

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cardiologia**

**Contribuição da Endotelina-1 para o Tônus  
Coronariano de Seres Humanos: Experimentos com  
o Antagonista dos Receptores ET-A**

**Marco V. Wainstein**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro**

**Co-orientador: Prof. Dr. Peter Ganz**

*Tese de Doutorado apresentada ao Curso  
De Pós-Graduação em Medicina: Cardiologia  
para obtenção do título de Doutor em Cardiologia*

**Porto Alegre  
2000**

*À minha filha e aos que nos seguem.*

**“Nada há de permanente, exceto a mudança”.**

*Heráclito, 450 a.C.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro, meu orientador no Curso de Doutorado, pela postura científica e pelos fundamentais conhecimentos a mim transmitidos. Agradeço pelo estímulo e pela orientação e, principalmente, por ter acreditado em mim desde a Faculdade de Medicina.

Ao Prof. Dr. Peter Ganz, meu co-orientador no exterior, pela enorme bagagem científica que me foi oferecida. Acima de tudo, agradeço ao Dr. Ganz pela oportunidade de realizar este estudo num dos melhores centros de pesquisa em fisiopatologia coronária do mundo.

Ao Prof. Dr. Paulo D. Picon, meu orientador de Mestrado, pelo constante apoio técnico e pessoal e, principalmente, por ter me despertado a paixão pela pesquisa.

À minha esposa, Helena E. González, pelo apoio e amor incondicionais, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais, Airton e Vânia, pelo carinho e ensinamentos a mim dedicados.

Ao Dr. Júlio R. González, pelo espírito inovador e pela ajuda na formatação final desta tese.

À CAPES pelo apoio financeiro no exterior, fundamental para execução deste estudo.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>5</b>
<i>Avaliação da Função Endotelial</i>	8
<i>Endotelina e Antagonistas da Endotelina</i>	11
<i>O Grupo das Endotelinas</i>	11
<i>Controle da Produção</i>	12
<i>Locais de Produção</i>	12
<i>Biosíntese e Liberação</i>	13
<i>Concentração Plasmática e Eliminação</i>	14
<i>Receptores</i>	15
<i>Eventos Intracelulares</i>	18
<i>Efeito das Endotelinas</i>	19
<i>Endotelinas e Aterosclerose</i>	22
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>IV. MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<i>Seleção dos Pacientes</i>	26
<i>Protocolo de Estudo</i>	26
<i>Doses das Drogas</i>	27
<i>Angiografia Coronária Quantitativa</i>	28
<i>Fluxo Coronariano e Resistência Vascular</i>	28
<i>Avaliação do Fluxo Arterial Coronariano pelo Método da Contagem TIMI</i>	29
<i>Parâmetros Clínicos e Hemodinâmicos</i>	30
<i>Análise Estatística</i>	30
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<i>Variação do Diâmetro e do Fluxo Sangüíneo nos Pacientes com Coronárias Livres de Lesões Obstrutivas</i>	33
<i>Comparação da Resposta do Diâmetro Coronário em Pacientes com Lesões Ateroscleróticas e em Pacientes com Coronárias Normais</i>	36
<i>Resposta da Velocidade do Fluxo Coronariano à Adenosina e ao BQ-123 pelo Método da Contagem TIMI</i>	38

<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<i>Efeito da ET-1 no Tônus Basal de Coronárias Livres de Lesões Obstrutivas</i>	<b>42</b>
<i>Comparação da Contribuição da ET-1 no Tônus Basal em Coronárias Livres de Lesões Obstrutivas e em Coronárias com Doença Aterosclerótica</i>	<b>44</b>
<i>Uso do Método da Contagem TIMI para Medida da Velocidade do Fluxo Coronariano em Resposta à Adenosina e ao BQ-123</i>	<b>46</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>50</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>

## RESUMO

**Introdução.** A endotelina-1, o mais potente vasoconstritor endógeno, atua através de dois receptores de afinidades distintas, conhecidos como ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. Os receptores ET<sub>A</sub> estão localizados predominantemente na musculatura lisa vascular e são os principais mediadores do efeito vasoconstritor da endotelina-1. Diversos estudos demonstraram que a endotelina-1 exerce um papel importante na manutenção do tônus arterial basal. Entretanto, a contribuição da endotelina-1 para o tônus coronariano basal em seres humanos, especialmente em coronárias com lesões ateroscleróticas, permanece alvo de interesse.

**Objetivos.** Os objetivos deste estudo foram avaliar a contribuição da endotelina-1 no tônus coronariano epicárdico e na microcirculação em coronárias livres de lesões obstrutivas e em coronárias com lesões ateroscleróticas e comparar o método da contagem TIMI com o Doppler intracoronário na detecção de alterações do fluxo sanguíneo em resposta à adenosina.

**Métodos.** Um total de 16 pacientes, sendo oito destes no grupo com coronárias livres de lesões obstrutivas e oito pacientes com lesões coronarianas obstrutivas, foram incluídos neste estudo. Todos pacientes receberam a infusão seletiva intracoronária de BQ-123, um inibidor específico dos receptores ET<sub>A</sub> da endotelina-1, durante 60 minutos. Adenosina e nitroglicerina foram administradas em *bolus* no tronco da coronária esquerda. O efeito do BQ-123 no diâmetro coronário epicárdico foi avaliado por angiografia quantitativa realizada a cada 15 minutos ao longo da infusão da droga. O efeito na microcirculação coronária foi avaliado por variações no fluxo sanguíneo medido por guia-Doppler e pelo método da contagem TIMI.

**Resultados.** A infusão de BQ-123 resultou em aumento de 7% do diâmetro coronário e de 19% no fluxo sanguíneo volumétrico em pacientes com artérias livres de lesões obstrutivas ( $P < 0,001$  para comparação com basal). O aumento do calibre do vaso ocorreu de forma progressiva e uniforme ao longo do vaso. Os pacientes com lesão aterosclerótica apresentaram um aumento de 16% ( $P < 0,001$  para comparação com artérias livres de lesões obstrutivas) no diâmetro coronário e 28% no local da estenose. A velocidade do fluxo sanguíneo em coronárias livres de lesões obstrutivas não se alterou significativamente tanto na medida por Doppler como pelo método de contagem TIMI. Houve uma correlação de 0,67 ( $P < 0,05$ ) entre o método da contagem TIMI e o Doppler para detecção de alterações na velocidade do fluxo sanguíneo em resposta à adenosina.

**Conclusões.** A infusão seletiva intracoronária do inibidor específico dos receptores  $ET_A$  da endotelina-1 em seres humanos pode ser feita de maneira segura. A endotelina-1 exerce um papel importante na manutenção do tônus coronariano basal em artérias livres de lesões obstrutivas, sendo responsável pela quase totalidade do tônus constritor aumentado presente em coronárias com lesões ateroscleróticas. O método da contagem TIMI apresenta uma boa correlação com o Doppler para medida do fluxo sanguíneo em condições de hiperêmia.



## ABSTRACT

**Introduction.** Endothelin-1 is the most potent endogenous vasoconstricting substance and acts through two distinct receptors, known as ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>. ET<sub>A</sub> receptors are mainly located at the smooth muscle vascular wall, and are the principal mediators of endothelin-1 vasoconstricting effect. Several studies have shown that endothelin-1 has a central role in basal arterial tone. However, the contribution of endothelin-1 for the coronary arterial tone in normal individuals and patients with coronary atherosclerotic disease remains under investigation.

**Objectives.** To evaluate the contribution of endothelin-1 in the coronary epicardial and microvascular tone in normal and in atherosclerotic arteries, and to compare the TIMI frame count method with Doppler measurements to detect blood changes in response to adenosine.

**Methods.** Sixteen patients, 8 with smooth coronaries and 8 with coronary artery disease, were included in this study. All subjects received selective intracoronary infusion of BQ-123, a specific endothelin-1 ET<sub>A</sub> receptor antagonist, during 60 minutes. Adenosine and nitroglycerin were given in *bolus* in the left main coronary. Quantitative coronary angiography was performed every 15 minutes during drug infusion to evaluate the effect of BQ-123 on coronary epicardial diameters. The effect on coronary microcirculation was evaluated based on blood flow changes measured by Doppler-wire and TIMI frame count method.

**Results.** BQ-123 infusion resulted in 7% increase in the coronary diameter and 19% in volumetric blood flow in patients without focal coronary disease ( $P < 0.001$  versus baseline).

Patients with coronary artery disease had 16% increase in vessel diameter and 28% at the lesion site ( $P < 0.001$  versus normal coronaries). There was no significant change in blood flow velocity measured by Doppler and TIMI frame count method. The correlation between Doppler and TIMI frame count to detect changes in blood flow velocity in response to adenosine was 0.67 ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions.** Selective intracoronary infusion of endothelin-1  $ET_A$  receptor antagonist can be safely performed in humans. Endothelin-1 has an important role at basal coronary tone in arteries without obstructive disease and accounts almost entirely for the enhanced vasoconstrictive tone present in atherosclerotic coronaries. TIMI frame count method has a good correlation with Doppler blood flow measurements in hyperemic conditions.

## I. INTRODUÇÃO

A doença coronariana não pode ser vista simplesmente como um distúrbio estrutural das artérias. Investigações prévias demonstraram o papel da reatividade vasomotora coronariana e da ruptura da placa aterosclerótica com subsequente trombose aguda na patogênese das síndromes isquêmicas agudas (Davies e Thomas, 1985; Fuster et al., 1992). Mais recentemente, a inflamação da parede vascular tem sido implicada neste processo (Libby, 1995).

O endotélio vascular, além de mediar a vasodilatação, é uma fonte importante de fatores vasoconstritores. Yanagisawa e colaboradores (Yanagisawa et al., 1988) identificaram um potente fator constritor derivado do endotélio, que passou a ser denominado de endotelina, capaz de mediar uma constrição de início lento, mas com duração prolongada, podendo atingir de alguns minutos até horas (Parris e Webb, 1997; Haynes e Webb, 1998). Este peptídeo de 21 aminoácidos é sintetizado a partir de um precursor inativo (Grande Endotelina) por enzimas conversoras da endotelina em três isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). A ET-1 é a única endotelina liberada pelo endotélio vascular e possui potentes propriedades vasoconstritoras, além de promover a proliferação de células musculares lisas na parede vascular.

Os agonistas que estimulam a liberação de ET-1, como a trombina, a angiotensina II e a vasopressina, atuam através da transcrição *de novo* de RNA mensageiro (Parris e Webb, 1997; Haynes e Webb, 1998; Gensini et al., 1998; Kelly e Whitworth, 1999). Portanto, a ET-1 contribui para o tônus vascular primariamente por exercer uma constrição tônica sustentada.

A ET-1 liga-se a dois receptores específicos, denominados ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, que estão localizados predominantemente nas células musculares lisas, onde causam vasoconstrição da artéria braquial (Haynes et al., 1995). Os receptores ET<sub>B</sub> estão presentes tanto no endotélio, onde mediam a vasodilatação através da liberação de óxido nítrico, como nas células musculares lisas, onde contribuem para vasoconstrição (Verhaar et al., 1998). No antebraço de pacientes normais, o efeito global da ativação dos receptores ET<sub>B</sub> é vasodilatação (Verhaar et al., 1998).

A ativação dos receptores ET<sub>B</sub> endoteliais resulta em vasodilatação provavelmente através da liberação de óxido nítrico. A transdução dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> envolve a ativação de fosfolipase C, a geração de inositol 1,4,5 trifosfato e diacilglicerol e a mobilização de cálcio. Entretanto, os receptores ET<sub>B</sub> também estão ligados a proteínas-G que podem inibir a produção intracelular de AMPc em algumas células.

Antagonistas seletivos dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> já foram isolados e incluem respectivamente o BQ-123 e o BQ-788. Estes antagonistas têm sido úteis para avaliar as ações da ET-1 na circulação periférica em seres humanos (Gensini et al., 1998; Kelly e Whitworth, 1999; Haynes et al., 1995; Cardillo et al., 1999). Estudos realizados em seres humanos para examinar o papel da endotelina no controle vasomotor, têm se limitado à circulação do antebraço, utilizando pletismografia e/ou infusão sistêmica dos antagonistas da endotelina (Haynes et al., 1995; Verhaar et al., 1998). Haynes e Webb (1994) demonstraram que a produção endógena de ET-1 participa do controle vasomotor do antebraço ao mostrar uma resposta vasodilatadora ao antagonista BQ-123. Estes autores posteriormente infundiram ET-1 na artéria braquial de indivíduos normais e confirmaram que as respostas constritoras à endotelina eram abolidas pelo BQ-123 (Haynes et al., 1995). Em outro estudo, foi

demonstrado que a vasodilatação induzida pelo BQ-123 é em parte mediada pelo óxido nítrico. O efeito da administração do antagonista ET<sub>B</sub> seletivo BQ-788, tanto isolado como acompanhado por BQ-123, produziu uma resposta constritora leve, suportando o papel dos receptores ET<sub>B</sub> em produzir vasodilatação (Verhaar et al., 1998).

Os conhecimentos atuais sobre o papel da ET-1 no tônus vasomotor foram obtidos, fundamentalmente, a partir de estudos da circulação periférica. Wenzel e colaboradores realizaram um estudo onde a infusão intravenosa de bosentan, um inibidor combinado dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, resultou em aumento do diâmetro coronariano (Wenzel et al., 1998). Embora o efeito da ET-1 em pacientes com aterosclerose coronária não tenha sido avaliado *in vivo*, estudos patológicos sugerem que ela possa desempenhar um papel importante neste contexto (Lerman et al., 1991; Winkles et al., 1993; Timm et al., 1995). Lesões culpadas por evento isquêmico agudo apresentam numerosos macrófagos (Zeicher et al., 1994) e técnicas imunoreativas para ET-1 têm demonstrado níveis elevados desse peptídeo em lesões culpadas de pacientes portadores de angina instável. A ET-1 foi particularmente localizada nas células endoteliais e macrófagos no interior da lesão culpada (Zeicher et al., 1995). Existem poucas informações sobre os efeitos da ET-1 na circulação coronariana de seres humanos. Os estudos disponíveis envolvendo inibidores da endotelina foram realizados na circulação braquial ou avaliaram a circulação coronariana através de infusão intravenosa da droga.

A avaliação da resposta vasomotora da circulação coronariana é geralmente realizada pelo teste da acetilcolina e medida do diâmetro arterial em coronárias epicárdicas e pela resposta do fluxo coronariano medida por Doppler na microvasculatura. Mais recentemente, o método da contagem TIMI tem sido utilizado como uma ferramenta para avaliação do

fluxo coronariano. O uso da contagem TIMI foi proposto por Gibson e colaboradores (Gibson et al., 1996) com o objetivo de padronizar a avaliação do fluxo coronariano e desenvolver um índice simples e reprodutível do fluxo sanguíneo, apresentando validade prognóstica em pacientes pós-infarto do miocárdio (Gibson et al., 1999). Esta técnica correlaciona-se bem com medidas do fluxo coronariano obtidas por guia-Doppler (Kern et al., 1996) pós angioplastia e pode ser utilizada para a estimativa da reserva de fluxo coronariano (Manginas et al., 1999). Entretanto, a contagem TIMI não tem sido aplicada em protocolos experimentais para avaliação das variações do fluxo arterial endotélio-dependente.

Nesta tese, a infusão seletiva intracoronária do antagonista específico dos receptores  $ET_A$  foi realizada com o objetivo de avaliar a contribuição da ET-1 no tônus coronário epicárdico e na microcirculação de artérias livres de lesões obstrutivas em artérias com lesões ateroscleróticas

## II. REVISÃO DA LITERATURA

Localizado na interface entre o sangue e o tecido, o endotélio regula as funções vasculares através da síntese e liberação de várias substâncias que atuam localmente. O endotélio é o maior órgão autócrino, parácrino e endócrino do organismo. Cobrindo uma área de aproximadamente 700 m<sup>2</sup> e pesando 1,5 kg, ele regula o tônus vascular, a agregação plaquetária, adesão de monócitos, trombogênese, inflamação, metabolismo lipídico e remodelamento vascular (Vogel, 1999). A presença de um endotélio normal mantém a vasodilatação apropriada, inibe a atividade plaquetária, suprime a proliferação das células musculares lisas e contribui para o balanço entre trombose e fibrinólise. A disfunção endotelial é um processo sistêmico e o evento inicial na aterosclerose. Mendelsohn e Loscalzo criaram o termo *endoteliopatia* para descrever as entidades clínicas nas quais a patologia endotelial contribui para expressão clínica da doença (Mendelsohn e Loscalzo, 1992).

Os fatores de risco coronarianos tradicionais provocam disfunção endotelial mesmo em pacientes com artérias normais, conforme demonstrado por angiografia quantitativa e ultrassom intracoronário (Mano et al., 1996, Vita et al., 1990, Seiler et al., 1993). É evidente que a disfunção vascular contribui para a fisiopatologia da aterosclerose. Enquanto a gravidade anatômica da doença aterosclerótica parece não correlacionar-se com o potencial de produzir isquemia miocárdica aguda e crônica, as anormalidades vasculares funcionais que podem levar à trombose e vasoespasmo desempenham um papel mais importante na patogênese das síndromes isquêmicas agudas. Na maioria dos pacientes existe uma estenose relativamente leve na artéria culpada pelo infarto (menor do que 60-70%), sugerindo que a

trombose aguda e não a progressão da doença é responsável por estas entidades (Jackett et al., 1988; Brown et al., 1993). Na angina estável, a gravidade da estenose também apresenta fraca correlação com a expressão da doença. Um número crescente de estudos sugere que a disfunção vascular, particularmente a anormalidade do tônus vascular, contribui para a isquemia miocárdica nas síndromes coronárias estáveis.

Furchgott e Zawadzki (1980) foram os primeiros a demonstrar que a exposição da aorta isolada de coelhos à acetilcolina induz a liberação de uma substância vasodilatadora, o fator de relaxamento derivado do endotélio, que posteriormente veio a ser identificado como o óxido nítrico (Ignarro, 1999). O óxido nítrico é um radical livre sintetizado a partir da L-arginina nas células endoteliais pela NO sintetase (Palmer et al., 1988). Assim como os nitrovasodilatadores exógenos, o óxido nítrico relaxa as células musculares lisas vasculares e inibe a atividade plaquetária pela ativação da guanilil ciclase aumentando a concentração intracelular de 3'5'-guanosine monofosfato (cGMP) (Ignarro, 1984). O óxido nítrico é também estimulado por diversos outros agentes, incluindo agregados plaquetários, serotonina, trombina, substância P, agonistas adrenérgicos e bradicinina. A liberação de óxido nítrico pode ainda ser induzida pelo estresse vascular resultante do aumento do fluxo sanguíneo (Rubanyi et al., 1986; Olesen et al., 1988; Pohl e Lamontagne, 1991; Cooke , 1991).

O isolamento do óxido nítrico estimulou a busca substâncias vasoconstritoras produzidas pelo endotélio. Em 1985, já havia sido demonstrado que, além da angiotensina, o endotélio vascular era capaz de produzir ao menos duas outras substâncias com efeito vasoconstritor, sendo uma delas com efeito prolongado, durando até 60 minutos (Rubanyi e Vanhoute, 1985; Hickey et al., 1985 ). Esta substância de efeito durador foi isolada em 1988



por Yanagisawa et al. a partir de cultura de células endoteliais. Este peptídeo passou a ser denominado de endotelina e foi reconhecido como o mais potente vasoconstritor produzido pelo organismo (Yanagisawa et al., 1988).

Três isoformas de endotelina passaram a ser reconhecidas. A endotelina-1 causa constrição prolongada das artérias de médio e grande calibre e em coronárias porcinas isoladas possui uma potência 10 vezes maior do que os demais agentes constritores (Yanagisawa et al., 1988). Embora tenham menor potência, as endotelinas 2 e 3 também provocam vasoconstrição (Inoue et al., 1989), mas todas isoformas causam vasodilatação endotélio-dependente antes de desenvolverem vasoconstrição através da liberação de óxido nítrico mediada pelos receptores  $ET_B$  presentes no endotélio. (Cocks et al., 1989). Os vasos de resistência (microvasculatura) são bastante sensíveis à ação da endotelina-1 mas as veias são particularmente afetadas pelo efeito da endotelina (Miller et al., 1989). Em humanos, a infusão de endotelina-1 na artéria braquial provoca vasoconstrição dose-dependente dos vasos de resistência do antebraço de início lento e duração prolongada, permanecendo mais de duas horas após o término da infusão (Clarke et al., 1989).

A disfunção endotelial é um dos estímulos que podem desencadear a aterosclerose, de acordo com a teoria da resposta à lesão (Ross, 1993). Uma definição precisa de disfunção endotelial é difícil, pois alterações funcionais do endotélio nem sempre são acompanhadas de alterações morfológicas. O endotélio funciona como um modulador do tônus vascular, produzindo substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico e substâncias vasoconstritoras como a endotelina. A manutenção do tônus coronário depende de um equilíbrio entre estes fatores e, nos estados patológicos como a aterosclerose, o efeito final é um aumento do tônus vasomotor e uma diminuição do fluxo sanguíneo. O papel do endotélio no controle

vasomotor e sua participação na patogênese da doença arterial coronariana foram recentemente revisados por Caramori e Zago (2000). Discutiremos em profundidade o papel da endotelina no tônus coronariano em seres humanos.

### ***Avaliação da Função Endotelial***

Ludmer et al. (1986) foram pioneiros ao demonstrar que a acetilcolina (na concentração de até  $10^{-6}$  M) poderia ser infundida seletivamente na circulação coronária para avaliar o tônus dos vasos epicárdicos e isso tem servido como padrão-ouro para avaliação da função endotelial nesta última década. A vasoconstrição induzida pela acetilcolina é uma das mais precoces manifestações da disfunção endotelial (Zeicher et al., 1991). Em pacientes com evidência angiográfica de aterosclerose, a infusão de acetilcolina produz vasoconstrição coronária “paradoxal”, um efeito que provavelmente reflete a perda da liberação endotelial de óxido nítrico e efeitos diretos da acetilcolina na musculatura lisa vascular. Interessantemente, a administração crônica de nitroglicerina, um vasodilatador endotélio-independente, pode causar disfunção endotelial e perda da vasodilatação endotélio-dependente (Caramori et al., 1998). Vita et al. (1990) demonstraram constrição de coronárias angiograficamente normais em pacientes com fatores de risco para aterosclerose, incluindo dislipidemia, sugerindo que a disfunção endotelial precede o desenvolvimento de aterosclerose angiograficamente aparente. Respostas constritoras à acetilcolina também foram demonstradas em artérias angiograficamente normais de pacientes com evidência de aterosclerose em outras coronárias (Werns, 1989).

A aterosclerose está também associada com distúrbio da função endotelial em vasos de resistência (microcirculação) e esta anormalidade pode potencialmente afetar a perfusão miocárdica de forma adversa (Heistad, 1984). A função endotelial da microcirculação

coronária pode ser avaliada pela medida do fluxo sanguíneo por Doppler intracoronário (Doucette et al., 1992). O fluxo arterial aumenta em resposta à infusão de agonistas endoteliais, como a acetilcolina e a magnitude deste efeito pode ser usada para quantificar a função endotelial. Quando comparado com as respostas nos vasos de condução, a medida do fluxo coronariano é tecnicamente mais difícil e sujeita a maior variabilidade. Zeiher et al. (1991) demonstraram que em pacientes com dor torácica e coronárias normais ocorre uma disfunção endotelial na microcirculação que se manifesta por aumento inadequado do fluxo sanguíneo ao estímulo pela acetilcolina.

A medida do fluxo coronariano é obtida através do cálculo da velocidade da corrente sanguínea multiplicada pela área de seção transversal do vaso estudado. As variações do fluxo arterial a doses crescentes de acetilcolina intracoronária servem para quantificar a função endotelial da microcirculação. Em vasos normais, isto é, quando a função endotelial está preservada, a infusão de acetilcolina produz um aumento de até 50% do fluxo coronariano e de até 20% no diâmetro coronário. O fluxo coronariano pode ser medido de forma direta pela guia-Doppler intracoronária, que fornece a velocidade do fluxo sanguíneo, enquanto o diâmetro necessário para o cálculo da seção transversal (resposta epicárdica) é geralmente obtido por angiografia coronária quantitativa de pelo menos três segmentos distintos do vaso.

O fluxo coronariano pode também ser medido de forma simplificada através do uso da contagem TIMI. Basicamente, o fluxo coronariano pode ser avaliado de forma semi-quantitativa pelo sistema TIMI, ao passo que a contagem quadro a quadro do tempo necessário para perfundir a extensão total da artéria avaliada por angiografia fornece uma medida indireta da velocidade sanguínea, quando se conhece a distância em centímetros entre

dois pontos de referência ao longo da coronária (Gibson et al., 1996). Esta técnica permite uma avaliação da microcirculação prescindindo da instrumentação coronária pela guia-Doppler e tem demonstrado boa correlação clínica e matemática com o Doppler (Kern et al., 1996).

Embora clinicamente relevante, a avaliação da circulação coronária muitas vezes não é acessível para pacientes que não necessitem ser submetidos a cateterismo cardíaco. Por esta razão, informações importantes relacionadas à expressão clínica da disfunção endotelial foram obtidas através do exame das artérias periféricas. Celermajer et al. (1992) foram os primeiros a descrever uma técnica não-invasiva de avaliação da função endotelial baseada na vasodilatação mediada pelo fluxo (Sorensen et al., 1995). Anderson et al. (1995) demonstraram que os resultados obtidos por Doppler periférico apresentam boa correlação com aqueles obtidos pelo teste da acetilcolina em coronárias. A oclusão das artérias do antebraço ou da artéria braquial com um manguito de pressão durante 5 minutos resulta em hiperemia reativa após o manguito ser liberado, provocando um aumento de 5 a 7 vezes do fluxo sanguíneo local. Se o endotélio estiver funcionalmente íntegro, o aumento do fluxo sanguíneo induz estresse de cisalhamento, que resulta em dilatação da artéria braquial que poderá ser detectada por eco-Doppler de alta resolução. Esta técnica apresenta uma variabilidade aceitável (aproximadamente 2%) e as medidas são bastante reproduzíveis (Sorensen et al., 1995). Diversos investigadores têm confirmado que esta resposta depende da síntese de óxido nítrico. Usando este método, foi demonstrado que a dilatação mediada pelo fluxo está alterada em pacientes com hipercolesterolemia, diabete melito e aterosclerose coronariana (Celermajer et al, 1992). Desta forma, este teste relativamente simples e

não-invasivo da função endotelial pode servir como rastreamento de pacientes com evidência de disfunção endotelial coronária.

### ***Endotelina e Antagonistas da Endotelina***

Na busca por fatores endógenos com propriedades vasoativas, Yanagisawa e colaboradores identificaram, em 1988, um peptídeo de 21 aminoácidos que posteriormente ficou conhecido como endotelina (Yanagisawa et al., 1988). A endotelina apresenta três isoformas altamente relacionadas: endotelina-1 (ET-1); endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) (Inoue et al., 1989). Os peptídeos são produzidos sob forma de grandes moléculas denominadas preproendotelinas que são clivados por uma endopeptidase até um precursor biologicamente inativo, conhecido como “grande endotelina”, o qual é convertido ao peptídeo final pela enzima coversora da endotelina.

### ***O Grupo das Endotelinas***

As endotelinas compõe uma família de três peptídeos (Inoue et al., 1989) compostos por 21 aminoácidos contendo pontes de disulfito e produzindo uma estrutura semi-cônica. A endotelina-2 exibe o maior grau de semelhança estrutural em relação à endotelina-1, diferindo em apenas dois aminoácidos.

Em sua descrição original, Yanagisawa et al. (1988) perceberam semelhanças entre a estrutura da endotelina e diversas outras neurotoxinas peptídicas. A seguir, foi demonstrado que a endotelina apresentava uma estrutura muito próxima da sarafotoxina S6b, uma toxina extraída do veneno da cobra *Atractaspis engaddensis* (Klog et al., 1988), a qual causa morte por isquemia miocárdica e infarto via vasoconstrição coronária (Taksaki et al. 1988).

### ***Controle da Produção***

Yanagisawa et al. (1988) demonstraram que o RNAm da endotelina-1 pode ser induzido nas células endoteliais pela exposição à adrenalina, trombina e cálcio. A produção de endotelina-1 pode ser também estimulada por outros hormônios vasostritores, incluindo angiotensina II e vasopressina. A produção de endotelina estimulada pela adrenalina parece ser mediada por adrenoreceptores  $\alpha$ -1, sendo inibida por antagonistas seletivos destes receptores, como o prazosin (Prasad et al., 1991). Os glicocorticóides aumentam a produção de endotelina-1 em cultura de células musculares lisas, mas não afetam a produção endotelial de endotelina.

A produção de endotelina-1 é inibida pelo óxido nítrico. É possível que a diminuição da síntese do óxido nítrico possa ser responsável pelo efeito estimulatório dos glicocorticóides na produção de endotelina-1, uma vez que estes agentes inibem a óxido nítrico sintetase nas células musculares lisas (Boulanger e Lusher, 1990).

### ***Locais de Produção***

Espécies imunoreativas de endotelina-1 ou a expressão de RNAm para preproendotelina podem ser encontrados em vários tecidos, incluindo vasos sanguíneos (Boulanger e Lusher, 1990), coração, pulmões, pâncreas, baço, rins, neurohipófise (Yoshizawa et al., 1990) e neurônios cerebrais (Shinmi et al., 1989). A endotelina-1 é a principal isoforma expressada pelas células endoteliais e também a mais importante no controle local do tônus vascular. As células musculares lisas também produzem endotelina *in vitro*, embora a produção seja 100 vezes menor do que pelo endotélio (Kanase et al., 1991). Entretanto, a despeito da pequena produção, a grande massa de células musculares lisas

presente nos vasos arteriais poderia contribuir significativamente para produção local de endotelina-1.

Embora a endotelina-2 não seja detectada no plasma, técnicas imuno-histoquímicas, utilizando anticorpos altamente seletivos para proendotelina-2, podem identificar a presença desta isoforma no endotélio vascular (Howard et al., 1992). Isto sugere que a produção local de endotelina-2 participa no controle do tônus vascular. A endotelina-3 pode ser detectada no sistema nervoso central, adenohipófise, pulmões, pâncreas e baço, mas não é identificada nas células endoteliais e coração (Bloch et al., 1989; Shinmi et al., 1989; Howard et al., 1992).

### ***Biosíntese e Liberação***

A proendotelina-1 humana possui 212 aminoácidos e é clivada por endoproteases específicas, dando origem à proendotelina-1, um precursor peptídico de 38 aminoácidos (Yanagisawa et al., 1988). A conversão de proendotelina-1 em endotelina-1 ocorre predominantemente no plasma e não no interior das células endotélias, uma vez que a proendotelina-1 é encontrada em maiores quantidades de que seu produto final no plasma (Suzuki et al., 1989). Entretanto, a forma madura de endotelina-1 já foi detectada no interior do citoplasma de células endotélias humanas, sugerindo que alguma conversão ocorre no interior da célula (Howard et al., 1992).

A síntese de endotelina-1 a partir da proendotelina-1 ocorre através da ação da enzima conversora da endotelina (ECE) (Yanagisawa et al., 1988). Ao menos três subtipos de enzimas conversoras da endotelina já foram identificadas, sendo duas delas de ação intracelular e uma ligada à membrana. A forma fisiologicamente mais importante parece ser a ligada à membrana celular endotelial (Okada et al., 1990), ativa em pH neutro e inibida pelo forforamidon (Ikegawa et al., 1990). Esta metaloproteinase neutra não circula no sangue

e difere da enzima conversora da angiotensina. Tem sido sugerido que as enzimas conversoras da endotelina apresentam especificidade pelas diferentes isoformas e a ECE endotelial converte até 10 vezes mais proendotelina-1 do que proendotelina-3. Além disso, parece haver variação regional na ação da ECE porque em doses com semelhantes efeitos pressores sistêmicos, a proendotelina-1 e a endotelina-1 apresentam diferentes efeitos em leitos vasculares distintos (Yano et al., 1991).

Assim como o óxido nítrico e a prostaciclina, a endotelina-1 não parece ser armazenada no interior das células. A síntese *de novo* foi inicialmente sugerida por Yanagisawa et al. (1988), baseando-se na evidência de que a produção de endotelina-1 em cultura de células endoteliais não é detectada pelo menos 30 minutos após a estimulação por trombina. Entretanto, concentrações de endotelina-1 imunoreativa podem aumentar mais rapidamente em resposta a determinados estímulos do que seria esperado se toda síntese fosse *de novo*.

### ***Concentração Plasmática e Eliminação***

As concentrações de endotelina no plasma venoso variam entre 0,25 a 20 pg/ml, sendo bastante dependentes da técnica de dosagem utilizada (Vane et al., 1990; Loeffler e Maire, 1992). As formas imunoreativas de endotelina-1 encontradas no plasma compreendem: proendotelina-1 (65%); endotelina-1 (25%) e endotelina-3 (10%) (Suzuki et al., 1989). A endotelina-2 não é detectada no plasma. As concentrações de endotelina-1 circulantes são aproximadamente 10 vezes menores do que aquelas que causam vasoconstrição *in vitro* (Yanagisawa et al., 1988) ou *in vivo* (Haynes et al., 1991).

A endotelina-1 é rapidamente eliminada após a administração em *bolus*, possuindo uma meia-vida inferior a 1 minuto em modelos animais. A concentração plasmática de



endotelina-1 varia inversamente com a função renal, o que sugere um aumento da produção ou redução da eliminação associadas com insuficiência renal (Warrens et al., 1990). O aumento da concentração plasmática que ocorre em ratos pós-nefrectomia bilateral sugere que o efeito predominante seja na eliminação (Kohno et al., 1989). A degradação enzimática de endotelina pela endopeptidase neutra 24.11 também ocorre, mas seu significado biológico é desconhecido (Vijayaraghavan et al., 1990). Em humanos, a endotelina-1, quando administrada intravenosamente, possui uma meia-vida inferior a 3,6 minutos, com eliminação renal e hepática (Weitzberg et al., 1991), entretanto seus efeitos cardiovasculares são consideravelmente mais prolongados (Vierhapper et al., 1990; Haynes et al., 1991).

### ***Receptores***

Existem locais de ligação específicos e de alta afinidade para as endotelinas nos vasos sanguíneos, coração, adrenais, rins e cérebro, com uma distribuição que sugere um papel na regulação cardiovascular (Koseki et al., 1989). Diferentes respostas funcionais às isoformas de endotelina sugerem a existência de pelo menos três tipos de receptores (Inoue et al., 1989). Um tipo parece ligar-se preferencialmente à endotelina-1, o segundo não apresenta seletividade entre as endotelinas 1 a 3, enquanto o último liga-se com maior afinidade à endotelina-3. Dois destes receptores foram isolados pela expressão de DNA *in vitro* (Inoue et al., 1989).

O receptor ET<sub>A</sub> foi inicialmente isolado a partir de células de pulmão bovino, possuindo alta afinidade pela endotelina-1 (potência de ligação: endotelina-1 > endotelina-2 >> endotelina-3). Posteriormente, o receptor ET<sub>A</sub> humano foi clonado e localizado no cromossoma 4 (Hosoda et al., 1991; Cyr et al., 1991), possuindo 427 aminoácidos. Estes receptores estão presentes em diversos tecidos humanos, com maior expressão na aorta,

coração, pulmões e rins. Entretanto, a ausência de RNAm para receptores ET<sub>A</sub> nas células endoteliais sugere que a expressão vascular do receptor é limitada às células musculares lisas (Hosoda et al., 1991).

Um segundo receptor (ET<sub>B</sub>) foi inicialmente clonado a partir de DNA de ratos, possuindo igual afinidade pelos três tipos de endotelina (Sakurai et al., 1990). Posteriormente, este receptor foi clonado em células humanas, possuindo 442 aminoácidos (Ogawa et al., 1991) e apresentando apenas 55% de identidade genética com o receptor ET<sub>A</sub>. Os receptores ET<sub>B</sub> são encontrados em diversos tecidos, incluindo córtex cerebral, cerebelo, pulmões, rins, aorta e células endoteliais.

Os primeiros antagonistas dos receptores da endotelina desenvolvidos para teste em humanos foram obtidos através da fermentação do *Streptomyces misakiensis*, mas apresentavam baixa afinidade de ligação aos receptores. Posteriormente, uma série de compostos peptídicos seletivos e não seletivos para receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> foram desenvolvidos (Tabela 1). Estes compostos são hidrolizados por peptidases na circulação sistêmica e no trato gastrointestinal e não penetram a barreira hemato-encefálica.

A infusão de BQ 123 (antagonista dos receptores ET<sub>A</sub>) na artéria braquial de pacientes normais provoca vasodilatação progressiva (Haynes et al. 1994). Aumento do fluxo arterial e diminuição da resistência vascular foram obtidos após a infusão sistêmica de bloqueadores dos receptores ET<sub>A</sub> / ET<sub>B</sub> (Haynes et al., 1996). O bloqueio isolado dos receptores ET<sub>A</sub> pode ser diferente do bloqueio dos receptores ET<sub>B</sub> ou ET<sub>A</sub> / ET<sub>B</sub>, já que a ativação dos receptores ET<sub>B</sub> produz globalmente um efeito hipotensor e vasodilatador, enquanto a estimulação dos receptores ET<sub>A</sub> provoca basicamente vasoconstrição. Entretanto, ambos receptores podem mediar um efeito vasoconstritor em resposta à endotelina-1 em

**Tabela 1: Antagonistas dos receptores da endotelina peptídicos e não-peptídicos**

---

<b>Seletividade do receptor ET</b>		
ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>	ET <sub>A</sub> / ET <sub>B</sub>
<b>Inibidores peptídicos</b>		
BQ 123	BQ 788	PD142893
BQ 485	IRL 1038	PD145065
BQ 610		TAK 044
FR 139317		
<b>Inibidores não-peptídicos</b>		
PD 155080		Bosentan
PD 156707		RO 462005
BMS 182874		L-754142
A-127722		LU 135252
		SB 209670
		RO 470203
		CP 170687

---

situações patológicas, como na hipercolesterolemia, nas quais os níveis teciduais e circulantes de endotelina-1 encontram-se aumentados (Lerman et al., 1993)

Além de uma atividade da endotelina-1 aumentada, a hipercolesterolemia está associada com disfunção endotelial, diminuição da atividade basal do óxido nítrico e diminuição da atividade endotelial da óxido nítrico sintetase (Lerman et al., 1995). A atenuação da atividade do óxido nítrico é funcionalmente importante, uma vez que o óxido nítrico contribui tanto para forma basal como para a forma estimulada por demanda do fluxo coronariano. O óxido nítrico antagoniza os efeitos vasculares da endotelina-1 e está intimamente ligado à regulação da produção da endotelina-1 (Lopez et al., 1990).

A hipercolesterolemia está também associada com um aumento da produção de radicais livres e com um aumento do estresse oxidativo (Teerlink et al., 1994), o que leva a uma alteração na biodisponibilidade de óxido nítrico e/ou alterações funcionais no endotélio com importantes conseqüências na patogênese da aterosclerose (Erikson e Velasco, 1996). O estresse oxidativo aumenta também a produção e a liberação de endotelina-1 pelas células endoteliais (Sokolovsky, 1994) e a endotelina-1, por sua vez, pode aumentar o estresse oxidativo pelo estímulo da produção de radicais livres por macrófagos (Lerman e Bunnet, 1992). Recentemente, Best e colaboradores (1999) realizaram um estudo onde a administração crônica de antagonistas dos receptores A e B combinados com de receptores A específicos foi relacionada com uma melhora da função endotelial e com um aumento dos níveis de óxido nítrico num modelo experimental de hipercolesterolemia . Foi demonstrado ainda uma redução do estresse oxidativo relacionada à inibição dos receptores da endotelina que resultou em diminuição da produção de F2-isoprostanos. Os autores concluíram que a endotelina-1 participa da regulação da atividade do óxido nítrico e sugeriram um possível papel para os inibidores da endotelina na hipercolesterolemia.

### ***Eventos Intracelulares***

A endotelina-1 exerce seus efeitos através de uma série complexa de eventos intracelulares que incluem a ativação da fosfolipase C, aumento da transcrição genética e interações com canais iônicos. O evento final que resulta em vasoconstrição decorre de um aumento da concentração intracelular de cálcio. Em virtude do característico efeito constritor prolongado, a liberação sustentada de cálcio tem sido alvo de interesse. Inicialmente, foi sugerido que a endotelina-1 atuasse como um agonista endógeno dos canais de cálcio dihidropiridina-sensíveis (Yanagisawa et al., 1988), por seu efeitos serem dependentes do

cálcio extracelular e antagonizados por inibidores da dihidropiridina. Entretanto, foi demonstrado que as contrações resultantes da endotelina ocorrem, embora em menor grau, na ausência de cálcio extracelular, sendo improvável que a endotelina-1 atue como um agonista endógeno dos canais de cálcio dihidropiridina-sensíveis.

### ***Efeito das Endotelinas***

As endotelinas são potentes agentes pressores *in vivo*, sendo a endotelina-3 a isoforma de menor potência (Yanagisawa et al., 1988). O efeito dura mais de 60 minutos após a administração em *bolus* e é precedido por alguns minutos de hipotensão transitória, a qual é mais marcada com a endotelina-3 (Inoue et al., 1989). Em condições mais fisiológicas, nas quais as concentrações de endotelina aumentam de modo gradativo, a hipotensão transitória não ocorre (Gardiner et al., 1992). As circulações coronária e renal são mais sensíveis à infusão sistêmica de endotelina-1 do que a esplâncnica e a periférica (Miller et al., 1989).

As endotelinas estimulam a síntese de óxido nítrico em cultura de células endoteliais (Suzuki et al., 1991) e em vasos isolados (Warner et al., 1989) pela ação em receptores ET<sub>B</sub>. Entretanto, a endotelina-1, atuando em receptores ET<sub>A</sub>, inibe a síntese de óxido nítrico em células musculares lisas (Ikeda et al., 1997). Os efeitos vasodilatador e hipotensor transitórios que ocorrem após a infusão em *bolus* de endotelinas parecem ser relacionados em parte com a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais, uma vez que inibidores da óxido nítrico sintetase, como L-NAME, atenuam substancialmente este efeito (Douglas e Hiley, 1990). Talvez mais relevante do ponto de vista fisiológico, os inibidores da óxido nítrico sintetase também potencializam os efeitos constritor e pressor da endotelina-1, sugerindo que exista um mecanismo autócrino de retroalimentação que regula o efeito vasoconstritor da

endotelina (Douglas e Hiley, 1990). A endotelina-1 também aumenta a síntese de prostaciclina pelas células endoteliais (Suzuki et al., 1991) e inibidores da cicloxigenase potencializam a vasoconstrição induzida pela endotelina-1. Entretanto, as prostaglandinas parecem não interferir no efeito hipotensor das endotelinas, já que este efeito não é afetado por inibidores da cicloxigenase (Gardiner et al., 1990).

Desta forma, a estimulação das células endoteliais pelas endotelinas atenua mas não inibe seu prolongado efeito vasoconstritor. Este efeito autócrino é provavelmente mediado pelos receptores não seletivos ET<sub>B</sub> presentes nas células endoteliais. Existem evidências de que estes receptores estejam também presentes nas células musculares lisas, onde provocam vasoconstrição. A vasoconstrição dependente dos receptores ET<sub>B</sub> varia entre diferentes espécies e vasos, sendo mais predominante em veias do que em artérias (Moreland et al., 1992). Variações na distribuição dos receptores pode explicar porque a endotelina-3 é equípote à endotelina-1 como vasodilatador (células endoteliais, mediado por ET<sub>B</sub>), mas é menos potente como vasoconstritor (células musculares lisas, principalmente mediado por ET<sub>A</sub>) (Warner et al., 1989).

A endotelina-1 é um potente vasoconstritor das coronárias epicárdicas, podendo causar isquemia miocárdica e arritmias ventriculares (Ezra et al., 1989). A administração sistêmica provoca vasoconstrição coronária prolongada, sendo a circulação coronária mais sensível aos efeitos da endotelina do que outras circulações, exceto a renal (Miller et al., 1989). A endotelina-1 possui efeitos inotrópico e cronotrópico positivos *in vitro* que ocorrem em doses menores que as necessárias para provocar constrição coronária (Firth et al., 1990).

A endotelina-1 causa vasoconstrição das arteríolas aferente e eferente renais, reduzindo tanto o fluxo plasmático renal como a taxa de filtração glomerular (Edwards et al.,

1990). Entretanto, ao contrário do esperado, a endotelina-1 em baixas concentrações leva a um aumento da excreção urinária de sódio em virtude do estímulo da liberação de peptídeo natriurético atrial (ANP) e diminuição da resposta renal ao hormônio anti-diurético (ADH) (Kon e Badr, 1991). Alguns investigadores tem apontado a presença de níveis elevados de endotelina-1 circulantes para sugerir que a produção de endotelina-1 esteja aumentada na hipertensão arterial sistêmica (Kohno et al., 1990). Entretanto, a eliminação de endotelina é dependente da função renal e as concentrações extremamente elevadas que são encontradas em casos de hipertensão acelerada são mais provavelmente relacionadas a um déficit da função renal (Kohno et al., 1989). Estudos com antagonistas dos receptores da endotelina reforçam a idéia de que a endotelina-1 possa participar em modelos experimentais de hipertensão. O antagonista dos receptores  $ET_A$ , BQ-123, diminui agudamente a pressão arterial em camundongos SHR explicar a sigla alimentados com dieta rica em sal, mas não afetam a pressão de controles privados de sódio. Quando administrado cronicamente, o BQ 123 diminui a pressão arterial e previne o surgimento de anormalidades renais nestes animais (Nishikibe et al., 1992).

O potente efeito mitogênico da endotelina-1 pode contribuir para hipertrofia das células musculares lisas associada com a hipertensão, amplificando as respostas vasoconstritoras (Lever, 1986). A capacidade da endotelina-1 de promover a proliferação celular pode também contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose. Lesões ateroscleróticas apresentam forte expressão de endotelina-1 e pacientes com doença aterosclerótica possuem níveis plasmáticos de endotelina elevados, atingindo maiores concentrações nos pacientes com maior número de vasos afetados (Lerman et al., 1991).

### ***Endotelinas e Aterosclerose***

Embora o papel da endotelina como um potente vasoconstritor sistêmico e coronário tenha sido bem estabelecido, existem evidências crescentes de que a endotelina possa participar na patogênese e nas manifestações clínicas da aterosclerose. A endotelina pode exercer um papel central nos estágios clínicos da doença aterosclerótica, desde suas fases iniciais como disfunção endotelial que progride para isquemia miocárdica até o infarto do miocárdio. A endotelina-1 é um potente vasoconstritor e suas concentrações estão elevadas no endotélio e nas células musculares lisas de vasos ateroscleróticos (Winkles et al., 1993; Lerman et al., 1991). Em pacientes com cardiopatia isquêmica e angina estável, os níveis plasmáticos de endotelina-1 estão correlacionados diretamente com a extensão e a gravidade da aterosclerose coronária (Salomone et al., 1996). Além disso, a aterosclerose potencializa a atividade vasoconstritora da endotelina (Lopez et al., 1990) por estimular seu acúmulo local (Prat et al., 1993; Dashwood et al., 1993; Dashwood et al., 1994) e ligação ao receptor (Bacon et al., 1995).

A endotelina é liberada em resposta à lesão vascular, sendo um importante estímulo para quimiotaxia e adesão de monócitos circulantes, bem como ativação dos macrófagos (Haller et al., 1991). A forma oxidada da LDL, um dos principais participantes do processo aterogênico, funciona como um potente estímulo para produção e secreção de endotelina (Boulanger et al., 1992). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram um efeito mitogênico da endotelina sobre as células musculares lisas (Weissberg et al., 1990). A endotelina estimula a hipertrofia e a hiperplasia das células musculares lisas em cultura (Alberts et al., 1994), ao passo que as células musculares lisas, por sua vez, secretam e produzem endotelina (Resnik et al., 1990). Acima de tudo, a administração exógena de ET-1 aumenta a formação



neointimal *in vivo*, ao que tudo indica através da ativação da proteína-kinase C (Douglas et al., 1994). Estudos *in vitro* em cultura de células musculares lisas aórticas demonstraram que o efeito proliferativo da endotelina-1 ocorre através dos receptores ET<sub>A</sub> e não dos receptores ET<sub>B</sub> e, além disso, a atividade mitogênica da endotelina depende da densidade de receptores ET<sub>A</sub>. Estes achados foram corroborados pelo relato de que o bloqueio dos receptores ET<sub>A</sub> diminui a aterosclerose em hamsters com hipercolesterolemia (Kowala et al., 1995).

A endotelina-1 promove a formação de trombos plaquetários na microcirculação, (Halim et al., 1993), podendo contribuir para a patogênese das síndromes coronárias agudas. Este efeito também parece ser mediado por receptores ET<sub>A</sub>, uma vez que os receptores ET<sub>B</sub> apresentam um efeito inibitório sobre a trombose arterial (McMurdo et al., 1993). Além disso, as potentes propriedades vasoconstritoras da endotelina sobre a circulação coronariana podem potencializar o processo aterosclerótico através da redução do fluxo sanguíneo (Cannan et al., 1995).

Achados recentes sugerem que a endotelina-1 possa apresentar um papel central na ruptura das placas associadas com síndromes isquêmicas agudas. A ruptura da placa é o mecanismo predominantemente responsável pelo desenvolvimento de síndromes isquêmicas agudas (angina instável, infarto agudo do miocárdio), através da formação de trombo e vasoconstrição (Bogarty et al., 1994; Hackett et al., 1987). As placas culpadas pelas síndromes coronárias agudas são caracterizadas pela presença abundante de macrófagos (Libby, 1995) . As concentrações de endotelina-1 imunoreativa estão substancialmente elevadas nas placas ativas de pacientes com angina instável quando comparadas com placas inativas e o excesso de endotelina-1 está localizado em macrófagos e células endoteliais (Zeiber et al., 1994; Zeiber et al., 1995; Ihling et al., 1996). É interessante que a via de

oxidação da LDL é um potente estímulo para síntese de endotelina em macrófagos (Martin-Nizard et al., 1991; Boulanger et al., 1992).

Níveis elevados de endotelina plasmática e tecidual têm sido demonstrado nos estágios iniciais da aterosclerose em modelos experimentais e em seres humanos. A ET-1 pode estar elevada em ratos hipercolesterolêmicos antes do surgimento de alterações morfológicas na vasculatura (Horio et al., 1991). A dieta aterogênica em porcos resulta em disfunção endotelial, aumento dos níveis circulantes e teciduais de endotelina e, além disso, a administração intracoronária de acetilcolina resulta em elevação da endotelina plasmática que correlaciona-se com o grau de vasoconstrição (Lerman et al., 1993). Pacientes com disfunção endotelial que não apresentam evidências angiográficas de aterosclerose são caracterizados por uma diminuição do fluxo sanguíneo em resposta à acetilcolina. Lerman e colaboradores (1995) demonstraram que a presença de endotelina está aumentada na circulação sistêmica e coronária de pacientes portadores de disfunção endotelial e a acetilcolina provoca vasoconstrição nestes pacientes.

### III. OBJETIVOS

Nesta tese, utilizamos a infusão seletiva de BQ-123, um inibidor específico dos receptores ET<sub>A</sub> da endotelina-1, para:

1. Avaliar a contribuição da endotelina-1 no tônus coronariano epicárdico pela medida do diâmetro coronariano e na microvasculatura coronária, em artérias livres de lesões obstrutivas, pela medida do fluxo coronariano por Doppler intracoronário e pelo método da contagem TIMI;
2. Comparar a contribuição da endotelina-1 na vasoreatividade coronariana em artérias livres de lesões e em artérias com lesões ateroscleróticas obstrutivas.

Utilizamos também a administração intracoronária de adenosina, um vasodilatador específico da microcirculação, para:

3. Correlacionar o método da contagem TIMI com o Doppler intracoronário para medida da velocidade do fluxo coronariano.

## IV. MÉTODOS

### *Seleção dos Pacientes*

Pacientes de ambos os sexos, com idades variando entre 18 a 75 anos foram incluídos no estudo e alocados em 2 grupos: 1) grupo controle caracterizado por pacientes com dor torácica atípica submetidos a cateterismo cardíaco que apresentaram coronárias angiograficamente normais ou com irregularidades luminiais mínimas e 2) pacientes portadores de dor torácica e com pelo menos uma coronária apresentando estenose igual ou superior a 70%. Os critérios de exclusão foram os seguintes: 1) exclusão angiográfica na presença de lesão do tronco da coronária esquerda ou lesão severa de três vasos; 2) Insuficiência cardíaca e/ou fração de ejeção inferior a 40%; 3) nitroglicerina ou nitratos de ação prolongada nas 4 horas precedentes ao protocolo; 4) anormalidades da função renal, hepática ou hematológica e 5) incapacidade de assinar o termo de consentimento.

Os fatores de risco coronariano foram obtidos através dos prontuários médicos e por entrevista. Hipertensão arterial foi definida pelo uso de medicação anti-hipertensiva e fumantes ativos foram considerados aqueles pacientes com uso de pelo menos um cigarro ao dia nos últimos 30 dias. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento de acordo com os padrões do Comitê de Pesquisa em Seres Humanos do Brigham and Women's Hospital.

### *Protocolo de Estudo*

Os pacientes incluídos no estudo tiveram uma amostra de sangue coletada para análise do colesterol e receberam heparina intravenosa em *bolus* com o objetivo de atingir um tempo de coagulação ativado (TCA) superior a 250 segundos. Um cateter-guia 6Fr foi

posicionado no óstio da coronária a ser estudada e um cateter de infusão (Target Therapeutics, Fremont, CA-USA) foi posicionado num dos ramos principais da coronária esquerda para infusão da droga ativa. Uma guia-Doppler 0.014'' (Flow-wire, Cardiometrics, Rancho Cordova, CA-USA) foi introduzida através do cateter de infusão e mantida numa posição estável durante o estudo para avaliação contínua da velocidade do fluxo coronariano. Após a administração de soro fisiológico durante cinco minutos iniciais, o antagonista específico dos receptores ET<sub>A</sub> BQ-123 foi administrado seletivamente intracoronário numa taxa de infusão de 40 nmol/min (0.8 ml/minuto) durante 60 minutos. Esta dose atinge uma concentração local de 1 µM, que é duas vezes superior à necessária para inibir completamente os receptores ET<sub>A</sub> no antebraço de seres humanos. Além disso, esta dose de BQ 123 produziu uma queda pequena, porém significativa, da pressão arterial sistêmica (ver Resultados), portanto doses maiores foram intencionalmente evitadas. Os 60 minutos de infusão foram escolhidos por este ser o período necessário para o BQ-123 atingir seu platô em investigações prévias no antebraço (Cardillo 1999, Taddei 1999). No final da infusão da droga, 24 µg de adenosina e 200 µg de nitroglicerina foram injetados em *bolus* no tronco da coronária esquerda para avaliar a capacidade vasodilatadora respectivamente da microcirculação e das artérias epicárdicas.

Após o término do protocolo de avaliação da reatividade vasomotora coronariana, os pacientes com lesões ateroscleróticas passíveis de revascularização percutânea foram submetidos à angioplastia com implante de endoprótese coronária.

### ***Doses das Drogas***

O antagonista da endotelina BQ-123 foi previamente administrado na artéria braquial em seres humanos em doses de 10 a 100 nmol/min demonstrando inibir os efeitos

vasoconstritores da infusão de endotelina-1 (Haynes e Webb, 1994). Considerando-se que o fluxo coronariano excede o fluxo arterial do antebraço em até quatro vezes, uma infusão de 40 nmol/min da droga a uma velocidade de 0,8 ml/min foi escolhida visando obter-se efeitos semelhantes na circulação coronariana. A administração de nitroglicerina e adenosina em *bolus* são padronizadas por atingirem respectivamente a máxima dilatação epicárdica e da microcirculação (Feldman et al., 1981).

### ***Angiografia Coronária Quantitativa***

Angiografias coronárias foram realizadas a cada 15 minutos durante a infusão de BQ-123 e após a administração de adenosina e nitroglicerina. As cinecoronariografias foram digitalizadas no pico da diástole e três segmentos da artéria infundida (artéria alvo) mais três segmentos de outra coronária não infundida (artéria controle) angiograficamente livre de lesões epicárdicas foram analisados por angiografia quantitativa computadorizada (CMS-QCA, MEDIS, Leiden, Holanda). As respostas à administração em *bolus* de adenosina e nitroglicerina no tronco da coronária esquerda também foram avaliadas.

### ***Fluxo Coronariano e Resistência Vascular***

A velocidade do fluxo coronariano foi obtida de modo contínuo pela guia-Doppler. A guia-Doppler (Flowire, Cardiometrics) foi validada por Doucette et al. (1992) e possui 175 cm de comprimento, 0.014 polegadas de diâmetro com um transdutor de 12 MHz integrado na sua extremidade distal. O sistema é acoplado a um analisador de espectro em tempo-real, videocassete e impressora e os sinais auditivos quadratura/Doppler são analisados por transformação rápida de Fourier (Donohue et al., 1993). A velocidade média de pico (VMP) foi registrada a cada 5 minutos durante a infusão de BQ-123, após adenosina e nitroglicerina.

O fluxo coronariano foi calculado a partir da velocidade média de pico e do diâmetro coronário logo após a extremidade distal da guia-Doppler como:

$$\text{Fluxo coronariano} = \pi \cdot (\text{diâmetro}/2)^2 \cdot \text{VMP}/8$$

A resistência coronária na artéria alvo foi calculada como:

$$\text{Resistência Coronária} = \text{pressão arterial média}/\text{fluxo coronariano}$$

### ***Avaliação do Fluxo Arterial Coronariano pelo Método da Contagem TIMI***

A contagem TIMI foi utilizada para medida da velocidade do fluxo coronariano durante a administração do BQ 123 e adenosina. A contagem TIMI é um método validado (Gibson et al., 1996; Dotani et al., 1996) que permite a análise quantitativa da velocidade do fluxo coronariano. No método TIMI, a artéria coronária esquerda é estudada em projeção oblíqua anterior direita caudal e a coronária direita é melhor analisada na projeção oblíqua anterior esquerda cranial, ambas numa magnificação de 9 polegadas e velocidade de 30 quadros/segundo. Durante a injeção de contraste, a artéria é focalizada ao longo do seu trajeto para gravar a imagem durante a qual o contraste entra primeiro no vaso e segue o avanço do contraste a medida que este evolui ao longo do vaso até um ponto de referência distal. O número de “quadros” necessários para que o contraste percorra estes extremos é contagem TIMI (Gibson et al., 1996; Dotani et al., 1996). A contagem TIMI possui excelente reprodutibilidade (coeficiente de variabilidade 9%) (Gibson et al., 1996) e correlaciona-se bem com as medidas por Doppler intracoronário (Kern et al., 1996).

As seguintes fórmulas foram utilizadas para o cálculo do fluxo sanguíneo:

$$\text{Fluxo} = \text{Velocidade} \times \text{Área do Vaso} \times 0.06$$

$$\text{Velocidade} = \text{Distância} \times 30/\text{TFC}; \text{TFC} = \text{contagem TIMI}$$

$$\text{Área do Vaso} = \pi \cdot (\text{raio})^2$$

### ***Parâmetros Clínicos e Hemodinâmicos***

As características clínicas dos pacientes, incluindo dados demográficos e fatores de risco foram documentadas no início do estudo. A frequência cardíaca, a pressão arterial sistêmica e o eletrocardiograma foram monitorizados permanentemente ao longo do protocolo de infusão das drogas.

### ***Análise Estatística***

Os resultados são apresentados como como média  $\pm$  desvio padrão (DP), ou como proporções, conforme o apropriado. Os seguintes desfechos foram avaliados em resposta ao antagonista da endotelina (após 60 minutos de infusão), nitroglicerina e adenosina: (a) a variação no diâmetro luminal médio basal avaliado por angiografia quantitativa nos segmentos proximal, médio e distal da coronária infundida e (b) a reserva de fluxo coronária avaliada por Doppler intracoronário.

As medidas do diâmetro epicárdico, da resistência coronária e das alterações hemodinâmicas foram comparadas com as medidas basais usando modelos de análise de variância de dupla entrada para medidas repetidas (ANOVA). As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. O coeficiente de Pearson foi utilizado para comparar a resposta da velocidade do fluxo arterial à infusão de adenosina medida por Doppler e pelo método da contagem TIMI.



O nível de significância estatística deste estudo foi menor ou igual a 0,05 considerando-se um poder de 80%. Todos dados foram analisados pelo pacote estatístico STATA (Stacorp, TX).

## V. RESULTADOS

Um total de 36 pacientes consentiram em participar do estudo. Dezesesseis pacientes foram incluídos no trabalho, sendo oito destes com coronárias sem lesões epicárdicas significativas (grupo controle) e oito pacientes com estenoses coronárias igual ou superior a 70% na artéria a ser estudada. Os demais pacientes foram excluídos por não preencherem os critérios angiográficos de inclusão.

As características demográficas basais dos pacientes estão apresentadas na Tabela 2. As variáveis clínicas foram semelhantes nos dois grupos, exceto o uso de estatinas que foi significativamente maior e o HDL que foi menos elevado no grupo com lesões coronarianas.

**Tabela 2. Características clínicas basais**

	<b>Livre de lesões obstrutivas (n= 8)</b>	<b>Lesões ateroscleróticas (n= 8)</b>
Idade (anos)	52 ± 9	54 ± 8
LDL colesterol (mg/dL)	101 ± 43	102 ± 37
HDL colesterol (mg/dL)	62 ± 22	37 ± 11 *
Diâmetro coronário médio (mm)	1,79 ± 0,53	1,78 ± 0,51
Homens	2 (25)	6 (75)
Hipertensão	3 (38)	3 (38)
Fumantes	2 (25)	1 (13)
Uso de estatinas	1 (13)	6 (75) *

dados apresentados como média ± DP ou n (%); \* P < 0,05

*Varição do Diâmetro e do Fluxo Sangüíneo nos Pacientes com Coronárias Livres de Lesões Obstrutivas*

A média do fluxo sangüíneo na coronária alvo foi  $26 \pm 26$  ml/min. Após 60 minutos, a infusão de BQ-123 foi associada com uma diminuição modesta porém significativa da pressão arterial sistêmica (de  $97 \pm 11$  mm Hg para  $88 \pm 13$  mm Hg,  $P < 0.001$ ) acompanhada de um leve aumento da frequência cardíaca (de  $69 \pm 10$  batimentos/minuto para  $72 \pm 9$  batimentos/minuto). (Figura 1)

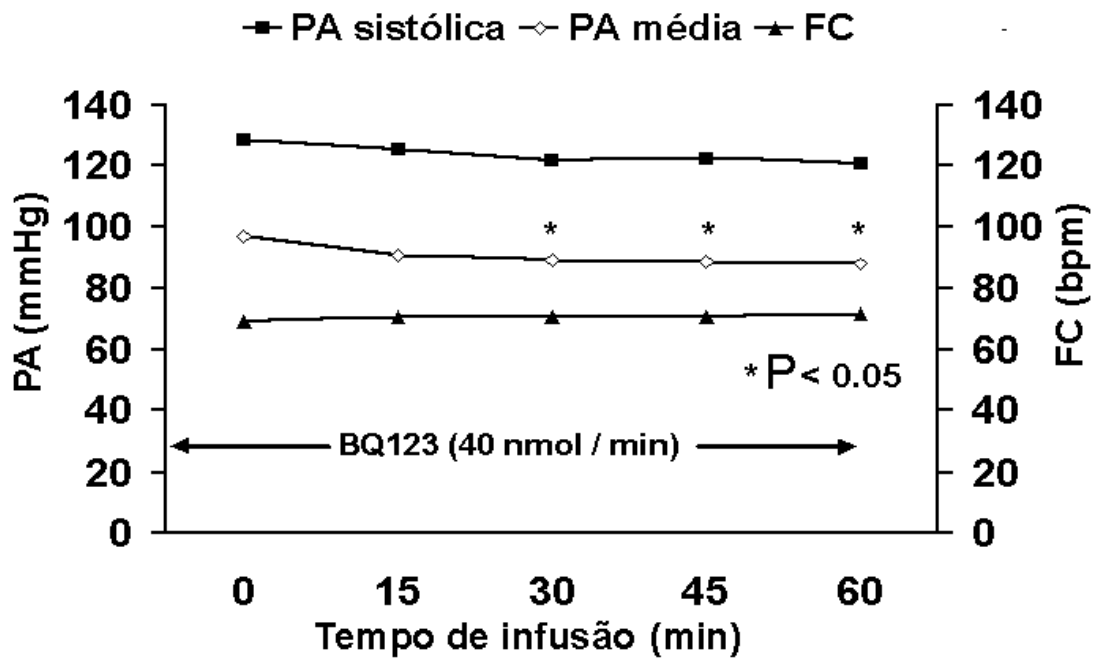


Figura 1. Resposta hemodinâmica média para 8 pacientes à infusão de BQ-123. PA sistólica: pressão arterial sistólica; PA média: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; BPM: batimentos por minuto.

A infusão de BQ-123 provocou dilatação progressiva da coronária alvo (Figura 2). Após 60 minutos de infusão, o diâmetro da coronária alvo aumentou 7% acima do seu basal ( $P < 0,001$ ) enquanto o diâmetro do vaso controle não se alterou ( $P = 0,2$ ) ( $P < 0,001$  para comparação entre artéria alvo e artéria controle). Esta dilatação ocorreu de modo uniforme ao longo da extensão da coronária infundida (média  $\pm$  DP: segmento proximal =  $5\% \pm 1\%$ ; segmento médio =  $9 \pm 2\%$ ; segmento distal =  $7\% \pm 2\%$ ) (Figura 3).

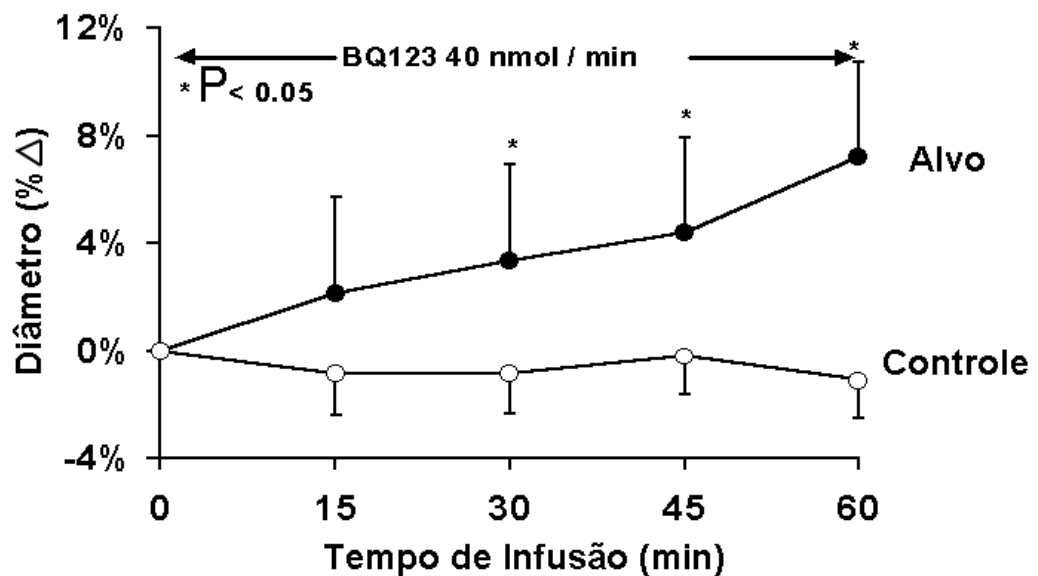


Figura 2. Efeito do BQ-123 no diâmetro epicárdico médio (+ DP) de coronárias livres de lesões obstrutivas. Alvo: coronária infundida; Controle: coronária não-infundida

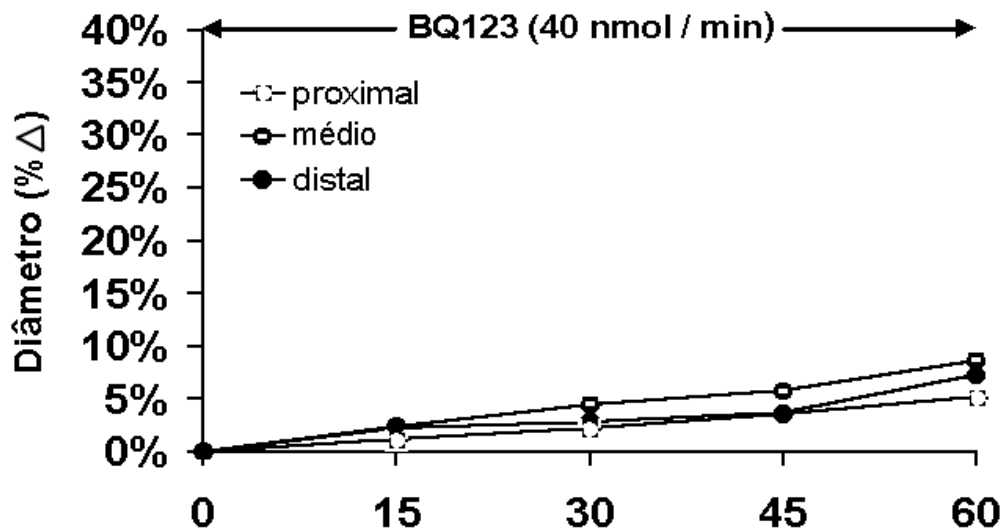


Figura 3. Análise por segmento arterial do efeito do BQ-123 em coronárias livres de lesões obstrutivas.

O fluxo coronariano na artéria alvo aumentou 19% no final dos 60 minutos de infusão de BQ-123 ( $P = 0,002$ ). Este achado foi associado com uma redução de 22% na resistência vascular coronária ( $P < 0,001$ ) (Figura 4). Não houve diferenças na resposta epicárdica ou no fluxo sanguíneo em relação à presença ou ausência de fatores de risco.

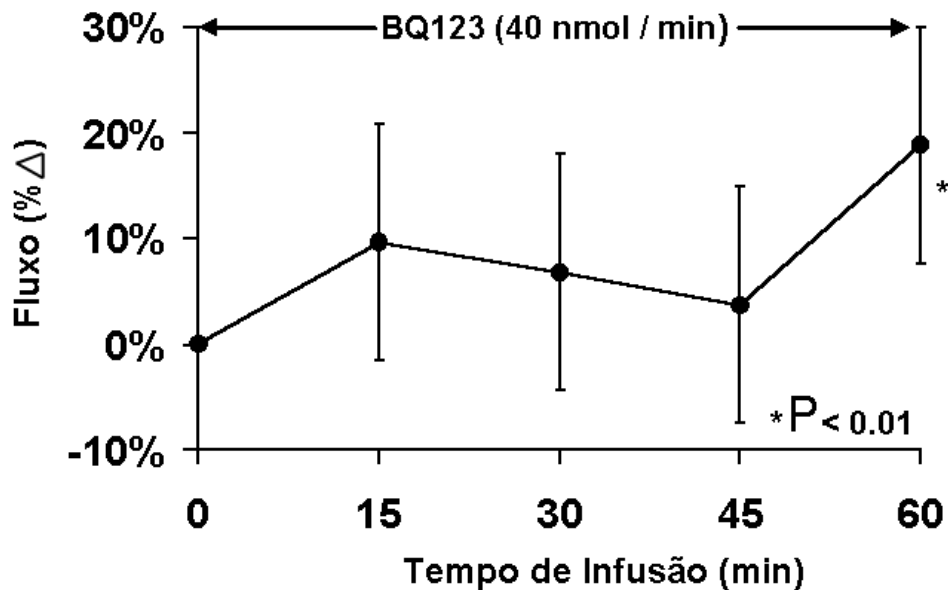


Figura 4. Resposta do fluxo sanguíneo coronariano em resposta à infusão de BQ-123 em coronárias livres de lesões obstrutivas.

***Comparação da Resposta do Diâmetro Coronário em Pacientes com Lesão Aterosclerótica e em Pacientes com Coronárias Normais***

A infusão de BQ-123 causou dilatação progressiva da coronária alvo em ambos os grupos. Após 60 minutos de infusão, o diâmetro da coronária alvo aumentou 7% no grupo com coronárias normais e 16% no grupo com lesão epicárdica ( $P < 0.01$ ) (Figura 5). Esta dilatação ocorreu de modo uniforme ao longo da extensão da coronária infundida no grupo controle (média  $\pm$  DP: segmento proximal=  $5\% \pm 1\%$ ; segmento médio=  $9 \pm 2\%$ ; segmento distal=  $7\% \pm 2\%$ ), enquanto no grupo com doença coronária a dilatação foi mais pronunciada no local da lesão aterosclerótica ( $P < 0.01$ ) (Figura 6).

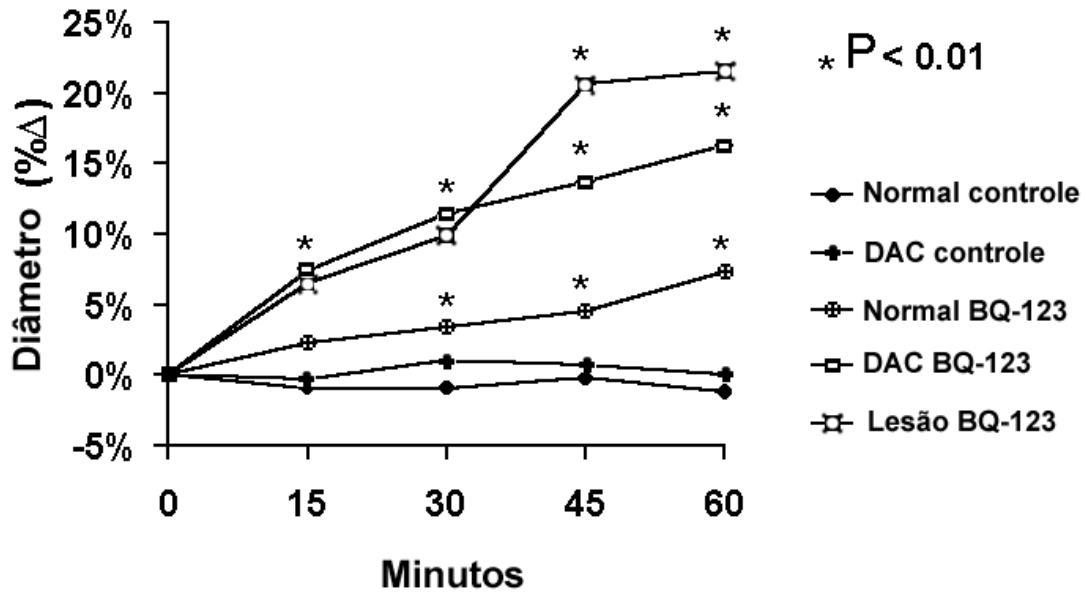


Figura 5. Comparação do efeito do BQ-123 no diâmetro epicárdico médio de coronárias livres de lesões obstrutivas e coronárias com lesões ateroscleróticas. Normal controle: coronárias livres de lesões ateroscleróticas, vaso não-infundido; DAC controle: coronárias com lesões ateroscleróticas, vaso não-infundido; Normal BQ-123: coronárias livres de lesões ateroscleróticas, vaso infundido; DAC BQ-123: coronárias com lesões ateroscleróticas, vaso infundido; Lesão BQ-123: local da lesão aterosclerótica, vaso infundido.

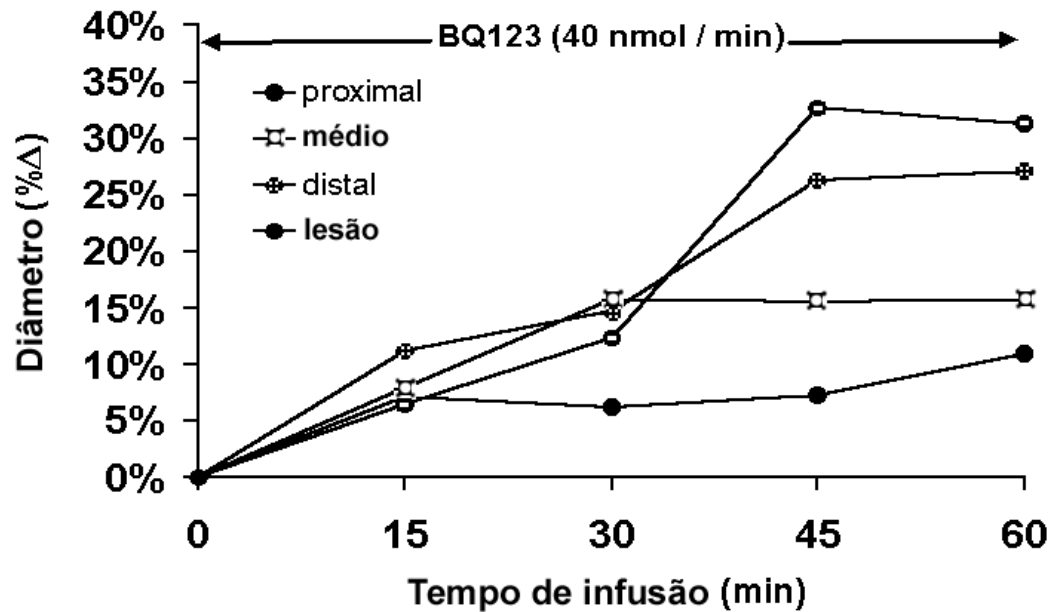


Figura 6. Análise por segmento arterial do efeito do BQ-123 em coronárias com lesões obstrutivas.

A administração de adenosina aumentou o diâmetro da artéria alvo em 9% no grupo controle ( $p < 0.001$ ) e em 16% no grupo com lesão aterosclerótica ( $p < 0.001$ ). A nitroglicerina foi associada com um aumento de respectivamente 21% e 26% do diâmetro epicárdico nos grupos controle e com lesão aterosclerótica significativa.

### ***Resposta da Velocidade do Fluxo Coronariano à Adenosina e ao BQ-123 pelo Método de Contagem TIMI***

A administração de BQ-123 não resultou em alteração significativa da velocidade do fluxo sanguíneo tanto da coronária alvo como da coronária controle pela contagem TIMI (Figura 7), não ocorrendo diferença significativa na variação da velocidade do fluxo medida por Doppler intracoronário e pela contagem TIMI ( $P = 0,4$  Doppler;  $P = 0,2$  TIMI) (Figura 8). Entretanto, a adenosina provocou um aumento significativo da velocidade do fluxo coronariano em condições de hiperemia, havendo boa correlação entre as alterações da velocidade detectadas por Doppler e pela contagem TIMI ( $r = 0,67$ ;  $P = 0,01$ ) (Figura 9).

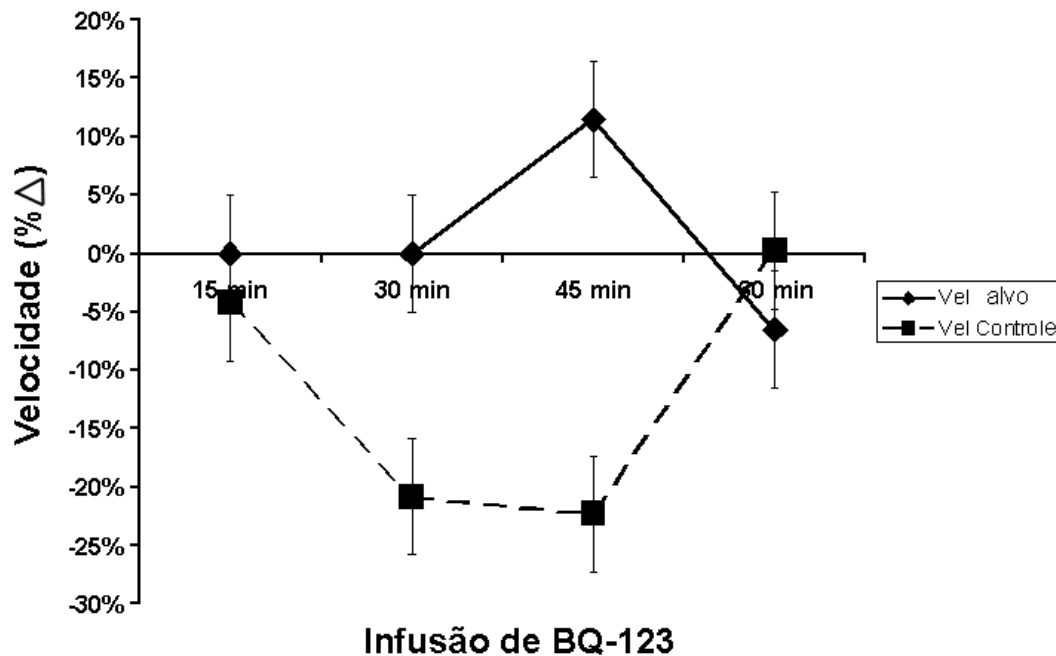


Figura 7. Resposta da velocidade do fluxo sanguíneo à infusão de BQ-123. Vel alvo: velocidade na artéria infundida; Vel controle: velocidade na coronária não-infundida.



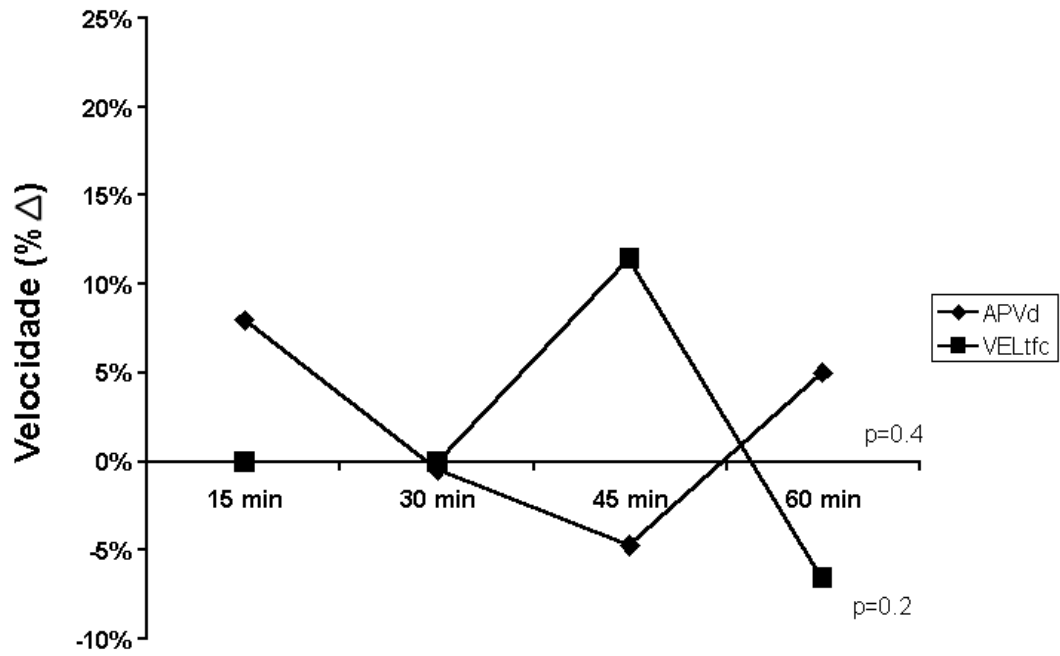


Figura 8. Variação da velocidade do fluxo sanguíneo em resposta à infusão de BQ-123 avaliada por Doppler e pelo método da contagem TIMI.

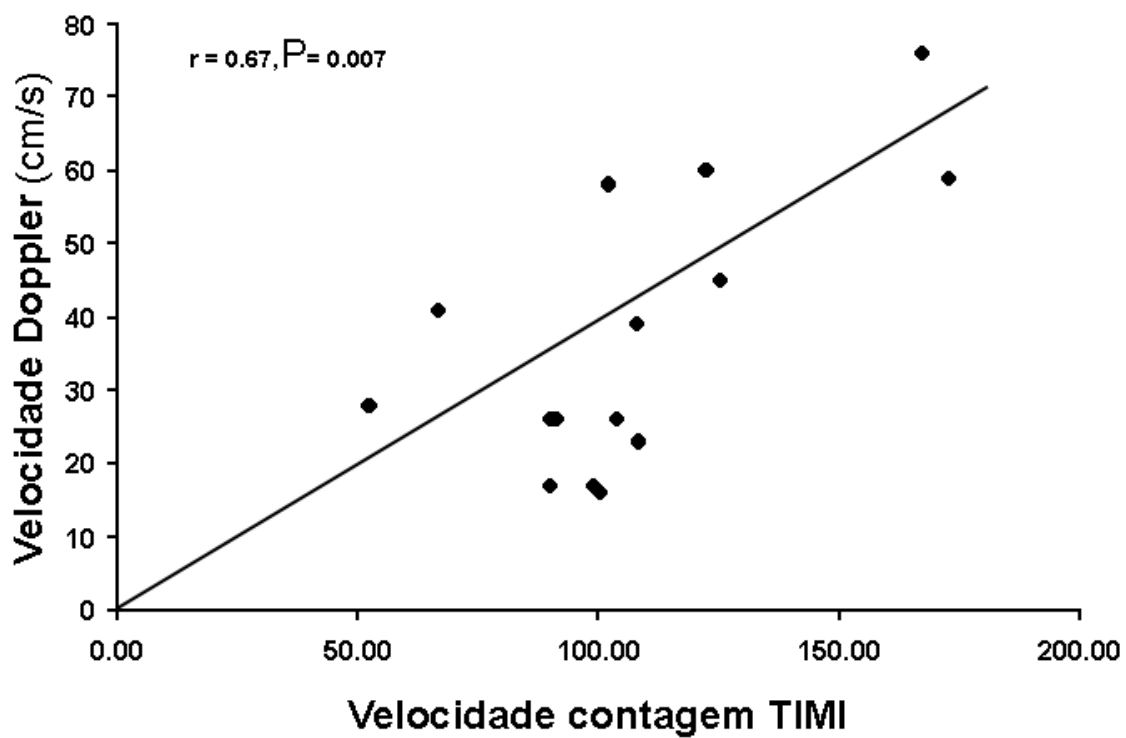


Figura 9. Correlação entre a variação da velocidade do fluxo sanguíneo em resposta à adenosina medida por Doppler e pelo método da contagem TIMI.  $R = 0,67$ ; coeficiente de correlação.

## VI. DISCUSSÃO

O conceito de que o endotélio vascular representa uma barreira celular ativa que reveste os vasos sanguíneos e possui múltiplas funções é bastante conhecido. O endotélio produz e libera substâncias que irão participar da homeostase vascular. Em condições normais, predominam as ações vasodilatadoras, anti-proliferativas e anti-plaquetárias relacionadas principalmente ao óxido nítrico (Furchgott e Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1988). A disfunção endotelial caracterizada pela vasoconstrição e/ou redução do fluxo arterial em resposta à acetilcolina é um evento precoce que precede o surgimento de lesões ateroscleróticas angiograficamente detectáveis (Zeicher et al., 1991). As alterações da função endotelial podem ser reversíveis com o tratamento dos fatores de risco como a dislipidemia (Anderson et al., 1995). A presença de disfunção endotelial é marcante também após procedimentos de revascularização percutânea. Caramori e colaboradores (1999) realizaram um estudo onde foi demonstrado que a disfunção endotelial pós-implante de endoprótese coronária é mais exacerbada do que pós angioplastia ou aterectomia coronária. Entretanto, apenas recentemente foi comprovado que a disfunção endotelial apresenta valor prognóstico no desenvolvimento de eventos cardiovasculares futuros, podendo fornecer informações importantes tanto no diagnóstico como no manejo de pacientes com risco de desenvolverem aterosclerose (Schachinger et al., 2000; Al Suwaidi et al., 2000).

Uma atividade peptidérgica produzida pelas células endoteliais capaz de provocar vasoconstrição coronariana foi inicialmente descrita em 1995 e, subsequentemente, uma família de peptídeos denominados endotelinas foi isolada (Hickey et al., 1985). A descoberta e o desenvolvimento de antagonistas específicos dos receptores da endotelina possibilitou

avanços na compreensão da biologia destes peptídeos vasoativos, permitindo avaliar a participação da endotelina na fisiologia e na patogênese das doenças vasculares.

A ET-1 é um potente vasoconstritor em mamíferos e, além de suas potentes ações vasopressoras, também induz a proliferação de células endoteliais e musculares lisas (Bobik et al., 1990; Vigne et al., 1990). A vasoconstrição coronária em cães induzida pela ET-1 é mediada principalmente por receptores ET<sub>A</sub> (Rigel e Lappe, 1993) que possuem uma afinidade 10 vezes maior pela ET-1 do que pela ET-2 e pela ET-3 (Arai et al., 1990). Os efeitos mitogênicos e vasoconstritores da endotelina podem ser bloqueados por antagonistas dos receptores ET<sub>A</sub> (Ohlstein et al., 1992). Um aumento da endotelina e de seus precursores pode ser observado em placas ateroscleróticas, ocorrendo um predomínio de receptores ET<sub>A</sub> na camada média. Esta evidência sugere que a ET-1, através de ligação aos seus receptores ET<sub>A</sub>, estimula a proliferação das células musculares lisas e, portanto, pode ser fundamental na patogênese da aterosclerose. McKeenna e colaboradores (1998) demonstraram que antagonistas ET<sub>A</sub> seletivos orais reduzem significativamente a hiperplasia neointimal em modelos animais de re-estenose.

Existem diversas evidências de que a endotelina modula o tônus arterial periférico em seres humanos e de que o efeito vasoconstritor da ET-1 pode ser bloqueado por antagonistas dos receptores ET<sub>A</sub>. Entretanto, apesar da endotelina-1 ser o mais potente dos vasoconstritores endógenos (Yanagisawa et al., 1988), sua contribuição no tônus coronário em seres humanos permanece alvo de investigação.

### ***Efeito da ET-1 no Tônus Basal de Coronárias Livres de Lesões Obstrutivas***

Demonstramos que a inibição dos receptores A da endotelina, pela administração intracoronária seletiva de BQ-123, provoca dilatação das artérias epicárdicas e da

microvasculatura em pacientes com coronárias angiograficamente livres de lesões focais significativas. Esta dilatação ocorreu de forma gradativa ao longo dos 60 minutos de infusão da droga, à semelhança de um estudo realizado na circulação periférica, sugerindo que a endotelina-1 e, particularmente seus receptores  $ET_A$ , apresentam um importante papel no controle do tônus da circulação coronária em seres humanos.

Em recente estudo, envolvendo pacientes portadores de doença coronariana, a infusão intravenosa de bosentan, um inibidor combinado dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , não apresentou efeito em coronárias epicárdicas com estenoses, mas dilatou artérias livres de lesões obstrutivas sem afetar o fluxo sanguíneo coronário (Wenzel et al., 1998). O efeito do bosentan pode ter sido subestimado porque a via intravenosa de administração da droga foi associada com hipotensão sistêmica significativa e taquicardia, o que limitou a concentração da droga que efetivamente atingiu a circulação coronária. Em contrapartida, nós infundimos BQ-123 seletivamente na coronária, atingindo uma concentração local provavelmente várias vezes maiores do que na circulação sistêmica ou nas coronárias adjacentes.

O BQ-123 induziu um aumento de 8% no diâmetro epicárdico, ao passo que a nitroglicerina foi associada com uma vasodilatação de 24% em relação ao basal. Como a nitroglicerina é o principal agente dilatador das artérias epicárdicas e elimina o tônus constritor basal coronariano (Feldman et al., 1981), nossos achados sugerem que aproximadamente um terço do tônus epicárdico basal pode ser atribuído à ação da endotelina-1 em seus receptores  $ET_A$ . Além de dilatar as coronárias epicárdicas em até 8%, o BQ-123 provocou um aumento de 19% no fluxo coronariano com uma conseqüente redução de 22% da resistência vascular, um efeito consistente com aquele observado em arteríolas do antebraço em seres humanos (Haynes e Webb, 1998). Portanto, a endotelina-1 contribui para

a regulação fisiológica do fluxo sanguíneo miocárdico e contrabalança os efeitos dos vasodilatadores endógenos como o óxido nítrico.

Existe uma clara interação entre as ações da endotelina-1 e do óxido nítrico. A infusão de endotelina-1 provoca um efeito vasodilatador inicial que parece ser mediado pela liberação de óxido nítrico via receptores  $ET_B$ , enquanto a administração do antagonista dos receptores  $ET_A$  provoca uma vasodilatação que pode ser em parte óxido nítrico dependente (Verhaar et al., 1998). Best e colaboradores (1999) realizaram um estudo experimental onde a administração crônica via oral de um antagonista dos receptores  $ET_A$  causou aumento dos níveis de óxido nítrico e melhora da vasodilatação endotélio-dependente em porcos com hipercolesterolemia. Em contrapartida, a administração aguda de antagonista dos receptores  $ET_A$  não resultou em melhora da função endotelial (Hasdai et al., 1998), apesar de atenuar os efeitos vasoconstritores da endotelina-1 em coronárias epicárdicas. Em outro estudo, foi demonstrado que a endotelina-1, via receptores  $ET_A$ , inibe a produção de óxido nítrico em cultura de células musculares lisas (Ikeda et al., 1997).

#### ***Comparação da Contribuição da ET-1 no Tônus Basal em Coronárias Livres de Lesões Obstrutivas e em Coronárias com Doença Aterosclerótica***

As artérias coronárias ateroscleróticas são suscetíveis a desenvolverem vasoconstrição que contribui para isquemia miocárdica, entretanto o papel dos fatores constritores em seres humanos não está estabelecido neste contexto. A contribuição da ET-1 no tônus arterial de 8 pacientes com coronárias angiograficamente normais e em 8 pacientes com estenoses coronárias significativas e angina pectoris foi avaliada. O receptor-A da endotelina foi bloqueado pela infusão intracoronária seletiva de BQ-123 numa concentração de 40 nmol/min durante 60 minutos e as respostas foram analisadas por angiografia coronária

quantitativa. As artérias angiograficamente normais dilataram 7% em resposta ao BQ-123 e 21% em resposta à nitroglicerina. As coronárias com lesões ateroscleróticas apresentaram 16% de dilatação em resposta ao BQ-123 e 26% em resposta à nitroglicerina. As lesões ateroscleróticas dilataram 28% em resposta ao BQ-123 e 30% em resposta à nitroglicerina.

Apesar das coronárias angiograficamente normais terem apresentado dilatação com a infusão de BQ-123, a resposta vasodilatadora foi significativamente maior nas coronárias que apresentavam lesões ateroscleróticas. No local da estenose, este efeito é responsável pela quase totalidade do tônus basal uma vez que a resposta ao BQ-123 é de semelhante magnitude a da nitroglicerina. Este achado sugere que a ET-1 e seus receptores  $ET_A$ , embora contribuam para o tônus basal presente em coronárias normais, este efeito apresenta maior expressão na presença de placas ateroscleróticas.

Em situações onde existe aterosclerose coronária e conseqüente disfunção endotelial (Ludmer et al., 1986), a pronunciada resposta ao BQ-123 pode estar relacionada à diminuição da atividade do óxido nítrico presente nestas situações (Verhaar et al., 1998). Existe um mecanismo de retroalimentação negativa entre a endotelina e o óxido nítrico e em situações onde existe diminuição do óxido nítrico como na aterosclerose coronarína, a atividade da endotelina e a conseqüente resposta ao seu antagonista ficam aumentadas. Best e colaboradores (1999) demonstraram que a administração crônica de antagonistas da endotelina preserva a função endotelial e aumenta a produção de óxido nítrico em modelos animais de hipercolesterolemia. Este efeito pode ter importantes implicações clínicas, especialmente em pacientes com aterosclerose coronária onde a ET-1 exerce um destacado papel no tônus constritor.

Zeicher e colaboradores (1995) realizaram um estudo onde foi demonstrado por técnicas de imuno-histoquímica que a presença de endotelina-1 em placas ateroscleróticas extraídas por aterectomia direcional localiza-se predominantemente nas áreas ricas em macrófagos e células inflamatórias. Neste trabalho, obteve-se ainda que existe maior concentração de endotelina nas placas ativas de pacientes com angina instável em comparação com aqueles com angina estável. Desta forma, é esperado atingir-se um maior efeito vasodilatador do BQ-123 em pacientes instáveis onde a endotelina-1 parece ser o principal mediador do no tônus constritor aumentado encontrado nestes pacientes.

Apesar de diversos estudos terem testado o efeito da endotelina na tônus arterial de pacientes normais através da infusão de antagonistas da endotelina na circulação do antebraço (Haynes et al., 1994; Haynes et al., 1995; Verhaar et al., 1998), o presente trabalho foi o primeiro a investigar a participação da endotelina-1 no tônus coronariano de pacientes com aterosclerose coronária pela infusão seletiva intracoronária de BQ-123. Em outro estudo, a administração intracoronária de BQ-123 durante 60 minutos provocou redução das pressões arterial sistêmica, arterial pulmonar e capilar pulmonar mas o efeito da droga na fisiologia coronariana não foi testado (Halcox et al., 2000).

#### ***Uso do Método da Contagem TIMI para Medida da Velocidade do Fluxo Coronariano em Resposta à Adenosina e ao BQ-123***

O efeito da administração intracoronária seletiva de BQ 123 e de adenosina na velocidade do fluxo arterial coronariano foi avaliado pelo método de contagem TIMI e por Doppler intracoronário. A infusão de BQ-123 não foi associada com uma alteração significativa da velocidade do fluxo coronariano medido tanto por Doppler como pela contagem TIMI. O aumento do fluxo sanguíneo coronariano em 19% parece ocorrer



predominantemente devido ao efeito vasodilatador sobre as coronárias epicárdicas, apresentando ação limitada sobre a microvasculatura. A ausência de efeito na velocidade do fluxo, que reflete a ação sobre a microvasculatura, deve-se provavelmente ao aumento do diâmetro do vaso epicárdico que resulta numa queda da velocidade do fluxo.

Neste mesmo estudo, a administração de intracoronária não-seletiva de adenosina em *bolus* resultou em aumento da velocidade do fluxo sanguíneo coronário, havendo boa correlação entre as alterações na velocidade detectada por Doppler e pela contagem TIMI. A adenosina apresenta um efeito apenas modesto sobre o diâmetro epicárdico, sendo o aumento global do fluxo sanguíneo atribuído quase totalmente devido ao pronunciado efeito vasodilatador sobre a microcirculação e conseqüente queda da resistência coronariana (Doucette et al., 1992).

O uso da contagem TIMI foi proposto por Gibson e colaboradores (Gibson et al., 1996) com o objetivo de padronizar a avaliação do fluxo coronariano e desenvolver um índice simples e reprodutível do fluxo sanguíneo, apresentando validade prognóstica em pacientes pós-infarto do miocárdio (Gibson et al., 1999). Esta técnica correlaciona-se bem com medidas do fluxo coronariano obtidas por guia-Doppler (Kern et al., 1996) pós angioplastia e pode ser utilizada para a estimativa da reserva de fluxo coronariana (Manginas et al., 1999). Entretanto, a contagem TIMI não tem sido aplicada em protocolos experimentais para avaliação das variações do fluxo arterial endotélio-dependente.

A contagem TIMI permite a análise quantitativa da velocidade do fluxo coronariano e não sofre algumas das limitações da medida direta da velocidade do fluxo coronariano por Doppler intracoronário, um método que necessita instrumentação da artéria culpada, é altamente dependente da posição do transdutor de Doppler e, portanto, de difícil realização

durante protocolos longos durante os quais a posição do transdutor de Doppler irá ser alterada. Além disso, a avaliação do fluxo sanguíneo por Doppler fica limitada à artéria na qual a guia-Doppler está posicionada, enquanto o método de contagem TIMI permite a medida do fluxo tanto na artéria alvo como em uma coronária controle. A contagem TIMI é, portanto, um índice simples, reproduzível e objetivo da velocidade do fluxo coronariano que pode ser realizado sem instrumentação direta da artéria (Gibson et al., 1996; Manginas et al., 1999).

O método da contagem TIMI tem demonstrado apresentar uma correlação adequada com a medida por Doppler em condições de hiperemia, quando ocorrem alterações mais pronunciadas da velocidade fluxo sanguíneo (Kern et al., 1996). A contagem TIMI pode inclusive ser utilizada para a estimativa da reserva de fluxo coronariano sob estímulo da adenosina (Manginas et al., 1999). O fluxo sanguíneo coronariano em condições de repouso é uma função da pressão sistêmica dividida pela resistência vascular total, a qual inclui a resistência imposta pela estenose e a resistência imposta pela microcirculação. Uma estenose coronariana geralmente deve exceder em 75% do diâmetro arterial até que a sua resistência se aproxime da resistência da microcirculação coronária reduzindo o fluxo sanguíneo em repouso. Este conceito sugere que a contagem TIMI pode ser um índice do comportamento da microcirculação, o qual reflete a resistência do leito vascular coronariano (Faile et al., 2000).

A administração intracoronária seletiva de BQ-123 em pacientes com coronárias angiograficamente normais não resultou em aumento da velocidade do fluxo sanguíneo coronariano a despeito de provocar um aumento global do fluxo sanguíneo. O método da contagem TIMI demonstrou ser uma técnica de fácil aplicabilidade e possuir adequada

correlação com as medidas de fluxo sanguíneo por Doppler intracoronário, especialmente em condições de hiperemia.

## VII. CONCLUSÕES

Em resposta aos objetivos propostos neste estudo, concluímos que:

1. A infusão intracoronária seletiva de BQ-123, um inibidor específico dos receptores  $ET_A$  da endotelina-1 em pacientes com coronárias angiograficamente normais resultou em aumento significativo do diâmetro e do fluxo coronariano, sugerindo que a endotelina-1 participa da manutenção do tônus constritor basal coronário em oposição às substâncias vasodilatadoras endotélio-dependentes como o óxido nítrico.
2. Houve um aumento significativamente maior do diâmetro coronariano epicárdico em pacientes com lesões obstrutivas focais em comparação com o aumento no calibre arterial daqueles pacientes com coronárias normais. O efeito vasodilatador obtido foi semelhante ao obtido com a administração de nitratos, sugerindo que a endotelina desempenha um papel central no tônus constritor aumentado presente nos pacientes com doença aterosclerótica. No local da estenose, este efeito é responsável pela quase totalidade do tônus basal. Este achado sugere que a ET-1 e seus receptores  $ET_A$ , embora contribuam para o tônus basal presente em coronárias normais, este efeito apresenta maior expressão na presença de placas ateroscleróticas.
3. Utilizando adenosina como estímulo, demonstramos que existe uma correlação significativa entre a medida da velocidade do fluxo coronariano avaliada pela contagem TIMI e pela guia-Doppler em situações de hiperêmia. Neste mesmo estudo, a velocidade do fluxo coronariano manteve-se constante ao longo dos 60 minutos de infusão de BQ-123 em pacientes com coronárias angiograficamente normais.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al Suwaidi J, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101:948-954.
2. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 1994; 269:10112-10118.
3. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 1995; 332:488-493
4. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relationship of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235-41.
5. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nankanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:730-732.
6. Bacon CR, Cary NR, Davenport AP: Distribution of endothelin receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovascular Pharmacol* 1995; 26 (suppl 3):S439-S441.
7. Best PJM, Lerman LO, Romero JC, Richardson D, Holmes DR, Lerman A. Coronary endothelial function is preserved with chronic endothelin receptor antagonism in experimental hypercholesterolemia in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2769-2775.

8. Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J Biol Chem* 1989; 264:14954-14959.
9. Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 258:C408-C415.
10. Bogaty P, Hackett D, Davies G, Maseri A: Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 1994, 90:5-11.
11. Boulanger C, Lusher TF. Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990;85:587-90.
12. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Lusher TF. Oxidized and low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992;70:1191-1197
13. Brown B, Zhao X, Sacco D, Albers J. Lipid lowering and plaque regression: New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993; 87:1781-1791.
14. Cannan CR, Burnett JC Jr, Brandt RR, Lerman A. Endothelin at pathophysiological concentrations mediates coronary vasoconstriction via the endothelin-A receptor. *Circulation* 1995;92:3312-3317.
15. Caramori PRA, Zago AJ. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. *Arq Bras Cardiol* 2000; 75:163-172.
16. Caramori PRA, Lima VC, Seidelin PH, Newton GE, Parker JD, Adelman AG. Long-term endothelial dysfunction after coronary artery stenting. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1675-1679.

17. Caramori PR; Adelman AG; Azevedo ER; Newton GE; Parker AB; Parker JD . Therapy with nitroglycerin increases coronary vasoconstriction in response to acetylcholine. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:1969-1674
18. Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon RO, Panza JA. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 753-758.
19. Celemajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-1115.
20. Clarke JG, Benjamin N, Larkin SW, Webb DJ, Davies GJ, Maseri A. Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in man. *Am J Physiol* 1989; 257:H2033-2035.
21. Cocks TM, Broughton A, Dib M, Sudhir K, Angus JA. Endothelin is blood vessel selective: studies on a variety of human and dog vessels in vitro and on regional blood flow in the conscious rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16:243-246.
22. Cooke JP. Flow activates an endothelium potassium channel to release endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88:1663-1671.
23. Cyr C, Huebner K, Druck T, Kris R. Cloning and chromosomal localisation of a human endothelin ETA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:184-190.
24. Dashwood M, Allen SP, Iu TN Muddle JR: The effect of the ET<sub>A</sub> receptor antagonist, FR 139317, on <sup>125</sup>I -ET-1 binding to the atherosclerotic human coronary artery. *Br J Pharmacol* 1994;112:386-389.
25. Dashwood M, Barker SGE, Muddle JR, Yacoub MH, Martin JF: <sup>125</sup> I-Endothelin-1 binding to vasa vasorum and regions of neovascularization in human and porcine blood

- vessels: a possible role for endothelin in intimal hyperplasia and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(suppl 8):S343-S347.
26. Davies M, Thomas A. Plaque fissuring: the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53:363-373.
  27. Dotani I, Dodge JT, Goel M, et al. Techniques in the angiographic analysis of coronary flow: past present and future. *J Intervent Cardiol* 1996; 9:429-444.
  28. Doucette JW, Corl PD, Payne HM, et al. Validation of a doppler guide wire for intravascular measurement of coronary artery flow velocity. *Circulation* 1992;85:1899-1911.
  38. Donohue TJ, Kern MJ, Aguirre FV, et al. Assessing the hemodynamic significance of coronary stenosis: analysis of translesional pressure-flow velocity relationship in patients. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 449-458.
  39. Douglas SA, Hiley CR. Endothelium-dependent vascular activities of endothelin-like peptides in the isolated superior mesenteric arterial bed of the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101:632-639.
  29. Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, et al. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty: protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 1994; 75:190-197.
  30. Edwards RM, Trizna W, Ohlstein EH. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol* 1990; 259:F217-221.
  31. Erikson JM, Velasco CE. Endothelin-1 and myocardial preconditioning. *Am Heart J* 1996; 132:84-90.



32. Ezra D, Goldstein RE, Czaja JF, Feurstein GZ. Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs. *Am J Physiol* 1989; 257:H339-343.
33. Faile BA, Guzzo JA, Tate DA, Nichols TC, Smith SC, Dehmer GJ. Effect of sex, hemodynamics, body size, and other clinical variables on the corrected Thrombolysis In Myocardial Infarction frame cont used as an assessment of coronary blood flow. *Am Heart J* 2000; 140:308-314.
34. Feldman RL, Pepine CJ, Conti CR. Magnitude of dilatation of large and small coronary arteries to nitroglycerin. *Circulation* 1981; 64:324-333.
35. Firth JD, Roberts AF, Raine AE. Effect of endothelin on the function of isolated perfused working heart. *Clin Sci* 1990; 79:221-226.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
37. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes (Part I & II). *N Engl J Med* 1992; 326:242-250, 310-318.
38. Gardiner Sm, Compton AM, Bennet T. Effects of indomethacin on the regional hemodynamic responses to low doses of endothelin and sarafotoxin. *Br J Pharmacol* 1990; 100:158-162.
39. Gardiner SM, Kemp PA, Compton AM, Bennet T. Coeliac haemodynamic effects of endothelin-1, endothelin-3, proendothelin-1 and proendothelin-3 in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1992; 106:483-488
40. Gensini GF, Conti AA, Prisco D. Endothelins: an overview of recent achievements. *Ann Ital Med Int* 1998; 13:88-92.

41. Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, et al. TIMI frame count – A quantitative method of assessing coronary artery flow. *Circulation* 1996;93:879-888.
42. Gibson MC, Murphy SA, Rizzo MJ, et al. Relationship between TIMI frame count and clinical outcomes after thrombolytic administration. *Circulation* 1999; 99:1945-1950.
43. Hackett D, Davies G, Chierchia S, Maseri A: Intermittent coronary occlusion in acute myocardial infarction. Value of combined thrombolytic and vasodilator therapy. *N Engl J Med* 1987;317:1055-59.
44. Halcox J, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Quyyumi AA. Systemic and pulmonary hemodynamic effects of ETA receptor antagonism. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:(Suppl) 249.
45. Halim A, Kanayama N, el Maradny E, Maehara K, Terrao T. Coagulation in vivo microcirculation and in vitro caused by endothelin-1. *Throm Res* 1993; 72:203-209.
46. Haller H, Schaberg T, Lindschau C, Lode H, Distler A. Endothelin increases (Ca), protein phosphorylation, and O<sub>2</sub> production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991;261:L478-484
47. Hasdai D, Best PJM, Cannan CR, Mathew V, Schwartz RS, Holmes DR, Lerman A. Acute endothelin-receptor inhibition does not attenuate acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in experimental hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:108-113.
48. Haynes WG, Clarke J, Cockcroft J, Webb DJ. Pharmacology of endothelin-1 in vivo in man. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 (Suppl 7), S283-285.

49. Haynes WG, Ferro CJ, O’Kane KPJ, Somerville D, Lomax CC, Webb DJ. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996; 93:1860-1870.
50. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 1995; 92:357-363.
51. Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994; 344:852-854.
52. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998; 16:1081-1098.
53. Heistad DD. Augmented responses to vasoconstrictor stimuli in hypercholesterolemic and atherosclerotic monkeys. *Circ Res* 1984; 54:711-780.
54. Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Hingsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured vascular cells. *Am J Physiol* 1985; 248:C550-556.
55. Horio T, Kohno M, Murakawa, et al. Increased plasma immunoreactive endothelin-1 concentration in hypercholesterolemic rats. *Atherosclerosis* 1991;89:239-246.
56. Hosoda K, Nakao K, Hiroshiarai, et al. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; 287:26-26.
57. Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens* 1992; 10: 1379-1389.
58. Ignarro LJ. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. *Adv Pharmacol* 1994; 26:35-65.

59. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999; 19:51-71.
60. Ihling C, Gobel HR, Lippold A, Wessels S, Paul M, Schafer HR, Zeiher AM, : Endothelin-1 like immunoreactivity in human atherosclerotic coronary tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin-1. *J Pathol* 1996;179:303-308.
61. Ikeda U, Yamamoto K, Maeda Y, Shimpo M, Kanbe T, Shimada K. Endothelin-1 inhibits nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997; 29:65-69.
62. Ikegawa R, Matsumura Y, Tsukahara Y, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the secretion of endothelin-1 from cultured endothelial cells by inhibiting a big endothelin-1 converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:669-675.
63. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2863-2867.
64. Jaccott D, Davies G, Maseri A. Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Heart J* 1988;8:1172-1181.
65. Kelly JJ, Whitworth JA. Endothelin-1 as a mediator in cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26:158-161.
66. Kern MJ, Moore JA, Aguirre FV, et al. Determination of angiographic (TIMI Grade) blood flow by intracoronary doppler flow velocity during acute myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:1545-1522.

67. Klog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 1988; 242:268-70.
68. Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, et al. Prolonged blood pressure elevation after endothelin administration in bilaterally nephrectomized rats. *Metab Clin Exp* 1989; 38:712-713.
69. Kohno M, Yasunari K, Murakawa KI, et al. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med* 1990; 88:614-618.
70. Kon V, Badr KF. Biological actions and pathophysiological significance of endothelin in the kidney. *Kidney Int* 1991; 40: 1-12.
71. Koseki C, Imai M, Hirata Y, Yanagisawa M, Masaki T. Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide? *Am J Physiol* 1989; 256:R166-170.
72. Kowala MC, Rose PM, Stein PD, et al. Selective blockade of endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Physiol* 1995; 146:819-826.
73. Lerman A, Burnett JC Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992; 86 (suppl III):III-12-III-19.
74. Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC, Jr: Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:997-1001

75. Lerman A, Holmes DR, Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Bunnett JC Jr. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995; 92:2426-2431.
76. Lerman A, Webster MW, Chesebro JH, Edwards WD, Wei CM, Fuster V, Bunnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. *Circulation* 1993; 88:2923-2928.
77. Lever AF. Slow pressor mechanism in hypertension: a role for hypertrophy of resistance vessels. *J Hypertens* 1986; 4:515-524.
78. Libby P. Molecular basis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-2850.
79. Loeffler BM, Maire JP. Levels of immunoreactive endothelin-1 measured in plasma are dependent upon assay conditions of the radioimmunoassay. *J Vasc Res* 1992; 29: 160.
80. Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates. *Atherosclerosis* 1990; 161:803-808.
81. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315:1046-51.
82. Manginas A, Gatzov P, Chasikidis C, Voudris V, Pavlides G, Cokkinos D. Estimation of coronary flow reserve using the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) frame count method. *Am J Cardiol* 1999; 83:1562-1564.
83. Mano T, Masuyama T, Yamamoto K, et al. Endothelial dysfunction in the early stage precedes appearance of intimal lesions assessable with intravascular ultrasound. *Am Heart J* 1996;131:231-238.

84. Martin-Nizard F, Houssani HS, Lestavel-Delattre S, Duriez P, Fruchart JC: Modified low density lipoproteins activate macrophages to secrete ir-ET. *FEBS Lett* 1991;293:127-130.
85. McKeenna CJ, Burke SE, Opgenorth TJ, et al. Selective ETA receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation* 1998; 97:2551-2556.
86. McMurdo L, Lidbury PS, Thiemermann C, Vane JR. Mediation of endothelin-1 induced inhibition of platelet aggregation via the ETB receptor. *Br J Pharmacol* 1993; 109:530-534.
87. Mendelsohn ME, Loscalzo J. The Endotheliopathies. In J Loscalzo, MA Creager, VJ Dzau, eds. *Vascular Medicine*. Boston: Little, Brown,, 1992. Pp.279-306.
88. Miller VM, Komori K, Burnett JC Jr, Vanhoutte PM. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am J Physiol* 1989; 257:H1127-1131.
89. Miller WL, Redfield MM, Burnett JC jr. Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *J Clin Invest* 1989; 83:317-320.
90. Moreland S, Mc Mullan DN, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET-B-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184:100-106.
91. Nishikibe M, Okada M, Tsuchida S, et al. Antihypertensive effect of a newly synthesized endothelin antagonist, BQ-123, in genetic hypertension models. *J Hypertens* 1992; 10:S50.
92. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, et al. Molecular cloning of a non-isopeptide selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178:248-255.

93. Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliot JD, Sung CP. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ 123 antagonizes endothelin-1 mediated mitogenesis. *Eur J Pharmacol* 1992;225:347-350.
94. Okada K, Miyazaki Y, Takada J, Matsuyama K, Yamaki T, Yano M. Conversion of big endothelin by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171: 1192-1198.
95. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 331:168-170.
96. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333;664-666.
97. Parris RJ, Webb DJ. The endothelin system in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Vasc Med* 1997; 2:31-43.
98. Pohl U, Lamontagne D. Impaired tissue perfusion after inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Basic Res Cardiol* 1991; 86(Suppl 2):97-105.
99. Prasad MR, Jones RM, Kreutzer DL. Release of endothelin from cultured bovine endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23:655-658.
100. Prat L, Carario I, Roca M, Raimbu V, Berne L, Estorch M, Ferrer I, Garcia C: Polyclonal <sup>111</sup>In-IgG, <sup>125</sup>I-LDL and <sup>125</sup>I-endothelin-1 accumulation in experimental arterial wall injury. *Eur J Nucl Med* 1993;20:1141-45
101. Resnik TJ, Hahn AW, Scott-Burden T, Powell J, Weber E, Buhler FR. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:1303-1310.



102. Rigel DF, Lappe RW. Differential responsiveness of conduit and resistance coronary arteries to endothelin A and B receptor stimulation in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S243-S247.
103. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993;362:801-809.
104. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250:H1445-H1449.
105. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364:45-46.
106. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of a endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:732-735.
107. Schachinger V, Britten M, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906.
108. Seiler C, Hess M, Buechi M, et al. Influence of serum cholesterol and other coronary risk factors on vasomotion of angiographically normal coronary arteries. *Circulation* 1993;88(pt1):2139-2148.
109. Salomone AO, Elliott PM, Calvino R, Holt D, Kaski JC. Plasma immunoreactive endothelin concentration correlates with severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris and normal ventricular function. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:14-19

110. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, et al. Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164:587-593.
111. Sokolovsky M. Endothelin and safotoxins. *Int J Biochem* 1994; 26:335-340.
112. Sorensen KE, Celemajer DS, Spiegehalter DJ, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br H J* 1995;74:247-253.
113. Suzuki N, Matsumoto H, Kitada C, Masaki T, Fugiino M. A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J Immunol Methods* 1989; 118:245-250.
114. Suzuki S, Kajikuri J, Suzuki A, Itoh T. Effects of endothelin-1 on endothelial cells in the porcine coronary artery. *Circ Res* 1991; 69:1361-1368
115. Takasaki C, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Similarity of endothelin to snake venom toxin. *Nature* 1988;355:303.
116. Teerlink JR, Loffler BM, Hess P, Maire JP, Clozel M, Clozel JP. Role of endothelin in maintenance of blood pressure in conscious rats with chronic heart failure: acute effects of endothelin receptor antagonist Ro 47-0323 (bosentan). *Circulation* 1994;90:2510-2515.
117. Timm M, Kaski JC, Dashwood MR. Endothelin-like immunoreactivity in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:S442-444.
118. Vane JR, Anggard EA, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.

119. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998; 97:752-756.
120. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Walshausl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 1990; 81:1415-1418.
121. Vigne P, Marsault R, Breittmayer JP, Frelin C. Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem J* 1990; 266:415-420.
122. Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moonaw C, Hersh LB. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 1990; 265:14150-14155.
123. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor responses to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990;81:491-497.
124. Vogel RA. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med* 1999;107:479-487.
125. Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13:S85-86.
126. Warrens AN, Cassidy MJD, Takahashi K, Ghatei MA, Bloom SR. Endothelin in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5:418-422.
127. Weissberg PL, Wiyshell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metclafe JC. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1990;85:257-262.

128. Weitzberg E, Ahlborg G, Lundberg JM. Long-lasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:1298-1303.
129. Wenzel RR, Fleish M, Shaw S, et al. Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998; 98:2235-2240.
130. Werns SW. Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 1989; 79:287-291.
131. Winkles JA, Alberts GF, Brogi E, Libby P: Endothelin-1 and receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries . *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:1081-1088
132. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
133. Yano M, Okada K, Takada J, et al. Endothelin-converting enzyme and its in vitro and in vivo inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 (Suppl 7):S26-28
134. Yoshisawa T, Shinmi O, Giaid A, et al. Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. *Science* 1990; 247:462-464.
135. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlaeger H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84:1984-1992.
136. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C: Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 1995;91:941-47.

137. Zeiher AM, Ihling C, Pistorius K, Schachinger V, Schaefer HE: Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994;344:1405-1406