, 2013.

MADI, M. et al. Status of Serum and Salivary Levels of Superoxide Dismutase in Type 2 Diabetes Mellitus with Oral Manifestations: A Case Control Study. **Ethiopian Health Sci.** v 26, p. 523-532, 2016.

MAKLUND, S. Pyrogallol auto oxidation. In R. A. Greenwald (Ed.), Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: **CRC Press**, p. 243–247, 1985.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 107, n. 3, sup. 3, p. 1-83, 2016.

MANCIA, G. et al. 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.**, v. 31, p. 1281-1357, 2013.

MASON, R .P. et al. Nebivolol reduces Nitroxidative Stress and Restore Nitric Oxide Bioavailability in Endothelium of Black Americans. **Circulation**, v. 112, p. 3795-3801, 2005.

MASON, R .P.; KUBANT, R.; JACOB, R. F. Effect of Nebivolol on Endothelial Nitric Oxide and Peroxynitrite Release in Hypertensive Animals: Role of Antioxidant Activity. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 862-869, Jul. 2006.

MERCHANT, N. et al. Nebivolol in High-Risk, Obese African Americans With Stage 1 Hypertension: Effects on Blood Pressure, Vascular Compliance and Endothelial Function. **J. Clin. Hypertens.**, v. 11, n. 12, p. 720-725, 2009.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R .M. Reactive Oxygen Species, Vascular NOXs and Hypertension: Focus on Translation and Clinical Research. **Antiox. Redox Signal.**, v. 20, p. 164-182, 2014.

MUNZEL, T.; GORI, T. G. Nebivolol: The Somewhat- Different Beta-Adrenergic Receptor Blocker. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 54, p. 1491-1499, 2009.

NETO, M. A.; RASCADO, R. R.; BENDHACK, L. M. Receptores Beta-Adrenérgicos no Sistema Cardiovascular. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 39, p. 3-12, 2006.

OZYILDIZ, A. G. et al. Effects of Carvedilol compared to Nebivolol in Insulin Resistance and Lipid profile in patients with essential Hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 1-6, 2016.

PASINI, A. F. et al. Nebivolol decreases oxidative stress in essential hypertensive patients and increases nitric oxide by reducing its oxidative inactivation. **J. Hypertens.**, v. 23, n. 3, p. 589-596, Mar. 2005.

PASINI, A. F. et al. Nebivolol treatment reduces serum levels of ADMA and improves endothelial dysfunction in essential hypertensive patients. **Am. J. Hypertens.**, v. 21, p. 1251-1257, 2008.

RADDINO, R. et al. Nitric oxide and cardiovascular risk factors. **Heart Int.**, v. 3, n, 18-26, 2007.

RADENKOVIC, M. et al. Therapeutic Approach in the improvement of endothelial Dysfunction: the current state of the art. **Biomed Res. Int.**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

SCALA, L. C.; MAGALHÃES, L. B.; MACHADO, A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica In: Moreira SM, Paola AV; Sociedade Brasileira e Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Segunda edição. São Paulo: Manole; p. 780-785, 2015.

SILVA, P. V. et al. Increased activity of the antioxidants systems modulate the oxidative stress in saliva of toddlers with early childhood caries. **Arch Oral Biol.**, v. 70, p. 62-66, 2016.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vasc. Pharmacol.**, v. 71, p. 40-56, 2015.

TANEJA, A. K. et al. Effects of nebivolol on biomarkers in elderly patients with heart failure. **Int. J. Cardiol.**, v. 175, p. 256-260, 2014.

TOBLLI, J. E. et al. Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility. **Vasc. Health Risk Manag.**, v. 8, p. 151-160, 2012.

TRAN, Q. T. et al. Investigation of the different adrenoreceptor target of nebivolol enantiomers in rat thoracic aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 156, p. 601-608, 1997.

TROOST, R. et al. Nebivolol decrease systemic oxidative stress in healthy volunteers. **Clin. Pharmacol.**, v. 50, p. 377-379, 2000.

TZEMOS, N.; LIM, P. O.; MACDONALD, T. M. Nebivolol Reverses Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. **Circulation**, v. 104, p. 511-554, 2001.

VAN BORTEL, L. M.; BULPITT, C. J.; FICI, F. Quality of life and antihypertensive effect with Nebivolol e Losartana. **Am. J. Hypertens.**, v. 18, p. 1060-1066, 2005.

VAN BORTEL, L. M.; FICI, F.; MASCAGINI, F. Efficacy and tolerability of nebivolol compared with other antihypertensive drugs: a meta-analysis. **Am. J. Cardiovasc. Drugs.**, v. 8, n. 1, p. 35-44, 2008.

VAN NUETEN, L. et al. A dose Response Trial of nebivolol in essential hypertension. **J. Hum. Hypertens.**, v. 2, p. 139-144, 1997.

VANHOUTTE, P. M. et al. Thirty years of saying NO Sources, Actions and misfortunes of the endothelium-Derived Vasodilator Mediator. **Circ. Res.**, v. 119, p. 375-396, 2016.

VANHOUTTE, P. M.; GAO, Y. Beta blockers, Nitric oxide, and Cardiovascular Disease. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 2, p. 265-273, 2013.

VARAGIC, J. Nebivolol reduces cardiac angiotensine II, associated oxidative stress and fibrosis, but not arterial pressure in salt-loaded spontaneously rats. **Hypertension**, v. 30, n. 9, p. 1766-1774, Sep. 2012.

WANG, Y. et al. Beneficial effects of Nebivolol and Hydrochlorothiazide Combination in Spontaneously Hypertensive Rats. **J. Int. Med. Res.**, v. 41, n. 3, p 603-617, 2013.

WEISS, R. J. Nebivolol: A Novel Beta-Blocker with Nitric Oxide-induced Vasodilatation. **Vas. Health Risk Manag.**, v. 2, n. 3, p. 303-308, 2006.

WHALEY-CONNELL, A. et al. Nebivolol Reduces Proteinuria and Renal NADPH Oxidase-Generated Reactive in the Transgenic Ren2 Rat. **Am. J. Nephrol. Ocut.**, v. 30, n. 4, p. 354-360, 2009.

WIDMER, R. J.; LERMAN, A. Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. **Glob. Cardiol. Sci. Pract.**, v. 43, p. 291-308, 2014.

ZEPEDA, R. J. et al. Effects of Carvedilol and Nebivolol on Oxidative Stress-related Parameters and Endotelial Function in Patients with Essencial Hypertension. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 111, p. 309-316, 2012.