

Endotélio Vascular. Um Importante Sistema Cibernético Vaso-Modulador e Modulador cuja Disfunção Participa do Processo Hipertensivo

Emílio Antonio Francischetti, Virgínia Genelhu de Abreu Fagundes, Maria de Fátima França

Rio de Janeiro, RJ

Os últimos 15 anos vêm assistindo uma verdadeira explosão de observações experimentais e clínicas, mostrando que o endotélio não é, como se pensou durante décadas, uma simples barreira, inerte, entre o sangue e os tecidos, mas sim um órgão, metabolicamente ativo, que atua como um complexo sistema modulador com inúmeras funções, desde o transporte de macrócélulas e solutos pela parede dos vasos ao controle da resposta imune. No sistema cardiovascular, além de suas propriedades antitrombogênicas, por intervir na ativação, agregação e adesão plaquetária, mantendo a fluidez do sangue circulante, intervém, direta ou indiretamente, no tônus vascular, ajustando precisamente o equilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação. Mais ainda, o endotélio controla o crescimento de células musculares lisas, liberando fatores promotores desse crescimento e outros inibidores da mitogênese.

A tabela I mostra algumas das substâncias produzidas pelo endotélio. Ao longo desta revisão, daremos ênfase aos dois agentes vasoativos definidos como importantes moduladores da pressão arterial (PA) e implicados, também, na gênese e manutenção de modelos experimentais e clínicos de hipertensão: a endotelina (ET) e o fator relaxador derivado do endotélio - óxido nítrico (EDNO).

| Agentes vasodilatadores | Agentes vasoconstritores |
|--|---|
| Fator de Von Willebrand | Mucopolissacarídeos |
| t-PA | Substâncias promotoras do crescimento |
| Inibidores do t-PA | Substâncias inibidoras do crescimento |
| Fator ativador de plaquetas | Substâncias quimio-aderentes |
| Histamina | Cininas II |
| Bradicinina | Renina-angiotensina |
| Colágeno tipo IV | Endotelinas |
| Enzimas anti-oxidantes | Ânion-superóxido |
| Prostaciclina | Tromboxano A ₂ |
| Óxido nítrico (EDNO) | Prostaglandina H ₂ (PGH ₂) |
| Fator hiperpolarizante derivado do endotélio | |

Seção de Hipertensão, Metabolismo e Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Correspondência: Emílio Antonio Francischetti
Rua Paulo Cezar de Andrade, 106/602 - CEP 22221-090 - Rio de Janeiro, RJ
Recebido para publicação em 19/7/94
Aceito em 7/11/94

Endotelina

Em 1985, Hickey e col¹ mostraram que as células endoteliais em cultura sintetizavam e secretavam um potente vasoconstritor coronário. Nesse mesmo ano, Rubanyi e Vanhoutte², estudando os efeitos da hipóxia sobre células endoteliais, verificaram que as mesmas liberavam uma substância que se difundia pela musculatura lisa adjacente, induzindo importante processo contrátil.

Em 1988, Yanagisawa e col³ isolaram no sobrenadante de cultura de células endoteliais um peptídeo vasoconstritor e vasopressor - a ET (fig. 1). Determinaram a seqüência de aminoácidos da molécula e clonam o peptídeo precursor. Yanagisawa e col propuseram que o tônus basal dos leitos vasculares *in vivo* pode ser influenciado pelos níveis de produção de ET pois seu RNAm expressa-se ativamente na célula endotelial *in situ*.

A ET é gerada a partir de um precursor - a pré-endotelina, polipeptídeo com 203 aminoácidos e da pró-endotelina ou *big* endotelina, outro peptídeo que contém 92 aminoácidos. A conversão da *big* endotelina em ET, que tem 21 aminoácidos, é feita pela enzima conversora da endotelina (ECE) que é essencial para a expressão da atividade vascular plena (fig. 2). Essa enzima é bloqueada por metaloproteases como a fosforamidona e pepstatina A⁴.

Três formas de ET foram caracterizadas: a endotelina 1 (ET-1) - denominada endotelina humana ou de porco; a endotelina 2 (ET-2) - humana e a endotelina 3 (ET-3), previamente conhecida como ET humana e de rato⁵. Um 4º peptídeo, identificado como agente constritor vaso-intestinal, foi descrito como ET-2 de ratos e murinos⁶.

Atualmente, sabe-se que muitas espécies, incluindo o homem, podem sintetizar todas as formas de ET. No

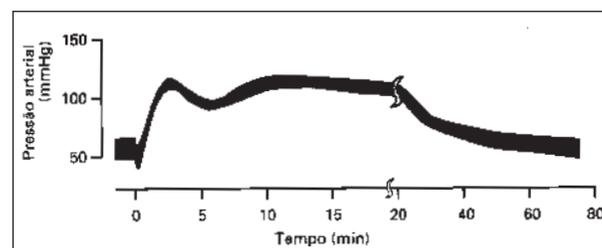


Fig. 1 - Resposta típica vasopressora da endotelina administrada em bolus, endovenosamente, no momento zero (0) a ratos desnervados. Observar que o efeito pressor é duradouro e a resposta é bifásica. O efeito hipotensor inicial tem sido atribuído à liberação de EDNO. Apud Yanagisawa e col³.

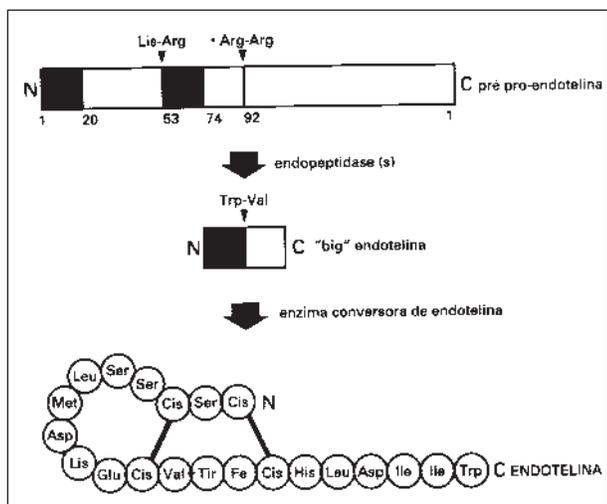


Fig. 2 - Biossíntese da endotelina. A big endotelina é gerada de uma pré pró-endotelina, por clivagem proteolítica. A endotelina é produzida pela ação de uma enzima de conversão da endotelina. Apud Yanagisawa e col¹.

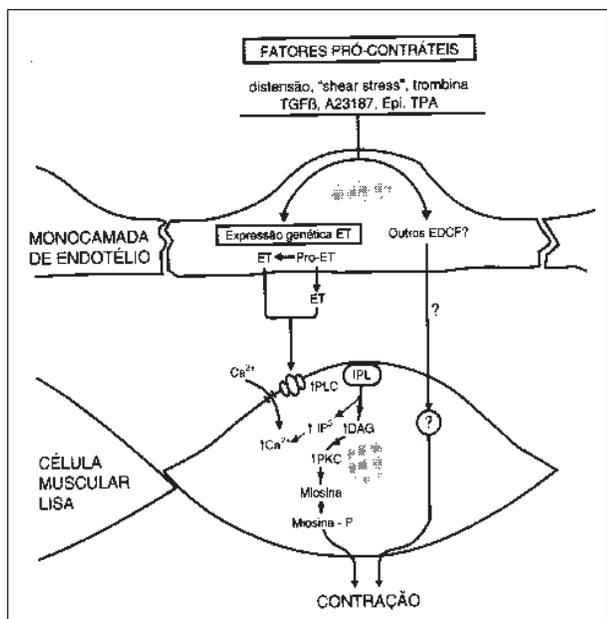


Fig. 3 - Contração do músculo liso vascular dependente do endotélio. Vários fatores pró-contráteis incluindo a distensão do vaso, shear stress, trombina, fator transformador do crescimento beta (TGF beta), ionóforo de cálcio (A23187), epinefrina (Epi) etc, estimulam a expressão gênica e liberação de endotelina e de outros possíveis fatores vasoconstritores. A endotelina liga-se a receptores de superfície da célula muscular lisa, abre canais de cálcio voltagem-sensíveis, ativa a fosfolipase C (PLC) para liberar inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) de fosfolípídeos (IPL) da membrana plasmática. IP₃ e DGA promovem liberação de cálcio de fontes intracelulares e ativam a proteína-quinase C (PKC). A calmodulina e a miosina-quinase de cadeia leve auxiliam na fosforilação das miosinas (miosinas-P) de cadeia leve, pré-condição da contração muscular. Apud Brenner e col²⁰.

homem, três genes se relacionam às ET. Porém, apenas um desses genes codifica a ET-1, enquanto os outros dois codificam a ET-2 e ET-3. O endotélio vascular produz ET-1 mas não ET-2 e ET-3. A expressão da ET-2 não foi demonstrada, ainda, em qualquer tecido e a ET-3 tem origem neural⁷.

As ET-1, ET-2 e ET-3 são isoformas com estrutura

de 21 aminoácidos em comum, incluindo duas pontes dissulfídicas entre as cisteínas. A ET-2 e ET-3 diferem da ET-1 em duas e seis posições de aminoácidos, respectivamente⁸.

A expressão do RNAm da pre-pro ET-1 de células endoteliais de porco é aumentada por inúmeros fatores, tais como ionóforo de cálcio A23187, trombina, epinefrina³, fator transformador do crescimento (TGF-beta)⁹, aumento da pressão de deslocamento do sangue sobre a superfície luminal (shear stress)¹⁰ e bradicinina¹¹. Com exceção do TGF-beta e do shear stress, esses agentes ativam a fosfolipase C. A regulação da expressão gênica da pre-pro ET-1 em células do endotélio umbilical parece aumentar com ésteres de forbol¹², sugerindo que sua síntese seja mediada por mecanismos proteína cinase C - dependentes. Agregação de plaquetas e formação de coágulo aumentam a síntese de ET-1 via estímulo trombina e TGF-beta. A auto-regulação do fluxo sanguíneo pode ser mediada por síntese local de ET-1 em resposta ao shear stress.

A ativação de receptores de ET associa-se, à abertura de canais iônicos, mudanças no potencial de membrana e influxo de Na⁺ e Ca²⁺. O maior sinal de transdução para os receptores se estabelece como um sistema envolvendo o inositol 1, 4, 5 - trifosfato (IP₃) e que implica, também, na ativação da fosfolipase C por uma proteína G, ligada ao receptor. O IP₃ e seus metabólitos atuam sobre receptores específicos para liberar Ca²⁺ armazenado dentro da célula (fig. 3). Esse cálcio, ligado à calmodulina, ativa enzimas como a miosina-quinase de cadeia leve que dispara mecanismos contráteis intracelulares⁶.

O fator relaxador derivado do EDNO¹³, a prostaciclina (PGI₂) e o peptídeo atrial, natriurético (ANP)¹⁴ reduzem a síntese de ET-1 por mecanismos dependentes do GMPc. Recentemente, o fator hiperpolarizante do endotélio foi identificado como sendo o peptídeo natriurético do tipo C (CNP). Esse agente é dotado de importante efeito vasodilatador, inibe a proliferação de células musculares lisas e é o mais potente inibidor da ET¹⁵.

In vivo, os níveis circulantes de ET-1 são baixos¹⁶, o que sugere que em condições fisiológicas pouca ET é produzida, ou que o peptídeo é liberado em direção às células musculares lisas e não na luz dos vasos. A ET-1 é, pois, mais um agente local, controlando mecanismos homeostáticos, que um hormônio circulante.

Receptores da endotelina

Resultados obtidos de estudos de clonagem mostram a existência de pelo menos duas classes de receptores de ET, os tipos ET_A e ET_B. São assim designados pela seletividade de suas afinidades às ET 1, 2 e 3. Assim, o ET_A tem menos afinidade pela ET-3 que pela ET-1 e ET-2, enquanto o ET_B não tem afinidade seletiva a qualquer um desses peptídeos^{6,8}. Tem-se constatado, porém, que as células endoteliais são particularmente sensíveis a ET-3.

Efeitos biológicos da endotelina

Efeitos hemodinâmicos - A resposta inicial à administração, em bolus, de ET-1, a animais intactos, é a diminuição transitória da resistência periférica, que se acompanha de hipotensão, a que se segue efeito pressor importante e sustentado³. De todos os agentes vasopressores conhecidos as ET parecem ser os mais potentes⁷. O efeito hipotensor inicial tem sido atribuído à liberação de EDNO via ativação de receptores ET_B localizados nas próprias células endoteliais¹⁷. A vasoconstrição é mediada pela ativação de receptores ET_A situados na superfície de células musculares lisas⁷.

Efeitos cardíacos - A ET induz uma potente resposta inotrópica positiva, dose-dependente e promove resposta cronotrópica positiva. Libera o peptídeo atrial natriurético de células miocárdicas. A infusão intracoronária de ET-1, em porcos, pode causar isquemia fatal¹⁸.

Efeitos renais - A ET aumenta a resistência vascular renal, diminui o ritmo de filtração glomerular (RFG), o fluxo plasmático renal (FPR) e o coeficiente de ultrafiltração glomerular, este último efeito via contração do mesângio glomerular¹⁹. Em doses pequenas, contudo, a ET-1 reduz proporcionalmente menos o RFG que o FPR, de modo que a fração de filtração se eleva²⁰. A administração de ET-1, em doses que não comprometem gravemente o RFG, pode produzir natriurese modesta, o que implica em menor reabsorção tubular de sódio, provavelmente por inibição da atividade da Na⁺K⁺-AT-Pase²⁰. Quando, porém, as doses de ET-1 forem suficientes para produzir significativa redução no RFG, registra-se aumento da reabsorção tubular de sódio relacionado, agora, aos efeitos hemodinâmicos do peptídeo²¹. Exerce, também, efeitos pro-mitogênicos em células mesangiais cultivadas admitindo-se, por isso, sua participação na remodelagem estrutural da doença glomerular crônica⁸.

Efeitos neuroendócrinos - A ET participa da transmissão sináptica⁸ e aumenta os níveis plasmáticos do peptídeo atrial natriurético²¹, catecolaminas, e aldosterona²². Pode suprimir a liberação de renina se a perfusão renal estiver preservada²³. A ET-1 estimula a produção de PGI₂, NO e PGE₂²⁰. Aumenta, também, a síntese de TxA₂ de alguns leitos vasculares²⁴.

Outros efeitos - A ET estimula a mitogênese de células musculares lisas e de fibroblastos 3T₃⁸. Intervém na regulação de proto-oncogenes, c-fos e c-myc, envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda²⁵.

Endotelina e hipertensão arterial

A atuação da ET como mediadora de alterações vasculares e participante na gênese de complicações

graves e fatais da doença hipertensiva vem sendo intensamente estudada. Para se avaliar criticamente o envolvimento da ET na hipertensão arterial (HA) discutiremos respostas e perguntas que habitualmente são formuladas quando se pretende estabelecer relações de causa entre um agente pressor e a hipertensão e suas complicações. Além disso, há que se ressaltar que o envolvimento da ET no processo hipertensivo exige que se demonstre que antagonistas de sua síntese ou ações são capazes de reduzir a PA de modelos experimentais de hipertensão ou de seres humanos.

A ET “per se” inicia e mantém níveis elevados de pressão? - A infusão de ET-1 e ET-3 induz aumento significativo e duradouro da PA precedido por diminuição rápida e transitória do parâmetro^{3,23}. O aumento da pressão é dose-dependente e ocorre em concentrações muito menores do que qualquer hormônio vasoconstritor²⁶. Como já foi dito, tais efeitos parecem se relacionar à ativação de receptores ET_B (efeito hipotensor), localizados em células endoteliais e que modulam a síntese de PGI₂ e NO^{17,27}, enquanto a vasoconstrição e hipertensão são mediadas por receptores ET_A de células musculares lisas. A ET-1 pode, também, ativar um grande número de células, além daquelas da parede do vaso²⁸. Áreas específicas do sistema nervoso central são ativadas, o que resulta em aumento do tônus simpático²⁹ ou maior liberação de hormônios vasoconstritores, tais como catecolaminas adrenais e vasopressina³⁰.

A ET exerce importante controle da hemodinâmica renal reduzindo o fluxo plasmático renal e o ritmo de filtração glomerular, em concentrações séricas que são incapazes de interferir na hemodinâmica sistêmica²². Pelo papel central do rim no controle da relação pressão-volume esses efeitos podem ser importantes para o desenvolvimento da hipertensão.

Existem situações clínicas de hipertensão onde a ET esteja envolvida? - Em 1991, Yokokawa e col³¹ mostraram que hemangio-endoteliomas causam HA severa, que é controlada pela remoção do tumor. A

Tabela II - Resultados de nove estudos analíticos mostrando níveis de endotelina na hipertensão sistêmica

| Tipo de hipertensão | Controle | Hipertensão | P |
|-----------------------|-------------|--------------|-------|
| Hipertensão sistêmica | 1,4±0,1 | 1,4±0,1 | NS |
| | 1,6±0,1 | 1,7±0,1 | NS |
| | 5,1±0,5* | 5,7±0,5* | NS |
| | 44,7±3,5 | 42,3±4,9 | NS |
| | 0,24±0,02** | 0,23±0,01*** | NS |
| | 1,4±0,5 | 2,3±1,1 | 0,025 |
| | 0,5±0,2 | 1,1±0,7 | 0,05 |
| | 18,5±0,9 | 30,2±1,4 | 0,01 |
| | 18,5±0,9 | 30,1±1,4 | 0,01 |

Dados expressam média ± EPM, picogramas por ml. Apud Lüscher e col³⁷. * Dados expressos em picomoles/litro; ** dados expressos em femtomoles/ml; *** hipertensão severa não controlada.

hipertensão de portadores desse tumor acompanha-se de aumento nos níveis séricos de ET que se normalizam após a cirurgia, o que indica envolvimento do peptídeo na gênese dessa forma rara de HA (fig. 4).

Outro modelo clínico de hipertensão endotelino-dependente é a hipertensão induzida pela ciclosporina³². Em cultura de células endoteliais a ciclosporina induz liberação de ET³³. A droga parece elevar os níveis circulantes de ET registrando-se em alguns pacientes vasoconstricção intensa no leito vascular renal e nefrotoxicidade³².

A pré-eclâmpsia e a síndrome HELLP (pré-eclâmpsia grave, hemólise, elevação das enzimas hepáticas e trombocitopenia), acompanham-se de aumento sérico da ET, mais pronunciado em grávidas que cursam com hemólise, consumo de plaquetas e coagulação intravascular disseminada^{34,35}. Nova e col³⁶ demonstraram, em 1991, que o aumento de ET-1 exterioriza o dano endotelial que ocorre na pré-eclâmpsia, e pode explicar o vasoespasmoprogressivo e a redução dos fluxos renal e útero-placentário desta condição.

Ocorre maior produção de ET na hipertensão sistêmica? - A tabela II mostra os resultados de um levantamento feito por Lüscher e col³⁷ em que se mensurou os níveis circulantes de ET em vários grupos de hipertensos sistêmicos e na hipertensão pulmonar. Quatro desses estudos apontam para concentrações elevadas de ET, enquanto os demais mostram níveis normais. Tal discrepância pode refletir problemas metodológicos na dosagem de ET, ou que a síntese do peptídeo seja maior naqueles que evoluem com complicações de HA. Além disso, os níveis circulantes de ET podem não refletir sua produção total já que quantidades significativas da mesma são liberadas em área abluminal ao endotélio, isto é, em direção à musculatura lisa vascular circunvizinha.

Kaufmann e col³⁸ sugeriram recentemente a existência de dois sistemas vasopressores relacionados a ET. O primeiro, representado por células endoteliais que produziram apenas ET-1. Esse sistema, cuja natureza seria, exclusivamente vascular, responderia lentamente, demorando 2 a 4h, refletindo a síntese de novo de proteína e não sua liberação de reservas intracelulares. O outro, localizado na neurohipófise, responderia aos estímulos de síntese de ET rapidamente. Os resultados indicam que o sistema ET-1 vascular estaria envolvido em mudanças mais a longo-prazo do tônus vascular, enquanto a ET de origem neurogênica participaria de adaptações a curto prazo.

Outras evidências, embora indiretas, mostram a participação da ET em modelos hipertensivos que se caracterizam por diminuição da resposta da musculatura lisa ao seu estímulo, o que significa aumento nas taxas basais de ET e que pouca disponibilidade da mesma seria necessária para regular a contratilidade vascular a níveis

mais elevados³⁷.

Mesmo que a ET circulante esteja normal ou discretamente elevada em muitos pacientes com HA leve e moderada, nas formas malignas da doença ela está efetivamente elevada³⁹.

A ET participa de processos que comprometem os órgãos alvos da hipertensão? - A ET contribui para a emergência de complicações da hipertensão, seja por participar em eventos isquêmicos devido a sua potente ação vasoconstritora, seja pelos seus efeitos proliferativos que facilitam o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e insuficiência renal^{25,40}. Os níveis circulantes do peptídeo estão aumentados em casos de doença vascular aterosclerótica e infarto do miocárdio. A secreção de ET guarda relação com a extensão e gravidade da doença e é estimulada pelo próprio processo isquêmico^{41,42}.

Antagonistas da ET e inibidores da enzima de conversão da ET controlam a hipertensão? - A inibição da ECE por metaloproteases como a fosforamidona⁴³ e antagonistas de receptores ET_A (BQ 123, FR 139317) e ET_B⁴⁴⁻⁴⁶ são ferramentas farmacológicas que vêm sendo utilizadas para esclarecer o papel das ET no início e manutenção da HA. Em verdade, a única evidência disponível, até o momento, de que a ET-1 contribui para aumentar a resistência vascular periférica na hipertensão surgiu de observações em que se demonstrou que a fosforamidona induz redução apreciável da PA de ratos espontaneamente hipertensos⁴⁷.

Mais recentemente, um antagonista da *big* ET-1 foi sintetizado - bosentan ou RO - 470203⁴⁸. Esta substância

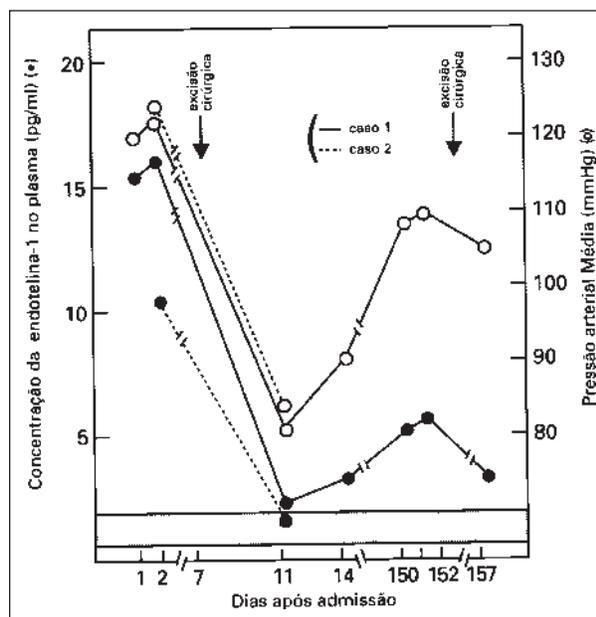


Fig. 4 - Sequência pré e pós-cirurgia dos níveis séricos de endotelina e da pressão arterial média em 2 pacientes com hemangio-endotelioma maligno. Apud Yokokawa e col³¹.

é ativa oralmente e atua como antagonista de receptores ET_A e ET_{B1} e ET_{B2} . Parece ser um agente muito efetivo no controle da hipertensão de ratos DOCA-Sal, mas não de ratos 2 rins - 1 clip. A associação de bosentan e cilazapril reduz a PA de ratos espontaneamente hipertensos predispostos a desenvolverem acidente vascular cerebral. A droga diminui eficientemente a hipertrofia ventricular esquerda de animais hipertensos, reduz a pressão de ratos com insuficiência cardíaca e controla o vasoespasma da hemorragia subaracnóide experimental.

Os efeitos hipertensores prolongados da ET, que se explicam pela estreita ligação da molécula pressora aos seus receptores, mantêm-se por muito tempo, mesmo com a interrupção da infusão. Por conseqüência, a terapêutica com antagonistas de ET deve ser mantida, a longo prazo, para que a resposta hipotensora se faça presente.

Ensaio clínico começam a ser desenvolvidos com esses agentes e resultados, ainda preliminares, apontam para uma resposta favorável em formas malignas da doença hipertensiva a na HA atribuída à ciclosporina⁴⁹.

É bastante provável que os antagonistas de receptores de ET venham representar, nos próximos anos, uma nova e eficiente alternativa no controle da HA e na prevenção de suas complicações.

Óxido nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadski⁵⁰ constataram, acidentalmente, que os efeitos vasorelaxadores da acetilcolina (Ach) dependiam da presença de um endotélio íntegro. Vasos desnudados de sua túnica mais íntima respondiam com vasoconstrição quando estimulados por esse agente. Propuseram a hipótese de que o relaxamento era causado pela ação da Ach sobre receptores muscarínicos de células endoteliais que, quando estimulados, induziam a síntese de uma ou mais substâncias que atuavam na musculatura vascular adjacente ativando, assim, o relaxamento dela. Denominaram a substância de fator relaxador derivado do endotélio (EDRF) que foi logo caracterizado como distinto da PGI_2 pois o relaxamento ocorria em presença da indometacina.

Em 1986, descobriu-se que o EDRF é um inibidor da agregação plaquetária induzida por agonistas distintos, atuando como agente desagregador dessas mesmas células (agregadas com colágeno ou tromboxano), e inibe a adesão de trombócitos ao endotélio de vasos e colágeno^{51,52}. É desse período as observações realizadas independentemente, por Palmer e col⁵³ e Ignarro e col⁵⁴, de que o EDRF poderia ser o óxido nítrico (NO). Atualmente, o agente é conhecido como NO derivado do endotélio ou EDNO (*endothelium derived nitric oxide*).

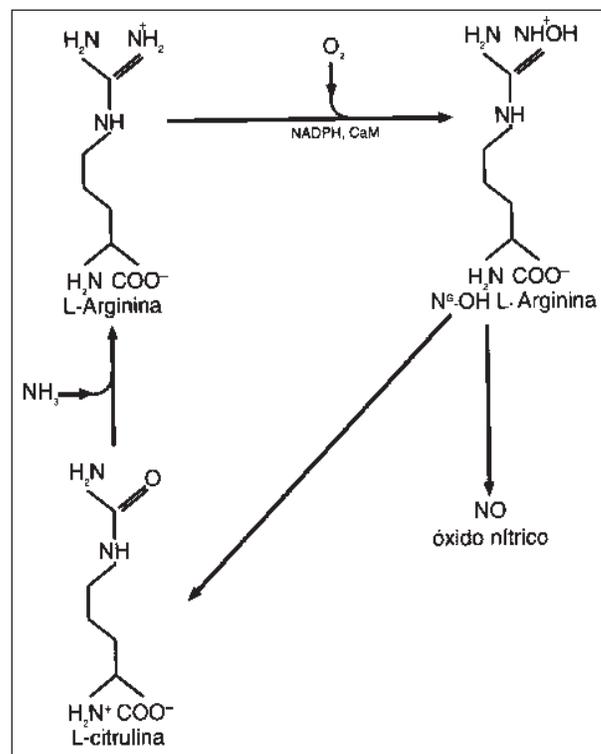


Fig. 5 - Biossíntese do NO endógeno a partir da L-arginina e reciclagem da L-citrulina. O processo incorpora o oxigênio molecular em NO e citrulina. Normalmente, os níveis de L-arginina são suficientes para a biossíntese e secreção de NO. A citrulina é reciclada, de volta, para L-arginina, incorporando um nitrogênio. Esse ciclo de uréia modificado regenera L-arginina para a síntese de NO e elimina o excesso de nitrogênio proveniente do metabolismo celular.

É em 1987, porém, que acontece a descoberta mais importante. Moncada e seu grupo⁵⁵ demonstraram que as células endoteliais em cultura sintetizavam NO a partir de átomo(s) de nitrogênio do terminal guanidino do aminoácido L-arginina. A reação mostrou-se específica e mediada, como logo depois se verificou, por enzima solúvel, a NO sintase (fig. 5), NADPH dependente e que forma citrulina como co-produto do NO⁵⁶. Qualquer outro aminoácido sem ser a L-arginina, inclusive seu análogo mais próximo, a D-arginina, não atua como substrato da enzima. Demonstrou-se, nessa época, que um desses análogos, a L-N^G-monometil arginina (L-NMMA) inibe o processo de geração de NO pelas células endoteliais em cultura, de modo enantiomericamente específico⁵⁷ e seus efeitos são prevenidos pela L mas não D-arginina⁵⁸. Mostrou-se, também, que o L-NMMA induzia aumento do tônus endotélio-dependente de anéis de aorta de coelho e atenuava o relaxamento induzido pela Ach, ionóforos de cálcio e substância P⁵⁷. Verificou-se que homogeneizados de células endoteliais não convertem L-arginina em L-citrulina na presença de L-NMMA⁵⁹.

Esses dados acabaram apontando uma rota enzimática específica para a síntese de NO, passível de manipulação farmacológica e bioquímica. É a partir daí que se inicia uma fase extremamente promissora no

universo da pesquisa clínica e experimental, relacionando HA e NO.

A NO sintase é uma família de isoenzimas, existindo: 1) isoformas constitutivas, ligadas à membrana, ou intracitosólicas, dependentes do NADPH, do complexo cálcio-calmodulina e que são bloqueadas por análogos estruturais da L-arginina como L-NMMA e L-NAME⁶⁰, e 2) isoformas induzíveis, encontradas nas células da musculatura lisa vascular, NADPH dependentes, bloqueadas pela ação da L-NMMA e pelos glicocorticóides e dependentes de substrato exógeno^{61,62}. Lipopolissacarídeos podem induzir essa NO sintase produzindo quantidades significativas de EDNO em condições como o choque séptico⁶³.

O EDNO é liberado pelas células endoteliais quando a membrana celular é distendida - liberação basal, por aumento da pressão de deslocamento do sangue sobre a superfície luminal (*shear stress*), por estímulo de receptores da NO sintase, por agentes como a Ach, bradicinina, substância P, e por agonistas que são liberados na vizinhança das células endoteliais⁶⁴.

Em sistemas bem oxigenados o EDNO é muito instável transformando-se rapidamente nos radicais livres NO² e NO³.

É difícil atribuir papel de mediador circulante ao EDNO. É mais plausível imaginá-lo difundindo-se, de sítios onde é gerado, em direção às células musculares adjacentes, dentro da parede vascular (fig. 6). Por ser também lipofílico, o EDNO passa facilmente pela membrana plasmática onde se combina com proteínas que contêm heme, entre elas a guanilato-ciclase solúvel, para produzir adutores que facilitarão a conversão de MgGTP em GMPc⁶⁵. A GMPc ativa a proteína-quinase GMPc-dependente que leva à desfosforilação da miosina de cadeia leve e ao relaxamento da célula muscular lisa²⁰.

Envolvimento do EDNO no controle do tônus vascular. Implicações fisiológicas e fisiopatológicas

Em várias situações experimentais, avaliando-se leitos vasculares distintos, de animais diferentes, tem-se constatado que os inibidores na NO sintase, causam aumento na resistência vascular arterial, que é dose-dependente e atenuam parcialmente, a ação hipotensora da Ach⁵⁸. Tais efeitos desaparecem lentamente, a não ser que doses elevadas de L-arginina sejam administradas, reforçando a idéia de que sejam inibidores competitivos da síntese de EDNO. Vários inibidores já foram descritos, alguns com potência muito maior que o L-NAME e L-NMMA⁶⁶. Estes, porém, são efetivos oralmente, induzindo HA em ratos geneticamente deficientes em vasopressina, os ratos Brattleboro⁶⁷.

Esses fatos sugerem que existe uma utilização contínua de L-arginina para a formação enzimática de EDNO pelos vasos de resistência⁶⁸. O registro de que a

PA não se altera ou se altera modestamente quando a NO sintase não está inibida mostra que, em condições normais, deve existir suficiente L-arginina endógena para saturar a enzima Ca²⁺ dependente geradora de EDNO⁶⁹.

Contudo, a importância maior, atribuída à geração de EDNO pelas estruturas vasculares aparece com a demonstração de que uma única injeção de L-NMMA induz resposta vasoconstritora e vasopressora intensa e prolongada⁷⁰⁻⁷². Pelo fato da substância não ser, ela própria, um agente vasoconstritor, mas sim um inibidor da síntese de um vasodilatador endógeno, o significado do fenômeno biológico transcende muito ao que dele inicialmente se esperava. Moncada passou a admitir que o EDNO seria gerado constantemente na parede do vaso, afirmando que o sistema vascular em repouso refletiria um estado de vasodilatação ativa⁶⁸. Essa nova visão passou a contradizer inteiramente o conceito prévio e clássico de que o leito vascular seria uma estrutura rígida, composta por vasos de resistência ou um sistema que equilibraria forças constritoras e dilatadoras para manter o fluxo. Em verdade, o que caracterizaria o sistema vascular seria a sua vasodilatação ativa e basal contra a qual influências constritoras agiriam.

Provas que a liberação basal de EDNO afeta o controle da pressão arterial

O bloqueio da síntese de EDNO causa hipertensão arterial crônica. Um novo modelo de hipertensão experimental - Já vimos que o comprometimento da liberação basal de EDNO afeta a regulação da PA, levando a um estado hipertensivo. Tal constatação tornou possível o surgimento de um novo modelo de hipertensão obtido pela administração de inibidores de síntese de EDNO, seja infundindo-os continuamente na veia ou administrando-os oralmente. Em um desses modelos, Davis Manning e col⁷³ demonstraram, em cães alertas, recebendo infusão contínua de L-NAME, elevação em 120% da PA média registrada durante 24h e que foi acompanhada de bradicardia reflexa no período hipertensivo. A administração de L-arginina reverteu parcialmente a hipertensão. Também não houve resposta pressora significativa à fenilefrina, após o 2º dia de sua administração. O balanço de sódio mostrou-se positivo no 1º dia da infusão de L-NAME, mantendo-se, a partir daí estável, indicando que o aumento da pressão não se associou a um volume extracelular maior. Os resultados assinalaram que hipertensão sustentada pode ser induzida pela inibição da liberação basal de EDNO. Retenção de volume e ou maior sensibilidade do sistema cardiovascular aos agentes constritores não parecem ter sido a causa maior de surgimento e manutenção desse modelo hipertensivo.

Em outro modelo, Ribeiro e col⁷⁴ mostraram que a inibição crônica da NO sintase pelo L-NAME promove

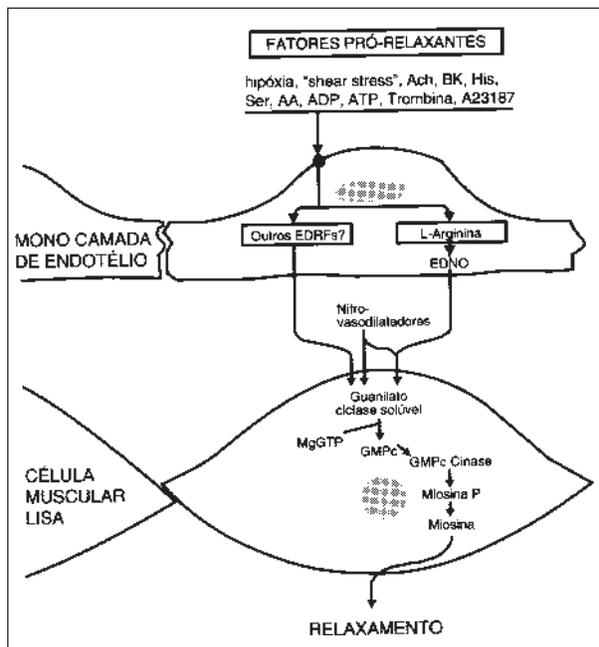


Fig. 6 - Relaxamento do músculo liso vascular dependente do endotélio. Vários fatores pró-relaxantes estão apontados, incluindo, hipóxia, *shear stress*, acetilcolina (Ach), bradicinina (BK), histamina (His), serotonina (Ser), ácido araquidônico (AA), ADP, ATP, trombina, ionóforo de cálcio A23187. Nitrovasodilatadores, EDNO e outros vasodilatadores derivados do endotélio estimulam a guanilato-ciclase solúvel de célula muscular lisa para converter MgGTP em GMPc que, por sua vez, ativa a proteína-quinase GMPc-dependente que leva à desfosforilação da miosina de cadeia leve e ao relaxamento da célula muscular lisa. Apud Brenner e col²⁰.

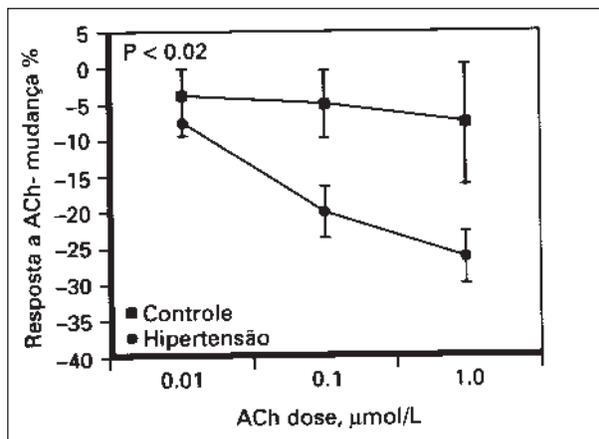


Fig. 7 - A resposta do diâmetro da artéria coronária às infusões de acetilcolina (ACh) expressa modificações percentuais comparadas aos valores basais. Observar que essa resposta está marcadamente comprometida em pacientes hipertensos. O valor de P refere-se a comparação de curvas dose-resposta. Apud Treasure e col⁷.

hipertensão e vasoconstrição renal severa, que se acompanha de lesões morfológicas da microcirculação renal compatíveis com as de hipertensão maligna. Comprovaram, também, que a hipertensão foi revertida parcialmente pela administração aguda de L-arginina e pelo antagonista da angiotensina, losartan. A partir desses resultados admitiram um novo modelo de HA persistente, induzido pela inibição crônica da biossíntese de EDNO, em que haveria participação, também, do

sistema renina-angiotensina.

Predominância do tônus vasoconstritor sobre o tônus vasodilatador seria uma explicação plausível para os modelos de HA resultantes da menor síntese de EDNO. A diminuição ou mesmo abolição do tônus vasodilatador pela inibição basal da síntese de EDNO seria o ponto crucial do fenômeno, as forças adaptativas dirigindo-se para a predominância do tônus vasoconstritor. O EDNO, porém, exerce algum papel na inibição de neurotransmissores autonômicos simpáticos, podendo, desse modo, reduzir a hiperatividade simpática⁷⁵. Além disso, evidências de que o EDNO inibe a liberação de renina fazem supor que o SR-A pode participar nesse modelo de hipertensão, fato reforçado pela reversão, ainda que parcial, do quadro hemodinâmico e das lesões morfológicas em território renal pela administração de inibidores da ECA ou antagonistas da AU II⁷⁴.

Bloqueio da liberação basal de EDNO em leitos vasculares de indivíduos normais -

Em seres humanos saudáveis a administração L-NMMA na artéria braquial causa redução em 50% do fluxo basal do antebraço medido por pletismografia que é revertido pela infusão de L-Arginina. O inibidor da NO sintase atenua também a resposta à infusão de Ach, embora não intervenha sobre a vasodilatação induzida pelo trinitrato de glicerina⁷⁶. Esse estudo confirma, em seres humanos, que a vasoconstrição produzida pelo L-NMMA é devido à inibição da síntese de EDNO mostrando, também, que o análogo estrutural da L-Arginina não tem efeitos constritores ou dilatadores diretos sobre a musculatura lisa. Aponta que no sistema arteriolar do antebraço, o processo é revertido pela infusão de L-arginina, mas não D-arginina, confirmando a especificidade enantiomérica, previamente registrada em tecidos animais e sistemas de células endoteliais cultivadas.

Haveria uma disfunção endotelial na gênese da hipertensão essencial ?

A hipótese de haver atenuação na liberação contínua de EDNO em hipertensos é confirmada por fatos, recentemente demonstrados, de que na hipertensão em humanos e em modelos experimentais existiria um aumento da reatividade vascular, não específica em sua natureza^{77,78}. Por exemplo, a resposta à infusão de Ach em artérias coronárias epicárdicas (fig. 7) reduz significativamente o diâmetro dos vasos de indivíduos hipertensos, mas não de normotensos, revelando que a substância atuaria diretamente sobre a musculatura lisa dessas artérias e que o endotélio das mesmas é funcionalmente incompetente⁷⁹. Esses resultados foram confirmados por Panza e col⁸⁰ que verificaram, em outro leito vascular, o do antebraço, um defeito importante na resposta vasodilatadora à Ach do leito vascular do

antebraço de hipertensos, quando comparado com o de normotensos, traduzido por redução significativa do fluxo sanguíneo e aumento da resistência vascular. Como tal diferença não se mostrasse significativa durante a infusão de nitroprussiato de sódio, que atua sobre a musculatura lisa vascular, via elevação das concentrações de GMPc, os autores admitiram que a resposta inadequada à Ach resultaria da menor quantidade de NO liberada pelas células endoteliais e não de uma resposta menor da musculatura lisa a concentrações normais de fatores vasorelaxadores. Dados obtidos em outro projeto, utilizando agora indivíduos normotensos com história familiar de hipertensão caracterizou, pela primeira vez, que a vasodilatação acetilcolina-dependente estaria afetada nesse grupo, sugerindo que a disfunção endotelial precederia a emergência clínica da hipertensão⁸¹.

Mais recentemente, o grupo de Calver, Callier, Moncada e col⁸², utilizando também pletismografia com oclusão venosa para medir a resistência vascular e o fluxo sanguíneo do antebraço, e L-NMMA e noradrenalina como agentes testadores da função endotelial e da musculatura lisa de hipertensos essenciais e de normotensos, mostraram que a resposta dos parâmetros hemodinâmicos ao L-NMMA e noradrenalina estava alterada em hipertensos, quando comparada a de normotensos. Contudo, a resposta ao L-NMMA, cotejada com a da noradrenalina, foi significativamente menor nos hipertensos. Como o L-NMMA aumenta o tônus vascular por inibição de componente vasodilatador - síntese basal de EDNO, a resposta atenuada ao L-NMMA poderia representar uma anormalidade na vasodilatação óxido nítrico-dependente em vasos de hipertensos essenciais. Esses achados confirmaram observações prévias em que se verificou menor resposta à Ach em animais hipertensos e menor liberação basal de EDNO em vasos de ratos hipertensos.

Os mecanismos intrinsecamente envolvidos nas mudanças do sistema vasodilatador de hipertensos não são plenamente conhecidos, sendo possível que o endotélio libere menor quantidade de EDNO tanto em condições basais como em resposta aos estímulos. Cogita-se, como veremos a seguir, existência de um inibidor endógeno da NO sintase em alguns casos ou modelos de hipertensão humana e experimental.

Os resultados desses trabalhos apontam, também, uma disfunção do endotélio em hipertensos que se traduz por um estado de hipovasodilatação. Disfunção que não é exclusiva da hipertensão, podendo ser encontrada em diabéticos⁸³ e pacientes com hipercolesterolemia⁸⁴. Qualquer que seja a natureza dessa disfunção, o fato é que, pelo menos experimentalmente, a redução de EDNO permite resposta vascular plena aos agentes vasoconstritores⁸⁵, aumenta a agregação⁸⁶ e adesão de plaquetas⁵², produz vasoespasmo, prolifera as células musculares lisas⁸⁷, possibilitando o surgimento da placa de ateroma. Se o fenômeno inicial - atenuação do sistema

vasodilatador EDNO-dependente é causa ou consequência da hipertensão, a resposta permanece ainda incerta. É provável que a vasoconstrição que aparece, secundária à menor liberação ou eficiência do EDNO, possa levar ao fenômeno hipertensivo.

A disfunção endotelial pode ser revertida ? O papel da L-arginina

Admitindo-se que o sistema vasodilatador EDNO-dependente estaria atenuado em alguns hipertensos, a idéia de se prover um excesso de seu substrato específico, a L-arginina, para aumentar a síntese de EDNO seria uma hipótese atraente para restituir o tônus vasodilatador e reduzir, assim, a PA.

Controle da hipertensão essencial pela L-Arginina - Recentemente, em nossos laboratórios, França e col⁸⁸ avaliaram, em voluntários saudáveis e hipertensos leves e moderados, os efeitos da infusão intravenosa de uma solução contendo 30g de monoclóreto de L-Arginina, durante 45min, sobre a PA, frequência cardíaca, fluxo plasmático renal (FPR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fração de filtração (FF), resistência vascular renal (RVR), excreção de sódio (UNaV), fração de excreção de sódio (FENa) e níveis séricos de GMPc. Os resultados, comparados por estudo duplo-cego e cruzado àqueles obtidos com frutose (30g, administrados em solução cujo volume e características físicas foram idênticas aos da L-arginina) e com os do período pré-infusão mostraram, no grupo hipertenso, diminuição significativa da PA sistólica, diastólica e média, enquanto no grupo normotenso a resposta não teve relevância estatística (fig. 8). A L-arginina aumentou os níveis

Tabela III - Efeitos da infusão aguda de frutose e L-arginina na hemodinâmica renal, excreção de sódio e GMPc plasmático em hipertensos (n=15) e normotensos (n=7).

| | Normotensos | | Hipertensos | |
|--------------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | Frutose | L-arginina | Frutose | L-arginina |
| RFG (ml/min/1,73m ²) | 116,84±10,46 | 110,77±5,78 | 125,44±7,39 | 144,78±11,13* |
| FPRE (ml/min/1,73m ²) | 533,41±14,14 | 699,71±78,5 | 457,69±21,80 | 529,29±29,92* |
| RVR (mmHg.min/l) | 6,07±0,21 | 4,64±0,59 | 11,02±0,64 | 8,72±0,53*** |
| FF (%) | 21,83±2,33 | 17,37±2,49 | 28,27±2,12 | 28,57±2,69 |
| Diurese (ml/min) | 9,20±0,81 | 9,0±0,30 | 9,67±0,65 | 10,43±0,61 |
| U _{Na} V (mEq/ml/min) | 0,37±0,05 | 0,42±0,08 | 0,45±0,03 | 0,67±0,06** |
| GMPc (pmol/ml) | 23,81±3,17 | 40,1±4,39*** | 27,99±3,11 | 31,99±4,32 |

RFG- ritmo de filtração glomerular; FPRE- fluxo plasmático renal efetivo; RVR- resistência vascular renal; FF- fração de filtração; U_{Na}V- excreção urinária de sódio. Valores são média± erro padrão da média. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 comparado com frutose.

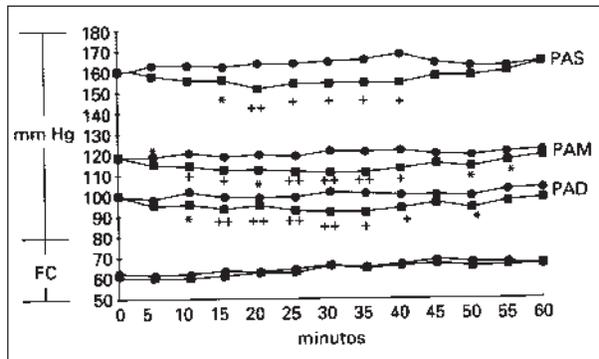


Fig. 8 - Efeitos da infusão aguda de L-arginina (■) e frutose (●) durante 45min sobre a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em 15 hipertensos essenciais. Valores correspondem a média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; + $p < 0,01$; ++ $p < 0,001$ vs frutose.

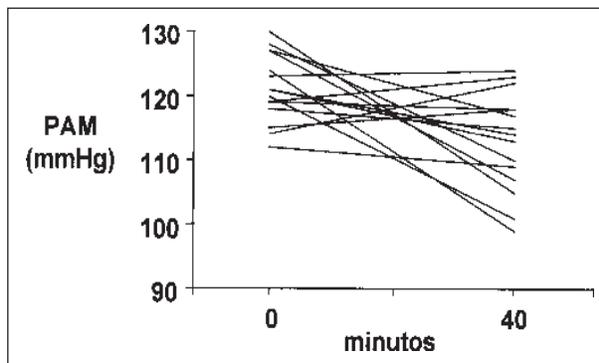


Fig. 9 - Variação individual da pressão arterial média durante a infusão de L-arginina em 15 hipertensos essenciais. O minuto zero (0) corresponde ao período pré-infusão.

plasmáticos de GMPc mais em normotensos (49,7%) que em hipertensos (14,4%). Houve alteamento do FPPE (15,6%), RFG (15,4%) e redução da RVR, enquanto a FF manteve-se estável. O RFG manteve-se inalterado quando se comparou os resultados com os da fase pré-infusão. Em indivíduos normais os efeitos sobre a hemodinâmica renal não foram significantes (tab. III).

A infusão aguda de L-arginina provocou aumento na excreção e fração de excreção de sódio de hipertensos. Contudo, essas mudanças não foram significantes em normotensos.

Ressalte-se, ainda, que a resposta hipotensora foi heterogênea, havendo quatro hipertensos que responderam com elevação e não redução da PA (fig. 9).

Tais achados confirmam os de Nakaki e col⁸⁹ de que a L-arginina, administrada agudamente na veia, controla a PA de hipertensos.

O fato da concentração plasmática de GMPc não ter aumentado significantemente nesses hipertensos não exclui a hipótese que o controle da PA não resulte na maior conversão de L-arginina exógena em EDNO, pois o NO é rapidamente metabolizado e tem direção mais abluminal que via luz dos vasos. Além disso, o EDNO pode ter exercido seu efeito vasodilatador e hipotensor por suas características de agente autócrino e parácrino, sem que seus níveis plasmáticos estivessem alteados.

O aumento da natriurese poderia causar depleção de volume, explicando assim a redução da PA. Contudo, essa possibilidade é improvável pela rapidez da instalação da hipotensão e também pelo pronto retorno dos níveis pressóricos aos valores pré-infusão, quando se interrompeu a administração de L-arginina.

A administração de L-arginina pode ter interferido na síntese de EDNO de hipertensos possivelmente por dois mecanismos. O 1º pela provisão de um excesso de substrato à NO sintase da musculatura lisa vascular que depende de substrato exógeno e é Ca^{2+} -independente. Assim, em situações especiais, tanto o endotélio como o músculo liso vascular expressariam uma segunda NO sintase para a qual um suplemento de L-arginina seria capaz de sintetizar mais EDNO⁹⁰. O 2º mecanismo admite a hipótese de que em alguns tipos de hipertensão, como na hipertensão sódio-sensível, haveria produção inadequada de EDNO⁹¹, seja por defeito no metabolismo e ou na mobilização da L-arginina, seja pela existência de um inibidor endógeno da NO sintase. Em 1992, Vallance e col⁹² descreveram a existência de um desses inibidores, a di-metil-arginina assimétrica (ADMA) cuja concentração no plasma seria detectada em condições de baixo débito urinário como a insuficiência renal. A suposição é de que: 1) esse inibidor, que intervém na via de síntese de EDNO, por competir com o substrato, à semelhança do L-NMMA e L-NAME, participaria da gênese do fenômeno hipertensivo de alguns pacientes e 2) a L-arginina, administrada exogenamente, e em excesso, restabeleceria a síntese de EDNO a níveis basais, o que acabaria por regular a resistência periférica e reduzir a PA.

Em normotensos, a administração de L-arginina aumentou significantemente os níveis plasmáticos de GMPc, mas a PA se reduziu discretamente. Isto, também, ocorreu quando a L-arginina foi infundida a animais saudáveis⁶⁹. A elevação de GMPc registrada em normotensos se explicaria pela maior síntese de EDNO, via NO sintase muscular, graças a maior provisão de seu substrato. Contudo, o ajuste adequado de mecanismos cardiorreguladores da PA impediriam que o parâmetro se alterasse expressivamente nesses indivíduos.

Repercussões da L-arginina na hemodinâmica renal

A infusão de L-arginina aumentou significantemente a natriurese elevando, concomitantemente, o FPR. Esses dados coincidem com resultados experimentais de Baer e col⁹³ que mostraram que a infusão de Ach a cães associou-se ao aumento do FPR, embora o RFG se mantivesse estável e a FF diminuísse. Por sua vez, Tolins e col⁹⁴ mostraram que a vasodilatação renal era devido à maior síntese de EDNO pelo endotélio, o que foi comprovado pelo aumento na excreção urinária de GMPc e pela prevenção desses efeitos hemodinâmicos pelo L-NMMA.

Tabela IV - Fatores que modulam o crescimento das células musculares lisas dos vasos

| Promotores do crescimento | Inibidores do crescimento |
|---|---|
| - Fatores de crescimento derivados de plaquetas AA, AB e BB | - Heparan sulfato |
| - Fatores transformadores do crescimento beta 1 ^o e beta 2 | - Fibronectina |
| - Fator de crescimento insulina-símile I | - Fatores transformadores do crescimento beta 1 ^o e beta 2 |
| - Trombina | - Gama-interferom |
| - Serotonina | - Óxido nítrico |
| - Angiotensina II ^o | - Prostaglandinas |
| - Endotelina | - Peptídeo atrial natriurético |
| - Vasopressina | - Peptídeo natriurético tipo C |
| - Substância P e K | |
| - Leucotrienos | |
| - Tromboxano | |
| - Distensão ou tensão parietal | <i>shear stress</i> |

* mais de uma função como fator de crescimento. Apud Gibbons e Dzau¹⁰².

Em pacientes de nosso estudo a redução da PA acompanhou-se de importante vasodilatação renal e o RFG ou permaneceu inalterado ou se elevou proporcionalmente ao FPR (a FF não se alterou), dependendo se a comparação do parâmetro foi feita com dados da fase pré-infusão ou com os obtidos após a administração de frutose. Tais achados sugerem que o EDNO em hipertensos essenciais modula o tônus de arteríolas glomerulares interferindo, portanto, na autorregulação da pressão do capilar glomerular.

Esses resultados têm contrapartida experimental. Imig e Roman⁹⁵, analisando os efeitos de um potente inibidor da NO sintase, a L-NOARG sobre preparações microvasculares justamedulares perfundidas com salina e albumina, verificaram redução significativa no diâmetro das arteríolas aferentes, em todas as pressões de perfusão estudadas, que foi revertida completamente pela infusão de L-arginina. Os resultados sugerem que o EDNO seria liberado tonicamente sendo um determinante do tônus aferente. A ação mais efetiva do EDNO - L-arginina dependente na musculatura lisa das arteríolas aferentes se justificaria por um defeito local de sua produção.

Outros estudos têm constatado que a inibição da síntese de EDNO atenua a inclinação da curva de relação entre a pressão da artéria renal e excreção de sódio, ainda que a eficiência do mecanismo autorregulador permaneça intacto. Majid e col⁹⁶ demonstraram que a administração de nitro-L-arginina (NLA), por exemplo, aumentou a RVR, diminuiu o FPR e a excreção de sódio, mantendo estável o RFG, numa faixa de pressão de perfusão renal que variou de 75 a 150mmHg. Isso mostra que a eficiência autorreguladora permaneceu intacta embora atenuada. A resposta renal à administração de um doador de EDNO, o S-nitro-n-acetilpenicilamina (SNAP) elevou o FPR, manteve estável o RFG e aumentou a natriurese, embora a inclinação da curva pressão - natriurese permanecesse atenuada. Os resultados indicam que o EDNO deve atuar no

componente autorregulador proporcionalmente, tanto nas resistências pré como pós-glomerular. Os autores ressaltam, ainda, que a resposta natriurética ocorreu na ausência de mudanças da carga de sódio filtrada e sugerem que o EDNO exerce um efeito inibidor direto nos processos de reabsorção tubular de sódio. O EDNO poderia atuar diretamente no transporte de sódio pelo epitélio dos túbulos renais ou quando mudanças da hemodinâmica intra-renal intervissem no processo.

Repercussões da L-Arginina sobre a excreção de sódio em normotensos e hipertensos

Em animais normais o estímulo da síntese de EDNO acompanha-se de franca natriurese enquanto a inibição da NO sintase produz efeito contrário, desde que se mantenha estável a pressão de perfusão renal^{97,98}. Tem-se demonstrado, também, aumento na síntese de NO, durante ingestão elevada de sódio a ratos Sprague-Dawley, resposta aliás adequada para que se excrete mais sódio e se regule a PA⁹⁹. A partir desses fatos vem-se postulando que L-arginina aumentaria a excreção de sódio e controlaria a PA por restaurar convenientemente a resposta pressão-natriurese desses animais.

A administração crônica de excesso de sódio a cães conscientes e que vem recebendo, concomitantemente, um inibidor de síntese de óxido nítrico - L-NAME, causa aumento significativo na PA além de redução na natriurese e diurese. Salazar e col¹⁰⁰ observaram que não se inibindo a NO sintase o incremento de sódio na dieta não eleva, por si só, a PA. Por outro lado, o balanço de sódio acumulado durante o período que durou o protocolo foi significativamente maior no grupo que recebeu o inibidor da NO sintase e a dieta hipersódica, do que nos grupos tratados exclusivamente com dieta hipersódica ou L-NAME. Esses resultados apontam para o comprometimento na excreção de sódio quando o cátionte é ofertado em excesso e a síntese de NO estiver inibida. Sugerem, também, que a hipertensão, secundária em parte ao aumento do líquido extracelular, é uma compensação necessária para manter o balanço de sódio.

Shultz e Tolins⁹⁹ têm proposto que o sistema do EDNO endógeno tem grande importância na adaptação renal ao aumento de sódio na dieta. A hipertensão de ratos Dahl-sódio sensíveis (D-SS) é prevenida completamente pela administração oral ou parenteral de L-arginina mas não D-arginina. A L-arginina além de controlar a HA interviria favoravelmente no rim impedindo o surgimento de nefrosclerose e insuficiência renal nesses animais. Embora não se conheça inteiramente os fenômenos envolvidos na gênese e controle da HA desse modelo genético de hipertensão, vem-se postulando que os ratos D-SS não excretam eficientemente sódio.

Estudos realizados por Chen e Sanders⁹¹ da Universidade de Alabama advogam que haveria um

defeito único nos mecanismos de nitrovasodilatação, que seria revertido pela administração da L-arginina. Acreditam que a L-arginina seria o substrato estéreo-específico de uma NO sintase não constitutiva, mas induzível, e inibida por glicocorticóides, que diferenciariam a fonte predominante de geração de EDNO. A L-arginina infundida endovenosamente a ratos D-SS, em uso de dieta prolongada com 8% de cloreto de sódio, aumentou significativamente a excreção urinária de nitratos reduzindo, simultaneamente, a PA.

Admite-se, também, que uma resposta pressão-natriurese inadequada caracterizaria a HA de ratos D-SS e que a L-arginina corrigiria essa resposta. Patel e col¹⁰¹ mostraram que quando se varia a pressão de perfusão renal numa faixa de 100 a 158 mmHg, a excreção de sódio foi maior no grupo de ratos D-SS que receberam L-arginina, quando comparados aos que receberam apenas veículo. Acabaram afirmando que a administração de L-arginina normalizaria a resposta pressão-natriurese de ratos D-SS e que tal efeito seria justificado por uma melhora da autorregulação do RFG.

Em resumo, pelo que foi exposto pode-se dizer que: 1) a excreção renal de sódio parece ser dependente do EDNO, principalmente durante os períodos de maior ingestão do cationte; 2) a inibição, mesmo discreta da síntese de EDNO acompanha-se de um estado hemodinâmico volume-dependente que se compara aos modelos de hipertensão sódio-sensível; 3) a L-arginina, precursora do EDNO, quando suplementada a animais geneticamente sódio-sensíveis previne o surgimento de HA; 4) o grupo de hipertensos essenciais responde à administração aguda de L-arginina com redução, e muitas vezes, controle da PA; 5) alguns pacientes respondem menos ou mesmo elevam sua PA durante a infusão de aminoácido; essa heterogeneidade de resposta pode indicar que a participação do EDNO, no processo hipertensivo é mais definida em alguns hipertensos que em outros. É possível se especular que hipertensos sódio-sensíveis são os que se beneficiam com a administração de L-arginina. O esclarecimento dessa suposição depende de estudos adicionais.

Endotélio e remodelagem vascular na hipertensão

As alterações estruturais em vasos de hipertensos refletem-se na relação entre a espessura da parede arterial e a amplitude de sua luz, elevando-a. Isto ocorre seja pelo aumento da massa muscular, ou pelo rearranjo de elementos celulares e não celulares. Tal remodelagem depende da interação entre fatores mitogênicos, substâncias vasoativas e estímulos hemodinâmicos. Como sugerem Gibbons e Dzau¹⁰², o endotélio participa ativamente do processo, atuando ora como um sensor de sinais representados por forças mecânicas e substâncias vasoativas, ora como um transdutor desses mesmos estímulos.

Na HA, o aumento de tensão sobre o endotélio promove a síntese de substâncias vasoconstritoras e mito-

gênicas tais como a ET, angiotensina II, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e moduladores da matriz extracelular como o colágeno¹⁰³⁻¹⁰⁵. Admite-se que sejam esses os mecanismos pelos quais a hipertensão promove hipertrofia vascular e surgimento de lesões mioproliferativas¹⁰².

A tabela IV mostra uma lista de fatores que regulam o crescimento vascular, alguns promotores, outros inibidores do crescimento das células musculares lisas. São geralmente substâncias que agem localmente, autócrina ou paracrinamente, e podem ter efeitos adicionais além dos específicos. O PDGF, por exemplo, tem propriedades vasoativas¹⁰⁶ enquanto o fator transformador de crescimento beta 1 pode atuar como agente estimulador ou inibidor da mitogênese dependendo da célula e do meio celular envolvidos^{107,108}. Já a angiotensina II induz a produção de PDGF, TGF-beta 1 e do fator de mitogênese de fibroblastos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Em contrapartida, os vasodilatadores endógenos como o EDNO, a prostaciclina e o peptídeo atrial natriurético inibem o crescimento celular contribuindo, assim, para definir as características estruturais dos vasos sanguíneos.

Vaux, em 1993, sugeriu que o conteúdo da parede vascular pode ser determinado pelo equilíbrio entre o crescimento celular e a morte celular programada ou apoptose¹¹⁰ que, ao contrário da necrose celular da qual participa a resposta inflamatória, é um processo de perda celular altamente seletivo e que tem papel de destaque na remodelagem.

Os vasos de animais e humanos hipertensos caracterizam-se por espessamento da túnica média, redução da luz e aumento da matriz extracelular^{111,112}. Como foi demonstrado por Panza e col⁸⁰ em 1990 e Luscher e col¹¹³ mais recentemente, tais alterações associam-se a disfunção endotelial.

Na hipertensão, as alterações vasculares acompanham-se de aumento na expressão de fatores mitogênicos como o TGF-beta 1¹¹⁴, peptídeos vasoativos como a angiotensina II¹¹⁵, colágeno e elastina¹¹⁶ e proteínases da matriz, como colagenase e elastase¹¹⁷. Esse conjunto de mudanças, que ocorre na intimidade do vaso, acaba predispondo o hipertenso às suas três principais "patologias de efeito": a doença isquêmica miocárdica, o acidente vascular encefálico e a insuficiência renal.

O papel do endotélio nas ações de inibidores de enzima de conversão e antagonistas de cálcio

Inibidores da enzima de conversão - Os efeitos hipotensores dos inibidores da enzima de conversão (ECA) dependem, além de sua intervenção direta sobre a geração de angiotensina II^{118,119}, da não degradação de cininas vasodilatadoras a peptídeos inativos¹²⁰. Contudo, tais efeitos são muito mais complexos e relacionam-se a mecanismos dos quais participa o endotélio.

A administração de L-NMMA a ratos espontaneamente hipertensos atenua o efeito hipotensor agudo induzido pelo captopril ou ramipril, o que indica a contribuição do EDNO na redução da PA mediada por inibidores da ECA¹²¹. Por outro lado, o captopril mostrou-se capaz não apenas de impedir o desenvolvimento de hipertensão crônica produzida pelo L-NAME (fig. 11) como, também, de reverter os níveis elevados de PA induzidos por este tratamento¹²².

Ainda que não se tenha esclarecido completamente como o EDNO contribui para a ação hipotensora dos inibidores da ECA admite-se que a redução da PA e o aumento do fluxo sanguíneo, resultantes do bloqueio da formação de angiotensina II e da não degradação da bradicinina, promoveriam um aumento do *shear stress* sobre o endotélio estimulando a produção de EDNO e aumentando o efeito hipotensor¹²³.

A contribuição do EDNO aos efeitos hipotensores dos inibidores da ECA observa-se, também, quando se utiliza um antagonista de receptores AT₁ da angiotensina II, o losartam¹²¹. Ressalte-se, porém, que esse papel do EDNO não é um fenômeno geral, inespecífico, comum a todos os antihipertensivos. Cachofeiro¹²³ demonstrou que a administração, por exemplo, de L-NMMA a ratos espontaneamente hipertensos não modificou a redução da pressão induzida pelo nitroprussiato de sódio ou pelo prazosin. A elevação dos níveis endógenos de cininas, secundária à presença do inibidor de ECA, mediará a biossíntese de EDNO, já que o peptídeo estimula *in vitro* e *in vivo* a geração de EDNO. Além disso, antagonistas de cininas abolem, *in vitro*, os efeitos do ramipril sobre a produção de EDNO¹²⁴.

Nem todos os inibidores da ECA, porém, intervêm igualmente sobre a síntese de EDNO. O captopril é capaz de relaxar anéis de aorta de coelho pré-contraídos com norepinefrina, desaparecendo, contudo, esse efeito quando se desnuda o vaso. Por sua vez, o enalapril não induz relaxamento vascular na presença ou ausência de endotélio¹²⁵. Já o cilazapril potencializa o relaxamento dependente de endotélio na presença de bradicinina, em artérias femoral e coronária de cães, mas não modifica o relaxamento provocado pela Ach ou trombina¹²⁶.

A presença na molécula de um inibidor da ECA de um grupo sulfidrilo, como é o caso do captopril, parece explicar as diferenças entre os efeitos dos inibidores da ECA sobre o relaxamento induzido por agentes vasodilatadores. Sugere-se que apenas o grupo sulfidrilo potencializaria a síntese de um S-nitrosotiol, precursor lábil do EDNO^{127,128}. Outra possibilidade aventada é de que o grupo sulfidrilo impediria a degradação do EDNO, graças à sua capacidade em eliminar o anion superóxido (O⁻²)^{53,125}.

Antagonistas de cálcio - Alguns antagonistas de cálcio como o verapamil, diltiazem, nifedipina e nicardipina não alteram nem a secreção basal, nem a secreção induzida pela bradicinina ou por estímulos mecânicos de

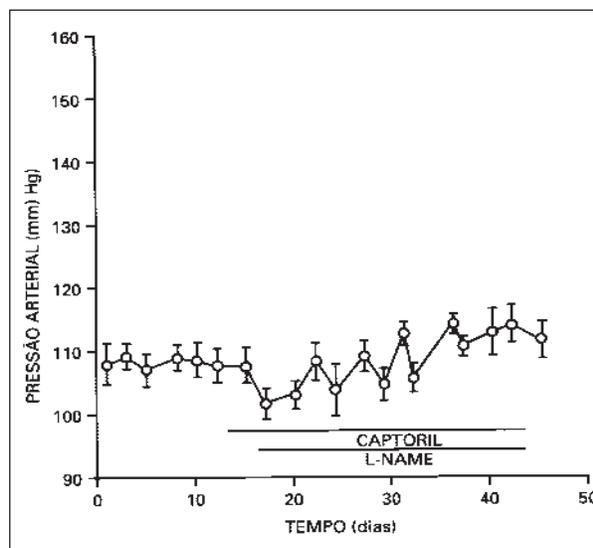


Fig. 10 - Prevenção pelo captopril de aumento significativo na pressão arterial induzido pelo L-NAME em ratos não anestesiados (cada ponto representa a média \pm erro padrão da média; n=16). O L-NAME e o captopril foram administrados conforme indicado pelas barras. Apud Leão MC¹²².

EDNO pelas células endoteliais em cultura^{129,130}, em que pese o aumento do cálcio citosólico ser um passo essencial para a síntese e liberação de NO.

Quando se induz contrações da musculatura lisa de artéria coronária de cães pela 5-hidroxitriptamina, a nisoldipina, um antagonista de cálcio dihidropiridínico, consegue preveni-las. Esse efeito da nisoldipina é maior em presença do endotélio que em sua ausência. Isto sugere a existência, de um provável sinergismo de ação entre o antagonista de cálcio e o EDNO ao nível de canais de cálcio voltagem-sensíveis e receptor-dependentes¹³¹.

Os antagonistas de cálcio modulam as contrações da musculatura lisa vascular desencadeadas por fatores constritores produzidos pelo endotélio. Assim, as contrações de artérias isoladas de cães, secundárias à hipóxia, são inibidas por diversos antagonistas de cálcio, como a flunarizina e o diltiazem^{131,132}. Recentemente, Criscione e col¹³³, estudando a reatividade de leitos vasculares e anéis de aorta de ratos espontaneamente hipertensos e a sensibilidade dessas estruturas aos antagonistas de cálcio, mostraram que tais agentes atenuam as contrações induzidas pela ET. Além disso, os antagonistas de cálcio são capazes de bloquear a síntese de ET induzida pela ciclosporina e, por conseqüência, os efeitos mitogênicos do peptídeo sobre a musculatura do leito vascular³³.

Antagonistas de cálcio x aterogênese - Como já foi mencionado, a disfunção endotelial na hipertensão está associada à remodelagem vascular e à expressão de mediadores dessa remodelagem como fatores mitogênicos da célula muscular lisa, substâncias locais vasoativas, matriz protéica e proteinases. Alterações do endotélio promovem anormalidades na regulação do tônus vascular, no metabolismo de lipídeos, na coagulação do sangue

e na resposta inflamatória e aterogênese^{134,135}. Tem sido descrito, também, que os antagonistas de cálcio, particularmente os dihidropiridínicos, têm um efeito anti-aterogênico¹³⁶.

Em 1993, Ciriaco e col¹³⁷ foram capazes de demonstrar que o tratamento prolongado com isradipina, principalmente quando se empregou doses antihipertensivas, a ratos espontaneamente hipertensos, reverte as alterações estruturais causadas pela hipertensão na morfologia endotelial. Esses efeitos, atribuídos à isradipina, podem explicar, pelo menos em parte, a intervenção do fármaco no processo de aterogênese.

Sinzinger e col¹³⁸ mostraram os efeitos benéficos da isradipina na lesão endotelial experimental caracterizados, principalmente, por redução da entrada de LDL-colesterol e do conteúdo de colesterol na parede da aorta de coelhos hipercolesterolêmicos. Esse efeito parece estar ligado ao papel de potente agente estimulante da PGI₂ da isradipina que deprimiria a liberação do fator de crescimento derivado das plaquetas, e diminuiria esterificações do colesterol, mobilizando-o das células da parede vascular.

Numa revisão de 37 estudos Sugano e col¹³⁹ verificaram que os efeitos anti-aterogênicos dos antagonistas de cálcio (supressão das alterações morfológicas da aterosclerose, principalmente proliferação celular) ocorreram, quando sua administração precedeu ou coincidiu com o início da aterosclerose, sendo ineficaz quando iniciado após o estabelecimento pleno do processo. Há que se considerar, porém, que extrapolar esses achados experimentais às condições humanas é muito difícil.

O sistema fibrinolítico é uma proteção natural contra a trombose. A atividade fibrinolítica tende a se reduzir em hipertensos não tratados¹⁴⁰. Os esquemas antihipertensivos, por sua vez, não deveriam exacerbar essa tendência já que a doença arterial, que acompanha muitos hipertensos, torna-os vulneráveis às complicações tromboembólicas. O propranolol, por exemplo, reduz o AMPc na célula endotelial. Isto pode se repercutir na síntese e liberação do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), reduzindo a atividade fibrinolítica¹⁴¹. A isradipina tem um efeito oposto ao propranolol, aumentando a atividade do t-PA, possivelmente pela sua ação direta sobre o endotélio¹⁴². O possível impacto desse agente antihipertensivo na proteção natural contra a trombose é mais um aspecto importante da interação entre antagonistas de cálcio e endotélio.

Conclusões

O endotélio vascular não é simplesmente um recipiente inerte de sangue. Tem todas as características de uma glândula endócrina e assim deve ser considerado. Sua superfície estende-se sobre um campo de futebol e

seu peso, em indivíduos adultos, alcança 1,5kg. A principal função do endotélio é inibir a adesão e agregação de plaquetas e outras células e manter os vasos dilatados e o fluxo sanguíneo ajustado às necessidades. Esta última função é alcançada graças ao equilíbrio na síntese de substâncias cujos efeitos são funcionalmente opostos e que atuam parácrina ou autocrinamente sobre leitos vasculares regionais.

As ET, um grupo de isopeptídeos, induzem respostas pressoras as mais potentes. Além de sua sustentada ação vasoconstritora, a ET-1 atua sobre a musculatura lisa vascular como importante agente mitogênico. Caracterização da ET como fator circulante na hipertensão, constatação de uma maior expressão genética da ET em seres hipertensos, comprovação de que nas fases iniciais da hipertensão a ET-1 é um fator mitogênico de células musculares lisas e participação do peptídeo em lesões de órgãos-alvo da doença, são pontos que vêm sendo cuidadosamente avaliados. A descoberta de antagonistas de receptores das ET e de inibidores de sua enzima de conversão, alguns efetivos por via oral, poderá trazer, em futuro próximo, contribuição importante para o esclarecimento do papel desses agentes na fisiopatologia da hipertensão.

O EDNO é talvez uma das substâncias, da área biomédica, mais estudada nos últimos anos. Em 1992, a revista Science apontou-o como a molécula do ano.

A caracterização de uma disfunção do endotélio vem sendo descrita como processo endócrino de natureza genética ou adquirida. A hipercolesterolemia familiar e o diabetes são exemplos típicos da primeira condição. Por outro lado, o fumo e a hipercolesterolemia de origem alimentar podem induzir uma disfunção adquirida. A disfunção diminui a geração e ação de mediadores como o EDNO, promovendo perda do tônus vasodilatador e resposta vasoconstritora exagerada ou paradoxal ao estresse físico ou mental.

A HA é, também, um exemplo de disfunção endotelial. No modelo de hipertensão L-NMMA-dependente, a elevação, em 35%, na resistência periférica indica que a geração basal de EDNO tem importante papel no controle do tônus vascular. Em indivíduos normais, o EDNO mantém o sistema arterial em ativo estado de vasodilatação. A HA exteriorizaria um estado de hipovasodilatação, peculiar a alguns modelos experimentais e, possivelmente, a um certo percentual de pacientes hipertensos.

Novas estratégias terapêuticas emergem dos conhecimentos básicos sobre endotélio e EDNO. A L-arginina tem efeitos hipotensores definidos em animais sódio-sensíveis e em um grupo de pacientes com hipertensão leve e moderada. Além disso, tem efeitos natriuréticos e induz significante vasodilatação renal.

Agradecimentos

À Xerox do Brasil.

Referências

1. Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF - Characterization of coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; 248: C555-6.
2. Rubanyi GM, Vanhoutte PM - Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364: 45-56.
3. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al - A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelium cells. *Nature* 1988; 332: 4411-15.
4. Itoh Y, Yanagisawa M, Okhubo S et al - Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identify of human and porcine endothelin. *FEBS Lett* 1988; 231: 440-4.
5. 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: 2863-7.
6. Miller RC, Pelton JT, Huggins JP - Endothelins - from receptors to medicine. *Trends Pharm Sci* 1993; 14: 54-60.
7. Yanagisawa M, Masaki T - Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharm Sci* 1990; 11: 96-9.
8. Hedner T - Endothelin. A bioactive peptide with a role in hypertension? In: Hansson L - Hypertension Annual. London, Current Science 1991; 33-7.
9. Kurihara H, Yoshizumi F, Takaku M et al - Induction of endothelin/gene expression by thrombin and TGF beta. *Circulation* 1988; 78: II-336.
10. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T et al - Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 859-64.
11. Marsden PA, Martin ER, Dorfman T et al - Endothelin: Gene expression, release and action in cultured cells of the renal glomerulus. *Am J Hyperten* 1989; 2: 49A.
12. Yanagisawa M, Inoue A, Takuwa Y et al - The human preendothelin-1 gene: possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13(Suppl 5): S13-S17.
13. Boulanger CM, Lüscher TF - Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85: 587-90.
14. Sajnomaa O, Ristimäki A, Fyhrquist F - Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 514-20.
15. Wright RS, Miller WL, Brandt RR et al - Mechanisms of C-type natriuretic peptide mediated coronary vasodilatation: Roles of nitric oxide and beta-adrenergic systems. *Am J Hypert* 1994; 7: 25A.
16. Ando K, Hirata Y, Schichiri M - Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Lett* 1989; 249: 164-6.
17. Vane JR, Botting R, Masaki T - Endothelin: Workshop held in London 5-6 December 1988. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13(suppl 5).
18. King AJ, Marsden PA, Brenner B - Endothelin: a potent vasoactive peptide of endothelial origin. In: Laragh JH, Brenner BM - Hypertension Pathophysiology, Diagnosis and Management. New York, Raven Press 1990; 649-60.
19. Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC - Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. *J Clin Invest* 1989; 83: 336-42.
20. Brenner BM, Troy JL, Ballermann BJ - Endothelium-dependent vascular responses. *J Clin Invest* 1989; 84: 1373-8.
21. King AJ, Brenner BM, Anderson S - Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J Physiol* 1989; 256: F1051-F8.
22. Miller WL, Redfield MM, Burnett Jr JC - Integrated cardiac, renal and endocrine actions of endothelin. *J Clin Invest* 1989; 83: 317-20.
23. Tagaki M, Matsuoka K, Atarashi K, Yagi S - Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 1164-8.
24. Rae GAM, Trybulec M, De Nucci G, Vane JR - Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13(suppl 5): 589-2.
25. Simonson MS, Wann S, Mené P et al - Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 708-12.
26. Le Monnier de Gouville AC, Mondot S, Lippont H, Hyman A, Cavero I - Hemodynamic and pharmacological evaluation of the vasodilator and vasoconstrictor effects of endothelin-1 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 300-11.
27. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P et al - Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9797-800.
28. Simonson MS, Dunn MJ - Endothelins: A family of regulatory peptides. *Hypertension* 1991; 17: 856-63.
29. Nishimura M, Takahashi H, Matsusawa M et al - Chronic intracerebroventricular infusion of endothelin elevate arterial pressure in rats. *J Hypertens* 1991; 17: S156-S58.
30. Ohara-Imaizumi M, Kumakura K - Dynamics of the secretory response evoked by endothelin-1 in adrenal chromaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: S156-8.
31. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M et al - Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Inter Med* 1991; 114: 213-15.
32. Lüscher RF, Bong-Gwan S, Bühler FR - Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension* 1993; 21: 752-7.
33. Bunchman TE, Brookshire CA - Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; 88: 310-4.
34. Taylor RN, Varma M, Teng NNH, Roberts JM - Women with pre-eclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metabol* 1990; 1675-7.
35. Florijn KW, Derckx FHM, Visser W et al - Elevated plasma level of endothelin pre-eclampsia. *J Hypertens* 1991; 9: S166-7.
36. Nova A, Sibai BM, Barton JR - Maternal plasma level of endothelin is increased in pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 724-7.
37. Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y., Yang Z - Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992; 19: 117-30.
38. Kaufmann H, Oribe E, Oliver JA - Plasma endothelin during upright tilt: Relevance for orthostatic hypotension. *Lancet* 1991; 338: 1542-5.
39. Vanhoutte PM - Is endothelin involved in the pathogenesis of hypertension? *Hypertension* 1993; 21: 747-51.
40. Dubin D, Pratt RE, Cooke JP, Dzau VJ - Endothelin, a potent vasoconstrictor, is a vascular smooth muscle mitogen. *J Vasc Med Biol* 1989; 1: 13-7.
41. Watanabe T, Suyuki N, Shimamoto N et al - Endothelin in myocardial infarction. *Nature* 1990; 344: 114.
42. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P - Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 38-43.
43. Sawamura T, Kasuya Y, Matsushita Y - Phosphoramidon inhibits the intracellular conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 779-84.
44. Webb ML, Dickinson KE, Delaney CL et al - The endothelin receptor antagonist, BQ-123, inhibits angiotensin II-induced contraction in rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 887-92.
45. Krystek SJ, Bassolino DA, Bruccoleri RE et al - Solution conformation of a cyclic pentapeptide endothelin antagonist: Comparison of structures obtained from constrained dynamics and conformational search. *FEBS Lett* 1992; 299: 255-61.
46. Bazil MK, Lappe RW, Webb RL - Pharmacologic characterization of an endothelin (ET_A) receptor antagonist in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: 940-8.
47. Mc Mahon EG, Palomo MA, Moore WM - Phosphoramidon blocks the pressor activity of big endothelin-1 (1-39) and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17(suppl 7): 26-8.
48. Clozel M - Endothelin receptor antagonism: a new therapeutic approach in experimental hypertension. *Am J Hypertens* 1994; 7(4, part 2): 2A.
49. Remuzzi G, Negri M - Endothelin as a key modulator of hypertension and progressive renal injury and novel therapeutic strategies. *Am J Hypertens* 1994; 7(4, part 2): 6A.
50. Furchgott RF, Zawadzki JV - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
51. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S - Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 181-7.
52. Radomski MV, Palmer RMJ, Moncada S - Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2: 1057-8.
53. Palmer RMJ, Ferrig AG, Moncada S - Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
54. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS - Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM. ed - Vasodilation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium. New York, Raven Press 1988; 427-36.
55. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA - Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem*

- Pharmacol 1989; 38: 1709-15.
56. Nathan C - Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FABES J* 1992; 6: 3051-64.
57. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS et al - L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 1251-6.
58. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF et al - A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 418-24.
59. Palmer RMJ, Moncada S - A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 348-52.
60. Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE et al - Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-8.
61. Lyons CR, Orloff GF, Cunningham JM - Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1992; 267: 6370-4.
62. Salter M, Knowles RG, Moncada S - Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1991; 291: 145-9.
63. Lowenstein CJ, Glatt CS, Brecht DS, Snyder SH - Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrast with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6711-5.
64. Busse R, Mülsch A, Fleming I, Hecker M - Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 1993; 87(suppl 5): V-18-25.
65. Katsuki S, Murad F - Regulation of adenosine cyclic 3':5'-monophosphate and guanosine cyclic 3':5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 1977; 13: 330-41.
66. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA - Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 100-42.
67. Gardiner SM, Compton AM, Bennet T, Palmer RMJ, Moncada S - Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N^o-monomethyl-L-arginine or N^o-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 10-2.
68. Moncada S - The first Robert Furchgott Lecture: from endothelium-dependent relaxation the L-arginine: NO pathway. *Blood Vessels* 1990; 27: 208-17.
69. Aisaka K, Gross S, Griffith OW, Levi R - N^o methylarginine 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 Commun* 1989; 160: 881-6.
70. Rees DO, Palmer RMJ, Moncada S - Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-8.
71. Vallance P, Collier J, Moncada S - Nitric oxide synthesized from L-arginine mediates endothelium-dependent dilatation in human veins. *Cardiovasc Res* 1989; 23: 1053-7.
72. Vallance P, Collier J, Moncada S - Endothelium-dependent responses and nitric oxide production in human vasculature in vivo. In: Moncada S, Higgs EA, eds - Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System. Amsterdam, Elsevier 1990.
73. Manning RD Jr, Lufei HU, Mizelle H - Cardiovascular responses to long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension* 1993; 22: 40-8.
74. Ribeiro MD, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R - Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20: 298-303.
75. Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA et al - Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 182: 143-7.
76. Vallance P, Collier J, Moncada S - Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arterial tone in man. *Lancet* 1989; ii: 997-1000.
77. Treasure CB, Mandukian SV, Klein JL et al - Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ Res* 1992; 71: 776-81.
78. Lüscher TF - Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur Heart J* 1992; 13(suppl D): 50-5.
79. Brush JE Jr, Fason DP, Salmon S et al - Abnormal endothelium-dependent coronary vasomotion in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 809-15.
80. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein S - Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-7.
81. Tadei S, Virdis A, Mattei P et al - Endothelium-dependent forearm vasodilatation is reduced in normotensive subjects with a family history of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20(suppl 12): S193-5.
82. Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P - Effects of local intra-arterial n^o-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens* 1992; 10: 1025-31.
83. Vallance P, Calver A, Collier J - The vascular endothelium in diabetes and hypertension. *J Hypertens* 1992; 10(suppl 1): S25-9.
84. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME et al - Impaired vasodilatation of forearm resistance vessels in hypercholesterolaemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86: 228-34.
85. Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D - Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237: 529-38.
86. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S - Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelet. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 181-7.
87. Garg UC, Hassid A - Nitric oxide - generating vasodilators and B-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-7.
88. França MF, Netto FA, Fagundes UGA, Sanjuliani FA, Francischetti EA - Effects of L-arginine on blood pressure, renal hemodynamics and sodium excretion in essential hypertensive patients. *J Hypertens* 1994; 12(suppl 3): S32.
89. Nakaki T, Hishikawa K, Suzuki H et al - L-arginine-induced hypotension (letter). *Lancet* 1990; 336: 696.
90. Kanno K, Hirata Y, Emori T et al - L-arginine infusion induces hypotension and diuresis/natriuresis with concomitant increased urinary excretion of nitrite/nitrate and cyclic GMP in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19: 619-25.
91. Chen PY, Sanders PW - Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertension* 1993; 22: 812-8.
92. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S - Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-5.
93. Baer PG, Navar LG, Guyton AC - Renal autoregulation, filtration rate and electrolyte excretion during vasodilatation. *Am J Physiol* 1970; 219: 619-25.
94. Tolins JP, Palmer RMJ, Moncada S, Raij L - Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am J Physiol* 1990; 258: H655-62.
95. IMIG JD, Roman RJ - Nitric oxide modulates vascular tone in preglomerular arterioles. *Hypertension* 1992; 19: 770-4.
96. Majid DSA, Williams A, Kadowitz PJ, Navar G - Renal responses to intra-arterial administration of nitric oxide donor in dogs. *Hypertension* 1993; 22: 535-41.
97. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F et al - Effects of N^o-nitro-L-arginine methylester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* 1991; 261: F1033-7.
98. Chen C, Mitchell KD, Navar LG - Role of endothelium-derived nitric oxide in the renal hemodynamic response to aminoacid infusion. *Am J Physiol* 1992; 263: R150-6.
99. Javier-Salazar F, Alberola A, Pinilla JM, Carlos Romero J, Quesada T - Salt-induced increase in arterial pressure during nitric oxide synthesis inhibitor. *Hypertension* 1993; 22: 49-55.
100. Shultz PJ, Tolins JP - Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. *J Clin Invest* 1993; 91: 642-50.
101. Patel A, Layne S, Watts D, Kirchner KA - L-arginine administration normalizes pressure natriuresis in hypertensive Dahl rats. *Hypertension* 1993; 22: 863-9.
102. Gibbons GH, Dzau VJ - Mechanisms of disease the emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; 330: 1431-8.
103. Harder DR - Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium. *Circ Res* 1987; 60: 102-7.
104. Tozzi CA, Poiani GJ, Harangozo AM et al - Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium. *J Clin Invest* 1989; 84: 1005-12.
105. Naruse K, Sokabe M - Involvement of stretch-activated ion channels in Ca²⁺ mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; 264: C1037-44.
106. Cunningham LD, Brecher P, Cohen RA - Platelet-derived growth factor receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxation via nitric oxide in rat aorta. *J Clin Invest* 1992; 89: 878-82.
107. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ - Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia autocrine transforming growth factor-β, expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992; 90: 456-61.
108. Bategay EJ, Raines EW, Seifer RA et al - TGF-β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990; 63: 514-24.
109. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ - Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993; 91: 2268-74.
110. Vaux DL - Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 786-9.
111. Mulvany MJ - The structure of the resistance vasculature in essential hyperten-

- sion. *J Hypertens* 1987; 5: 129-36.
112. Baumbach GL, Heistad DD - Remodeling of cerebral arteries in chronic hypertension. *Hypertension* 1989; 13: 968-72.
113. Lüscher TF, Vanhoutte PM, Rajj L - Antihypertensive treatment normalizes decreased endothelium-dependent relaxations in rats with salt-induced hypertension. *Hypertension* 1987; 9(suppl III): III-193-7.
114. Sarzani R, Brecher P, Chobonian HU - Growth factor expression in aorta of normotensive and hypertensive rats. *J Clin Invest* 1989; 83: 1404-8.
115. Morishita R, Higaki J, Mivazaki M, Ogihara T - Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1992; 19(suppl II): 62-7.
116. Iwatsuki K, Cardinale GJ, Spector S, Udenfriend S - Hypertension: increase of collagen biosynthesis in arteries but not in veins. *Science* 1977; 198: 403-5.
117. Yamada E, Hazama F, Amano S et al - Elastase, collagenase and cathepsin D activities in the aorta of spontaneously hypertensive and renal hypertensive rats. *J Biol Chem* 1989; 264: 17445-53.
118. Gavras H, Brunner HR, Laragh JF et al - An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. *N Engl J Med* 1974; 291: 817-21.
119. McAreavey D, Robertson JIS - Angiotensin converting enzyme inhibitors and moderate hypertension. *Drugs* 1990; 40: 326-45.
120. Erdős EG - Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. *Hypertension* 1990; 16: 365-70.
121. Cachofeiro V, Sakakibara T, Nasjletti A - Role of kinin and nitric oxide in the hypotensive effects of captopril and ramiprilat. *Hypertension* 1992; 19: 138-45.
122. Leão MC - Efeito do captopril na hipertensão arterial e na resposta pressora induzida pelo L-NAME (inibidor de síntese de óxido nítrico). Tese. Rio de Janeiro, Instituto de Biologia - UERJ 1993.
123. Cachofeiro V - Fármacos antihipertensivos y endotelio. *Hypertension* 9; 5:221-30.
124. Wiemer G, Scholkens BA, Becker RH, Busse R - Ramiprilat enhances endothelial autocoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension* 1991; 18: 558-63.
125. Goldschmit JE, Tallarida RJ - Pharmacological evidence that captopril possesses an endothelium-mediated component of vasodilation: effect of sulphhydryl groups on endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257: 1136-45.
126. Mombouli JV, Nephtali M, Vanhoutte PM - Effects of the converting enzyme inhibitor cilazaprilat on endothelium-dependent responses. *Hypertension* 1991; 18: 1122-9.
127. Ignarro LJ - Nitric oxide: a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 1990; 16: 477-83.
128. Rubanyi GM, Johns A, Wilcox D et al - Evidence that a S-nitrosothiol, but not nitric oxide, may be identical with endothelium-derived relaxing factor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: S41-5.
129. Mügge A, Peterson T, Harrison DG - Release of nitrogen oxides from cultured bovine aortic endothelial cells is not impaired by calcium channel antagonist. *Circulation* 1991; 83: 1404-9.
130. Ohno M, Ochiai M, Taguchi J et al - Stretch may enhance the release of endothelium-derived relaxing factor in rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 1038-42.
131. Vanhoutte PM - Vascular endothelium and Ca²⁺ antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12: S21-9.
132. Iqbal A, Vanhoutte PM - Flunarizine inhibits endothelium-dependent hypoxic facilitation in canine coronary arteries with intact endothelium. *Br J Pharmacol* 1989; 95: 789-94.
133. Criscione L, Nellis P, Riniker B et al - Reactivity and sensitivity of mesenteric vascular beds and aortic rings of spontaneously hypertensive rats to endothelin: effects of calcium entry blockers. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 31-6.
134. Dzau VJ, Gibbons GH - Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension. *Hypertension* 1991; 18(suppl III): III 115-21.
135. Betz E, Weiss HD, Heinle H, Fotev Z - Calcium antagonists and atherosclerosis. *J Cardiol Pharmacol* 1988; 18(suppl 10): S71-5.
136. Hof RP, Ruegg UT: Calcium antagonists in experimental atherosclerosis. *Am J Hypertens* 1991; 4(suppl): 1075-1135.
137. Ciriaco E, Abbate F, Ferrante F et al - Structural changes in endothelium of femoral artery of spontaneously hypertensive rats: sensitivity to isradipine treatment. *J Hypertens* 1993; 11: 515-22.
138. Sinzinger H, Lupatelli G, Virgolini I et al - Isradipine, a calcium-entry blocker, decreases vascular [¹²⁵I] low-density lipoprotein entry in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 544-50.
139. Sugano M, Nakashima Y, Matsushima T et al - Suppression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by diltiazem injection. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 237-41.
140. Gleerup G, Winther K - Decreased fibrinolytic activity and increased platelet function in hypertension: possible influence of calcium antagonist. *Am J Hypertens* 1991; 4: 1671-85.
141. Winther K - Fibrinolyse und kardioprotektive therapie. *Haemostaseologie* 1988; 8: 100-1.
142. Gleerup G, Hedner T, Hansen Hjorting E, Winther K - Does antihypertensive therapy affect the natural protection against thrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18(suppl 3): S34-6.