

# Endotélio Arterial e Aterotrombogénese

## I - Intervenção do endotélio intacto na homeostasia vascular e sanguínea [80]

J. MARTINS E SILVA, CARLOTA SALDANHA

Unidade de Biopatologia Vascular do Instituto de Medicina Molecular e  
Instituto de Biopatologia Química da Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Rev Port Cardiol 2006; 25 (11): 1061-1083

### RESUMO

O endotélio normal constitui uma barreira física e biológica entre o sangue e a parede vascular, que actua também como sensor e transductor de diversos factores endógenos e exógenos influentes na modulação da circulação sanguínea. A função endotelial em dado indivíduo e momento reflecte o equilíbrio entre factores de risco cardiovascular, predisposição genética e mecanismos vasculo-protectores. Nestes mecanismos tem acção predominante a disponibilidade e actividade do monóxido de óxido (NO) derivado do endotélio. Adicionalmente, outras substâncias vasoactivas sintetizadas na parede vascular e/ou pelos elementos celulares do sangue também afectam o comportamento da interface sangue-endotélio. A vasomotricidade depende do equilíbrio entre substâncias vasodiladoras (em que se destaca a prostaciclina) e vasoconstritores (principalmente a endotelina-I e, também, a angiotensina II). O equilíbrio coagulação-anticoagulação/fibrinólise é também afectado por diversos tipos de proteínas específicas. São analisados os principais mecanismos de acção dos factores indicados, de que depende a fluidez sanguínea em condições normais e na presença de endotélio intacto. É feita referência a potenciais anomalias, a analisar na parte II desta revisão.

#### Palavras-Chave

Endotélio; Monóxido de azoto; Endotelina I, Prostaciclina; Vasomotricidade; Coagulação; Fibrinólise

### ABSTRACT

#### Arterial Endothelium and Atherothrombogenesis

#### I - Intact endothelium in vascular and blood homeostasis

Normal endothelium constitutes a physical and biological barrier between the blood and the vascular wall, and also acts as a sensor and transducer of various endogenous and exogenous factors that modulate the blood circulation. Endothelial activity in a given individual at any particular moment reflects the balance between cardiovascular risk factors, genetic predisposition and vascular protection mechanisms. The availability and activity of endothelium-derived nitric oxide (NO) is a major factor in these mechanisms. Further, vasoactive substances synthesized by the vascular wall and/or by blood cells may affect the behavior of the blood-endothelium interface. Vasomotricity is dependent on the balance between vasodilator substances (particularly prostacyclin) and vasoconstrictor products (mainly endothelin-I and angiotensin II). The coagulation-anticoagulation or fibrinolysis balance is also affected by various different proteins. The mechanisms of these factors, on which blood fluidity depends under normal conditions and with intact endothelium, are discussed, along with mention of potential abnormalities, which will be examined in the second part of this review.

#### Key words

Endothelium; Nitric oxide; Endothelin-I; Prostacyclin; Vasomotricity; Coagulation; Fibrinolysis

Abreviaturas (ou fórmulas químicas) utilizadas no texto (Nomenclatura anglo-saxónica):

- ACE: Angiotensin-converting enzyme
- ADMA: Asymmetric dimethyl arginine
- ADP: Adenosine 5'-diphosphate
- AMPc: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
- Ang II: Angiotensin I
- AT-1: Angiotensin II type (receptors)
- BH4: Tetrahydrobiopterine
- Ca<sup>2+</sup>: Calcium
- CAT-1: cationic amino acid transporter 1 (sistema y+)
- ECE - Endothelin converting enzyme (type 1)
- EDHF: Endothelium derived hyperpolarizing factor
- EDRF: Endothelium derived relaxing factor
- ET-(1, 2 ou 3) (s): Endothelin-(1, 2 ou 3)
- ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>: Endothelin receptor (type A or B)
- FAD: Flavin adenine dinucleotide
- FMN: Flavin mononucleotide
- GMPc: Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate
- LDL (cholesterol) - Low density lipoproteins
- NADP(H): Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
- NO: Nitric oxide (monóxido de azoto);
- N-OH arginine: N-hidroxil-L-arginine
- NOS: Nitric oxide synthase (eNOS: endothelial; nNOS: neuronal; iNOS: induced);
- PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1
- PDGF: Platelet derived growth factor;
- PGH<sub>2</sub>: Prostaglandin H<sub>2</sub>
- PGI<sub>2</sub>: Prostacyclin (Prostaglandin I<sub>2</sub>)
- RNAm: Ribonucleic acid (messenger)
- tPA: Tissue plasminogen activator
- TXA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>
- VEGF: Vascular endothelial growth factor

Abbreviations used in the text:

- ACE: Angiotensin-converting enzyme
- ADMA: Asymmetric dimethylarginine
- ADP: Adenosine 5'-diphosphate
- Ang II: Angiotensin II
- AT-1: Angiotensin II type I(receptors)
- BH<sub>4</sub>: Tetrahydrobiopterin
- Ca<sup>2+</sup>: Calcium
- cAMP: Cyclic adenosine 3',5'- monophosphate
- CAT-1: cationic amino acid transporter 1 (y+ system)
- cGMP: Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate
- ECE: Endothelin-converting enzyme (type 1)
- EDHF: Endothelium-derived hyperpolarizing factor
- EDRF: Endothelium-derived relaxing factor
- ET-(1, 2 or 3): Endothelin-(1, 2 or 3)
- ETA, ETB: Endothelin receptor (type A or B)
- FAD: Flavin adenine dinucleotide
- FMN: Flavin mononucleotide
- LDL (cholesterol): Low-density lipoprotein
- NADP(H): Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
- NO: Nitric oxide
- N-OH arginine: N-hydroxyl-L-arginine
- NOS: Nitric oxide synthase (eNOS: endothelial; nNOS: neuronal; iNOS: induced)
- PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1
- PDGF: Platelet-derived growth factor
- PGH<sub>2</sub>: Prostaglandin H<sub>2</sub>
- PGI<sub>2</sub>: Prostacyclin (Prostaglandin I<sub>2</sub>)
- mRNA: Messenger ribonucleic acid
- tPA: Tissue plasminogen activator
- TXA<sub>2</sub>: Thromboxane A<sub>2</sub>
- VEGF: Vascular endothelial growth factor

## INTRODUÇÃO

Em editorial de 1995, no influente *American Journal of Cardiology*, Franck Sacks<sup>(1)</sup> manifestava a sua perplexidade por a cardiopatia isquémica continuar a aumentar, não obstante verificar-se franca melhoria nos valores da colesterolemia total e da LDL-colesterol, assim como no controlo de outros reconhecidos factores de risco cardiovascular.

Aquela observação sugeria duas possíveis explicações genéricas para o aumento da

## INTRODUCTION

In a 1995 editorial in the *American Journal of Cardiology*, Franck Sacks<sup>(1)</sup> questioned why the incidence of ischemic heart disease was still increasing even though total and LDL cholesterol levels were clearly improving, as was control of other known cardiovascular risk factors.

This fact suggested two possible explanations for the continuing increase in atherosclerotic coronary disease: either the known risk factors were still having harmful effects, despite having

coronariopatia aterosclerótica: (a) ou os factores de risco identificados continuam a exercer efeitos deletérios apesar da sua aparente diminuição ou controlo ou, em alternativa, (b) existem outros mecanismos ou factores de risco a serem valorizados ou a identificar no contexto. Aparentemente, ambas as hipóteses parecem coexistir.

Por sua vez, o cálculo de risco cardiovascular pelo Framingham Coronary Risk Score não tem robustez suficiente para prever entre 30 a 40% de todos os eventos cardiovasculares, ao que acresce uma fracção importante de eventos assintomáticos que estão na posição de risco intermédio<sup>(2)</sup>.

A par das observações que apoiam a influência da hiperlipidemia (secundária a hábitos dietéticos e ou de causa genética) como principal factor patogénico determinante das lesões vasculares ateroscleróticas<sup>(3)</sup>, têm sido indicados outros resultados potencialmente relevantes<sup>(4)</sup>. Designadamente, tem sido demonstrado que os factores de risco cardiovascular mais comuns actuam através da disfunção ou lesão do endotélio<sup>(5-7)</sup>.

A presente revisão é subdividida em duas partes. Nesta primeira parte será dado realce ao endotélio intacto da vasculatura arterial. A estrutura e funcionalidades finais serão relacionadas com a homeostasia vascular e sanguínea, a par com indicações de causas ou mecanismos potencialmente lesivos.

## **ESTRUTURA E FUNÇÕES GERAIS DO ENDOTÉLIO**

### **Disposição e particularidades estruturais**

O sistema circulatório é delimitado internamente por uma monocamada de células endoteliais que reveste todos os vasos sanguíneos e estabelece a continuidade com o endocárdio. A superfície interna dos vasos e endocárdio apoia-se numa fina camada de tecido conjuntivo, que forma a membrana basal. O endotélio e a membrana basal vascular constituem a íntima vascular. Exceptuando os capilares, formados quase unicamente por endotélio e alguns pericitos, todas as artérias possuem uma camada média rica em fibras elásticas e células musculares lisas, e uma camada externa representada pelo tecido

apparently been reduced or controlled, or there were other mechanisms or risk factors still to be identified or recognized as such. It now appears that both hypotheses are true.

Furthermore, the Framingham Coronary Risk Score is not sufficiently reliable to predict 30-40% of cardiovascular events, while there is also a significant number of asymptomatic events that have been categorized as intermediate risk<sup>(2)</sup>.

Along with observations suggesting that hyperlipidemia secondary to diet and/or genetic predisposition is the main factor leading to atherosclerotic vascular lesions<sup>(3)</sup>, other factors have also been shown to be potentially important<sup>(4)</sup>. In particular, it has been demonstrated that the main cardiovascular risk factors are mediated by endothelial dysfunction or damage<sup>(5-7)</sup>.

This review is divided into two parts, the first of which focuses on intact endothelium of the arterial vasculature. Its structure and functions will be described in relation to vascular and blood homeostasis, together with some indications of possible causes and mechanisms of damage.

## **GENERAL STRUCTURE AND FUNCTIONS OF THE ENDOTHELIUM**

### **Disposition and structure**

The circulatory system is bounded internally by a monolayer of endothelial cells that lines all blood vessels and the endocardium. The internal surface adheres to a thin layer of connective tissue, the basement membrane. The endothelium and the basement membrane make up the tunica intima of the vessel. With the exception of capillaries, which are composed almost entirely of endothelium and some pericytes, all arteries also have a tunica media rich in elastic fibers and smooth muscle cells and an external layer, the adventitia, consisting of loose connective tissue.

Given that the vasa vasorum, which cross the adventitia and irrigate the media, also have a lining of endothelium, it could be said that the media, the middle layer of arteries and veins, lies between two active endothelial surfaces, the lumen and the vasa vasorum<sup>(8)</sup>. It can thus be concluded that the nourishment and oxygenation of the vessel wall depend on substances of luminal and contraluminal origin<sup>(9)</sup>.

conjuntivo laxo da adventícia.

Atendendo a que os *vasa vasorum*, que atravessam a adventícia e irrigam a camada média também possuem revestimento endotelial poderá dizer-se que a camada média vascular (de artérias e veias) está interposta entre duas superfícies endoteliais activas, a do lume principal e a dos *vasa vasorum*<sup>(8)</sup>. Daqui se conclui que a nutrição e a oxigenação da parede vascular dependem, conjuntamente, de substâncias com origem luminal e contra-luminal<sup>(9)</sup>.

Até meados dos anos oitenta o endotélio era considerado (quase só) uma barreira (da parede vascular) com funções meramente selectivas<sup>(10)</sup>. Desde então, o interesse pelo endotélio aumentou exponencialmente ao serem identificadas numerosas outras actividades próprias ou em que participa, as quais permitem considerá-lo o maior órgão parácrino do corpo humano<sup>(11,12)</sup>.

O endotélio caracteriza-se por expressar fenotipos diferentes em sectores vasculares distintos ou sujeitos a condições próprias de perfusão<sup>(13,14)</sup>.

O comportamento funcional do endotélio arterial difere marcadamente do venoso\*. Nas artérias, o endotélio está adaptado para responder às características pulsáteis do fluxo sanguíneo e à grandeza das respectivas forças de cisalhamento sobre a parede vascular<sup>(15,16)</sup>. Esta distinção tem particular importância, por exemplo, na escolha entre a veia safena ou a artéria mamária interna para enxertos vasculares em doentes com obstrução das artérias coronárias<sup>(17)</sup>.

O endotélio arterial intacto intervém, designadamente (*Quadro I*), na regulação do tónus vasomotor, inibe a proliferação do músculo liso vascular, inibe a actividade (adesão e agregação) plaquetária, inibe a adesão e migração leucocitárias, inibe a trombogénese, activa a fibrinólise e exerce efeitos anti-oxidantes e anti-inflamatórios; acresce ainda a síntese do colagénio e proteoglicanos da membrana basal, a de citocinas e de diversos factores activadores ou inibidores de crescimento celular<sup>(18)</sup>. Fundamentalmente, o endotélio normal constitui uma superfície com características não trombogénicas pela quais interage de modo

Until the mid-1980s, the endothelium was thought of merely as a barrier, part of the vascular wall, and its functions as purely selective<sup>(10)</sup>. Since then, however, interest in the endothelium has increased greatly, as more is discovered of its actions and the part it plays in other functions, to the point where it has been called the largest paracrine organ in the human body<sup>(11,12)</sup>.

Different phenotypes of endothelium are expressed in different parts of the vascular system or under different perfusion conditions<sup>(13,14)</sup>.

Functionally, arterial endothelium is markedly different from venous endothelium\*. In arteries, the endothelium is adapted to respond to the pulsatile characteristics of the blood flow and the magnitude of the resulting shear stresses on the vascular wall<sup>(15,16)</sup>. This difference is important when it comes to choosing between the saphenous vein or the internal mammary artery for grafting in patients with obstructed coronary arteries<sup>(17)</sup>.

The main functions of intact arterial endothelium (*Table I*) include regulation of vasomotor tone; inhibition of smooth vascular muscle proliferation, platelet adhesion and aggregation, leukocyte adhesion and migration, and thrombogenesis; activation of fibrinolysis; and antioxidant and anti-inflammatory action. It also synthesizes the collagen and proteoglycans of the basement membrane, cytokines, and various cell growth factors, both activators and inhibitors<sup>(18)</sup>. Basically, normal endothelium is a non-thrombogenic surface that interacts reciprocally with the contents of the compartments it bounds, both intra- and extracellular, with local and distant effects<sup>(11)</sup>.

There is a surprising degree of regional variation in some of these functions, such as biosynthesis of particular substances, permeability to macromolecules, and the response to different stimuli<sup>(19)</sup>. This heterogeneity, which is found in health and disease<sup>(20)</sup>, tends to increase with age, particularly in the resistance arteries and arterioles of muscles with greater oxidative activity<sup>(21)</sup>.

At the root of this diversity of functions and effects lie microenvironmental factors such as cardiovascular risk factors, as well as epigenetic,

\* No presente texto serão referidas somente as características e propriedades do endotélio arterial.

\* This review only deals with the characteristics and properties of arterial endothelium.

recíproco com o conteúdo dos compartimentos que delimita (intra- e extracelulares), originando repercussões locais e ou à distância<sup>(11)</sup>.

#### Quadro I

##### Principais funções e ou efeitos do endotélio intacto e normal

- Barreira física semipermeável.
- Controlo do tónus arterial.
- Efeitos anticoagulantes e profibrinolíticos.
- Manutenção da fluidez sanguínea.
- Inibição da adesão e agregação plaquetárias.
- Inibição da adesão e migração leucocitárias.
- Inibição da proliferação e migração do músculo liso vascular.
- Efeitos anti-inflamatórios.
- Efeitos anti-oxidantes.
- Formação e manutenção do colagénio e proteoglicanos da membrana basal em que assenta a camada endotelial.
- Formação e secreção de citocinas e de outras moléculas inibidoras e estimuladoras do crescimento celular.

É de notar a variação regional de algumas daquelas funções, como a biossíntese de substâncias específicas, a permeabilidade a macromoléculas e a resposta a diversos tipos de estímulo<sup>(19)</sup>. Esta heterogeneidade, que se verifica tanto na saúde como na doença<sup>(20)</sup>, tende a acentuar-se com o envelhecimento, em particular nas artérias de resistência e arteríolas de músculos com maior actividade oxidativa<sup>(21)</sup>.

Na origem da referida diversidade endotelial (de funções e ou efeitos) intervêm factores micro-ambientais (p.ex., factores de risco cardiovascular), epigenéticos, bioquímicos e biomecânicos, pelos quais as células endoteliais detectam constantemente uma grande variedade de sinais extracelulares, luminiais (emanados do fluxo sanguíneo e seus constituintes), provenientes da superfície contraluminal (e das restantes camadas da parede vascular e tecidos adjacentes) ou dos espaços inter-endoteliais<sup>(21, 22)</sup>.

A transdução intracelular daqueles sinais inclui receptores membranares, vias metabólicas próprias e o mecanismos de expressão genética. O fenotipo da resposta aos estímulos traduz-se na modificação do comportamento celular (p.ex., forma, proliferação, migração, equilíbrio vasomotor, equilíbrio hemostasiológico, apoptose, entre outros), que pode variar com o sector vascular afectado e o ritmo

biochemical and biomechanical elements, with the result that the endothelium receives a constant stream of signals, which can be extracellular, luminal (from the blood flow and its constituents), contraluminal, or from the other layers of the vessel wall and adjacent tissues, and from interendothelial spaces<sup>(21, 22)</sup>.

#### Table I

##### Main functions and effects of normal intact endothelium

- Semipermeable physical barrier
- Control of arterial tone
- Anticoagulant and profibrinolytic effects
- Maintenance of blood fluidity
- Inhibition of platelet adhesion and aggregation
- Inhibition of leukocyte adhesion and aggregation
- Inhibition of vascular smooth muscle proliferation and migration
- Anti-inflammatory effects
- Antioxidant effects
- Formation and maintenance of collagen and proteoglycans in the basement membrane to which the endothelium adheres
- Formation and secretion of cytokines and other molecules that inhibit or stimulate cell growth.

Intracellular transduction of these signals involves membrane receptors, specific metabolic pathways and the mechanisms of gene expression. The phenotype of the response to stimuli is reflected in modification of cell behavior (such as shape, proliferation, migration, vasomotor balance, hemostasis, or apoptosis), which can vary according to the vascular sector affected and the organism's functional rhythm<sup>(22)</sup>.

Aging and other pathophysiologic factors alter endothelial morphology to a greater or lesser extent, and this affects vascular function. Age-related changes, which are independent of known risk factors, probably result from chronobiologic deregulation of various mechanisms that act on the endothelium<sup>(23)</sup>.

The discovery that the endothelial surface, in both its normal and pathologic states, has direct effects on biochemical reactions in blood constituents<sup>(24)</sup>, and the fact that the endothelium's functions are dynamically modulated by blood flow and the vascular wall<sup>(13, 25, 26)</sup>, together led to a great advance in understanding, supporting the idea that the blood and the endothelium constitute an

funcional do organismo<sup>(22)</sup>.

O envelhecimento e diversos factores fisiopatológicos tendem a alterar a morfologia endotelial de modo mais ou menos acentuado, com naturais repercussões nas funções vasculares. As modificações decorrentes do envelhecimento são independentes dos factores de risco conhecidos, resultando provavelmente da desregulação cronobiológica de diversos mecanismos com acção no endotélio<sup>(23)</sup>.

A demonstração de que a superfície endotelial intervém activamente (no estado normal ou alterado) em reacções bioquímicas dos constituintes sanguíneos<sup>(24)</sup>, e o facto de que as funções endoteliais estão sujeitas à modulação dinâmica emanada do fluxo de perfusão ou da parede vascular<sup>(13, 25, 26)</sup>, representaram um grande avanço conceptual, a justificar a proposta de que o sangue e o endotélio constituiriam um órgão interactivo<sup>(27)</sup>. Por conseguinte, o endotélio normal actuará como indutor ou sensor de estímulos (locais e sistémicos) que possam alterar a sua funcionalidade, a da parede vascular e ou tecidos envolventes, e a dos constituintes do sangue, a partir dos quais desencadeará respostas adaptativas que tendam a restabelecer a normalidade.

No seu conjunto, a organização e disposição do endotélio como interface sangue-parede vascular, assim como a sua intervenção dinâmica e especializada (sectorial), teriam implicações manifestas quer no funcionamento normal quer na resposta endotelial a estímulos fisiopatológicos<sup>(14, 20, 28)</sup>.

O equilíbrio existente, em condições normais, entre os factores sintetizados pelo endotélio que modulam a hemostasiologia (pró-trombogénicos e anti-trombogénicos) e o tónus vascular (vasodilatadores e vasoconstrictores) (*Quadro II*) é determinante para a fluidez sanguínea e perfusão regular dos vasos<sup>(11)</sup>.

*Quadro II*

**Principais factores sintetizados no endotélio, que intervêm no tónus vascular e equilíbrio hemostasiológico.**

Vasodilatadores	Vasoconstrictores
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monóxido de azoto</li> <li>• Prostaciclina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotelina-1</li> <li>• Angiotensina II</li> <li>• Factor de crescimento derivado das plaquetas</li> </ul>

interactive organ<sup>(27)</sup>. Thus, normal endothelium induces or senses local and systemic stimuli that can alter its functions and those of the vessel wall, the surrounding tissues, and blood constituents, triggering adaptive responses to restore normality.

Taken together, the organization and disposition of the endothelium as the blood/vessel wall interface, as well as its dynamic and specialized actions in different sectors, have clear implications both for normal functioning and for endothelial responses to pathophysiological stimuli<sup>(14, 20, 28)</sup>.

The balance under normal conditions between endothelium-derived prothrombotic and antithrombotic factors that modulate hemostasis and vasodilators and vasoconstrictors that regulate vascular tone (*Table II*) determines blood fluidity and normal perfusion<sup>(11)</sup>.

*Table II*  
**Main factors synthesized in the endothelium that affect vascular tone and hemostasis.**

Vasodilators	Vasoconstrictors
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nitric oxide</li> <li>• Prostacyclin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endothelin-1</li> <li>• Angiotensin II</li> <li>• Platelet-derived growth factor</li> </ul>
Antithrombotic	Prothrombotic
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostacyclin</li> <li>• Thrombomodulin</li> <li>• Tissue plasminogen activator</li> <li>• Urokinase</li> <li>• Heparin-type molecules</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Platelet activating factor</li> <li>• Tissue factor</li> <li>• von Willebrand factor</li> <li>• Plasminogen activator inhibitor</li> <li>• Other coagulation factors</li> </ul>

**Effects on hemostasis**

As a result of this prothrombotic and antithrombotic balance, the blood does not coagulate inside vessels so long as the endothelium's integrity and function are maintained. The lack of thrombogenicity is due to various factors synthesized by the vessel wall and particularly by the endothelium. Among them are prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), a metabolite of arachidonate from the endothelial cytoplasmic membrane. PGI<sub>2</sub> is a powerful inhibitor of platelet aggregation and also has vasodilatory effects<sup>(29, 30)</sup>. A significant number of anticoagulation mechanisms, such as thrombin-antithrombin complexes, protein C, thrombomodulin and tPA, are based in or



Antitrombóticos	Protrombóticos
<ul style="list-style-type: none"><li>• Prostaciclina</li><li>• Trombomodulina</li><li>• Activador tecidual do plasminogénio</li><li>• Urocinase</li><li>• Moléculas do tipo - heparina</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Factor activador das plaquetas</li><li>• Factor tecidual</li><li>• Factor von Willebrand</li><li>• Inibidor do activador do plasminogénio</li><li>• Outros factores da coagulação</li></ul>

### Efeitos na hemostasiologia

Devido aquele balanço protrombótico-antitrombótico o sangue não coagula no interior dos vasos desde que o endotélio permaneça íntegro e funcional. Esta ausência de trombogenicidade resulta de diversos factores sintetizados pela parede vascular e, em especial, pelo endotélio. Entre outros, destaca-se a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que é um metabolito derivado do araquidonato da membrana citoplásmica endotelial. A PGI<sub>2</sub> é um potente inibidor da agregação plaquetária e possui também acção vasodilatadora<sup>(29, 30)</sup>. Uma parte importante dos mecanismos de anticoagulação (p.ex., os complexos trombina-antitrombina, proteína C, trombomodulina, tPA e outros), estão sedeados ou dependentes do endotélio<sup>(24, 31)</sup>.

Através daqueles processos o endotélio assegura que o sangue permaneça fluido e circule em condições fisiológicas ou, em alternativa, tem a capacidade de intervir em situações patológicas decorrentes com hemorragia ou trombose, restabelecendo a normalidade quando possível. O mesmo tipo de resposta compensadora, mediada por transdução mecânica endotelial, parece intervir na presença de alterações da viscosidade sanguínea e plasmática<sup>(32)</sup>.

A contrabalançar os mecanismos anti-trombóticos, o endotélio sintetiza também factores protrombóticos<sup>(33)</sup> além de participar activamente nos mecanismos de coagulação sanguínea. Entre outros, destacam-se alguns factores que promovem a agregação plaquetária (p.ex., factor von Willebrand, fibronectina, trombospondina) ou a coagulação (p.ex., o factor V e o factor tecidual). Adicionalmente, o endotélio é um dos tipos celulares que sintetiza o inibidor do activador do plasminogénio (PAI-1), o qual é um dos principais inibidores endógenos

dependent on the endothelium<sup>(24, 31)</sup>.

By means of these processes, the endothelium is responsible for ensuring that the blood remains fluid and circulates in physiologic conditions, and can also intervene in pathologic situations arising from hemorrhage or thrombosis to restore normality whenever possible. The same types of compensatory response mediated by endothelial mechanotransduction appear to occur in cases of alterations in blood and plasma viscosity<sup>(32)</sup>.

As a counterbalance to these antithrombotic mechanisms, the endothelium also produces prothrombotic factors<sup>(33)</sup> and plays an active part in blood-clotting mechanisms. These factors include those that promote platelet aggregation (such as von Willebrand factor, fibronectin, and thrombospondin) and coagulation (such as factor V and tissue factor). In addition, endothelial cells are among those that synthesize plasminogen activator inhibitor (PAI-1), which is one of the main endogenous inhibitors of fibrinolysis and is considered to be a cardiovascular risk factor<sup>(34)</sup>.

### Effects on vasomotricity

Vasomotor tone in resting animals<sup>(35)</sup> and humans<sup>(36)</sup> depends on the partial vascular constriction that is associated with sympathetic innervation. Vascular smooth muscle is also affected by myogenic, hormonal and metabolic control mechanisms and various physical stimuli<sup>(37)</sup>, but there is still debate as to whether vasodilatory innervation exists in primates<sup>(38, 39)</sup>. While the presence of cholinergic sympathetic fibers has been histologically demonstrated in the muscles of animals, this has not been confirmed in humans, although peripheral vasodilation has been observed following surgical sympathectomy<sup>(40)</sup>.

Vascular smooth muscle in resistance vessels is particularly sensitive to vasodilation of metabolic origin induced by metabolites produced by the endothelium and leading to increased compensatory local perfusion<sup>(37, 41, 42)</sup>. Most of the vasodilatory response in humans attributed to sympathetic innervation may in fact result from secretion of nitric oxide (NO) stimulated by the endothelium through the local action of epinephrine or cholinergic mechanisms<sup>(40)</sup>.

The discovery and characterization of the first endothelial substances with vasodilatory action - endothelium-derived relaxing factor (EDRF)<sup>(38)</sup>

da fibrinólise e, também, considerado um potencial factor de risco cardiovascular<sup>(34)</sup>.

### Efeitos na vasomotricidade

O tónus vasomotor depende, em animais<sup>(35)</sup> e humanos<sup>(36)</sup> em repouso, do estado de constricção vascular parcial que se associa à inervação simpática. Adicionalmente, o músculo liso vascular é também afectado por mecanismos de controlo miogénico, hormonal, metabólico e estímulos físicos diversos<sup>(37)</sup>, sendo controversa a existência de inervação vasodilatadora nos primatas<sup>(38, 39)</sup>. Enquanto nos músculos dos animais foi demonstrada (histologicamente) a existência de fibras simpáticas colinérgicas com acção vasodilatadora, o mesmo ainda não foi comprovado no homem, não obstante verificar-se vasodilatação periférica pós-simpactectomia cirúrgica<sup>(40)</sup>.

O músculo liso vascular dos vasos de resistência é particularmente sensível à vasodilatação de origem metabólica, induzida por metabolitos sintetizados pelo endotélio, de que depende o aumento da perfusão sanguínea local compensadora<sup>(37, 41, 42)</sup>. Eventualmente, a generalidade da resposta vasodilatadora atribuída à inervação simpática no homem resultará, na generalidade, da estimulação da secreção de monóxido de azoto (NO) pelo endotélio por acção local da epinefrina ou de mecanismos colinérgicos<sup>(40)</sup>.

A descoberta e caracterização das primeiras substâncias endoteliais com acção vasodilatadora - o factor relaxante derivado do endotélio (EDRF)<sup>(38)</sup> e o factor hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)<sup>(43)</sup> - foi seguida pela identificação do vasoconstrictor endógeno mais potente então conhecido, a endotelina-1 (ET-1)<sup>(44)</sup>.

A acetilcolina, a bradicinina e a serotonina estão entre os activadores da vasodilatação cuja acção é mediada por receptores da membrana citoplasmática (*Fig. 1*) em artérias com endotélio intacto e funcionalmente normais<sup>(45)</sup>. A acetilcolina e a bradicina também exercem uma acção cardioprotectora, que simula o pré-condicionamento à isquémia e aumenta a resistência do miocárdio<sup>(46)</sup>.

A acção moduladora do endotélio nos mecanismos da vasomotricidade constitui uma das grandes descobertas científicas que, como muitas outras, se deveram ao acaso mas que

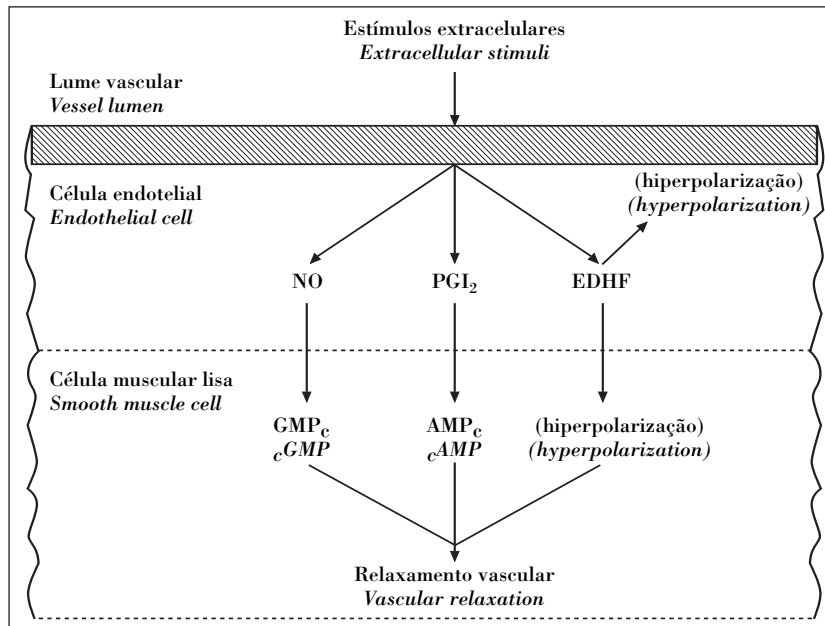
and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)<sup>(43)</sup> - was followed by identification of the most powerful endogenous vasoconstrictor then known, endothelin-1 (ET-1)<sup>(44)</sup>.

Acetylcholine, bradykinin and serotonin are examples of vasodilatory activators whose action is mediated by receptors in the cytoplasmic membrane (*Fig. 1*) in arteries with intact endothelium and normal function<sup>(45)</sup>. Acetylcholine and bradykinin also have cardioprotective properties, simulating ischemic preconditioning and increasing myocardial resistance<sup>(46)</sup>.

The discovery of the endothelium's role in modulating vasomotricity, although (like many other great scientific discoveries) the result of chance, is still worth recalling. The powerful vasodilator effect produced by acetylcholine *in vitro* in preparations of rabbit thoracic aorta was already known and had been confirmed in other vessels. In one experiment, however, this vasodilation was consistently replaced by intense vasoconstriction. The experiment was repeated with increasing concentrations, much higher than the levels that would have triggered vasodilation. The vasoconstriction was maintained, however, mediated by muscarinic receptors<sup>(43)</sup>. Various possible explanations for this discrepancy were explored until it was shown that the loss of vasorelaxation with acetylcholine was due to the unintentional removal of the internal surface of the vessel, which had been scraped away as part of the procedure for preparing the sample. The response to acetylcholine was then systematically studied in vessels with and without endothelium. In those with intact endothelium, there was vasorelaxation, while vasoconstriction occurred in vessels without endothelium.

Acetylcholine can thus induce relaxation or contraction in vascular smooth muscle depending on the presence or absence of endothelium, and on the type of signal transduction<sup>(43)</sup>. While vasodilation is associated with NO formation followed by increased cGMP, vasoconstriction as induced by serotonin, is triggered by activation of cyclooxygenase, and subsequent production of thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) and prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)<sup>(30)</sup>. Binding of these two eicosanoids to thromboxane-specific receptors triggers contraction of vascular smooth muscle. Similarly, binding to the same type of receptors in platelets increases platelet adhesion and aggregation.





**Figura 1.** Indução do relaxamento vascular por estimulação do endotélio intacto. Em condições basais de fluxo sanguíneo, o tónus vascular é modulado por diversos estímulos físicos (p.ex., tensão de cisalhamento laminar, fluxo pulsátil, hipóxia) e químicos (p.ex., neurotransmissores, hormonas ou outros compostos em circulação), de que resulta habitualmente uma resposta vasodilatadora ou de constrição atenuada. Aqueles estímulos, ao actuarem na superfície luminal das células endoteliais, induzem a secreção basal de três tipos principais de substâncias: NO (monóxido de azoto). PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e EDHF (factor hiperpolarizante). Este último pode ser gerado, por vezes, por estímulos que também desencadeiam a síntese de NO. Além de provocar a hiperpolarização da membrana citoplasmática, activando o efluxo de K<sup>+</sup> e a bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, o EDHF também origina o relaxamento da camada do músculo liso vascular. O NO e a PGI<sub>2</sub> são secretados na direcção luminal e contra-luminal pelo que, além de induzirem o relaxamento vascular, também inibem a activação e agregação plaquetárias. A acção vasodilatadora NO-dependente é potenciada pela acção inibidora que exerce sobre a libertação da norepinefrina das extremidade nervosas na parede vascular, de que resulta a redução do tónus simpático vascular. A nível da camada do músculo liso vascular, o NO activa a guanilato ciclase, com o aumento da concentração local de GMP<sub>c</sub>, enquanto a PGI<sub>2</sub>, ao actuar sobre a adenilato ciclase, aumenta a formação de AMP<sub>c</sub>.

**Figure 1.** Induction of vascular relaxation through stimulation by intact endothelium. Under normal blood flow conditions, vascular tone is modulated by various stimuli, some physical (laminar shear stress, pulsatile flow, or hypoxia) and some chemical (neurotransmitters, hormones and other circulating compounds). These normally lead to vasodilation or slight vasoconstriction. Acting on the luminal surface of endothelial cells, these stimuli induce baseline secretion of three main substances: NO, PGI<sub>2</sub> and EDHF. The latter may be produced by stimuli that also trigger NO synthesis. As well as causing hyperpolarization of the cytoplasmic membrane, activating K<sup>+</sup> outflow and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump, EDHF also induces relaxation of vascular smooth muscle. NO and PGI<sub>2</sub> are secreted both lumenally and contraluminally, so that they inhibit platelet activation and aggregation as well as causing vascular relaxation. NO-dependent vasodilation is strengthened by its inhibitory effect on norepinephrine release at nerve endings in the vessel wall, resulting in reduced vascular sympathetic tone. In vascular smooth muscle, NO activates guanylate cyclase, with increased local concentrations of cGMP, while PGI<sub>2</sub>, by acting on adenylate cyclase, increases cAMP formation.

continua a ser interessante recordar. Assim, era já conhecido o forte efeito vasodilatador que a acetilcolina produzia *in vitro* em preparações de aorta torácica de coelhos, e que já havia sido verificada em outros vasos sanguíneos. Em determinada experiência foi constatado que a resposta vasodilatadora era sistematicamente substituída por intensa vasoconstrição. O ensaio foi repetido utilizando uma escala progressiva de concentrações muito superiores às que deveriam desencadear a vasodilatação. Todavia a vasoconstrição manteve-se, mediada pelo receptor muscarínico<sup>(43)</sup>. Perante aquela discrepância foram analisadas todas as hipóteses

Vasoconstrictors derived from membrane arachidonic acid thus tend to oppose the effects of NO and PGI-2 in both platelets and endothelium<sup>(41, 47)</sup>.

It has now been confirmed that acetylcholine-induced vasorelaxation and vasoconstriction are mediated by five subtypes of muscarinic receptors (M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>), the M<sub>3</sub> subtype being the most common in human endothelial and vascular smooth muscle cells, while M<sub>4</sub> appears to exist only in other species<sup>(48)</sup>.

que se afiguravam mais adequadas para uma explicação. Por fim, ficou demonstrado que a perda de vasorrelaxamento à acetilcolina resultara da remoção *não intencional* da superfície interna vascular que, durante o procedimento técnico da preparação da amostra, havia sido raspada. A resposta à acetilcolina foi então (intencionalmente) estudada em vasos com e sem endotélio. Nos vasos com endotélio intacto havia vasorrelaxamento, nos vasos sem endotélio observava-se vasoconstrição.

A acetilcolina pode induzir relaxamento ou contracção do músculo liso vascular consoante existir ou não endotélio, dependendo também do tipo de transdução de sinal<sup>(43)</sup>. Enquanto a vasodilatação está associada à formação de NO e subsequente aumento do GMP<sub>c</sub>, a vasoconstrição é accionada (tal como para a serotonina) pela activação da ciclooxigenase, com subsequente síntese de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)<sup>(30)</sup>. A união destes dois eicosanoides aos receptores específicos do tromboxano activa a contracção do músculo liso vascular. Igualmente, a sua fixação ao mesmo tipo de receptores nas plaquetas aumenta a adesão e agregação plaquetárias. Deste modo, os mediadores da vasoconstrição derivados do ácido araquidónico membranar tendem a opor-se ao efeito do NO e PGI-2, quer nas plaquetas quer no endotélio<sup>(41, 47)</sup>.

Está actualmente confirmado que o vasorrelaxamento ou vasoconstrição, induzidos pela acetilcolina, são mediados por cinco subtipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>), sendo o subtipo M<sub>3</sub> prevalente nas células endoteliais e do músculo liso vascular do homem, enquanto o M<sub>2</sub> parece existir somente noutras espécies<sup>(48)</sup>.

### **Substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio**

Ao fim de algum tempo de polémica, veio a ser confirmado que o EDRF era sinónimo de um nitrovasodilatador endógeno secretado pelas células endoteliais sob a forma de gás, o monóxido de azoto (NO), que actuará por um mecanismo receptor-independente<sup>(49)</sup>.

A síntese e secreção do NO ocorrem em condições basais e em resposta a diversos estímulos vasoactivos, tais como a tensão de cisalhamento de parede, factores derivados das plaquetas e hormonas. O NO, outras

### **Vasodilator substances produced by the endothelium**

After a period of disagreement, it was finally confirmed that EDRF was in fact an endogenous nitrovasodilator secreted by endothelial cells in the form of a gas, nitric oxide, which acts by a receptor-independent mechanism<sup>(49)</sup>.

NO is synthesized and secreted under normal conditions and as a response to various vasoactive stimuli, such as wall shear stress, platelet-derived factors and hormones. NO, related substances and PGI<sub>2</sub> make up a group of endogenous compounds with antihypertensive action arising from the peripheral vasodilation that they induce<sup>(25, 26, 42)</sup>.

As explained above, the endothelium has a fundamental role in regulating vascular tone. Under normal conditions, it induces relaxation of vascular smooth muscle being stimulated by factors such as mechanical stress, hormones, neurotransmitters, platelets and platelet-derived products, or coagulation proteins. This response is mediated by NO<sup>(43, 49)</sup>, which is synthesized by the enzyme NO synthase (eNOS) from L-arginine by oxidation of the appropriate N-terminal guanidine group (*Fig. 2a*). eNOS is coded by the *NOS S3* gene<sup>(50)</sup>.

NO is the main endothelium-dependent vasodilation effector induced by shear stress in perfusion blood flow in small and large arteries<sup>(51)</sup>. In intact endothelium, NO-induced relaxation depends on the formation of a particular nucleotide, cyclic guanosine monophosphate (cGMP), and on reduced intracellular calcium levels in vascular smooth muscle cells<sup>(52)</sup>.

In addition, NO has a cytoprotective effect at the vascular level<sup>(14, 53)</sup>, by inhibiting platelet adhesion and aggregation<sup>(54)</sup>, leukocyte adhesion and migration<sup>(55)</sup>, expression of tissue factor<sup>(56)</sup>, inflammation<sup>(57)</sup>, and proliferation of vascular smooth muscle<sup>(58)</sup>. NO is also an important mediator of blood and vascular homeostasis<sup>(59)</sup>. Its absence leads to vasoconstriction, platelet aggregation, proliferation of vascular smooth muscle and leukocyte adhesion<sup>(11, 60, 61)</sup>, which in turn cause endothelial dysfunction and trigger various cardiovascular diseases<sup>(5, 28, 62, 63)</sup>.

NO synthesis is one of arginine's metabolic options (*Fig. 2b*); others include the urea cycle and conversion into proline or glutamine/glutamate or creatine and its derivatives<sup>(64, 65)</sup>. The NO synthesis pathway is complex and is

substâncias afins e ainda a PGI<sub>2</sub> constituem um grupo de compostos endógenos com acção anti-hipertensiva, pela vasodilatação periférica que induzem<sup>(25, 26, 42)</sup>.

De acordo com o exposto, o endotélio desempenha uma função primordial na regulação do tónus vascular. No estado normal, o endotélio induz o relaxamento do músculo liso vascular ao ser estimulado p.ex., por forças mecânicas, hormonas, neurotransmissores, plaquetas e produtos seus derivados, proteínas da coagulação e outros. O mediador daquela resposta é o NO<sup>(43, 49)</sup>, sintetizado pela enzima endotelial NO sintase (eNOS) a partir da L-arginina, por oxidação do respectivo grupo guanidino N-terminal (*Fig. 2a*) A eNOS é codificada pelo gene *NOS 3*<sup>(50)</sup>.

O NO é o principal efector da vasodilatação endotélio-dependente induzida pela tensão de cisalhamento do fluxo sanguíneo de perfusão, nas pequenas e grandes artérias<sup>(51)</sup>. No endotélio intacto o relaxamento induzido pelo NO depende da formação de um nucleótido específico, o guanosina monofosfato cíclico (GMP<sub>c</sub>), e da diminuição do cálcio intracelular nas células do músculo liso vascular<sup>(52)</sup>.

Adicionalmente, o NO exerce efeito citoprotector a nível vascular<sup>(14, 53)</sup>, ao inibir a adesão e agregação plaquetárias<sup>(54)</sup>, a adesão e migração leucocitárias<sup>(55)</sup>, a expressão do factor tecidual<sup>(56)</sup>, a inflamação<sup>(57)</sup> e a proliferação do músculo liso vascular<sup>(58)</sup>. Adicionalmente, o NO é um mediador importante da homeostasia sanguínea e vascular<sup>(59)</sup>. Na sua ausência, prevalece a vasoconstricção, a agregação plaquetária, a proliferação do músculo liso vascular e a adesão leucocitária<sup>(11, 60, 61)</sup>, que estão na origem da disfunção endotelial e do desencadeamento de diversas doenças cardiovasculares<sup>(5, 28, 62, 63)</sup>.

A síntese do NO é uma das possíveis opções metabólicas da arginina (*Fig. 2b*), das quais se destacam o ciclo da ureia, a conversão em prolina ou glutamina/glutamato e outros produtos (p.ex. creatina e derivados)<sup>(64, 65)</sup>. A via para a síntese do NO é complexa e está sujeita a um mecanismo regulador multifactorial, de que serão referidos somente os aspectos mais genéricos (*Fig. 3*).

*Características e mecanismos de acção da NOS sintase* - Estão identificadas três isoformas da NOS, duas das quais são enzimas constitutivas

regulated by a multifactorial mechanism, which will be described in general terms only (*Fig. 3*).

*Characteristics and mechanisms of NO synthase* - Three isoforms of NOS have been identified, two of which are constitutive (NOS-I or nNOS, for neural NOS, and NOS-III or eNOS, for endothelial NOS) and the other inducible (NOS-II or iNOS)<sup>(60)</sup>. All are homodimeric, being composed of two globular proteins (an oxidase domain and a reductase domain) joined by a flexible protein linker. Their composition includes various coenzymes and cofactors: the nucleotides NADP, FAD and FMN, tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) and the heme group<sup>(66)</sup>. The reductase domain, on binding with NADPH, catalyzes a reaction that produces the electrons required for NO synthesis. These electrons are transported along the protein linker to the oxidase domain, which is the catalytic center of the enzyme and contains the heme group and BH<sub>4</sub>; this is where L-arginine is fixed. The heme group is essential for catalysis to occur<sup>(50, 66)</sup>.

The constitutive isoforms are activated reversibly by the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex, while the iNOS isoform binds to calmodulin but is not dependent on calcium levels<sup>(67)</sup>. For peak activity, the enzyme also requires the presence of thiol compounds in reduced form such as glutathione. The constitutive forms of the enzyme intermittently produce small quantities of NO, while iNOS synthesizes high concentrations of NO in response to various stimuli, with cytoprotective or cytotoxic effects<sup>(68)</sup>.

All NOS isoforms catalyze the oxidation of L-arginine to L-citrulline and NO in a two-stage reaction in which the intermediate metabolite N-hydroxyl-L-arginine (N-OH-arginine) is formed. NADPH provides reducing equivalents, while the oxygen molecule gives up one of its atoms to the citrulline molecule (the ureide group) and the other to form NO (as the radical NO<sup>o</sup>) with one nitrogen atom from the guanidine group of arginine (*Fig. 2b*).

The concentration of arginine normally found in endothelial cells saturates eNOS, and so in theory enzyme activity should not increase in response to raised arginine levels. However, NO synthesis is stimulated by the addition of extracellular arginine<sup>(65, 69)</sup>. Known as the “arginine paradox”, this response of eNOS to arginine may be due to the presence of some

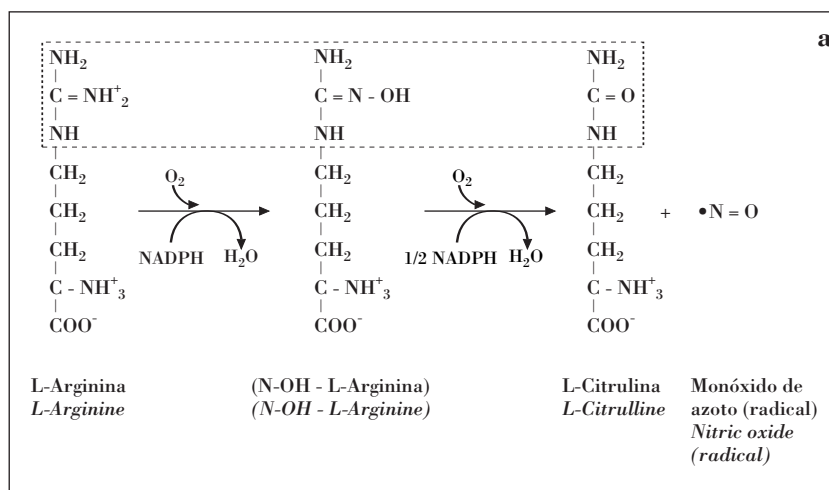


Figura 2. (a) Biossíntese do radical monóxido de azoto (NO<sup>•</sup>) a partir da arginina, que é convertida enzimaticamente em citrulina pela sintase do NO (NOS). A reacção decorre em duas etapas, em que o intermediário N-OH-L-Arginina é o produto da 1<sup>a</sup> etapa e substracto da 2<sup>a</sup>. A tracejado é demarcada a transformação do grupo guanidina da L-arginina em grupo ureido da L-citrulina. Além da arginina são também substractos da reacção o O<sub>2</sub> e a NADPH. A arginina e a citrulina são intermediários do ciclo da ureia, pelo que a arginina pode ser regenerada a partir da citrulina.

(b) Opções metabólicas da L-arginina.

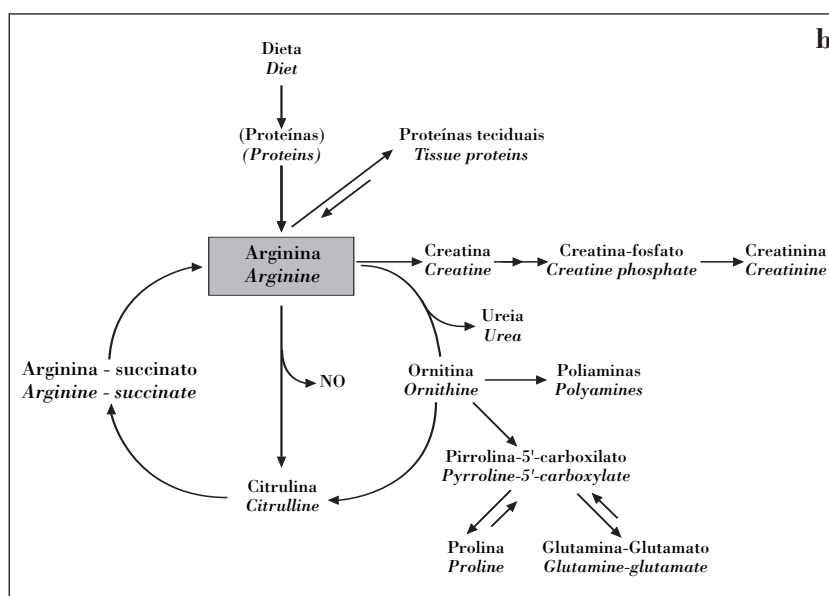


Figure 2. (a) Biosynthesis of the nitric oxide radical (NO<sup>•</sup>) from arginine, which is converted enzymatically into citrulline by NOS in a two-stage process in which the intermediate N-OH-L-arginine is produced in the first step and is the substrate for the second. The box demarcates the transformation of the guanidino group of L-arginine into the ureido group of L-citrulline. Other substrates for the reaction besides arginine are O<sub>2</sub> and NADPH. Arginine and citrulline are intermediates in the urea cycle and thus arginine can be regenerated from citrulline.

(b) Metabolic options for L-arginine.

(NOS-I ou nNOS: neuronal; NOS-III ou eNOS: endotelial) sendo a outra inductível (NOS-II ou iNOS: induzida).<sup>(50)</sup> Todas as isoformas são homodiméricas, constituídas por duas proteínas globulares (um domínio oxidase e um domínio redutase) unidas entre si por uma haste proteica flexível. Na sua composição participam diversas coenzimas e cofactores: os nucleótidos NADP, FAD e FMN, a tetrabiopterina (BH<sub>4</sub>) e o grupo heme<sup>(66)</sup>. O domínio redutase, ao unir-se ao NADPH, catalisa a reacção que produz os electrões necessários para a síntese do NO. Estes electrões são transportados ao longo da haste proteica para o domínio oxidase, que é o centro catalítico da enzima, onde se localizam o heme e a BH<sub>4</sub> e é fixada a L-arginina. O grupo heme é essencial para actividade catalítica da enzima<sup>(50, 66)</sup>.

eNOS in the caveolae of the cytoplasmic membrane, where the extracellular arginine transport protein CAT-1 is also found; this would be the substrate for NO synthesis<sup>(70)</sup>. An alternative explanation would be that it is caused by continual inhibition of NO by endogenous products such as asymmetric dimethylarginine (ADMA) produced by proteolysis of methylated arginine<sup>(71, 72)</sup>. Under normal conditions, the activity of NOS isoforms would be reduced to a fraction of their potential maximum, increasing with the supplementary extracellular arginine taken up by the cells in exchange for its methylated derivatives that are then expelled<sup>(64)</sup>.

Shear stress exerted by blood flow on the internal surface of a normal vessel wall is a crucial factor in the peripheral vasodilatory response to variations in perfusion<sup>(25, 26, 32)</sup>. This

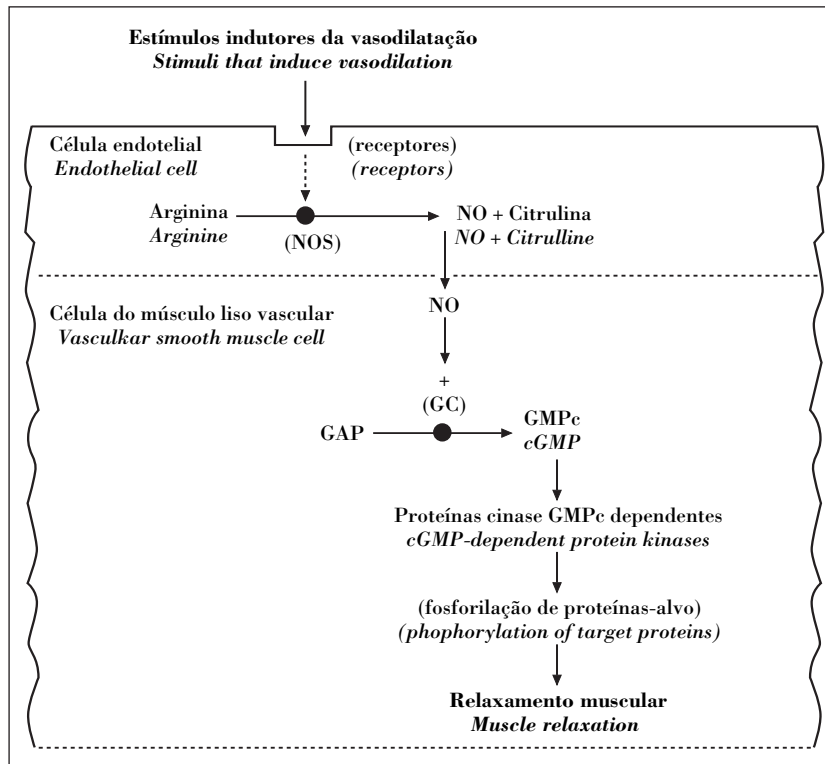


Figura 3. Representação simplificada da síntese do monóxido de carbono (NO) numa célula endotelial(e) a partir da arginina, por acção da enzima NO sintase tipo III (eNOS). O NO difunde para as células adjacentes do músculo liso vascular, onde estimula a guanilato ciclase (GC). Esta enzima catalisa a formação do guanósina mononucleótido cíclico (GMP<sub>c</sub>) a partir de uma molécula de guanósina trifosfato. O GMP<sub>c</sub> actua como 2º mensageiro na transdução do sinal, activando proteínas cinase GMP<sub>c</sub> dependentes, de que resulta o relaxamento muscular.

Figure 3. Simplified diagram of NO synthesis in an endothelial cell from arginine through the action of type III NO synthase (eNOS). NO diffuses into adjacent vascular smooth muscle cells, where it stimulates guanylate cyclase (GC). This enzyme catalyzes the formation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) from a molecule of guanosine triphosphate. cGMP acts as a second messenger in signal transduction, activating cGMP-dependent protein kinases and leading to muscle relaxation.

As isoformas constitutivas são activadas reversivelmente pelo complexo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, enquanto a isoforma iNOS está unida à calmodulina mas não depende dos níveis de cálcio<sup>(67)</sup>. Em actividade máxima a enzima requer ainda a presença de compostos tiol na forma reduzida (p.ex., o glutatião). As formas constitutivas da enzima produzem intermitentemente pequenas quantidades de NO, enquanto a iNOS sintetiza concentrações elevadas de NO em resposta a diversos estímulos, com efeitos citoprotectores ou citotóxicos<sup>(68)</sup>.

Todas as isoformas de NOS catalisam a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO, numa reacção a duas etapas em que é formado o metabolito intermediário N-hidroxilo-L-arginina (N-OH-arginina). O NADPH fornece equivalentes redutores, enquanto a molécula de oxigénio cede um dos seus átomos para a

response is modulated by the endothelium, by locally secreting vasorelaxant substances, some of which also act on the blood constituents or are produced by them<sup>(41, 42)</sup>.

This vasodilatory response is an adaptive response by the vasculature to stresses such as exercise hyperemia in normal individuals, and is inhibited by endogenous NOS inhibitors<sup>(73)</sup>. As it is immediate, the response does not involve mRNA or NOS synthesis, but is attributed to modulation of transmembrane ion transport (K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>) in the affected endothelium<sup>(74)</sup>. Changes in the rheological properties of blood lead to compensatory alterations in microvascular diameter and local perfusion following production of endothelial NO mediated by mechanotransduction in the vessel wall<sup>(32)</sup>.

In isolated arteries of both humans and experimental animals, NOS inhibitors also induce endothelium-dependent contraction<sup>(17, 75)</sup>,

molécula da citrulina (grupo ureídico) e outro para formar NO (como radical NO<sup>•</sup>) com um átomo de azoto do grupo guanidino da arginina (Fig. 2b).

A concentração da arginina normalmente existente nas células endoteliais satura a eNOS, pelo que, em princípio, a actividade enzimática não deveria responder ao aumento daquela concentração. Porém, sucede que a síntese do NO é estimulada pelo acréscimo de arginina extracelular<sup>(65, 69)</sup>. Este “paradoxo da arginina” (como é designada a resposta do eNOS à arginina), poderá resultar da coexistência de parte da eNOS nas cavéolas da membrana citoplásmica, nas quais está também localizada a proteína de transporte CAT-1 para a arginina extracelular, que será o substrato para a síntese do NO<sup>(70)</sup>. Em alternativa, aquele efeito paradoxal resultaria da inibição corrente da NOS por produtos endógenos (p.ex., a dimetilarginina assimétrica, ADMA), que derivam da proteólise da arginina metilada<sup>(71, 72)</sup>. No estado normal, a actividade das isoformas de NOS estaria reduzida a uma fracção do seu valor máximo potencial, aumentando com os suplementos da arginina extracelular captada pelas células, por troca com os seus derivados metilados, expelidos para o exterior<sup>(64)</sup>.

A tensão de cisalhamento exercida pelo fluxo sanguíneo sobre a superfície interna da parede vascular normal é um factor determinante da resposta vasodilatadora periférica às variações de perfusão<sup>(25, 26, 32)</sup>. Essa resposta é modulada pelo endotélio, ao secretar localmente substâncias vasorrelaxantes, algumas das quais actuam também nos constituintes do sangue ou emanam destes<sup>(41, 42)</sup>.

A resposta vasodilatadora induzida pela tensão de cisalhamento na parede vascular constitui uma resposta adaptativa da vasculatura, p.ex., à hiperémia do exercício nos indivíduos normais, sendo inibida por inibidores endógenos da NOS<sup>(73)</sup>. Esta resposta, por ser imediata, exclui a participação do ácido ribonucleico mensageiro (RNA<sub>m</sub>) e do mecanismo de síntese proteica para a NOS, sendo atribuída à modulação do transporte iónico (K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) transmembranar no endotélio afectado<sup>(74)</sup>. As modificações das propriedades reológicas do sangue induzem variações compensadoras do diâmetro microvascular e da perfusão sanguínea local, na sequência da produção de NO endotelial mediada por transducção mecânica

and when infused in isolated organs or limbs, they reduce perfusion downstream<sup>(76)</sup>.

Administration of NOS inhibitors in drinking water induced long-lasting hypertension in rats<sup>(75, 77)</sup>. This effect was related to reduced intracellular cGMP levels<sup>(52)</sup>. In NOS knockout mice, a tendency was seen for hypertension and more extensive cerebral infarction following occlusion of the middle cerebral artery<sup>(78)</sup>. Inhibition of NOS reduced cerebral irrigation and increased tissue damage following local ischemia<sup>(78)</sup>. Animals deficient in NOS have shorter lives, apparently due to higher incidence of damage to the heart, kidneys and nervous system<sup>(56, 75, 77, 79)</sup>. It has also been demonstrated that mice with this deficiency have systemic arterial<sup>(80)</sup> and pulmonary<sup>(81)</sup> hypertension, diminished endothelium-dependent vasorelaxation<sup>(80)</sup>, decreased vascular remodeling following reduction of blood flow and angiogenesis<sup>(82)</sup>, increased intimal proliferation<sup>(83)</sup>, and malformed heart valves<sup>(84)</sup>.

NOS inhibition in animal models of acute myocardial ischemia significantly reduced ventricular mechanical efficiency<sup>(85)</sup>.

Conversely, increased NO production following administration of NO donors or NOS-inducing substrates appears to protect against postischemic cerebral infarction independently of cholesterolemia<sup>(86, 87)</sup>.

A greater risk of myocardial ischemia is seen in humans with eNOS polymorphisms that reduce the enzyme's activity<sup>(88)</sup>.

In turn, increased cGMP in platelets reduces platelet adhesion and aggregation, while adenosine diphosphate (ADP) and serotonin secreted by platelets<sup>(17)</sup>, as well as circulating thrombin, immediately trigger NO and PGI<sub>2</sub> synthesis in adjacent endothelial cells in humans and animals<sup>(17)</sup>. On the other hand, prolonged incubation of thrombin with endothelial cells of the human aorta suppresses expression of eNOS and upregulated endothelin-1 (ET-1) converting enzyme (ECE)<sup>(90)</sup>.

These interactions explain the simultaneous occurrence in vessels with intact endothelium of vasodilation and inhibition of platelet aggregation in sectors of the circulation in which activation of the coagulation and platelet cascade would lead to vasoconstriction and thrombosis. Given that an increase in thrombin is accompanied by mechanisms that induce atherogenesis, and as



na parede vascular<sup>(32)</sup>.

Igualmente em artérias isoladas, de humanos ou animais de experiência, os inibidores da NOS induzem contracção endotélio-dependente<sup>(17, 75)</sup> e, quando infundidos em órgãos isolados ou membros, diminuem a perfusão sanguínea a juzante<sup>(76)</sup>.

A administração de inibidores de NOS na água de beber induzia hipertensão duradoura em ratos<sup>(75, 77)</sup>. Este efeito estava relacionado com a diminuição dos níveis intracelulares do GMP<sub>c</sub><sup>(52)</sup>. Em murganhos deficientes no gene da NOS foi observada tendência para hipertensão e enfarte cerebral mais extenso, após oclusão da artéria cerebral média<sup>(78)</sup>. A inibição da NOS diminuía a irrigação cerebral e promovía a lesão tecidual subsequente à isquémia local<sup>(78)</sup>. Animais deficientes em NOS tinham menor tempo de vida, aparentemente devido a uma maior incidência de lesões no coração, rins e sistema nervoso<sup>(56, 75, 77, 79)</sup>. Também foi demonstrado naquele tipo de deficiência em murganhos hipertensão arterial sistémica<sup>(80)</sup> e pulmonar<sup>(81)</sup>, decréscimo da vasorrelaxamento endotélio-dependente<sup>(80)</sup>, diminuição da remodelação vascular pós-redução do fluxo e da angiogénese<sup>(82)</sup>, aumento de proliferação da íntima<sup>(83)</sup> e malformação das válvulas cardíacas<sup>(84)</sup>.

A inibição do NOS em modelo animal de isquémia aguda do miocárdio deteriorava significativamente a eficácia mecânica da energética ventricular<sup>(85)</sup>.

Pelo contrário, a produção aumentada de NO (pela administração de dadores de NO ou substratos indutores de NOS) parecia conferir protecção contra o enfarte cerebral pós-isquémia, independentemente da colesterolemia<sup>(86, 87)</sup>.

Observou-se maior tendência para isquémia do miocárdio em humanos com polimorfismos de eNOS que diminuem a actividade enzimática<sup>(88)</sup>.

Por sua vez, o aumento do GMP<sub>c</sub> nas plaquetas induz a diminuição da adesão e agregação plaquetárias<sup>(89)</sup>, enquanto a adenosina-difosfato (ADP) e a serotonina secretados pelas plaquetas<sup>(17)</sup>, assim como a trombina circulante, induzem imediatamente a síntese de NO e da PGI<sub>2</sub> nas células endoteliais adjacentes, em animais e humanos<sup>(17)</sup>. Em contrapartida a incubação prolongada de trombina com células endoteliais da aorta humana reduziu a expressão da eNOS e activou a da enzima conversora da endotelina-1 (ET-1)<sup>(90)</sup>.

the endothelium is subject to prolonged exposure to this protease, it can be assumed that the effect of NOS inhibition would prevail, together with upregulation of ECE. The imbalance between NO and endothelin formed in the endothelium through the action of thrombin could be behind the mechanisms that influence the triggering of acute coronary events<sup>(91)</sup>.

The existence in the endothelium of an inducible form of NOS means that the vasodilatory response may be linked to the microbicidal action seen in inflammation following induction of local NO synthesis by various molecules that mediate septic shock, particularly cytokines, endotoxins, tumor necrosis factor and interleukin-1 $\beta$ <sup>(92)</sup>.

#### *Formation and activity of PGI<sub>2</sub>*

Prostacyclin is secreted by endothelial cells and is activated by stimuli that in most cases also induce NO synthesis. Unlike NO, PGI<sub>2</sub> induces the formation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) in vascular smooth muscle cells and in platelets, thereby promoting vasodilation and, by inhibiting platelet aggregation, exerting an antithrombotic effect<sup>(30, 93)</sup>. PGI<sub>2</sub> has completely the opposite effect from thromboxane, and hence the balance between these two eicosanoids is important for hemorheological homeostasis.

Among other important effects, PGI<sub>2</sub> (i) has antioxidant properties, protecting the myocardium and blood vessels from significant lesions by binding to reactive forms of oxygen produced by ischemia-reperfusion, (ii) increases the metabolism of cholesterol esters accumulating in the vessel wall in smooth muscle cells and macrophages, and (iii) inhibits the secretion of growth factors associated with wall thickening<sup>(93)</sup>.

#### **Vasoconstrictor substances produced by the endothelium**

The tendency towards vasodilation is countered by a group of endogenous substances with vasoconstrictor properties that are also produced and secreted by the endothelium. Besides endothelin-1, particular mention should be made of angiotensin II (Ang II), synthesized at the luminal surface of endothelial cells by angiotensin-converting enzyme (ACE)<sup>(94)</sup>, and platelet-derived growth factor (PDGF)<sup>(95)</sup>.

Aquelas interações justificam a ocorrência simultânea (em vasos com endotélio intacto) de vasodilatação e inibição da agregação plaquetária nos sectores da circulação em que, por haver activação da cascata da coagulação e das plaquetas, poderia pressupor-se o desenvolvimento de vasoconstricção e trombose. Atendendo a que o aumento da trombina coexiste com os mecanismos indutores da aterogénese, e estando o endotélio sujeito a prolongada exposição de níveis elevados daquela protease, seria de admitir que prevalecesse o efeito inibidor da NOS sintase, juntamente com a indução da enzima de conversão da endotelina-1 (ECE). O desequilíbrio entre o NO e a endotelina formados no endotélio por acção da trombina poderá estar na origem de mecanismos influentes no desencadeamento de eventos coronários agudos<sup>(91)</sup>.

A existência (também no endotélio) de uma isoforma inductível de NOS justifica que a resposta vasodilatadora possa ocorrer a par com a acção microbiciada observada em situações inflamatórias, na sequência da indução da síntese do NO local por diversas moléculas mediadoras do choque séptico, designadamente citocinas, endotoxinas, factor da necrose tumoral e interleucina-1 $\beta$ <sup>(92)</sup>.

#### *Formação e actividade da PGI<sub>2</sub>*

A prostaciclina é secretada por células endoteliais activada por estímulos que, na generalidade, também induzem a síntese de NO. Ao contrário deste gás, a PGI<sub>2</sub> induz a formação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>) nas células do músculo liso vascular e, também, nas plaquetas, pelo que promove a vasodilatação e, ao inibir a agregação plaquetária, exerce acção antitrombótica<sup>(30, 93)</sup>. A PGI<sub>2</sub> tem uma acção diametralmente oposta à do tromboxano, pelo que o equilíbrio entre ambos os tipos de eicosanóides é importante para a homeostasia hemorreológica.

Entre outras acções importantes, a PGI<sub>2</sub> (i) actua como anti-oxidante, protegendo o miocárdio e os vasos de lesões significativas, ao captar formas activas de oxigénio resultantes, em particular, de estados de isquémia-reperfusão, (ii) aumenta a metabolização de ésteres de colesterol acumulados na parede vascular (em células musculares lisas e macrófagos e (iii) inibe a secreção de factores de crescimento associados

The signal transduction pathways mediated by Ang II and NO are mutually regulated through various mechanisms. NOS expression and NO production are affected by Ang II, while NO depresses the AT1 receptor of Ang II. Additionally, the metabolic mediators of both pathways induce antagonistic responses. Normal vascular structure and function depend on the dynamic balance between Ang II and NO, while imbalance between them is implicated in the pathogenesis of various cardiovascular diseases<sup>(96)</sup>.

#### *Formation and activity of ET-1*

Among the most important of the vasoconstrictors secreted by the endothelium is endothelin. There are at least three isoforms, ET-1, ET-2 and ET-3, type 1 apparently being found exclusively in the endothelium<sup>(44)</sup>. The active forms are derived from the same precursor (preendothelin), from which an inactivating segment is removed by endothelin-converting enzyme. This enzyme, which is found in endothelial cells, is essential to the complete activation of endothelin-1 and its vascular action<sup>(97)</sup>.

The genetic expression of ET-1 is induced by various factors, particularly thrombin, interleukin-1, epinephrine, angiotensin II, arginine vasopressin and hypoxia, among others<sup>(44, 98)</sup>. ET-1 acts in both autocrine and paracrine fashion in that it is secreted by endothelial cells at their contraluminal surface into smooth muscle cells of the tunica media<sup>(99)</sup>. The effect of ET-1 effect depends on its concentration, since it induces sustained vasoconstriction at high levels and vasodilation at low levels<sup>(44, 98)</sup>. Under physiological conditions, ET-1 is found at very low levels in the circulation and has a slight vasodilatory effect in most of the arterial territory. Vasoconstriction occurs following abnormal situations such as myocardial ischemia, arrhythmia, or sudden death<sup>(98, 101)</sup>. The endothelin system is involved in a wide range of other pathophysiological situations<sup>(102)</sup>, notably primary pulmonary hypertension<sup>(103)</sup>. The latter is caused by increased expression of ECE, as has also been shown in atherosclerosis and restenosis<sup>(104)</sup>.

It has recently been suggested that there is a link between raised ET-1 and the action of leptin in obese hypertensive patients, particularly when the clinical setting develops into metabolic

ao espessamento da parede vascular<sup>(93)</sup>.

### **Substâncias vasoconstrictoras produzidas pelo endotélio**

A tendência para a vasodilatação é equilibrada por uma classe de substâncias endógenas com acção vasoconstrictora, também geradas e secretadas pelo endotélio. Além da endotelina-1, justificam referência especial a angiotensina II, (Ang II), sintetizada na superfície luminal das células endoteliais pela enzima conversora da angiotensina (ACE)<sup>(94)</sup>, e o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)<sup>(95)</sup>.

As vias de transdução de sinal mediadas pela Ang II e pelo NO são reguladas mutuamente por diversos mecanismos. Deste modo, a expressão da NOS e a produção de NO são afectadas pela Ang II, enquanto o NO deprime o receptor AT<sub>1</sub> da Ang II. Igualmente, os mediadores metabólicos de ambas as vias induzem respostas antagónicas. Enquanto a normalidade da estrutura e funções vasculares depende do equilíbrio dinâmico entre a Ang II e o NO, o seu desequilíbrio está implicado na patogénese de diversas doenças cardiovasculares<sup>(96)</sup>.

### *Formação e actividade da ET-1*

Relativamente aos vasoconstrictores secretados pelo endotélio importa destacar a endotelina. Existem pelo menos três isoformas de endotelina (ET-1, ET-2 e ET-3), das quais o tipo I parece ser exclusivo do endotélio<sup>(44)</sup>. As formas activas provêm de um precursor comum (preproendotelina), de que é removido um segmento inactivador pela enzima conversora da endotelina. Esta enzima, presente nas células endoteliais, é indispensável para a activação completa da endotelina-1 e respectiva acção vascular<sup>(97)</sup>.

A expressão genética da ET-1 é induzida por diversos factores, designadamente a trombina, interleucina-1, epinefrina, angiotensina II, vasopressina-arginina e hipóxia, entre outros<sup>(44, 98)</sup>. A ET-1 actua de modo autócrino e parácrino, ao ser secretada das células endoteliais (pela superfície contra-luminal) para as células de músculo liso da camada vascular média<sup>(99)</sup>. O efeito da ET-1 depende da sua concentração, pelo que induz vasoconstricção sustentada a níveis elevados, e vasodilatação a níveis baixos<sup>(44, 98)</sup>. Em condições fisiológicas, a ET-1

syndrome with type II diabetes<sup>(105)</sup>.

Two receptors for endothelin-1 have been identified in vascular smooth muscle cells, ETA and ETB, both associated with protein G, phospholipase C and protein kinase C (106). ET<sub>A</sub> receptors predominate in arteries, while the ET<sub>B</sub> type are found in veins and pulmonary vessels, although overall type A receptors are more numerous in these vessels also<sup>(107)</sup>.

Although veins are more sensitive than arteries, it is known that ET-1 has a significant effect on regulation of arterial blood flow, particularly in the myocardium<sup>(108)</sup> due to the low number of ET<sub>B</sub> receptors in the coronary arteries<sup>(109)</sup>.

Binding of ET-1 to either receptor triggers contraction of vascular smooth muscle (leading to proliferation and hypertrophy) (*Fig. 4*). The ET<sub>B</sub> receptor, being expressed in endothelial cells together with the formation of NO and PGI<sub>2</sub>, is behind the episodes of vasodilation seen after intravenous infusion of ET-1 in animals or isolated organs<sup>(110)</sup>. Chronic antagonism of ET-1 receptors in pigs with experimentally-induced hypercholesterolemia preserved endothelial function and increased intracoronary NO activity<sup>(111)</sup> at the same time as it suppressed expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and neovascularization of the vasa vasorum<sup>(112)</sup>. Blocking ETA receptors also significantly reduced atheromatous plaques in a mouse model of atherosclerosis by inhibiting local neoangiogenesis<sup>(113)</sup>.

The known involvement of ET-1 in atherogenesis also results from its mitogenic effect and the way it strengthens the extracellular matrix<sup>(44, 114)</sup>. ET-1 is expressed in the extra- and intracellular spaces of atheromatous plaques in human coronary arteries<sup>(115)</sup>, and specific immunoreactivity has been detected in both tissue and the circulation in advanced stages of atherosclerosis<sup>(116)</sup>.

In patients with atherosclerotic coronary disease who have undergone bypass, the internal mammary artery used for grafting has shown evidence of increased necrosis of the tunica media, type I collagen and expression of ET-1 and ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> receptors<sup>(117)</sup>. These alterations indicate endothelial dysfunction in the vessels used for the grafts, although not as severe as in the coronary lesions that were the reason for the intervention.

existe em circulação a níveis muito baixos, exercendo uma ação vasodilatadora discreta em grande parte do território arterial<sup>(100)</sup>. A ação vasoconstrictora sucede a situações anormais, estando associada, por exemplo, a isquémia do miocárdio, arritmia e morte súbita<sup>(98,101)</sup>. O sistema da endotelina está envolvido num vasto número de outras condições fisiopatológicas<sup>(102)</sup>, com destaque para a hipertensão pulmonar primária<sup>(103)</sup>. Na origem daquela situação estará o aumento de expressão da enzima conversora da endotelina-1 (ECE-1), como foi demonstrado na aterosclerose e re-estenose<sup>(104)</sup>.

Foi recentemente sugerida a associação entre o aumento da ET-1 e a ação da leptina em doentes hipertensos obesos, particularmente quando o quadro clínico evoluiu para síndrome metabólica com diabetes do tipo II<sup>(105)</sup>.

Estão identificados dois receptores (nas células do músculo liso vascular) para a endotelina-1 (ETA e ETB), ambos associados à proteína G, fosfolipase C e proteína cinase C<sup>(106)</sup>. Os receptores ETA predominam nas artérias, enquanto os do tipo ETB existem nas veias e vasos pulmonares, embora no total continuem a prevalecer nestes vasos os receptores do tipo A<sup>(107)</sup>.

Não obstante as veias serem mais sensíveis do que as artérias, é admissível que a ET-1 intervenha significativamente na regulação do fluxo no trajecto arterial, em particular do miocárdio<sup>(108)</sup> devido ao reduzido número de receptores ETB existentes nas artérias coronárias<sup>(109)</sup>.

A fixação de ET-1 a ambos os receptores induz contracção (proliferação e hipertrofia) do músculo liso vascular (*Fig. 4*). O receptor ET<sub>B</sub>, por ser expresso também nas células endoteliais a par com a formação do NO e PGI<sub>2</sub>, está na origem dos episódios de vasodilatação observados após infusão endovenosa de ET-1 em animais ou órgãos isolados<sup>(110)</sup>. A inibição crónica dos receptores da ET-1 em porcos com hipercolesterolemia experimental preservava a função endotelial, originando aumento de actividade do NO intracoronário<sup>(111)</sup>, ao mesmo tempo que reprimia a expressão da VEGF e a neovascularização dos *vasa vasorum*<sup>(112)</sup>. A inibição dos receptores ETA também reduziu significativamente a placa de ateroma em murganhos-modelo de aterosclerose, por inibição da neo-angiogénese local<sup>(113)</sup>.

By increasing oxidative stress on the vascular intima, ET-1 triggers an inflammatory response that may lead to wall remodeling and endothelial dysfunction, as found in ET-1-dependent hypertension<sup>(118)</sup>. Rises in blood pressure and vascular remodeling are inhibited by the administration of ET-1 receptor antagonists<sup>(102)</sup>.

A new vasoconstrictor peptide has meanwhile been discovered in humans and in other vertebrates. At least ten times as potent as ET-1<sup>(119)</sup>, this vasoconstrictor, known as urotensin II, is a cyclic peptide with a structure similar to that of somatostatin. It was first isolated in fish spinal cords<sup>(120)</sup> and subsequently cloned in humans<sup>(121)</sup>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks to Sra. D. Emília Alves for her careful typing of the text.

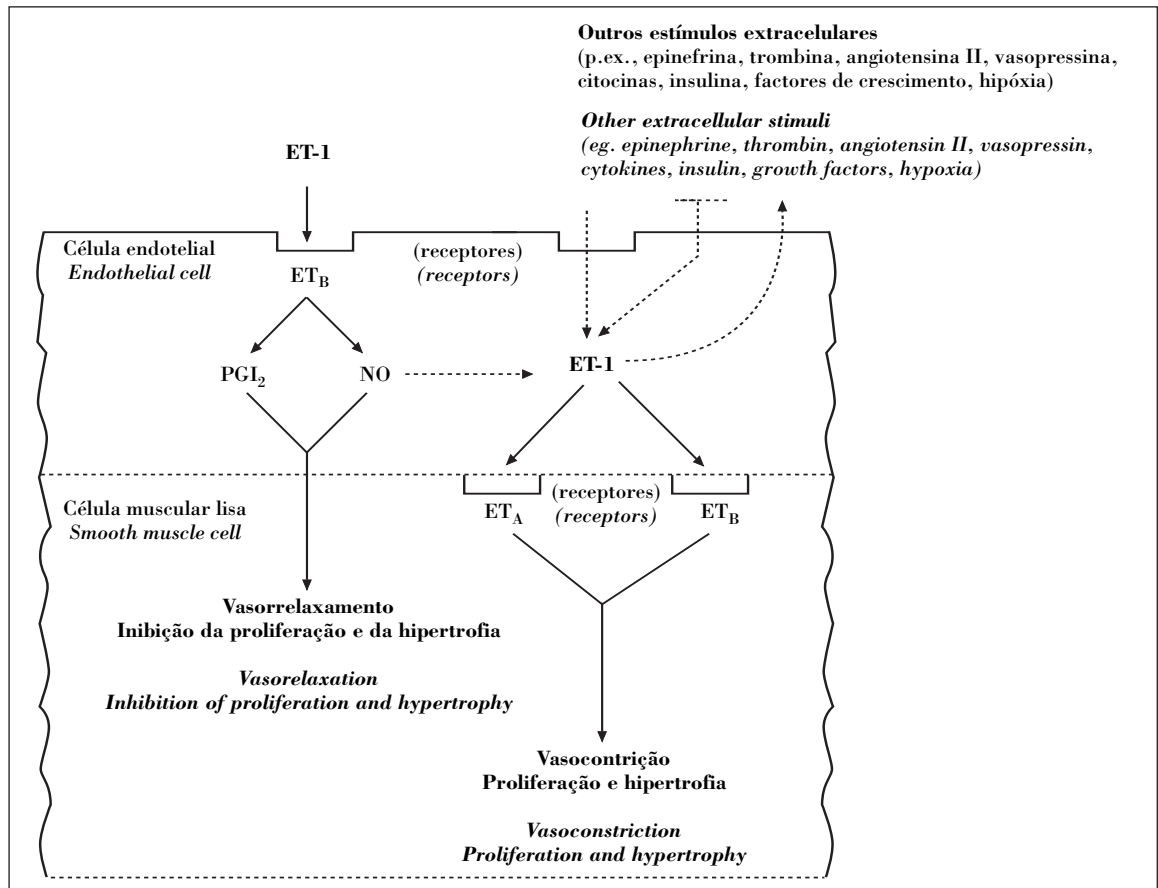


Figura 4. A endotelina (ET-1) liga-se aos seus receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> localizados em células do músculo liso vascular, induzindo vasoconstrição, proliferação e hipertrofia celular. Os receptores ET<sub>A</sub> predominam nas artérias, enquanto os ET<sub>B</sub> prevalecem nas veias, embora quantitativamente exista maior quantidade de ET<sub>A</sub> nestes vasos. Os receptores ET<sub>B</sub> existem também na superfície luminal das células endoteliais; ao serem activados por ET-1 exógena desencadeiam uma resposta vasodilatadora e inibidora da proliferação e hipertrofia do músculo liso, mediada pela síntese do NO e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). A reduzida quantidade de receptores ET<sub>B</sub> nas artérias coronárias justifica que a acção local da endotelina seja essencialmente vasoconstritora, ao contrário do que sucede nas outras regiões, em que poderá haver vasodilatação fisiológica.

Figure 4. Endothelin (ET-1) binds to ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in vascular smooth muscle, inducing vasoconstriction, proliferation and cell hypertrophy. ET<sub>A</sub> receptors predominate in arteries, while ET<sub>B</sub> receptors are more important in veins, although here too ET<sub>A</sub> receptors are more numerous. ET<sub>B</sub> receptors are also found on the luminal surface of endothelial cells, where they are activated by exogenous ET-1 and trigger vasodilation and inhibit smooth muscle proliferation and hypertrophy through synthesis of NO and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). The low number of ET<sub>B</sub> receptors in the coronary arteries explains why endothelin's local action is mainly vasoconstricting, unlike in other regions, where there may be physiological vasodilation.

O reconhecido envolvimento da ET-1 no processo aterogénico resultaria também do seu efeito mitogénico e do reforço que induz na matriz extracelular<sup>(44, 114)</sup>. A ET-1 é expressa nos espaços extra e intracelulares das placas de aterosclerose de artérias coronárias humanas<sup>(115)</sup>, além de ser detectada imuno-reatividade específica, quer tecidual quer em circulação, em estados avançados de aterosclerose<sup>(116)</sup>.

Em doentes com doença aterosclerótica coronária sujeitos a *by-pass*, a artéria mamária interna dos indivíduos transplantados evidenciava aumento de necrose da camada

média, colagénio do tipo I e expressão da ET-1 e dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub><sup>(117)</sup>. Estas alterações indicavam disfunção endotelial nos vasos a transplantar, embora sem a gravidade aparente das lesões coronárias que haviam justificado a intervenção cirúrgica.

A ET-1, ao aumentar a agressão oxidante sobre a íntima vascular, desencadeia uma resposta inflamatória que, eventualmente, justificará a remodelação da parede e a disfunção endotelial, verificadas na hipertensão arterial ET-1 dependente<sup>(118)</sup>. De facto, a tensão arterial e a remodelação vascular são bloqueadas pela administração de antagonistas de receptores de ET-1<sup>(102)</sup>.

Foi entretanto identificado um novo péptido vasoconstrictor, existente no homem e outros mamíferos, que é, pelo menos, cerca de dez vezes mais potente do que a ET-1<sup>(119)</sup>. Este vasoconstrictor, designado urotensina II, é um péptido cíclico com estrutura semelhante à somatostatina, tendo sido isolado inicialmente da espinal medula de peixes<sup>(120)</sup> e depois clonado do homem<sup>(121)</sup>.

## AGRADECIMENTOS

O nosso reconhecimento à Sra. D. Emília Alves pelo cuidadosa preparação dactilográfica do texto.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

J. MARTINS E SILVA

Conselho Directivo

Faculdade de Medicina de Lisboa

Av. Prof. Egas Moniz

1649-028 LISBOA

e-mail: jsilva@fm.ul.pt

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Sacks F.M. - Is there anything to add to our lipid risk factors for coronary heart disease? *Am. J. Cardiol.* 1995; 75:1263-1264.
2. Wilson P.W., D'Agostino R.B., Levy D., Belanger A.M., Sibershatz H., Kannel W.B. - Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998; 97:1837-1847.
3. Keys S.A. - "Seven Countries: a Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease", Cambridge, M.A.: Harvard University Press, 1980.
4. Rosenson R.S., Lowe G.D.O. - Effect of lipid and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis* 1988; 140:271-280.
5. Bonetti P.O., Lerman L.O., Lerman A. - Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:168-175.
6. Maas R., Boger R. - Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. *Atherosclerosis* 2003; 4:5-17.
7. Davignon J., Ganz J. - Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004; 109:III27-III32.
8. Lerman A., Burnett J. - Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992; 86 (Suppl. III): III.12-III.19.
9. Heistad D.D., Marcus M.L., Larsen G. E., Armstrong M.L. - Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 1981; 240:H781-H787.
10. Simionescu M., Simionescu N., Palade G.E. - Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J. Cell Biol.* 1974; 60:128-150.
11. Gimbrone M.A.Jr. - Vascular endothelium in health and disease. In: "Molecular Cardiovascular Medicine", E. Haber (ed), New York: Scientific American Inc, 1995; pp. 49-61.
12. Aird W.C. - Endothelium as an organ system. *Crit. Care Med.* 2004; 32:S271-S279.
13. Liepsch D.W. - Effect of blood flow parameters in flow patterns at arterial bifurcations - studies in models. In: "Blood Flow in Large Arteries: Application to Atherosclerosis and Clinical Medicine", D.W. Liepsch (ed), Basel: Karger, 1990, pp. 63-76.
14. Behrendt D., Ganz P. - Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am. J. Cardiol.* 2002; 90:40L-48L.
15. Ku D.D., Caulfield J.B., Kirklin J.K. - Endothelium-dependent responses in human coronary blood vessels. In: "Endothelium Regulation of Vascular Tone", U.S. Ryan, G.M., Rubanyi (eds), New York: Marcel Dekker, Inc, 1992; pp. 197-223.
16. Deng D., Tsalenko A., Vailaya A., Ben-Dor A., Kundu R., Estay I., Tabibiazar R., Kincaid R., Yakhini Z., Bruhn L., Quertermous T - Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ. Res.* 2006; 98:200-208.
17. Yang Z., Stulz P., Von D.L., Bauer E., Turina M., Lüscher T.F. - Different interactions of platelets with arterial and venous coronary bypass vessels. *Lancet* 1991; 337:939-943.
18. Geortsen M.E. - Physiologic function of normal endothelial cells. In: "Vascular Medicine: A textbook of vascular biology and diseases". J. Loscalzo, M.A. Creager, V.J. Dzau (eds), Boston: Little, Brown and Company, 1996, pp. 3-38.



19. Mehta D., Malik A.B. - Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006; 86:279-367.
20. Aird W.A. - Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease. *Circ. Res.* 2006; 98:159-162.
21. Muller-Delp J.M. - Aging-induced adaptations of microvascular reactivity. *Microcirculation* 2006; 13:301-314.
22. Brooks A.R., Leekes P.I., Rubanyi G.M. - Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: relevance for focal susceptibility to atherosclerosis. *Endothelium* 2004; 11:45-57.
23. Zeiher A.M., Drexler H., Saurbier B., Just H. - Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J. Clin. Invest.* 1993; 92:652-662.
24. Pearson J.A. - The control of production and release of haemostatic factors in the endothelial cell. *Baillière's Clin. Haematol.* 1993; 6:629-651.
25. Nerem R.M. - Hemodynamics and the vascular endothelium. *J. Biomech. Eng.* 1993; 115:510-514.
26. Fisher A.B., Chien S., Barakat A.I., Nerem R.M. - Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2001; 281:L529-533.
27. Copley A.L. - Perihemorheology: the bridge between the vessel-blood organ and the organ it penetrates. *Biorheology* 1989; 26:377-388.
28. Gimbrone M.A. Jr. - Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 1999; 155:1-5.
29. Moncada S., Herman A.G., Higgs E.A., Vane J.R. - Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. *Thromb. Res.* 1977; 11:323-344.
30. Moncada S., Vane V.R. - Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 1979; 30:293-331.
31. Rosemberg R.D., Rosemberg J.S. - Natural anticoagulant mechanisms. *J. Clin. Invest.* 1984; 74:1-6.
32. Martini J., Cabrales P., Tsai A.G., Intaglietta M. - Mechanotransduction and the homeostatic significance of maintaining blood viscosity in hypotension, hypertension and haemorrhage. *J. Intern. Med.* 2006; 259:364-372.
33. Kalafatis M., Egan J.O., Mann K.G. - Coagulation factors. In: "The Endothelium in Clinical Practice", G.M. Rubanyi, V.J. Dzau (eds), New York: Marcel Dekker Inc., 1997, pp. 245-264.
34. Hoekstra T., Geleijnse J.M., Schouten E.G., Kluit C. - Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. *Thromb. Haemost.* 2004; 91:861-872.
35. Janig W. - Organization of the lumbar sympathetic outflow to skeletal muscle and skin of the cat hindlimb. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1985; 102:119-123.
36. Wallin B.G., Fagius J. - Peripheral sympathetic neural activity in conscious humans. *Annu. Rev. Physiol.* 1988; 50:565-576.
37. Brown M.D. - Metabolic control of blood flow with preference to heart, skeletal muscle and brain. In: "Cardiovascular Regulation", D. Jordan, J. Marchall (eds) London: Portland Press 1975; pp. 113-126.
38. Bolton T.B., Lang R.J., Takewaki T. - Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J. Physiol.* 1984; 351:549-572.
39. Hainsworth R., Dinkhill M.J. - Regulation of blood volume. In: "Cardiovascular Regulation", D. Jordan, J. Marchall (eds) London: Portland Press 1975; pp. 77-91.
40. Joyner M.J., Dietz N.M. - Sympathetic vasodilation in human muscle. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177:329-336.
41. Bassenge E. - Endothelial regulation of coronary tone. In: "Endothelial Regulation of Vascular Tone", U.S. Ryan, G.M. Rubanyi (eds). New York: Marcel Dekker Inc., 1992, pp. 225-264.
42. Ralevic V., Loncoln J., Burnstock G. - Release of vasoactive substances from endothelial cells. In: "Endothelial Regulation of Vascular Tone", U.S. Ryan, G.M. Rubanyi (eds). New York: Marcel Dekker Inc. 1992, pp. 297-338.
43. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
44. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mutsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. - A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
45. Marcondes S., Antunes E. - The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.* 2005; 3:33-44.
46. Critz S.D., Coheu M.V., Downey J.M. - Mechanisms of acetylcholine- and bradykinin-induced preconditioning. *Vascul. Pharmacol.* 2005; 42:201-209.
47. Vanhoutte P.M., Perrault L.P., Vilaine J.P. - Endothelial dysfunction and vascular disease. In: "The Endothelium in Clinical Practice", G.M. Rubanyi, V.J. Dzau (Eds), New York: Marcel Dekker Inc, 1997, pp. 265-289.
48. Walch L., Brink C., Norel X. - The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. *Therapie.* 2001; 56:223-226.
49. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. - Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
50. Michel T., Feron O. - Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* 1997; 100:2146-2152.
51. Goligorsky M.S., Li H., Brodsky S., Chen J. - Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2002; 283:F1-F10.
52. Rapoport R.M., Draznin M.B., Murad F. - Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983; 306:174-176.
53. Kinlay S., Libby P., Ganz P. - Endothelial function and coronary artery disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2001; 12:383-389.
54. Simon D.I., Stamler J.S., Jaraki O., Keaney J.F., Osborne J.A., Francis S.A., Singel D.J., Loscalzo J. - Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscler. Thromb.* 1993; 13:791-799.
55. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. - Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88:4651-4655.
56. Yang Y., Loscalzo J. - Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation.* 2000; 101:2144-2148.
57. Qian H.S., Neplioueva V., Shetty G.A., Channon K.M., George S.E. - Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1999; 99:2979-2982.
58. von der Leyen H.E., Gibbores G.H., Morishita R., Lewis N.P., Zhang L., Nakajima M., Kaneda Y., Cooke J.P., Dzau V.J. - Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:1137-1141.
59. Muller B., Kleschyov A.L., Alencar J.L., Vanin A., Stoclet J.-C. - Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular

- system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 962:131-139.
60. Anderson T.J. - Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34:631-638.
61. Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. - An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1990; 87:5193-5197.
62. Harrison D.G. - Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:2153-2157.
63. Lerman A., Zeiher A.M. - Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005; 111:363-368.
64. Grillo M.A., Colombatto S. - Arginine revisited: minireview article. *Amino Acids.* 2004; 26:345-351.
65. Huynh N.N., Chin-Dusting J. - Amino acids, arginine and nitric oxide in vascular health. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006;33:1-8.
66. Parkinson J.F., Phillips G.B. - Nitric oxide synthases; enzymology and mechanism-based inhibitors. In: "The Endothelium in Clinical Practice", G.M. Rubanyi, V.J. Dzau (eds), New York: Marcel Dekker Inc, 1997; pp. 95-123.
67. Bredt D.S., Snyder S.H. - Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87:681-685.
68. Wu K.K. - Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 962:122-130.
69. Creager M.A., Gallagher S.J., Girerd X.J., Coleman S.M., Dzau V.J., Cooke J.P. - L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.* 1992; 90:1248-1253.
70. McDonald K.K., Zharikov S., Block E.R., Kilbery M. S. - A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J. Biol. Chem.* 1997; 272:31213-31216.
71. Rees D.D., Palmer R.M., Schulz R., Hodson H.F., Moncada S. - Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101:746-752.
72. Achan V., Ho H.K., Heeschen C., Stuehlinger M., Jang J.J., Kimoto M., Vallance P., Cooke J.P. - ADMA regulates angiogenesis: genetic and metabolic evidence. *Vasc. Med.* 2005; 10:7-14.
73. Joannides R., Haefeli W.E., Linder R., Richard V., Bakkali E.H., Thuillez C., Lüscher T.F. - Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995; 91:1314-1319.
74. Lieu D.K., Papone P.A., Barakat A.I. - Differential membrane potential and ion current responses to different types of shear stress in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2004; 286:C1367-C1375.
75. Rees D.D., Palmer R.M.J., Moncada S. - Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1989; 86:3375-3378.
76. Vallance P., Collier J., Moncada S. - Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1990; II:997-1000.
77. Moreau P., Takase H., Küng C.F., van Rouijen M-M., Schaffner T., Lüscher T.F. - Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke* 1995; 26:1922-1928.
78. Huang Z., Huang P.L., Ma J., Meng W., Ayata C., Fishman M.C., Moskowitz M.A. - Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1996; 16:981-987.
79. Li W., Mital S., Ojaimi C., Csiszar A., Kaley G., Hintze T.H. - Premature death and age-related cardiac dysfunction in male eNOS-knockout mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004; 37:671-680.
80. Kojda G., Laursen J.B., Ramasamy S., Kent J.D., Kurz S., Buchfield J., Shesely E.G., Harrison D.G. - Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc. Res.* 1999; 42:206-213.
81. Fagan K.A., Fouty B.W., Tyler R.C., Morris Jr. K.G., Kepler L.K., Sato K., LeCras T.D., Abman S.H., Weinberger H.D., Huang P.L., McMurtry I.F., Radman D.M. - The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:291-299.
82. Rudic R.D., Shesely E.G., Maeda N., Smithies O., Segal S.S., Sessa W.C. - Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:731-736.
83. Moroi M., Zhang L., Yasuda T., Virmani R., Gold H.K., Fishman M.C., Huang P.L. - Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:1225-1232.
84. Lee T.C., Zhao Y.D., Courtman D.W., Stewart D.J. - Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2000; 101:2345-2348.
85. Nordhaug D., Steensrud T., Aghajani E., Korvald C., Myrnes T. - Nitric oxide synthase inhibition impairs myocardial efficiency and ventriculo-arterial matching in acute ischemic heart failure. *Eur. J. Heart. Fail.* 2004; 6:705-713.
86. Zhang F., White J.C., Iadecola C. - Nitric oxide donors increase blood flow and reduce brain damage in focal ischemia: evidence that nitric oxide is beneficial in the early stages of cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994; 14:217-226.
87. Moro M.A., Cardenas A., Hurtado O., Leza J.C., Lizasoain I. - Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell. Calcium.* 2004; 36:265-275.
88. Leeson C.P., Hingorani A.D., Mullen M.J., Jeerooburkhan N., Kattenhorn M., Cole T.J., Muller D.P., Lucas A., Humphries S.E., Deanfield J.E. - Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function. *Circ. Res.* 2002; 90:1153-1158.
89. Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. - Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1990; 87:10043-10047.
90. Eto M., Barandier C., Rathgeb L., Kozai T., Joch H., Wang Z., Luscher T.F. - Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ. Res.* 2001; 89:583-90.
91. Rentrop K.P. - Thrombi in acute coronary syndromes: revisited and revised. *Circulation.* 2000; 101:1619-1626.
92. Petros A., Bennett D., Vallance P. - Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338:1557-1558.
93. Vane J.R., Anggard E.E., Botting R.M. - Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323:27-36.
94. Ng K.K., Vane J.R. - Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 1967; 216:762-766.
95. Berk B.C., Alexander R.W., Brock T.A., Gimbrone M.A. Jr., Webb R.C. - Vasoconstriction: a new activity for platelets derived growth factor. *Science* 1986; 232:87-90.
132. Yan C., Kim D., Aizawa T., Berk B.C. - Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide. Cyclic GMP as a key

- mediator. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:26-36.
97. Turner A.J., Tanzawa K. - Mammalian membrane metalloproteinases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* 1997; 11:355-364.
98. Kiowski W., Lüscher T.F., Linder L., Bühler F.R. - Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 1991; 83:469-475.
99. Wagner O.F., Christ G., Wojta J., Vierhapper H., Parzer S., Nowotny P.J., Schneider B., Waldhausl W., Binder B.R. - Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:16066-16068.
100. Verhaar M.C., Strachan F.E., Newby D.E., Cruden N.L., Koomans H.A., Rabelink T.J., Webb D.J. - Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation.* 1998; 97:752-756.
101. McCabe C., Hicks M.N., Kane K.A., Wainwright C.C. - Electrophysiological and haemodynamic effects of endothelin ETA and ETB receptors in normal and ischaemic working rabbit hearts. *Br. J. Pharmacol.* 2005; 146:118-128.
102. Schiffrin E.L. - Vascular endothelin in hypertension. *Vasc. Pharmacol.* 2005; 413:19-29.
103. Goerre S., Wenk M., Bärtsch P., Lüscher T.F., Niroomand S., Hohernhaus H., Oelz O., Reinhart W.H. - Endothelin-1 in pulmonary hypertension associated with high altitude. *Circulation* 1995; 91:359-364.
104. Minamino T., Kurihara H., Takahashi M., Shimada K., Maemura K., Oda H., Ishikawa T., Uchiyama T., Tanzawa K., Yasaki Y. - Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1997; 95:221-230.
105. Quehenberger P., Exner M., Sunder-Plassmann R., Ruzicka K., Bieglmayer C., Endler G., Muellner C., Speiser W., Wagner O. - Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ. Res.* 2002; 90:711-718.
106. Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., Nakanishi S. - Cloning and expression of a cDNA encoding and endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:730-732.
107. Davie N., Haleen S.J., Upton P.D., Polak J.M., Yaxoub M.H., Morrell N.W., Wharton J. - ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2002; 165:398-405.
108. Lüscher T.F., Yang Z., Tschudi M., Von S.L., Stulz P., Boulanger C., Siebenmann R., Turina M., Bühler F.R. - Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ. Res.* 1990; 66:1088-1094.
109. Bacon C.R., Davenport A.P. - Endothelin receptors in human coronary artery and aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 117:986-992.
110. Lüscher T.F. - Do we need endothelium antagonists? *Cardiovasc. Res.* 1993; 27:2089-2093.
111. Best P.J., McKenna C.J., Hasdai D., Holmes D.R.Jr., Lerman A. - Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation.* 1999; 99:1747-1752.
112. Herrmann J., Best P.J., Ritman E.L., Holmes D.R., Lerman L.O., Lerman A. - Chronic endothelin receptor antagonism prevents coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39:1555-1561.
113. McKenna C.J., Burke S.E., Oppenorth T.J., Padley R.J., Camrud L.J., Camrud A.R., Johnson J., Carlson P.J., Lerman A., Holmes D.R.Jr., Schwartz R.S. - Selective ET(A) receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation* 1998; 97:2551-2556.
114. Battistini B., Chailer P., D'Orleans-Juste P., Briere B., Sirois P. - Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides.* 1993;14: 385-399.
115. Zeiher A.M., Goebel H., Schachinger V., Ihling C. - Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque: a clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 1995; 91:941-947.
116. Lerman A., Edwards B.S., Hallett J.W., Heublein D.M., Sandberg S.M., Burnett J.J. - Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325:997-1001.
117. Sutherland A.J., Nataatmadja M.I., Walker P.J., Cuttle L., Garlik R.B., West M.J. - Vascular remodeling in the internal mammary artery graft and association with in situ endothelin-1 and receptor expression. *Circulation* 2006; 113:1180-1188.
118. Gossli M., Lerman A. - Endothelin: beyond a vasoconstrictor. *Circulation.* 2006; 113:1156-1158.
119. Ames R.B., e 26 Cols. - Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the uphan receptor GRR 14. *Nature* 1999; 401:282-286.
120. Conlon J.M., Yano K., Waugh D., Hazon N. - Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *J. Exp. Zool.* 1996; 275:226-238.
121. Coulouarn Y., Lihrmann I., Jegou S., Anouar Y., Tostivint H., Beauvillain J.C., Conlon J.M., Bern H.A., Vaudry H. - Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:15803-15808.