

O Endotélio como Modulador de Respostas Vasomotoras

Pedro José de Almeida, Antonio de Melo Cabral, Elisardo Corral Vasquez
Vitória, ES

O conjunto das células endoteliais, o sistema endotelial, como tem sido denominado¹, pode ser encarado como um órgão endócrino e metabólico altamente ativo com várias atividades biológicas. Ocupando uma interface estratégica entre o sangue e o tecido celular, além da função de barreira seletivamente permeável, o endotélio desempenha várias funções regulatórias, entre as quais incluem-se a regulação da trombogênese e o controle do tônus vasomotor. A regulação da trombogênese faz-se através de atividades antitrombogênicas e trombogênicas (tab. I) de cujo balanço depende a fluidez do sangue no compartimento vascular². Alguns dos fatores ligados à regulação da trombogênese estão também relacionados com a regulação vasomotora. Neste sentido, a produção e a inativação, pelo endotélio, de substâncias vasoativas (tab. II) serve para ressaltar a importância da integridade funcional desse sistema⁴. A síntese e a liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs), em resposta a aumentos de fluxo e de pressão pulsátil, assim como a estímulos pela acetilcolina (Ach), bradicinina (BK), histamina, ADP, e outros (fig. 1), evidenciam que o endotélio pode ser apresentado como um órgão

transdutor de variações de estímulos mecânicos e químicos corrente sanguínea^{3,5-8}.

Tabela I - Atividades do endotélio relacionadas com a regulação da trombogênese.

A-Antitrombogênicas	B-Trombogênicas
Inibição da formação do trombo	Interação com plaquetas
Repulsão eletrostática	Trombospondina
Heparansulfato	Fibronectina
Trombomodulina	Colágeno tipo IV
Ligação de trombina	Fator Vw
Inativação de ADP (ADPases)	Fator ativador de plaquetas (PAF)
Prostaciclina (PGI ₂)	
Fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)	ATP/ADP
	Ligação de fibrogênio
Dissolução do trombo	Coagulação
Ativador do plasminogênio (t-PA)	Fator V
	Fatores IX e X (ligação)
	Inibição da Fibrinólise
	Inibidor do ativador do plasminogênio (PAI)

Tabela II - Produção e inativação pelo endotélio, de substâncias vasoativas passíveis de influenciar o tônus vasomotor.

A- Produzidas	B - Inativadas
ADP	ADP (via ADPases)
ATP	Adenosina (MAO/ Deaminase)
Acetilcolina	Angiotensina (via ECA)
Substância P	Serotonina (via MAO)
Fator ativador de plaquetas (PAF)	Bradicinina (via ECA)
Prostaciclina (PGI ₂)	Catecolaminas
Óxido nítrico	Acetilcolina
Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)	
Fatores de contração derivado do endotélio (EDCFs)	
Guanosina monofosfato cíclico (GMPc)	
Endotelina-1	

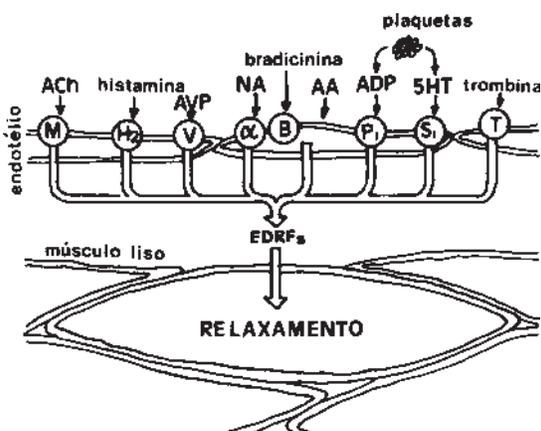


Fig 1 - Liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF's) por diversos agentes. AA= ácido araquidônico, Ach= acetilcolina, ADP= difosfato de adenosina, 5-HT= 5-hidroxitriptamina (serotonina), M= receptor muscarínico, H= receptor histamínico, a = receptor alfa-adrenérgico, b = receptor beta-adrenérgico, P= receptor purinérgico, S= receptor serotoninérgico, T= receptor de trombina .

O Papel Modulador do Endotélio. O Óxido Nítrico como Fator de Relaxamento

Há pouco mais de uma década, Furchgott e Zawadzki⁹, trabalhando com anéis e tiras de aorta isolados, descobriram acidentalmente que a presença do endotélio é o requisito indispensável para o relaxamento da musculatura lisa arterial produzido pela Ach. Nesses trabalhos pioneiros efetuados em coelhos, anéis (transversais) e tiras (transversais ou helicoidais) isolados de aorta torácica

Laboratório de Hipertensão Experimental - Depto Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico - UFES

Correspondência: Pedro José de Almeida

Centro Biomédico - UFES - CP 780 - CEP 29001-900 - Vitória, ES

Recebido para publicação em 4/1/93

Aceito em 8/3193

descendente pré-contraídos com noradrenalina (NA), não se relaxavam quando a sua superfície intimal era friccionada (intencional ou não-intencionalmente) durante os procedimentos de montagem das preparações. Registros típicos obtidos com preparações pré-contraídas, ajustadas para níveis moderados de tônus mostraram que, na ausência de fricção intimal, a Ach produzia um relaxamento dose-dependente que não se verificava quando a superfície intimal era friccionada. A perda da capacidade de relaxamento em resposta à Ach relacionava-se com a remoção das células endoteliais devido à fricção da superfície intimal durante o curso da elaboração experimental, o que foi demonstrado anatomicamente^{9,10}. Desde então vários procedimentos têm sido usados (tab. III), objetivando a disrupção do endotélio com mínimo dano para a camada muscular. A descoberta de Furchgott e Zawadzki contribuiu para a resolução de um antigo paradoxo acerca das ações da Ach, a qual, evocando um potente efeito vasodilatador in vivo, não produzia relaxamento em algumas preparações vasculares isoladas, ou mesmo produzia contração. A esta descoberta seguiu-se a confirmação por parte de vários laboratórios, de que a Ach requer a integridade funcional do endotélio para a produção de relaxamento arterial em preparações isoladas. Em vasos sanguíneos de diferentes origens anatômicas e de diferentes espécies, as respostas endoteliais aos estímulos são heterogêneas, predominando em condições fisiológicas, a liberação de fatores de relaxamento. Pelo fato do endotélio vascular ser a principal fonte de produção de prostaciclina no organismo, as primeiras investigações foram dirigidas no sentido de averiguar a participação desse eicosanóide nos relaxamentos vasculares dependentes do endotélio. Entretanto, logo foi constatado que tais relaxamentos, além de ocorrerem em vasos que não respondem à prostaciclina (como a aorta do rato e do coelho), não eram bloqueados pelos inibidores da ciclo-oxigenase (CO). Isso levou à exclusão da prostaciclina como mediador dos relaxamentos vasculares dependentes do endotélio⁹⁻¹¹. Através de ensaios biológicos "em cascata" em vasos isolados, em que o efluente de uma preparação endotelizada perfundia uma artéria pré-contraída, foi demonstrada a produção endotelial de um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) em condições basais e, em maior proporção sob estímulo, por exemplo, pela Ach^{12,13}. Alterando o tempo de trânsito entre a preparação doadora do efluente e a preparação receptora, foi possível demonstrar que o EDRF é uma substância instável, com uma meia-vida da ordem de segundos ou menos³. A elevação dos níveis de guanosina monofostado cíclico (GMPc) nas células da musculatura lisa vascular que ocorre durante os relaxamentos vasculares produzidos pela Ach, levou à hipótese de que o óxido nítrico (NO), um metabólito final dos nitrovasodilatadores com potente ação estimulante sobre a guanilato-ciclase solúvel

(GCs)¹⁴ ou uma substância da qual o NO pode ser imediatamente liberado, responde pelas atividades biológicas do EDRF. Essa hipótese apoiou-se principalmente na observação original de que o NO exerce um potente efeito relaxante sobre a musculatura lisa vascular¹⁵. Os estudos visando a identificação do EDRF levaram à conclusão de que os efeitos vasculares desta substância são virtualmente semelhantes aos do NO. O achado de que ambas as substâncias ativam diretamente a GCs levou à hipótese de que o EDRF poderia ser o NO ou uma substância precursora lábil, da qual o NO seria imediatamente liberado. Usando ensaios químicos e biológicos simultâneos, Palmer e col¹⁶, em 1987, demonstraram que o NO liberado pelas células endoteliais sob estímulo pela BK responde pelas ações do EDRF, o que foi imediatamente confirmado por outros¹⁷. Permanece entretanto, a suspeita de que o EDRF pode não ser o NO, mas, uma molécula precursora intimamente relacionada com ele.

Tabela III - Procedimentos usados para a remoção do endotélio vascular.

Mecânicos
Fricção da superfície endotelial
Secagem com papel de filtro
Cateter-balão
Roçadura (atrito) com cordão de nylon
Adesão a lamínula de vidro
Fricção com cabelo humano
Físicos
Ressecagem pelo ar
Perfusão hipotônica
Exposição a KCl 40mM
Perfusão com água destilada (até 10min)
Perfusão controlada com bolhas de ar
Irradiação com Laser
Químicos
Remoção do Ca ^{**}
Quelantes (EDTA, EGTA)
Saponina
Deoxicolato de sódio
CHAPS (0,3%)
Enzimáticos
Tripsina
Colagenase

A Via da L-Arginina de Produção de Óxido Nítrico

Em macrófagos ativados, assim com em células endoteliais, o NO é formado a partir de um nitrogênio do grupamento guanidínico (N^G) do aminoácido L-arginina, através de uma série de reações de óxido-redução, tendo a tetrahydrobiopterina (THBP) como co-fator¹⁸. O NO é clivado da L-arginina, a qual é transformada em L-citrulina, sob ação da NO sintetase sensível ao aumento do Ca⁺⁺ citosólico (fig. 2). As evidências disponíveis indicam que a hidroxilação da L-arginina é a primeira etapa do processo, levando à N^G-hidroxi-L-arginina. Em seguida, este intermediário é convertido a N^G-oxo-L-arginina e, finalmente, a NO (assim como a NO₂- e NO₃-) e L-citrulina¹⁹. Uma vez que a L-arginina é regenerada endogenamente de ou-

tros aminoácidos, o seu suprimento exógeno não é limitante do processo de síntese de NO. Na musculatura lisa

vascular, o NO estimula a GCs, ligando-se ao seu grupamento heme. Esse grupamento age como um transdutor, transferindo o sinal do NO para a enzima, aumentando o V_{max} e a sua afinidade pelo Mg-GTP²⁰. A elevação do GMPc decorrente da ativação da GCs reduz o influxo de Ca^{++} através do sarcolema, reduz a liberação de Ca^{++} de seus estoques e aumenta o seqüestro desse íon para os sítios de estoque intracelulares. Há ainda indícios de que o GMPc inibe especificamente o *turnover* de inosítídeos induzidos por agonistas, reduzindo a produção de inositol trifosfato (IP_3). Essas ações contribuem para a redução da concentração de Ca^{++} citosólico, com o seqüente relaxamento vascular. Além disso, tem-se sugerido que a elevação do GMPc reduz a sensibilidade do aparelho contrátil ao cálcio através da redução simultânea da produção de diacilglicerol (DAG), um importante intermediário na ativação da proteína quinase C^{3,4,21}.

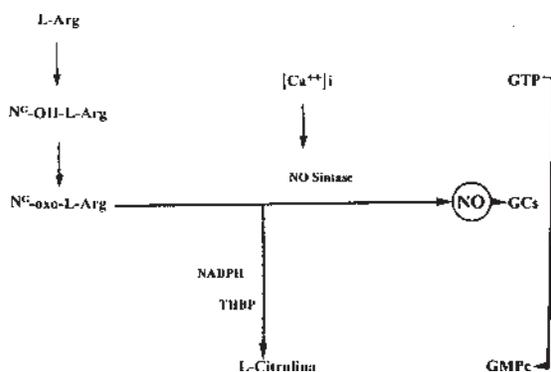


Fig 2 - Esquema da formação do óxido nítrico (NO) pela via da L-arginina (L-Arg) e seu papel na ativação da guanilato-ciclase solúvel (GCs).

Importância Fisiológica da Produção de Óxido Nítrico

O achado de que o efeito citotóxico produzido por macrófagos imuno estimulados depende da produção de nitrito e nitrato, por uma via em que a L-arginina é o principal precursor e que tal produção pode ser bloqueada pela NG-monometil-L-arginina (L-NMMA)²², foi a base para a demonstração de que este análogo natural de L-arginina inibe a formação de NO nas células endoteliais²³⁻²⁵. Essa inibição, à maneira de um antagonismo competitivo, é reversível em presença de excesso de L-arginina. Nos estudos em vasos isolados, a L-NMMA tem sido usada para inibir o relaxamento dependente do endotélio, visando demonstrar que o NO é sintetizado no endotélio vascular, tendo a L-arginina como precursor. No leito vascular mesentérico (LVM) isolado, a inibição do relaxamento com L-NMMA é menor do que nas preparações de grandes artérias. Isso tem levado à suposição de que o endotélio das artérias de resistência mesentéricas é capaz de liberar outros fatores de relaxamento distintos

do NO^{26,27}. No decurso de investigações sobre relações entre estrutura química e atividade de análogos da L-arginina sobre a liberação endotelial de NO, foi demonstrado que a Nw-nitro-L-arginina (L-NOARG), com um perfil farmacológico muito semelhante ao da L-NMMA, é cerca de 70 vezes mais potente do que essa²⁸. Isto coloca a L-NOARG numa posição de destaque em investigações neste campo.

O Fator Hiperpolarizante

O fato de que a Ach é capaz de produzir hiperpolarização dependente do endotélio nas células da musculatura lisa vascular, um achado que não é observado com o NO ou com a prostaciclina, indica a existência de um outro fator, denominado fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), cuja natureza ainda não foi determinada³⁵⁻³⁹. A atividade relaxante do EDHF tem sido detectada em artérias sistêmicas e pulmonares isoladas^{27,38,41} e não é bloqueada pelos inibidores da ação do NO sobre a GCs, tais como a hemoglobina e o azul de metileno (AzM) assim como não se acompanha da elevação dos níveis de GMPc nas células musculares lisas vasculares^{38,40}. A hiperpolarização, fenômeno correlato ao relaxamento, deve-se à ativação da bomba Na^+/K^+ ³⁷ ou de canais de potássio ATP-sensíveis na membrana das células musculares lisas vasculares^{19,42}, o que tem levado a considerar o EDHF como um ativador endógeno dos canais de potássio sensíveis ao ATP.

Mecanismos Iônicos Envolvidos na Liberação de NO e na Hiperpolarização

O acoplamento entre o estímulo e a liberação de NO pelas células endoteliais envolve mecanismos iônicos favoráveis ao aumento da concentração de Ca^{++} citosólico, o que é apoiado principalmente nas observações de que a biossíntese e a liberação de NO são dependentes do Ca^{++} ^{44,45}. Submetidas a uma ampla variedade de forças geradas hemodinamicamente, as células endoteliais, além da adaptação morfológica que experimentam, respondem aumentando a concentração de Ca^{++} intracelular. Nesse incremento de Ca^{++} , duas correntes de entrada, uma catiônica não-seletiva e outra K^+ -seletiva, estão envolvidas. Pela técnica de *patch clamp* foi possível demonstrar que a Ach, agindo através de receptor muscarínico endotelial, produz uma corrente K^+ -seletiva hiperpolarizante. A hiperpolarização aumenta a força propulsora para a entrada de Ca^{++} , via canais catiônicos não seletivos operados por receptores⁴⁶. O estímulo de outros receptores endoteliais (como receptores de BK e trombina) produz hiperpolarização por meio de correntes menos seletivas (Na^+/Ca^{++})⁴⁷. O estímulo dos receptores purinérgicos endoteliais acompanha-se de um rápido aumento do Ca^{++} citosólico, o qual se deve tanto ao influxo de Ca^{++}

transmembrana como a uma lenta mobilização (intracelular) de Ca^{++} do retículo endoplasmático⁴⁸. Assim, é provável que as forças geradas pelo fluxo intraluminal produzam hiperpolarização da célula endotelial, aumentando indiretamente a entrada de Ca^{++} via canais catiônicos operados por receptores, como os do ADP^{48-50} . O resultado final seria um controle súbito e lento da entrada de Ca^{++} determinado pelo número de receptores ligados ao canal catiônico, por célula⁴⁶.

Produção de Eicosanóides

Várias drogas, assim como vários mediadores endógenos estimulam a produção de prostaciclina em cultura de células endoteliais. Entre as substâncias endógenas, incluem-se a BK, Ach, substância P, ácido araquidônico (AA), PGH_2 , trombina, tripsina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina I e nucleotídeos da adenina. O papel destes agentes endógenos na formação de prostaciclina *in vivo* não é bem conhecido. A própria pressão pulsátil também induz a liberação de prostaciclina em artérias isoladas, sugerindo que esta pode ser um estímulo para a sua produção contínua basal. Muitos dos agentes endógenos citados estimulam também a liberação de EDRF. Juntamente com a prostaciclina, outros produtos da via da CO, incluindo a PGE_2 e o TXA_2 , são também gerados pela célula endotelial, conforme esquema da figura 3. A produção de eicosanóides pelas células endoteliais é iniciada, tanto através da transferência transmembrana de endoperóxidos das plaquetas, como pela via intracelular do AA liberado dos fosfolípidios da membrana endotelial por fosfolipases ativadas⁷. Em células endoteliais de porcos sob estímulo pela BK, a liberação de prostaciclina é acompanhada da ativação tanto da fosfolipase A_2 como da fosfolipase C. Esta última é responsável pela rápida produção de IP_3 e se acompanha de mobilização de Ca^{++} de seus estoques intracelulares para o citosol e liberação simultânea de AA. Através da ciclicização do AA e, ao mesmo tempo, da adição de um grupamento 15-hidroperoxi, a ciclooxigenase (CO), uma oxigenase contendo heme, produz o endoperóxido cíclico PGG_2 . Por ação de uma peroxidase (PGG_2 peroxidase) que utiliza uma variedade de compostos como fonte de elétrons, o grupamento hidroperoxi da PGG_2 é reduzido a hidroxil, dando origem ao endoperóxido cíclico PGH_2 . A CO é inibida por anti-inflamatórios não-esteroidais como a aspirina e a indometacina e sua ação é regulada por hidroperóxidos, incluindo a PGG_2 . A PGG_2 peroxidase (também conhecida como PGH_2 sintetase) que é parte do complexo CO, contribui ainda para o ajuste do rendimento global do complexo. Estas outras peroxidases mantêm a concentração intracelular de lípidos peróxidos, os quais regulam tanto a atividade da CO como a da prostaciclina sintetase¹¹. Pequenas quantidades de prostaglandinas estáveis (como a PGD_2 , PGE_2 e PGF_2) são formadas não

enzimaticamente a partir dos endoperóxidos cíclicos. Entretanto, a principal via de conversão desses compostos é a que se faz pela ação da prostaciclina sintetase, gerando prostaciclina. Tanto esta como o tromboxano- A_2 são muito instáveis, sendo rapidamente convertidos através de hidrólise não-enzimática, a 6-ceto- PGF_1 e tromboxano- B_2 (TX-B_2), respectivamente.

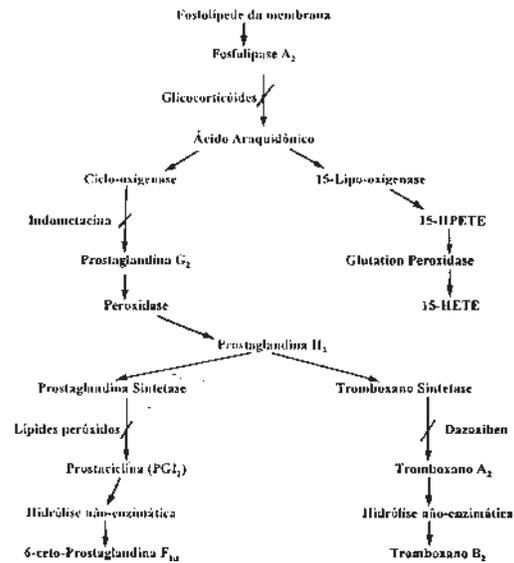


Fig 3 - Produção de eicosanóides com ênfase sobre a via da ciclo-oxigenase, mostrando os diversos níveis em que a produção pode ser inibida. HPETE= hidroperoxieicosatetraenólico, HETE= hidroxeicosatetraenólico.

Importância Fisiológica da Produção de Prostaciclina

Apesar da elevação da pressão arterial ser acompanhada de síntese acelerada de prostaciclina, este processo não parece ser de maior relevância na patogênese da hipertensão arterial, a julgar pelos achados experimentais contraditórios disponíveis em diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial. Ratos hipertensos Dahl sensíveis ao sal, assim como humanos com hipertensão primária, apresentam altas taxas de síntese vascular de prostaciclina, enquanto que taxas normais ou baixas têm sido encontradas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). É provável que a síntese acelerada de prostaciclina que acompanha a elevação da pressão arterial possa ser um mecanismo adaptativo compensatório em resposta ao estado hipertensivo.

Muito embora a produção vascular de eicosanóides possa ser potencialmente inibida em vários níveis¹ conforme o esquema da figura 3, o meio mais comum e difundido é a inibição da CO. Agentes anti-inflamatórios não-esteroidais como a aspirina, a indometacina e o meclofenamato têm sido usados com tal propósito. Em preparações vasculares isoladas, a indometacina tem sido utilizada tanto previamente, no animal *in vivo*, como após

o isolamento dos vasos, através

através de perfusão *in vitro*. Nessas preparações, concentrações de indometacina da ordem de $10^{-5}M$, têm sido utilizadas no sentido de verificar a participação de produtos da via da CO nos relaxamentos e/ou contrações dependentes do endotélio. Nas respostas do leito vascular mesentérico isolado à NA, o uso de indometacina com tal finalidade tem levado à conclusão de que a prostaciclina não participa como fator relaxante nesses vasos de resistência, uma vez que ela não reduz os relaxamentos induzidos pela Ach, nem aumenta as contrações produzidas pela NA^{26,27}. Em concordância com os estudos em vasos isolados, os inibidores da CO não reduzem o relaxamento dependente do endotélio, produzido pela Ach administrada *in vivo* na circulação do antebraço de seres humanos¹. Apesar de ser um potente vasodilatador e de ser produzido em quantidades apreciáveis pelo endotélio, a liberação de prostaciclina pode dar-se em sua maior parte, luminalmente isto é, para o lúmen vascular, onde *in vivo*, interage com as plaquetas circulantes, e apenas em quantidades mínimas, abluminalmente, isto é, para a musculatura vascular subjacente. Cabe ainda salientar que a prostaciclina não atende ao *strictu sensu* do termo EDRF, pelo fato de ser produzida, não só pelo endotélio, mas também por outros elementos da parede vascular. Apesar destas observações, tem-se sugerido que a prostaciclina pode agir como EDRF, se liberada abluminalmente em quantidades adequadas e em leitos vasculares sensíveis¹⁹.

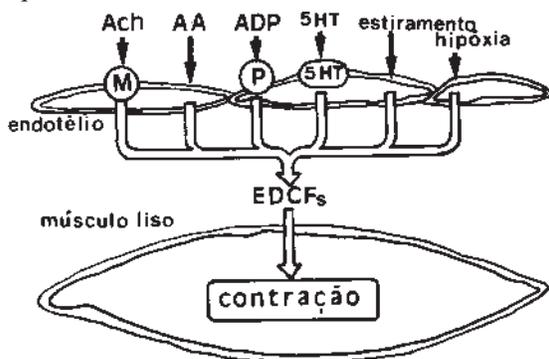


Fig 4 - Liberação de fatores de contração derivados do endotélio (EDCFs) por estímulo de diversos fatores. AA= ácido araquidônico, Ach= acetilcolina, ADP= difosfato de adenosina, ⁵HT= serotonina (5-hidroxitriptamina), S₁= receptor serotoninérgico, M= receptor muscarínico, P= receptor purinérgico.

Fatores de Contração

Além de fatores de relaxamento, o endotélio é capaz de sintetizar substâncias vasoconstritoras que, em analogia às denominações atribuídas aos fatores de relaxamento, são chamados de fatores de contração derivados do endotélio (EDCFs) (fig. 4). Em diferentes leitos vasculares, pelo menos 3 EDCFs distintos (EDCF₁, EDCF₂, EDCF₃) têm sido descritos. Sob estímulos físicos ou químicos (estiramento, Ach, AA, serotonina, ATP/ADP, ionóforo

de cálcio A23 187), o endotélio libera pela menos um fator de contração produzido pela via da CO (EDCF₁). Evidências desse metabólito do AA têm sido descritas em veias safena, esplênica, femural e pulmonares do cão^{51,52}, artéria pulmonar de coelho⁵³, aorta de SHR⁵⁴, artérias renais de ratos normotensos e SHR⁵⁴, artéria basilar do cão⁵⁵⁻⁶⁰ e arteríolas cerebrais do camundongo⁶¹. Em todas as preparações citadas, as respostas vasoconstritoras atribuídas ao EDCF, têm em comum, a susceptibilidade ao bloqueio pela indometacina. Curvas dose-resposta à NA em leito mesentérico isolado de ratos são atenuadas pela presença de ADP, uma evidência do efeito relaxante endotélio-dependente do nucleotídeo. Em preparações de animais normotensos, este relaxamento não é alterado pela indometacina, o que indica que eicosanóides com ação relaxante não participam deste efeito. Entretanto, o efeito relaxante do ADP é potencializado pela ação desse anti-inflamatório nos vasos de animais hipertensos renovasculares²⁷. Tal evidência parece indicar que o endotélio dos vasos de resistência mesentéricos dos animais hipertensos distingue-se especialmente pelo fato de produzir pelo menos um princípio vasoconstritor produzido pela via da CO (possivelmente o EDCF₁)²⁷. Permanece a dúvida se o EDCF, é a mesma substância nos diferentes leitos vasculares. Respostas vasoconstritoras atribuídas a eicosanóides vasoconstritores (EDCF₁), embora inibidas por antagonistas dos receptores de TXA₂/PGH₂, não são afetadas por inibidores da tromboxano-sintetase. Isto sugere que o EDCF₁ não é o TXA₂, mas uma substância intimamente relacionada com ele^{53,58-60}. Evidências recentes obtidas em anéis isolados de aorta torácica de SHR comprovam o envolvimento dos receptores de TXA₂/PGH₂ nas contrações endotélio-dependentes evocadas pela Ach e sugerem que o eicosanóide responsável é a PGH₂^{62,63}. A possibilidade de radicais livres do oxigênio gerados pela atividade da CO endotelial serem os representantes do EDCF₁ é também sugerida. Essa possibilidade apóia-se nas seguintes evidências: a) liberação de radicais livres do oxigênio na parede vascular durante hipertensão aguda; b) geração de anion superóxido (O₂⁻) durante a conversão de PGG₂ a PGH₂; c) evidência de que o O₂⁻ pode ser o EDCF liberado pelo ionóforo de cálcio A23 187 na artéria basilar do cão⁵⁹; d) contrações em aorta de SHR, mediadas pela estimulação da CO do músculo liso vascular⁶⁴ podem ser causadas por radicais livres do oxigênio gerados enzimaticamente; e) antagonistas dos receptores de TXA₂/PGH₂ inibem as contrações produzidas por radicais livres do oxigênio em anéis de aorta de SHR⁶². Quanto ao EDCF₂, denominado endotelina, é um polipeptídeo, contendo 21 aminoácidos, isolado de cultura de células endoteliais. Sendo cerca de 10 vezes mais potente do que a angiotensina II, a endotelina é atualmente, o mais potente vasoconstritor conhecido^{65,66}. Entretanto, uma demonstração *in situ* de vasoconstricção endotélio-dependente mediada por endotelina não foi ainda relatada. Pelo menos 3 genes no genoma humano res-

pondem pela expressão de 3 tipos de endotelinas, designadas como ET-1, ET-2 e ET-3. Esta família de iso-peptídios é sintetizada a partir de um polipeptídeo precursor (pró-endotelina) de 203 aminoácidos. Das 3, apenas a ET-1 pode ser identificada nas células endoteliais. Em aorta intacta de porcos, a ET-1 é liberada em condições basais e após estímulo por trombina e ionóforo de cálcio A23 187. A produção é dependente do endotélio e pode ser inibida pela cicloheximida (um inibidor de síntese protéica), o que sugere que o peptídeo não é estocado em grânulos intracelulares, sendo sua liberação regulada principalmente pela síntese. Nas membranas das células da musculatura lisa vascular, a endotelina liga-se a receptores específicos, através dos quais ativa a fosfolipase C e assim, o metabolismo de fosfoinosítídeos, induzindo aumento do cálcio intracelular (para revisões sobre o assunto, ver Vane e col¹ 1990, Lüscher e col¹⁹ 1991, Sanchez-Ferrer e Marin⁶⁷ 1990). Finalmente, sob condições de hipóxia severa, um terceiro fator de contração (EDCF₃) é liberado em artérias coronária, cerebral e femoral do

cão^{51,68,69}. Sob condições apropriadas a presença do EDCF₃ como um fator difusível, pode ser demonstrada através da transferência de contrações de um segmento vascular doador com endotélio, para uma tira de coronária sem endotélio⁶⁵. O efeito contrátil do EDCF₃ não é bloqueado pela indometacina ou pelo tratamento com tripsina (excluindo a possibilidade de ser um produto da via da CO ou um peptídeo), porém é inibido por antagonistas de cálcio. Para revisões recentes ver, Lüscher e col¹⁹ 1991, Sanchez-Ferrer e Marín⁶⁷ 1990, Vanhoutte e col⁷⁰ 1991.

Endotélio x Hipertensão

Quando submetidas a estímulos mecânicos, tais como estiramento, aumentos de fluxo e pressão intraluminais e outras forças geradas hemodinamicamente, as células endoteliais adaptam-se, alterando a produção de mediadores vasoativos. A importância da modulação da resposta vascular aos estímulos endógenos pelo endotélio tem sido verificada, tanto em animais normotensos como em hipertensos. Na hipertensão arterial, o aumento da reatividade de vasos isolados aos estímulos vasoconstritores tem sido explicados por alterações na integridade funcional do endotélio²⁹⁻³⁴. A diminuição do relaxamento dependente do endotélio à Ach nos modelos de hipertensão experimental genético, renovascular e DOCA-sal, concorda com a idéia de que a redução (ou inibição) da liberação contínua de NO pode contribuir para a hipertensão arterial^{1,25}. Os modelos de hipertensão arterial experimental têm sido úteis para demonstrar tais adaptações endoteliais. Nesses, o aumento da reatividade vascular, especialmente em vasos de resistência, é um dos pontos de importância no desenvolvimento da hipertensão arterial. O aumento da reatividade tem sido atribuído, não só à redução da produção de fatores de relaxamento, como também ao aumento da produção de, pelo menos, um fator de contração derivado do endotélio (fig. 5). A figura 6 ilustra o aumento da reatividade em vasos de resistência mesentéricos isolados de ratos com hipertensão arterial induzida pela administração de DOCA-Sal, sob estímulo pela serotonina e noradrenalina¹⁰. Sob estímulo pelo ADP, demonstramos recentemente²⁷ que a inibição da produção endotelial de NO suprime totalmente o relaxamento endotélio-dependente induzido pelo nucleotídeo em vasos de resistência de ratos com hipertensão renovascular, o que não ocorre nos ratos normotensos (fig. 7). Isto indica que os vasos de resistência dos animais hipertensos, além de terem a produção de NO reduzida, praticamente não produzem um outro fator de relaxamento - possivelmente o EDHF - existente nos vasos dos animais normotensos^{26,27}. Por outro lado, a produção de um EDCF identificado como um produto da via da CO tem sido evidenciada em diversos setores do organismo, incluindo os vasos de resistência. A evidência de tal fator em vasos de

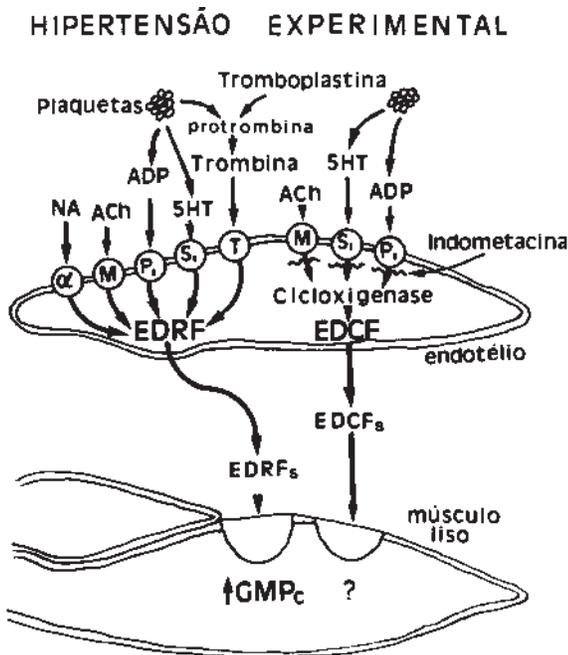


Fig 5 - Produção de fatores vasoativos endoteliais durante o desenvolvimento da hipertensão arterial em modelos experimentais. Em vasos isolados, o aumento da reatividade sob estímulos específicos tem sido atribuído, não só ao decréscimo da produção de fatores de relaxamento (EDRFs), como também ao aumento da produção de fatores de contração (EDCFs). ACh= acetilcolina, ADP= difosfato de adenosina, GMPc= guanosina monofosfato cíclico, 5-HT= serotonina (5-hidroxitriptamina), receptor serotoninérgico, M= receptor muscarínico, NA= noradrenalina, α=receptor alfa adrenérgico, P=receptor purinérgico, S= receptor serotoninérgico, T= receptor de trombina.

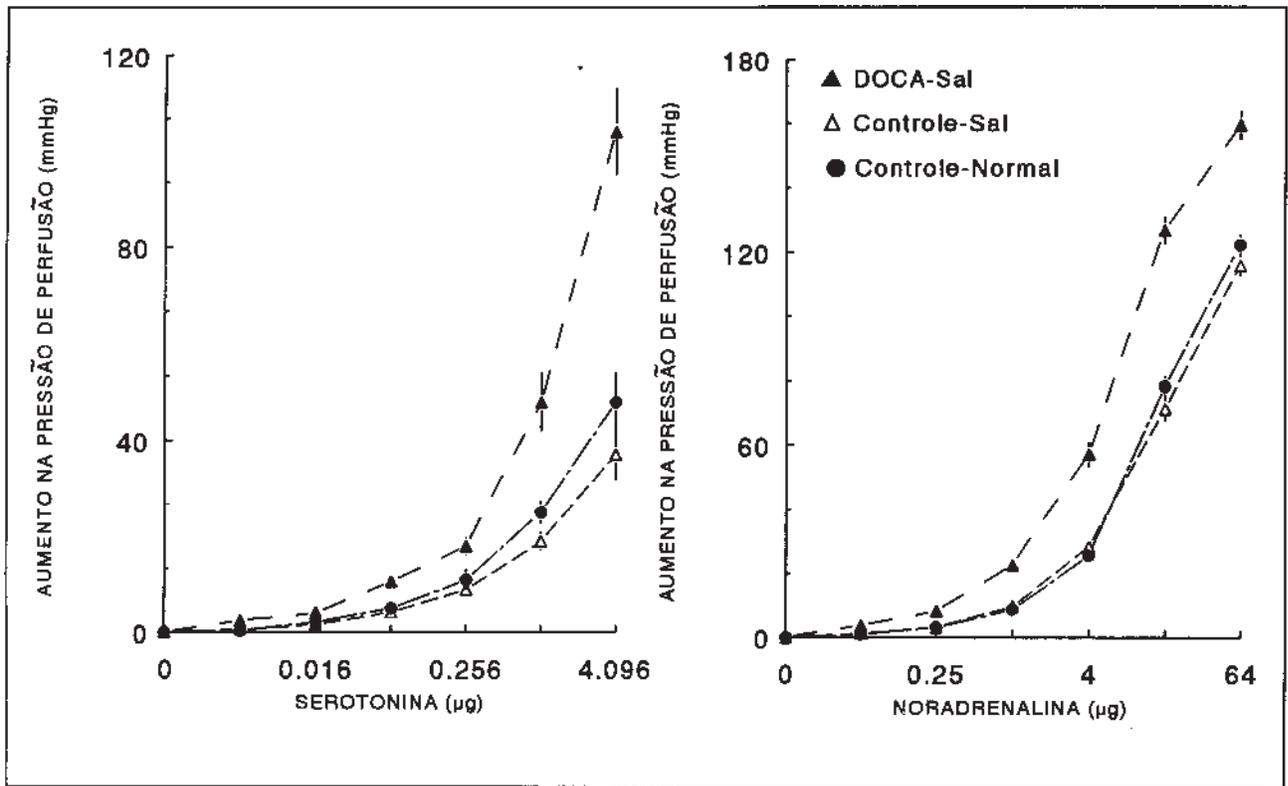


Fig 6 - Vasoconstrição induzida por serotonina e noradrenalina em leitos vasculares mesentéricos isolados de ratos com hipertensão induzida por DOCA-sal. Os valores representam os picos de resposta pressora a injeções *in bolus* de serotonina e noradrenalina em preparações mesentéricas perfundidas (4 ml/min) de ratos controle-normais, controle-sal e DOCA-sal. Os valores representam a média \pm EPM.

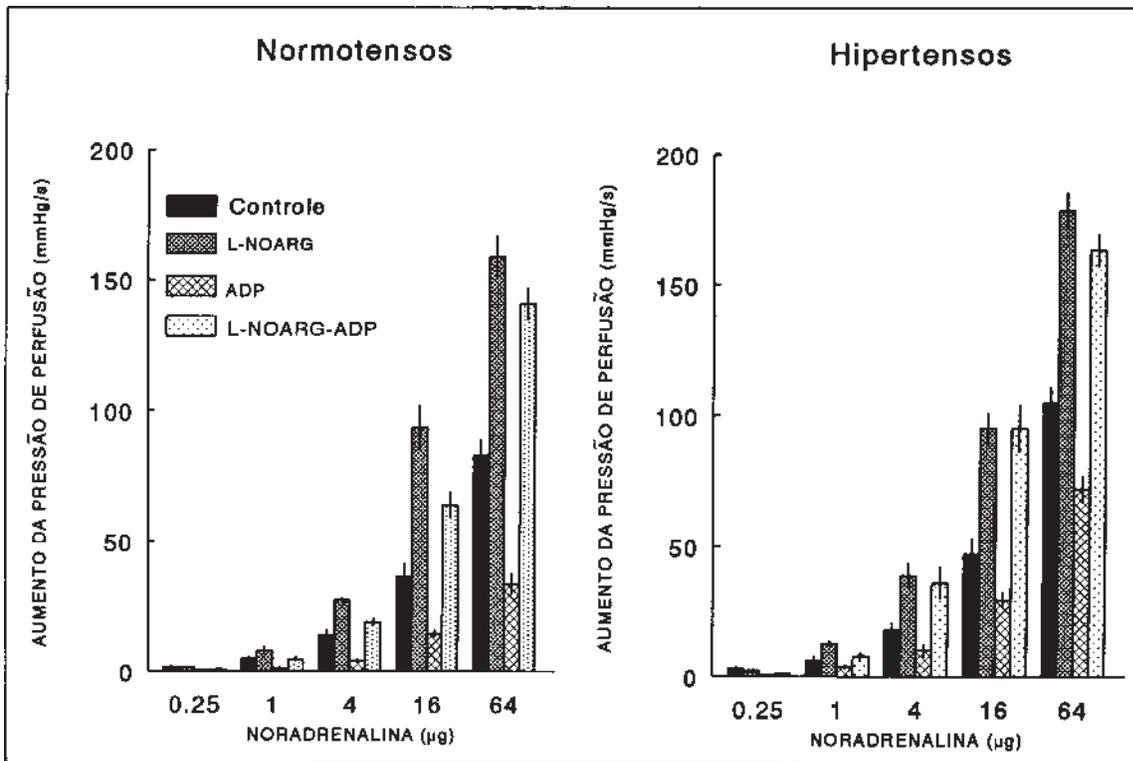


Fig 7 - Reatividade de artérias de resistência mesentérica durante inibição da produção endotelial de óxido nítrico com Nw-Nitro-L-arginina (L-NOARG, $5 \times 10^{-6} M$), na ausência e na presença de ADP ($2 \times 10^{-6} M$, perfundido intraluminalmente) em ratos normotensos e hipertensos. Nos controles de ambos os grupos, a presença de ADP exerce um efeito inibitório sobre as contrações evocadas pela noradrenalina. A inibição da via de L-arginina de produção de óxido nítrico acompanha-se de aumento das respostas pressoras à noradrenalina em relação aos controles. Sob efeito da inibição da produção de óxido nítrico, a presença de ADP reduz as respostas nos ratos normotensos, mas não nos hipertensos, o que equivale a dizer que nestes últimos, mas não nos primeiros, a inibição da produção endotelial de óxido nítrico suprime totalmente o efeito relaxante (endotélio-dependente) do ADP.

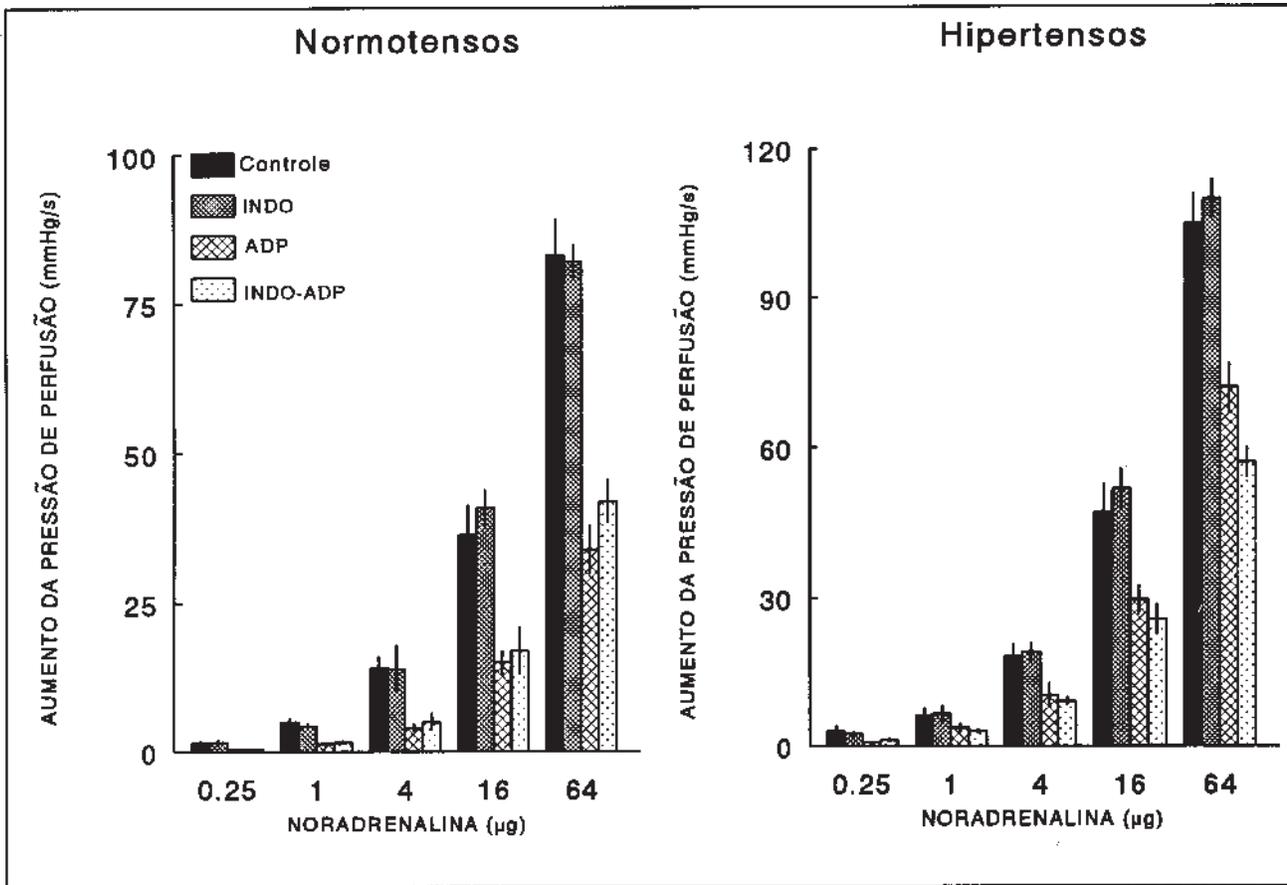


Fig 8 - Reatividade de artérias de resistência mesentéricas durante inibição da via da ciclo-oxigenase com indometacina ($5 \times 10^{-5}M$, na ausência e na presença de ADP ($2 \times 10^{-6}M$, perfundido intraluminalmente) em ratos normotensos e hipertensos. Nos controles de ambos os grupos, a presença de ADP exerce um efeito inibitório sobre as contrações evocadas pela noradrenalina. A inibição da via da ciclo-oxigenase não alterou as respostas pressoras à noradrenalina. O estímulo pelo ADP reduz as respostas sob efeito da inibição da ciclooxigenase, porém esta redução é mais acentuada nos ratos hipertensos. Esse dado indica que um fator de contração derivado do endotélio, um eicosanóide da via da ciclo-oxigenase é produzido nas artérias mesentéricas dos animais hipertensos, mas não nos normotensos.

resistência mesentéricas isolados de ratos hipertensos renovasculares pode ser observado na figura 8²⁷. Esse fator certamente contribui para o aumento da resistência periférica, com a conseqüente manutenção da hipertensão arterial.

Um Aspecto Particular da Interação Endotélio-Elementos do Sangue

Como agente vasodilatador dependente do endotélio liberado por plaquetas, hemácias e células endoteliais *in vivo*, o ADP parece ter um papel central na agregação plaquetária⁷¹⁻⁷³, na interação de eventos vasomotores e na resposta endotelial. Experimentos *in vitro* com sangue total, mostram que a liberação de ADP de plaquetas e hemácias tem sido verificada em resposta a estímulos mecânicos tais como as forças de cisalhamento (*shearing forces*) hemodinamicamente geradas⁷⁴. Quando o sangue circulante *in vivo* é forçado através de vasos em que a resistência ao fluxo está aumentada, como ocorre sob estímulos vasoconstritores, espasmos, hipertensão arterial ou aterosclerose, a liberação de ADP do endotélio e dos ele-

mentos circulantes, provavelmente contribui para a ativação de plaquetas, formação de agregados plaquetários circulantes^{72,76} e relaxamento vascular⁷⁷⁻⁷⁹. Como principal mediador do relaxamento dependente do endotélio produzido por plaquetas ativadas^{77,78} na interação plaqueta-vaso, o ADP é liberado na imediata vizinhança das células endoteliais, como também é localmente inativado pelas ADPases endoteliais². Essas condições assemelham-se às de um modelo em que as plaquetas são vistas como sinaptossomos ou terminações nervosas⁸⁰ e o ADP, como transmissor químico no relaxamento dependente do endotélio. O nucleotídeo liberado em tal situação favorece, tanto o relaxamento vascular mediado pelo endotélio, como a agregação e o recrutamento de plaquetas circulantes para o local^{2,72}. Tal situação poderia ser visualizada como um mecanismo de *feed-back* negativo em que, a agregação de plaquetas, favorecida por um estímulo vasoconstritor, atenuaria ou reverteria localmente tal estímulo, através do relaxamento endotélio-dependente produzido pelo ADP liberado dos grânulos plaquetários.

Em preparações vasculares isoladas mantidas sob perfusão, os estudos com ADP demonstram diminuição da

resposta endotelial ao nucleotídeo tanto na aterosclerose⁷⁹ como na hipertensão

experimentais²⁹⁻³⁴. Estas evidências apontam para alterações da integridade funcional do endotélio favoráveis ao aparecimento de espasmos arteriais e aumento da resistência vascular periférica^{5,6,8,29,30,33,81,83}. Desta maneira, o ADP, como agonista plaquetário liberado pelas hemácias, plaquetas ativadas e células endoteliais pode representar o principal agente intermediário entre os elementos do sangue circulante e as respostas vasculares em condições específicas.

Agradecimentos

A Mario Armando Dantas, pela ilustrações das figuras, ao BANDES, CNPq e FCAA, pelo apoio financeiro.

Referências

- Vane JR, Anggard EE, Botting RM - Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*, 1990; 323: 27-36
- Almeida PJ, Pires JGP, Marquezini AJ et al - Platelets, vessels and coagulation: basic mechanisms and drug actions. *J Drug Dev*, 1990; 2: 227-40.
- Henderson AH - Endothelium in control. *Br Heart J*, 1991; 65: 16-25.
- Benjamin N, Vallance P - Local control of human peripheral vascular tone: implications for drug therapy. *Clinical Science*, 1991; 80: 183-90.
- Furchgott RF - The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1984; 24: 175-97.
- Peach MJ, Singer HA, Loeb AL - Mechanisms of endothelin-dependent vascular smooth muscle relaxation. *Biochem Pharmacol*, 1985; 34: 1867-74.
- Gryglewski R, Botting R, Vane JR - Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*, 1988; 12: 530-48.
- Newby AC, Hendersen AH - Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Ann Rev Physiol*, 1990; 52: 661-74.
- Furchgott RF, Zawadzki JV - The obligatory role endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980a; 288: 373-6.
- Furchgott RF, Zawadzki JV - Acetylcholine relaxes arterial smooth muscle by releasing a relaxing substance from endothelial cells (abstract). *Fed Proc*, 1980b; 39:581.
- Lüscher TF, Vanhoutte PM - Endothelium-dependent contraction to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 1986; 8: 344-8.
- Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ et al - Evidence that cyclic guanosine monophosphate (cGMP) mediates endothelium relaxation. *Eur J Pharmacol*, 1985; 112: 195-202.
- Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM - Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol*, 1985; 249: H95-H101.
- Diamond J, Blisard KS - Effects of stimulant and relaxant drugs on tension and cyclic nucleotide levels in canine femoral artery. *Mol Pharmacol*, 1976; 12: 688-92.
- Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE et al - Relationship between cyclic guanosine 3': 5'- monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide. Effects of methylene blue and hemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981; 219: 181-6.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S - Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987; 327: 524-6.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM et al - Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, 1987; 61: 866-79.
- Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ - Reduced bipterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem*, 1989; 264: 20496-501.
- Lüscher TF, Bock HA, Yang Z et al - Endothelin-derived relaxing and contracting factors: perspectives in nephrology. *Kidney Int*, 1991; 39: 575-90.
- Ignarro LJ - Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels*, 1991; 28: 67-73.
- Rapaport RM - Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ Res*, 1986; 58: 407-10.
- Hibbs Jr JB, Taintor RR, Vavrin Z - Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 1987; 235: 473-6.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S - Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988; 333: 664-6.
- Sakuma I, Stuehr D, Gross SS et al - Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 8664-7.
- Aisaka K, Gross SS, Griffith OW et al - N⁶-Methyl-arginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo?. *Biochem Biophys Res Comm*, 1989; 160: 881-6.
- Dohi Y, Thiel MA, Buhler FR et al - Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension*, 1990; 15: 170-9.
- Almeida PJ - Fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio em vasos mesentéricos isolados de ratos normotensos e hipertensos renovasculares. Tese de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 1991.
- Ishii K, Chang B, Kerwin Jr et al - Nw-Nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur J Pharmacol*, 1990; 176: 219-33.
- Van De Voorde J, Leusen I - Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. *Am J Physiol*, 1986; 250: H711-7.
- Vanhoutte PM, Luscher TF - Vascular endothelium and hypertension. *J Pharmacol*, 1987; 10(suppl 4): S19-24.
- Tesfamarian B, Halpern W - Endothelium-dependent and independent vasodilation in resistance arteries from hypertensive rats. *Hypertension*, 1988; 11: 440-4.
- Randall MD, Kay AP, Hilley CR - Endothelium-dependent modulation of the pressor activity of arginine vasopressin in the isolated superior mesenteric arterial bed of the rat. *Br J Pharmacol*, 1988; 95: 646-52.
- Rees DD, Palmer MJ, Moncada S - Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86: 3375-8.
- Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM - Acute impairment of endothelium dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ Res*, 1990; 67: 385-93.
- Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T - Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol (Lond)*, 1984; 351: 549-72.
- Komori K, Suzuki H - Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circ Res*, 1987; 65: 199-204.
- Feletou M, Vanhoutte PM - Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 1988; 93: 515-24.
- Huang AH, Busse R, Bassege E - Endothelium-dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF (nitric oxide). *Naunyn-Schmiedeb Archs Pharmacol*, 1988; 338: 438-42.
- Komori K, Lorenz RR, Vanhoutte PM - Nitric oxide, Ach, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 1988; 255: H207-12.
- Chen G, Suzuki H, Weston AH - Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol*, 1988; 95: 1165-74.
- Gebremedhin D, Hadhazy P, Tomas III HM - Inhibition by quinine of endothelium-dependent relaxation of rabbit aortic strips. *Br J Pharmacol*, 1987; 92: 835-41.
- Chen G, Suzuki H - Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization in arterial smooth muscle cells of the rat. *J Physiol (Lond)*, 1989; 421: 521-34.
- Long CJ, Stone TW - The release of endothelium-derived relaxant factor is

- calcium dependent. Blood vessels, 1985; 22: 205-8.
44. Mayer B, Schmidt K, Humbert P et al - Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine endothelial cells Ca^{++} -dependently converts L-arginine into an activator of guanytyl cyclase. Biochem Biophys Res Commun, 1989; 164: 679-85.
 45. Clapham DE - Ion channels of vascular endothelial cells. In: Molecular Biology of the Cardiovascular System. New York, Alan R Liss, 1990; 187-90.
 46. Johns A, Lategan TW, Lodge NJ et al - Calcium entry through receptor-operated channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. Tissue & Cell, 1987; 19: 733-8.
 47. Sauve R, Parent L, Simoneau RG - External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K^+ channel in cultured bovine aortic endothelial cells. Pflugers Arch, 1988; 412: 469-75.
 48. Lansman JB, Hallan TJ - Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers?. Nature, 1987; 325: 811-3.
 49. Olesen S-P, Clapham DE, Davies PF - Hemodynamic shear stress activates a K^+ current in vascular endothelial cells. Nature, 1988; 331: 168-71.
 50. De Mey JG, Vanhoutte PM - Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall: importance of endothelium. Circ Res, 1982; 51: 439-47.
 51. Miller VM, Vanhoutte PM - Endothelium dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase in canine veins. Am J Physiol, 1985; 248: H432-7.
 52. Altieri RJ, Kiritsy JA, Catavras JD - Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries. Role of thromboxane A_2 . J Pharmacol Exp Ther, 1986; 236: 535-41.
 53. Lüscher TF, Diederich D, Weber et al - Endothelium-dependent responses in carotid arteries of normotensive and hypertensive rats. Hypertension, 1988; 11: 573-8.
 54. Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM - Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries. Am J Physiol, 1987; 252: H671-3.
 55. Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM - Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid and acetylcholine in canine basilar arteries. Stroke, 1981; 19:476-9.
 56. Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM - Potassium-induced endothelium derived rhythmic activity in the canine basilar artery. J Cardiovasc Pharmacol, 1988b; 12: 3741.
 57. Shirehase H, Fujiwara M, Usui H et al - A possible role of thromboxane A_2 in endothelium in maintaining resting tone and producing contractile response to acetylcholine and arachidonic acid in canine cerebral arteries. Blood Vessels, 1987; 24: 117-9.
 58. Shirahase H, Usui H, Manabe K et al - An endothelium-dependent contraction induced by A-23187, a calcium ionophore in canine basilar artery. J Pharmacol Exp Ther, 1988a; 247: 701-5.
 59. Shirahase H, Usui H, Manabe K et al - Endothelium-dependent contraction and independent relaxation induced by adenine nucleotides and nucleoside in canine basilar artery. J Pharmacol Exp Ther, 1988b; 247: 1152-7.
 60. Resenblun WI, Nelson GH - Endothelium-dependent constriction demonstrated in vivo in mouse cerebral arterioles. Circ Res, 1988; 63: 837-43.
 61. Auch-Schweik W, Katusic ZS, Vanhoutte PM - Thromboxane A_2 receptor antagonist inhibit endothelium-dependent contractions. Hypertension, 1990; 15: 699-703.
 62. Kato T, Iwama Y, Okumura K et al - Prostaglandin H_2 may be the endothelium derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. Hypertension, 1990; 15: 475-81.
 63. Auch-Schweik W, Katusic ZS, Vanhoutte PM - Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. Hypertension, 1989; 13: 859-64.
 64. Yanagisawa M, Masaki T - Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Biochem Pharmacol, 1989a; 38: 1877-83.
 65. Yanagisawa M, Masaki T - Molecular biology and biochemistry of the endothelins. Trends Pharmacol Sci, 1989b; 10: 374-8.
 66. Sanchez-Ferrer CF, Marín J - Endothelium-derived contractile factors. Gen Pharmacol, 1990; 21: 589-603.
 67. Rubanyi GM, Vanhoutte PM - Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. J Physiol (Lond), 1985; 364: 45-56.
 68. Vanhoutte PM, Auch-Schweik W, Boulanger C et al - Does endothelin-1 mediate endothelium-dependent contractions during anoxia?. J Cardio Pharmacol, 1989; 13(suppl 5): S124-8.
 69. Vanhoute PM, Lüscher TF, Gräser T - Endothelium-dependent contractions. Blood Vessels, 1991; 28: 74-83.
 70. Cabral AM, Musso MN, Bissoli NS et al - Chlortalidone reduces vascular hyperresponsiveness in doca-salt hypertensive rats. Clin Exp hypertension, 1992; 14: 667-83.
 71. Gaarder A, Jonsen J, Laland S et al - Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. Nature (London), 1961; 192: 531-3.
 72. Born GVR - Adenosine diphosphate as a mediator of platelet aggregation in vivo: an editorial view. Circulation, 1985; 72: 741-6.
 73. Colman RW - Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. FASEB J, 1990; 4: 1425-35.
 74. Würzinger LJ, Opitz R, Blasberg P et al - Platelet and coagulation parameters following millisecond exposure to lammar shear stress. Thromb Haemostat, 1985; 54: 381-6.
 75. O'Brien JR - Shear-induced platelet aggregation. Lancet, 1990; 335: 711-3.
 76. Jorgensen L, Glynn MF, Hovig T et al - Renal lesions and rise in blood pressure by adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in rabbits. Lab Invest, 1970; 23: 347-57.
 77. Houston DS, Shepherd JT, Vanhoute PM - Adenine nucleotides, serotonin and endothelium-dependent relaxations to platelets. Am J Physiol, 1985; 248: H389-95.
 78. Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM - Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries: role of serotonin, thromboxane A_2 and adenine nucleotides. J Clin Invest, 1988; 78: 539-44.
 79. Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ et al - Effect of early an advanced atherosclerosis on vascular responses to serotonin, thromboxane A_2 and ADP. Circulation, 1989; 79: 698-705.
 80. Kravtsov GM, Orlov SN, Postnov YV - Aggregation membrane potential, and transport in platelets of spontaneously hypertensive rats. Pflugers Arch, 1984; 402: 330-6.
 81. Forstermann U, Mugge U, Bode SM et al - Endothelium-derived relaxing factor (EDRF): a defense mechanism against platelet aggregation and vasospasm in human coronary arteries. Eur Heart J, 1989; 10 (suppl F): 36-43.
 82. Ignarro LJ - Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1990; 30: 535-60.
 83. Panza JA, Quyyumi AA, Brush Jr JE et al - Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. N Engl J Med, 1990; 323: 22-7.