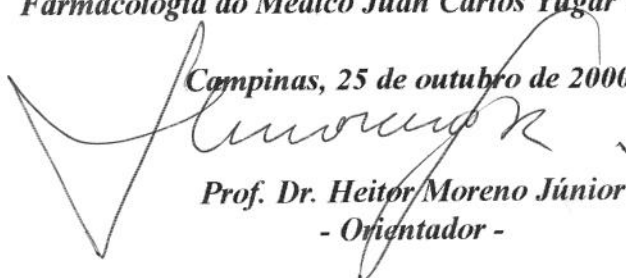


JUAN CARLOS YUGAR TOLEDO

***ESTUDO COMPARATIVO DA REATIVIDADE
VASCULAR EM TABAGISTAS, DIABÉTICOS E
HIPERTENSOS***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Médico Juan Carlos Yugar Toledo.

Campinas, 25 de outubro de 2000.



**Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior
- Orientador -**

JUAN CARLOS YUGAR TOLEDO

**ESTUDO COMPARATIVO DA REATIVIDADE
VASCULAR EM TABAGISTAS, DIABÉTICOS E
HIPERTENSOS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

CAMPINAS

2000

UNIDADE	30
N.º CHAMADA	TI UNICAMP
	Y9e
V.	Ex.
TOMBO BC	44093
PROC.	16-39210.1
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	25/04/01
N.º CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM-00154694-3

Y9e

Yugar Toledo, Juan Carlos

Estudo comparativo da reatividade vascular em tabagistas, diabéticos e hipertensos / Juan Carlos Yugar Toledo. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Heitor Moreno Júnior

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertensão. 2. Óxido Nítrico. 3. Endotélio. I. Heitor Moreno Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Membros:

1. Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

2. Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho

3. Prof. Dr. Francisco Antônio Helfenstein Fonseca

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/10/2000

DEDICATÓRIA

*À minha esposa, Lúcia Helena e às minhas
filhas Vivian e Lara pelo carinho, apoio e
compreensão incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior, cientista que personifica o ‘mestre-amigo’, pelo legado de dedicação, honestidade, perseverança e seriedade na pesquisa médica, que brilhantemente nos orientou para encontrar o caminho da pesquisa científica, que o tempo, havia apagado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus-Santos, pela amizade, colaboração, incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela atenção, apoio, estímulo e colaboração técnica.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pelos ensinamentos e apoio científico.

Aos colegas amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Joaquim Francisco do Prado, Wladimir Gordo, Maria Ondina Chaud, Maricene Sahba, Máira Cittadino, Márcio G. Souza, Valéria Cristina T. Frigatto, Gisele Abraços M. Dias, Deise Barbieri, Raquel Alves de Souza Araújo e Rita C. Sampaio, por terem colaborado, pela convivência amigável e produtiva, pelas valiosas sugestões e ajuda em vários aspectos teóricos e práticos deste estudo.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Farmacologia da FCM/UNICAMP.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FCM/UNICAMP.

Ao Dr. Antônio Barbosa de Oliveira e à Prof. Dra. Maria Tercília Vilela Azeredo de Oliveira pelo incentivo, apoio e ajuda científica inestimável na finalização deste trabalho.

À minha irmã, Livia A Toledo Yugar, pelo apoio, incentivo e colaboração na execução e mensuração dos exames vasculares.

Aos meus pais, Juan Yugar Lopez e Aida Toledo de Yugar, pelo incentivo e por acreditarem nos meus ideais.

Ao meu irmão Ivan Ramiro e às minhas irmãs Tânia, Lina e Mila pelo carinho, incentivo e apoio inestimáveis.

À memória da minha querida avó, Antonia Lopes v. de Yugar, por me ensinar a lutar sem parar, até conseguir os objetivos, sem desistir jamais.

Ao meu cunhado Luiz César B. Tácito pela incansável e imprescindível ajuda.

Ao laboratório de análises clínicas Laborclin, ao Dr. Daher Nassib Daher, ao Dr. João Batista Furquim e à incansável amiga Gisele Soler Orlandi, pelo apoio, e incentivo na realização dos exames.

Às secretárias e aos secretários da SCPG do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela atenção, gentileza e eficiência.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Fatores de risco para doença cardiovascular.....	27
1.2. Principais fatores de risco modificáveis para doença arterial coronariana.	28
1.2.1. Tabagismo.....	28
1.2.2. Diabetes melito.....	29
1.2.3. Hipertensão arterial.....	30
1.3. Aterosclerose - teoria da lesão endotelial.....	30
1.4. Funções do endotélio vascular.....	31
1.5. Modulação do tono vascular e principais substâncias vasoativas.....	34
1.5.1. Vasodilatação dependente do endotélio.....	34
1.5.1.1. Óxido nítrico.....	34
1.5.1.2. Prostaciclina.....	38
1.5.1.3. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio.....	38
1.5.2. Vasoconstrição dependente do endotélio.....	39
1.5.2.1. Tromboxano A ₂	39
1.5.2.2. Endotelina-1	40
1.6. Vasodilatação mediada pelo fluxo.....	41
1.7. Disfunção endotelial.....	46
1.8. Avaliação da disfunção endotelial.....	46
1.9. Relação entre alterações da reatividade vascular e mediadores vasoativos.....	47

2. OBJETIVOS.....	49
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	53
3.1. Comitê de etica em pesquisa.....	55
3.2. Seleção de voluntários.....	55
3.2.1. Grupos de voluntários.....	55
Grupo 1 – Controle.....	55
Grupo 2 – Tabagistas.....	55
Grupo 3 - Diabéticos tipo 2 não-compensados.....	55
Grupo 4 - Hipertensos não-controlados.....	55
3.2.2. Critérios de exclusão.....	56
3.2.3. Avaliação clínica.....	56
3.2.4. Exames laboratoriais complementares.....	57
3.2.4.1. Glicemia em jejum e hemoglobina glicosilada.....	57
3.2.4.2. Perfil lipídico.....	57
3.2.4.3. Função renal.....	57
3.2.4.4. Hematócrito e hemoglobina.....	57
3.2.4.5. Transferases e função hepática1.....	58
3.3. Protocolo de pesquisa.....	58
3.3.1. Vasodilatação mediada pelo fluxo (hiperemia reativa).....	58
3.3.2. Coleta de amostras e métodos analíticos.....	61
3.3.2.1. Nitritos e nitratos.....	62
3.3.2.2. Tromboxano B ₂	62
3.3.2.3. GMP cíclico.....	63
3.4. Análise de resultados.....	64
3.5. Estudo estatístico.....	64
3.5.1. Estatística paramétrica.....	64

3.5.2. Estatística descritiva.....	65
4. RESULTADOS.....	67
4.1. Perfil clínico.....	69
4.2. Perfil bioquímico.....	70
4.3. Reatividade vascular.....	71
4.3.1. Variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial – dilatação mediada pelo (fluxo).....	71
4.3.2. Variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina).....	71
4.3.3. Variação percentual do fluxo da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial).....	72
4.3.4. Variação percentual do fluxo da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina).....	72
4.3.5. Concentrações plasmáticas de nitritos e nitratos.....	75
4.3.6. Concentrações plasmáticas de tromboxano B ₂	75
4.3.7. Concentrações plasmáticas de GMP cíclico.....	75
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	85
7. SUMMARY.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
9. ANEXOS.....	113

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
Ach	acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
bpm	batimentos por minuto
COX	ciclooxigenase
DP	desvio-padrão
ECA	enzima conversora de angiotensina I
ECE	enzima conversora de endotelina-1
EDCF	fator constritor derivado do endotélio
EDTA	ácido etil-diamino-tetra-acético
EDRF	fator relaxante derivado do endotélio
EPM	erro -padrão da média
ET-A	receptor A de endotelina-1
ET-B	receptor B de endotelina-1
ET-1	endotelina-1
EET	ácido epoxi-eicosa-trienólico
FC	frequência cardíaca
FMD	dilatação mediada pelo fluxo
GMPC	guanosina monofosfato cíclico
HB	tetra-hidrobiopterina
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDRF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LDL	lipoproteína de baixa densidade
NO	óxido nítrico
NO²⁻ / NO³⁻	nitritos/nitratos
NTG	nitroglicerina
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PGI₂	prostaciclina
TX-A₂	tromboxano A ₂
TX-B₂	tromboxano B ₂
VLDL	lipoproteína de muita baixa densidade

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Características clínicas dos quatro grupos experimentais estudados.....	69
Tabela 2: Valores bioquímicos dos quatro grupos experimentais estudados...	70
Tabela 3: Variação percentual do diâmetro e do fluxo da artéria braquial.....	72
Tabela 4: Concentrações plasmáticas de nitritos e nitratos, tromboxano B ₂ e GMP cíclico.....	75

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Esquema representativo da ativação endotelial por estímulos bioquímicos e biomecânicos.....	42
Figura 2: Vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta normal.....	44
Figura 3: Vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta deprimida.....	45
Figura 4: Protocolo de pesquisa.....	61
Figura 5: Distribuição da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial dilatação mediada pelo fluxo).....	73
Figura 6: Distribuição da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós- estímulo farmacológico (nitroglicerina sublingual).....	74

RESUMO

O tabagismo, o diabetes melito e a hipertensão arterial são reconhecidos como importantes fatores de risco para aterosclerose e doença cardiovascular precoce. Tabagistas de grau importante, diabéticos não-compensados e hipertensos não-controlados, neste estudo, mostraram reduzida vasodilatação arterial como resultado de disfunção endotelial.

Avaliou-se o diâmetro e o fluxo da artéria braquial em resposta ao estímulo mecânico (dependente do endotélio) e farmacológico, pós-nitroglicerina (não-dependente do endotélio), em indivíduos saudáveis, tabagistas, diabéticos não-insulino-dependentes (tipo 2) não-compensados e hipertensos essenciais não-controlados. Níveis plasmáticos de nitritos/nitratos, GMPc e tromboxano B₂ foram quantificados.

Sessenta pacientes (34M e 26F), com idade entre 22 e 65 anos ($x=48.3$) foram alocados em quatro grupos: 1) Controle: $n=15$; 2) Tabagistas de grau importante (maior que 20 cigarros por dia): $n=15$; 3) Diabéticos não-insulino-dependentes não-compensados (glicemia $>140\text{mg/dl}$ e hemoglobina glicosilada maior que 8.0%): $n=15$; 4) Hipertensos essenciais não-controlados: $n=15$.

O diâmetro da artéria braquial foi mensurado pela técnica de ultra-sonografia de alta resolução antes e após hiperemia reativa e administração de nitroglicerina sublingual.

Tabagistas de grau importante, diabéticos tipo 2 não-compensados e hipertensos essenciais não-controlados mostraram reduzida vasodilatação dependente do endotélio ($8.0\pm2.5\%$, $5.7\pm2.5\%$ e $7.2\pm3.3\%$, respectivamente) comparados ao grupo-controle ($12.0\pm3.3\%$) ($P<0.001$). Tabagistas tiveram uma resposta não-dependente do endotélio normal comparada ao grupo controle ($25.0\pm78.3\%$ vs $25.5\pm9.2\%$). Diabéticos tipo 2 não-compensados e hipertensos essenciais não-controlados tiveram reduzida resposta não-dependente do endotélio ($17.2\pm6.8\%$ e $16.9\pm6.9\%$, respectivamente) comparados ao grupo controle ($25.59.2\%$) ($P<0.005$). Os níveis de GMPc e tromboxano B₂ não mostraram diferença nos quatro grupos, mas as concentrações de nitritos/nitratos estavam aumentadas em diabéticos, se comparados ao grupo-controle ($266\pm47\mu\text{M}$ vs $125\pm22\mu\text{M}$) ($P<0.005$).

Diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio foi semelhante em tabagistas, diabéticos tipo 2 não-compensados e hipertensos essenciais não-controlados, mas somente os tabagistas tiveram resposta não- dependente endotélio normal.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares passaram a ser reconhecidas como principal causa de morbidade e mortalidade nos países ocidentais a partir da década de 40. Atualmente, nos Estados Unidos, aproximadamente um milhão de mortes por ano são atribuídas a doenças cardiovasculares (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 1995). Dessas, 51% são provocadas por doença arterial coronariana (DAC), 27% são devido a outras doenças cardíacas, incluindo a insuficiência cardíaca (ICC), 16% ocasionadas por acidente vascular cerebral (AVC), 4% por doenças vasculares periféricas e os 2% restantes por outras situações mórbidas associadas à doença cardiovascular.

1.1. FATORES DE RISCO PARA DOENÇA CARDIOVASCULAR

Os estudos epidemiológicos prospectivos, realizados nas décadas de 40 e 50, na Europa e nos Estados Unidos, desenvolveram o conceito de fatores de risco e suas relações com a incidência de doença arterial coronariana (DAC) aterosclerótica (KANNEL, MCGEE, GORDON, 1976; KANNEL, CASTELLI, GORDON, 1979; CARLSON & BOTTINGER, 1985).

Esses estudos demonstraram, em indivíduos aparentemente saudáveis, a associação entre as características observadas, em dado momento, e a incidência futura de doença arterial coronariana (DAC) aterosclerótica. As características encontradas foram divididas em fatores de risco não-modificáveis, tais como: idade, sexo e antecedente familiar de doença arterial coronariana; e modificáveis, como: tabagismo, diabetes melito, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, obesidade, e sedentarismo; outros como aumento de Lp(a), hiperhomocisteinemia, aumento de fibrinogênio plasmático, menopausa e estresse também estão associados à incidência futura de DAC (AUERBACH, HAMMOND, GARFINKEL, 1965; HJERMAN *et al.*, 1981; KANNEL, 1981; RUDERMAN & HAUNDENSCHILD, 1984; KANNEL, 1987; DZAU, 1990; GIANINI, 1992).

1.2. PRINCIPAIS FATORES DE RISCO MODIFICÁVEIS PARA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

1.2.1. Tabagismo

As relações entre tabagismo e aumento da mortalidade por doença cardiovascular são consistentes e inequivocamente demonstradas (SHERMAN, 1991; FIORE, 1992; PETO *et al.*, 1992). Sendo a incidência de eventos cardiovasculares 1,36 a 2,76 vezes maior entre fumantes (Mc BRIDE, 1992), sabe-se, ainda, que o risco para doença aterosclerótica cardiovascular entre fumantes se relaciona com o número de cigarros consumidos por dia (MILEI & GRANA, 1998).

O aumento da mortalidade entre tabagistas correlaciona-se ao início do hábito, sendo maior quanto mais precocemente se começa a fumar (GOTTLIEB *et al.*, 1994). A incidência de infarto do miocárdio não fatal é cinco vezes mais freqüente entre tabagistas na faixa etária de 30 a 49 anos, três vezes mais freqüente na faixa etária de 50 a 69 anos e duas vezes maior na faixa etária de 60 a 79 anos quando comparada aos não tabagistas. Entre os tabagistas, 80% dos infartos do miocárdio, na faixa etária de 30 a 49 anos, foram relacionados ao tabagismo; aproximadamente, 66%, na faixa etária de 50 a 69 anos, e 50%, nos indivíduos entre 60 e 79 anos, também o foram (PARISH *et al.*, 1995).

O tabagismo também exerce efeitos adversos sobre o metabolismo lipídico, principalmente nos tabagistas de grau importante (>25 cigarros por dia), diminuindo o HDL colesterol e aumentando o LDL colesterol e triglicérides, além de promover aumento do fibrinogênio e do tromboxano A₂ (NOWAK *et al.*, 1987; MEADE, IMESON, STIRLING, 1987; MJOS, 1988).

Estudos epidemiológicos indicam que o tabagismo aumenta o risco de infarto do miocárdio e de morte súbita mais do que de angina, observação atribuída à predisposição à trombose e não à gravidade hemodinâmica da lesão aterosclerótica (KANNEL, D'AGOSTINO, BELANGER, 1987). As mulheres tabagistas, quando comparadas às não tabagistas, na faixa etária de 30 a 49 anos, também são mais suscetíveis aos efeitos deletérios do tabagismo, alcançando índices de risco relativo para infarto do

miocárdio, 1,8 vezes maiores entre fumantes de até 15 cigarros por dia e 6,9 vezes maiores em tabagistas de grau importante (> 35 cigarros por dia). Por outro lado, a gravidade das lesões coronarianas estenóticas e a incidência de infarto são discrepantes, sugerindo mecanismos não aterogênicos, envolvidos na etiologia do infarto agudo do miocárdio de mulheres tabagistas de grau importante (ROSENBERG *et al.*, 1980; FREEDMAN *et al.*, 1989; DUNN *et al.*, 1999).

Há evidências incontestáveis de que a exposição ambiental passiva à fumaça do tabaco promove discreto aumento da mortalidade por doença cardiovascular em indivíduos não tabagistas (STEENLAND, 1992; STANTON, GANTZ, PARMLEY, 1995; KRITZ, SCHMID, SINZINGER, 1995; HE *et al.*, 1999).

1.2.2. Diabetes melito

O diabetes melito é um fator de risco independente para doença aterosclerótica cardiovascular, aumentando em duas vezes o risco de doença coronariana entre homens e três vezes entre mulheres com maior incidência de insuficiência cardíaca e alta mortalidade neste grupo. Enquanto isso, em homens, há maior ocorrência de infarto silencioso (KANNEL, 1985; BARRET-CONNOR, 1997; ECKERL, 1999). Adultos diabéticos tipo 2 têm também níveis baixos de HDL colesterol e taxas altas de VLDL colesterol e triglicérides com LDL colesterol normal ou discretamente aumentados. Também a coexistência de hipertensão arterial agrava a exposição aos fatores de risco, e a hiperinsulinemia endógena presente entre diabéticos do tipo 2 potencializa o risco de doença vascular aterosclerótica (KANNEL & MC GEE, 1979; EASTMAN & KEEN, 1997; TURNER *et al.*, 1998; STERN, 1999; STEINER, 1999; SOWERS & LESTER, 1999). Várias publicações e estudos epidemiológicos e clínicos atribuem à hiperinsulinemia e à resistência à insulina uma maior incidência de coronariopatia e acometimento grave e difuso das artérias coronárias envolvidas (REAVEN, 1988; DESPRÈS *et al.*, 1996; COUTINHO *et al.*, 1999; BRUNZELL & HOKANSON, 1999).

A fisiopatologia da aterogênese no diabetes melito e os efeitos deletérios da hiperglicemia associada à dislipidemia não estão completamente esclarecidos; uma vez que ambas são doenças multifatoriais, mais estudos são necessários para identificar os fatores que levam à doença vascular acelerada em diabéticos.

1.2.3. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é o maior fator de risco independente relacionado à doença cardiovascular (MULTIPLE RISK FACTOR INTERVENTION TRIAL RESEARCH GROUP, 1990; KANNEL, 1993) por promover complicações diretas, as chamadas complicações mecânicas, que incluem o acidente vascular cerebral hemorrágico, a hipertrofia ventricular esquerda, a nefroesclerose e o aneurisma dissecante de aorta torácica além de promover também complicações indiretas relacionadas à aterosclerose responsável pela doença arterial coronariana obstrutiva, pela doença vascular cerebral isquêmica e pela doença arterial obstrutiva de carótidas e extremidades, responsáveis pela alta morbidade e mortalidade cardiovascular delas decorrentes. Tanto a hipertensão arterial sistólica como a diastólica, lábil ou fixa em qualquer faixa etária de ambos os sexos, está associada à elevada incidência de doença arterial coronariana: três vezes maior do que em adultos normotensos da mesma faixa etária (KANNEL, 1999).

1.3. ATEROSCLEROSE - TEORIA DA LESÃO ENDOTELIAL

A aterosclerose é uma doença das artérias elásticas (aorta, carótidas e ilíacas) e das artérias musculares calibrosas e médias (coronárias, poplíteas, etc.). A lesão básica – o ateroma ou placa fibro-gordurosa – consiste em uma placa focal elevada no interior da íntima que possui um núcleo lipídico (principalmente ésteres de colesterol) e uma capa fibrosa que o recobre. Este processo patológico e progressivo inicia-se geralmente na infância e produz manifestações clínicas na vida adulta.

As publicações iniciais de ROSS E GLOMSET (1976a, b) já formulavam a hipótese da teoria da lesão intimal da aterosclerose, propondo que, de alguma forma a lesão crônica levaria à desnudação repetitiva, ou à ulceração da íntima pela exposição a fatores de risco, como a hipercolesterolemia, o tabagismo e outros. Esses últimos seriam responsáveis pela ativação de plaquetas e liberação de fatores de crescimento que finalmente resultariam em hiperplasia intimal, acúmulo lipídico e formação de lesões ateroscleróticas (ROSS, 1981; ROSS *et al.*, 1984; ROSS, 1993).

Esse mecanismo hipotético foi reformulado pelos mesmos autores e, atualmente, combina conhecimentos de biologia celular e molecular, convergindo para a denominada disfunção endotelial como a base do mecanismo fisiopatogênico da doença aterosclerótica cardiovascular. Ele leva em consideração que a camada endotelial não constitui somente uma simples barreira mecânica, mas sim uma membrana semipermeável, multifuncional, versátil com inúmeras propriedades metabólicas e sintéticas, participando ativamente na homeostase da parede vascular e da função circulatória (ROSS, 1993; BERLINER *et al.*, 1995).

1.4. FUNÇÕES DO ENDOTÉLIO VASCULAR

Os vasos sanguíneos estão revestidos internamente por uma camada tênue de células denominado 'endotélio'. Esta membrana constitui um verdadeiro órgão multifuncional, essencial para fisiologia vascular normal, pois, quando disfuncionante, passa a ser um fator crítico na fisiopatogenia da doença vascular (SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1986; VANE, ANGGARD, BOTTING, 1990).

Anatomicamente o endotélio delimita a área de separação física do compartimento intravascular dos demais tecidos e órgãos do corpo humano.

Biologicamente esta interface executa um considerável número de funções vitais (LAURINDO, LUZ, PILEGGI, 1994; VOGEL, 1997; LUSCHER & BARTON, 1997; GIMBRONE & TOPPER, 1999). Entre elas:

a) Barreira de permeabilidade seletiva e regulação do transporte de pequenas moléculas. Macromoléculas encontram especializações regionais do endotélio incluindo glicocálix de superfície celular, complexos juncionais, microvesículas, canais transcelulares e matriz extracelular que aumentam ou retardam o movimento dessas moléculas por meio do espaço intravascular ou para ele. O aumento da permeabilidade de macromoléculas plasmáticas que ocorre na inflamação aguda, e o das lipoproteínas, faz parte importante do desenvolvimento da lesão aterosclerótica;

b) Capacidade de monitoração, integração e tradução de sinalizações através da expressão dos receptores de superfície para várias citocinas, interleucinas 1α e 1β , (IL- 1α , e IL- 1β), fator de necrose tumoral α (TNF α), interferon γ (IFN γ), fator transformador do crescimento β (TGF β), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator endotelial de crescimento vascular (VGEF), fator de permeabilidade vascular, e outros, como a insulina e os fatores tipo insulina, ou ainda os produtos bacterianos como as endotoxinas e suas proteínas de ligação que regulam importantes respostas teciduais. Em cada sítio do sistema circulatório, há diferente sensibilidade e diferente responsividade a estímulos fisiopatológicos locais que podem propagar-se transmuralmente da camada íntima para outros locais como a parede das grandes artérias, ou a partir da superfície luminal capilar diretamente para o interstício e/ou tecidos adjacentes como o miocárdio. Essa sensibilidade e as funções de tradução estendem-se, além do clássico estímulo humoral, à biotransdução de diferentes tipos de estimulação mecânica, como as forças geradas pelo fluxo sanguíneo pulsátil (“shear stress”, pressão transmural e estresse circunferencial parietal);

c) Produção de diversas substâncias biologicamente ativas, incluindo mediadores lipídicos, citocinas, fatores de crescimento, já citados, e outras substâncias semelhantes a hormônios, muitas das quais servem como importantes moléculas efetoras, pois influenciam o comportamento de múltiplas células e tecidos. Algumas ações ocorrem na célula de origem (regulação autócrina), enquanto outras agem nas células adjacentes (regulação parácrina), finalmente podem ser secretadas na circulação e agir à distância como verdadeiros hormônios (regulação endócrina);

d) Propriedade antitrombótica mediada pela síntese de óxido nítrico, inibindo a agregação, a adesão e a ativação plaquetária;

e) Interação com sistemas fibrinolíticos; e capacidade de produzir substâncias trombogênicas, como fatores da coagulação, moléculas de adesão, inibidor do ativador do plasminogênio e tromboxano A₂ (WU & THIAGARAJAN, 1996; WU, 1996);

f) Inibição da proliferação celular da musculatura lisa vascular impedindo a migração de células musculares lisas através de mecanismos diretos, como a síntese de óxido nítrico, que inibe a proliferação celular, e/ou indiretos (ação plaquetária), ou ainda, secretando fatores de crescimento e outras citocinas capazes de exercer controle autócrino, e /ou parácrino da multiplicação celular (WU, 1996; MATTSEN, KOHLER, VERGIL, 1996);

g) Regulador de vários fenômenos da resposta imunológica, por meio da contração ativa, atividade fagocitária (inclusive bactérias), controle do extravasamento de plasma, da expressão de integrinas, moléculas de adesão e secreção de citocinas, permitindo a migração de monócitos, linfócitos e neutrófilos. (KUBES, SUZUKI, GRANGER, 1991; DE CATERINA, LIBBY, PENG, 1995; WALPOLA *et al.*, 1995);

h) Participação na degradação e na transformação metabólica de numerosos fármacos endógenos, como norepinefrina, 5-hidroxitriptamina, prostaglandinas E e F, leucotrienos, nucleotídeos de adenina, adenosina e outros. A enzima conversora da angiotensina está presente no endotélio de vários órgãos, que, além de exercer atividade de conversão de angiotensina I em angiotensina II, atua também na degradação do peptídeo vasodilatador bradicinina pela cininase II, enzima idêntica à enzima conversora da angiotensina. A bradicinina é um indutor da liberação endotelial de óxido nítrico e prostaciclina; fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio. Finalmente, a enzima conversora da endotelina (ECE), presente na superfície endotelial, produz, principalmente, um potente vasoconstritor, a endotelina-1 (ET-1), por ação catalítica sobre a *big*-endotelina-1.

1.5. MODULAÇÃO DO TONO VASCULAR E PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS VASOATIVAS

O tono vascular, além de possuir mecanismos de controle centrais e periféricos, apresenta ainda o mecanismo endotelial, cuja potência é superior às anteriores (BASSENGE & MÜNZEL, 1988).

O mecanismo vasodilatador endotelial é mediado por substâncias vasoativas, principalmente pelo óxido nítrico (NO, antagonista fisiológico de substâncias vasoconstritoras endógenas como catecolaminas, angiotensina II e endotelina-1), também pela prostaciclina, bradicinina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), metabólitos das monoxigenases e outras (FURCHGOTT & ZADAWSKI, 1980; PALMER, FERRIGE, MONCADA, 1987; MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991; COOKE & DZAU, 1997b e a).

1.5.1. Vasodilatação dependente do endotélio

1.5.1.1. Óxido nítrico

Uma substância não prostanóide, lábil e difusível, mediadora do relaxamento dependente do endotélio, descrita por FURCHGOTT E ZAWADZKI (1980); identificada como óxido nítrico (NO), é formada a partir do nitrogênio-guanidino terminal do amino-ácido L-arginina, pela enzima NO sintase endotelial (eNOS) que é constitutiva (NO sintase III) na célula endotelial.

A ativação da eNOS depende da concentração intracelular de íons cálcio nas células endoteliais e é também calmodulina-dependente requerendo nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e 5,6,7,8 hidrobiopterina (HB) para ótima atividade. A enzima pode ser inibida de forma competitiva por análogos da L-arginina, como L-NMMA e L-NAME. O NO difunde-se em direção às células musculares lisas vasculares e as relaxa pela estimulação da enzima citosólica guanilato ciclase solúvel, que leva a aumento do GMP cíclico (MURAD, 1994; IGNARRO & MURAD, 1995; MURAD,

1996). O aumento de GMP cíclico, cuja ação nos tecidos de mamíferos é mediada principalmente pela ativação da proteína quinase G, diminui o influxo de cálcio para o citoplasma e aumenta a captação em nível $\text{Ca}^{++}/\text{ATPase}$ pelo retículo sarcoplasmático ou por interação direta em nível de proteínas contráteis.

Adicionalmente, o NO pode causar relaxamento muscular por interação com canais de potássio diretamente ou através do aumento de GMP cíclico; e também regula a produção de endotelina-1 nas células endoteliais, efeito mediado pelo aumento de GMP cíclico e também observado com o peptídeo natriurético atrial. O NO pode, também, regular o tono vascular através de interações complexas com hemoglobina proveniente dos glóbulos vermelhos, glutathione e pequenos grupos tióis.

A produção de NO é a maior contribuinte do relaxamento dependente do endotélio, em grandes artérias isoladas, incluindo as coronárias, artérias mesentéricas, pulmonares e cerebrais. Seu significado *in vivo* é sugerido pelas observações de que os inibidores da eNOS causam vasoconstrição em muitos leitos vasculares e um aumento da pressão arterial sistêmica em animais e humanos (DATILO & MAKHOUL, 1997; ZATZ & BAYLIS, 1998).

As células endoteliais liberam NO, não somente em direção à camada de células musculares lisas, como também, para o lúmen do vaso sangüíneo. O NO também inibe a adesão de plaquetas e leucócitos ao endotélio, tem ação inibitória na agregação plaquetária (sinergicamente com a prostaciclina), inibe a proliferação de células musculares lisas e modula a produção de moléculas de adesão e endotelina-1.

A liberação de NO é modulada por estímulos físicos e humorais. Entre os estímulos físicos cita-se a pressão hidrostática transmural, o estiramento circunferencial e o "shear stress", força de cisalhamento produzida pelo atrito da onda de fluxo sangüíneo na parede arterial, considerado, atualmente, um dos principais fatores reguladores da liberação local de NO, indicando que a dilatação induzida pelo fluxo é dependente do endotélio *in vivo* (GIMBRONE, NAGEL, TOPPER, 1997; TRAUB & BERK, 1998).

As substâncias endógenas que estimulam a liberação de NO são hormônios circulantes, como catecolaminas e vasopressina, autacóides como a bradicinina e a histamina ou ainda, mediadores liberados pelas plaquetas (serotonina e adenosina difosfato - ADP) ou formados durante a coagulação (trombina) (KIELY, *et al.*, 1995).

Os receptores para essas substâncias estão ligados à produção de NO por diferentes proteínas de acoplamento. Por exemplo, em células endoteliais porcinas, receptores alfa-adrenérgicos, serotoninérgicos e receptores de trombina estão acoplados às proteínas G toxina *pertussis*-sensíveis, enquanto receptores para ADP ou bradicinina são mediadores da produção de NO via ativação da proteína G toxina *pertussis* não-sensível (FLAVAHAN & VANHOUTTE, 1995). As substâncias, produzidas durante agregação plaquetária com liberação de serotonina, ADP e trombina, são igualmente importantes liberadoras de NO, o qual se difunde para camada de células musculares lisas, induzindo seu relaxamento e, ocasionando, assim, dilatação da artéria. Desta forma essa reação ajuda a eliminar os microagregados (VANHOUTTE, 1999).

A liberação de NO para o lúmen vascular também inibe a adesividade plaquetária na interface sangue-endotélio e, em sinergismo com a prostaciclina, elimina o iminente perigo da oclusão vascular. Se a barreira endotelial for removida, não há mais inibição da agregação plaquetária pelo NO, e a agregação plaquetária progride com a liberação de serotonina e tromboxano A₂. Além disso, a constrição dos vasos sangüíneos é constitutiva da fase vascular da hemostasia (VANHOUTTE, 1993).

A manutenção basal do tono vascular ocorre devido à liberação contínua de NO pelas células endoteliais. Alguns hormônios e drogas que alteram os níveis intracelulares de cálcio podem interferir na sua produção e liberação.

Há mais de um século, doadores de NO, como a nitroglicerina e nitratos de ação prolongada, têm sido usados como vasodilatadores coronarianos, para o tratamento de angina do peito. A nitroglicerina foi descoberta por Ascanio Sobrero, em 1847, sendo a primeira publicação do uso da nitroglicerina feita por William Murrel, em 1876. Anteriormente, o nitrito de amilo havia sido usado para essa finalidade, por Lauder Brunton. A nitroglicerina foi sintetizada inicialmente por Sobrero e, posteriormente,

utilizada por Alfred Nobel na fabricação de munição ao final do século dezenove (ABRAMS, 1999).

Recentes estudos mostraram que doadores de NO possuem ações *in vivo* e *in vitro* semelhantes àsquelas do NO endógeno. Entretanto, a concentração necessária para obter inibição da agregação plaquetária com nitroglicerina *in vitro* é muitas vezes, maior do que aquela necessária para obter o efeito farmacológico *in vivo* (FUNG, CHUNG, BAUER, 1992).

Os doadores de NO em sistemas biológicos podem ser divididos em três grupos, a saber: 1) nitratos orgânicos, como trinitrato de glicerol; 2) nitritos orgânicos, como nitrito de amilo e 3) compostos nitrosos inorgânicos, como nitroprussiato de sódio, sidnoniminas, mosildominas, nitrosotióis e nitroglutationas. Todos esses compostos diferem em suas necessidades de cofatores específicos requeridos para liberar NO.

Os nitratos orgânicos são metabolizados por via enzimática e não enzimática. A atividade da glutathione-S-transferase e as enzimas relacionadas ao citocromo P450 parecem estar envolvidas. Nitratos orgânicos têm mostrado baixa potência na inibição da agregação plaquetária *in vitro*, possivelmente, devido à ausência de metabolização enzimática nas plaquetas, entretanto, apresentam boa potência relaxante da musculatura lisa vascular (LOSCALZO, 1992). Nitritos inorgânicos reagem com grupos tióis disponíveis, formando nitrosotióis que, quando decompostos, liberam NO. Nitroprussiato de sódio libera, espontaneamente, NO por mecanismo desconhecido e é, portanto, um potente vasodilatador com uma meia vida biológica bastante curta (2 min). O principal inconveniente do nitroprussiato de sódio é a formação de tiocianato que parece ser obrigatória para liberação de NO.

Os efeitos biológicos da maioria dos doadores de NO são amplamente conhecidos. Dessa forma, as diferenças estruturais e de metabolismo entre os diferentes doadores de NO explicariam os diferentes efeitos farmacológicos observados com estas drogas, por exemplo, nitratos são predominantemente venodilatadores e reduzem seletivamente a pré-carga, enquanto o nitroprussiato de sódio é um vasodilatador balanceado.

1.5.1.2. Prostaciclina

A prostaciclina, substância vasodilatadora, é um produto da ciclooxigenase e o mais potente inibidor endógeno da agregação plaquetária, além de exercer outras funções sobre a ação dos polimorfonucleares e a ação moduladora das reações imunológicas e da proliferação celular. (WU, 1996; WU & THIAGARAJAN, 1996). Ela interfere também no metabolismo lipídico, mais notoriamente, no metabolismo do colesterol (SCHRÖR, 1997).

Essa substância é sintetizada primariamente nas células endoteliais, em resposta ao “shear stress”, hipóxia e outras condições que também liberam NO.

Prostaciclina causa relaxamento das células musculares lisas, pela ativação da adenilciclase e aumento da produção de AMP cíclico. Em muitos vasos sanguíneos, o relaxamento promovido pela prostaciclina é negligenciável e seu efeito é essencialmente adicional ao do NO. Todavia, as duas substâncias agem sinergicamente para inibir agregação plaquetária (MONCADA & VANE, 1979).

1.5.1.3. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

Estudos eletrofisiológicos, em diversas artérias, incluindo artérias coronárias, demonstraram que acetilcolina (Ach) e outros dilatadores dependentes do endotélio provocam hiperpolarização e relaxamento das fibras musculares lisas, os quais são causados por um fator difusível hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) diferente do NO e da prostaciclina, apesar destas poderem hiperpolarizar células musculares lisas (KOMOZI & VANHOUTTE, 1990; VANHOUTTE, 1996b). A natureza do EDHF permanece especulativa. Em alguns vasos sanguíneos, ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), formados a partir de ácido araquidônico pela ação do citocromo P 450, podem responder como EDHF. A hiperpolarização induzida pela EDHF é mediada pelo aumento do movimento de íons potássio. Os tipos de canais de potássio envolvidos não estão definitivamente estabelecidos, parecendo ser dependentes de cálcio, tais como os canais de potássio ATP.

A contribuição da hiperpolarização para o relaxamento dependente do endotélio varia com a função e o tamanho das artérias, sendo predominante em vasos de resistência. Nas grandes artérias, ambos podem contribuir para o relaxamento dependente do endotélio, mas o papel do NO predomina em circunstâncias normais. Com a participação do EHDF, pode haver relaxamento dependente do endotélio quando a síntese de NO está inibida. Em certos casos, o óxido nítrico exerce um efeito inibitório da hiperpolarização dependente do endotélio (COHEN & VANHOUTTE, 1995).

Outros fatores, tais como estrógenos, exercício físico e ácidos graxos presentes na dieta também podem modular a liberação de fatores relaxantes pelas células endoteliais (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1997).

1.5.2. Vasoconstrição dependente do endotélio

Células endoteliais também podem iniciar a contração da camada de células musculares lisas pela liberação de substâncias vasoconstritoras (EDCF). Os EDCFs incluem o peptídeo endotelina-1, prostanóides vasoconstritores, como tromboxano A₂ e prostaglandina H₂, ou ainda ânions superóxidos e componentes do sistema renina-angiotensina.

1.5.2.1. Tromboxano A₂

Um grupo de fatores constritores derivados do endotélio é gerado pelo metabolismo do ácido araquidônico (AA), envolvendo as ciclooxigenases (HAMBERG, SVENSSON, SAMUELSSON, 1975). Nas veias periféricas, na circulação cerebral e em algumas artérias de animais hipertensos, a constrição dependente do endotélio é mediada pelo tromboxano A₂, pela ativação do receptor tromboxano-endoperóxido (MEHTA & ROBERTS 1983). Entre os estímulos que causam vasoconstrição dependente do endotélio, sensíveis aos inibidores da ciclooxigenase; cita-se a resposta fisiológica ao estiramento circunferencial, iniciada pela distensão súbita da parede vascular, em resposta a um

aumento da pressão sanguínea, e a liberação de fatores vasoconstritores derivados do endotélio. Esses fatores promovem ativação da camada de células musculares lisas para restaurar a relação de fluxo normal (AUCH-SCHWELK KATUSIC, VANHOUTTE, 1990; GE, HUGHES, JUNQUERO, 1995). Além disso, a ciclooxigenase é uma fonte de ânions superóxidos, os quais podem causar vasoconstrição, direta ou indiretamente, pela inativação do NO.

1.5.2.2. Endotelina-1

As células endoteliais também podem iniciar contração da musculatura lisa através do mecanismo vasoconstritor mediado pela endotelina-1 (ET-1), o mais potente vasoconstritor endógeno já identificado, sendo 100 vezes mais potente que a norepinefrina em base molar (YANASIGAWA *et al.*, 1988; RUBANYI & POLOKOFF 1994; GOLIKORSKY *et al.*, 1994). Ela age sobre os receptores ET-A, ativa a proteína G, que estimula a hidrólise da fosfolipase C, dando origem ao diacilglicerol e ao inositol 1,4,5 trifosfato que mobiliza o cálcio intracelular para vasoconstrição.

Células endoteliais produzem ET-1 através da tradução do mRNA gerando pré-pró-endotelina, a qual é convertida em “big” endotelina. A “big” endotelina é convertida em peptídeo maduro ET-1 pela ação da enzima conversora da endotelina (ECE). Endotelina-1 causa vasodilatação em baixas concentrações, pela ativação do receptor ET-B acoplado à liberação de NO, prostaciclina e EDHF. Altas concentrações de ET-1 causam marcada e sustentada contração, pela ativação dos receptores ET-A, em alguns vasos sanguíneos, e dos receptores ET-B das células musculares lisas. Os níveis circulantes de ET-1 são baixos, sugerindo alguma ou discreta produção endógena sob condições fisiológicas e/ou liberação sub-luminal do peptídeo para células musculares lisas.

Vasodilatadores, como NO e prostaciclina, podem inibir a produção de ET-1 através de mecanismos envolvendo GMP cíclico e AMP cíclico respectivamente. Outras substâncias e hormônios, como o hormônio antidiurético, a ET-3 e a prostaglandina A₂, estão relacionados à inibição da liberação e da ação da ET-1.

Entre os fatores estimulantes, deve-se citar: angiotensina II, catecolaminas, fatores de crescimento, hipóxia, “shear stress”, insulina, LDL colesterol oxidada, diminuição de HDL colesterol e trombina (LEVIN, 1995).

1.6. VASODILATAÇÃO MEDIADA PELO FLUXO

As células endoteliais têm papel importante na homeostase vascular, são responsáveis por várias funções sensoras e de integração de estímulos bioquímicos e biomecânicos, alteram a função vascular através da secreção de mediadores proteicos e moleculares, similarmente a outros tecidos.

O endotélio possui a capacidade de detectar mudanças das condições fisiológicas, às quais é exposto e responde não somente a fatores humorais circulantes como também a condições mecânicas criadas pelo fluxo sanguíneo. Três forças mecânicas primárias são importantes para a ativação das células endoteliais: 1) a pressão intravascular criada pelas forças de pressão hidrostática dentro do vaso; 2) a tensão circunferencial, criada pelo estiramento das junções intercelulares exercidas sobre as células endoteliais e 3) o “shear stress” ou força de cisalhamento, criada durante o contato da coluna sanguínea sobre a superfície endotelial. Esta última, particularmente, é a mais importante, por estimular a liberação de substâncias vasoativas e promover alterações de expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e nas alterações morfológicas (GIMBRONE, NAGEL, TOPPER, 1997; TRAUB & BERK, 1997; GIMBRONE & TOPPER, 1999; DE CATERINA, 2000). O “shear stress” é o mais potente estímulo fisiológico para produção de NO na célula endotelial. Incrementos rápidos e agudos da produção de NO são secundários à ativação pós-traducional da óxido-nítrico sintase constitutiva endotelial (eNOS), enquanto alterações crônicas estão relacionadas a alterações da expressão gênica da eNOS (Figura 1).

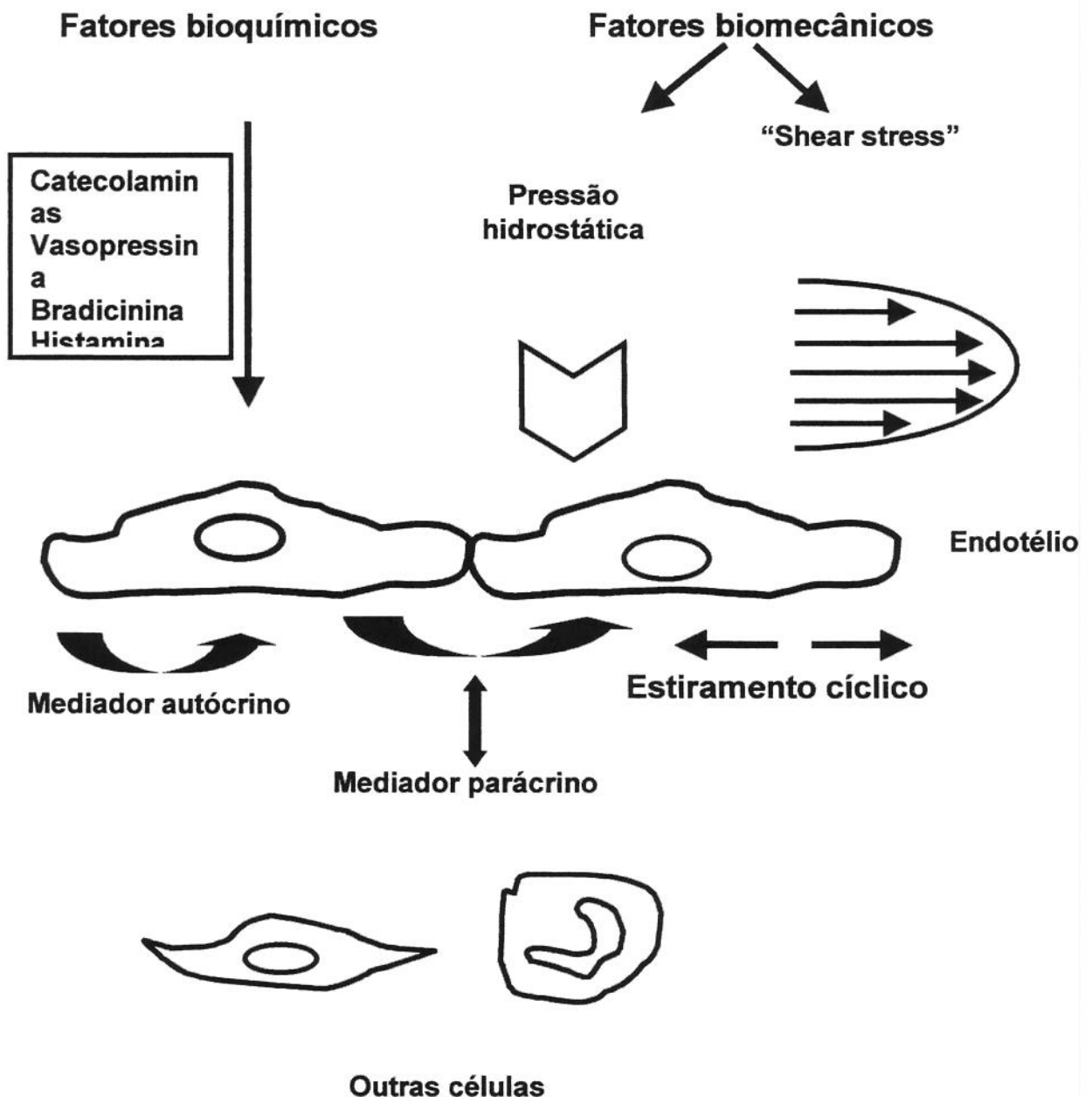


Figura 1: Esquema representativo da ativação endotelial por estímulos bioquímicos e biomecânicos. A figura mostra a ativação endotelial mediada por estímulos bioquímicos (catecolaminas, vasopressina, bradicinina, histamina, serotonina, adenosina difosfato [ADP] e trombina) e estímulos biomecânicos (pressão hidrostática, estiramento cíclico e "shear stress").

A dilatação, mediada pelo fluxo, pode ser induzida através de hiperemia reativa pós-compressão e descompressão vascular. O aumento de fluxo dessa manobra promove aumento do “shear stress” na parede vascular, detectado por mecano-sensores endoteliais que, em artérias normais, levam à produção e à liberação de substâncias vasodilatadoras, como NO, pelo endotélio. Dessa forma, o aumento de fluxo, pós-hiperemia reativa, promove dilatação da artéria em estudo (aumento do diâmetro, por exemplo, artéria braquial, variação esta expressa em % de incremento do diâmetro em relação ao diâmetro basal), mediada pelo óxido nítrico, denominada dilatação dependente do endotélio (SINOWAY *et al.*, 1989). A diminuição da dilatação dependente do endotélio é interpretada como alteração funcional da célula endotelial mediada pela via NO-GMP cíclico (Figura 2; Figura 3). Em contrapartida, doadores de óxido nítrico, como nitroglicerina (NTG), agindo diretamente sobre a musculatura lisa vascular, promovem dilatação não- dependente do endotélio.

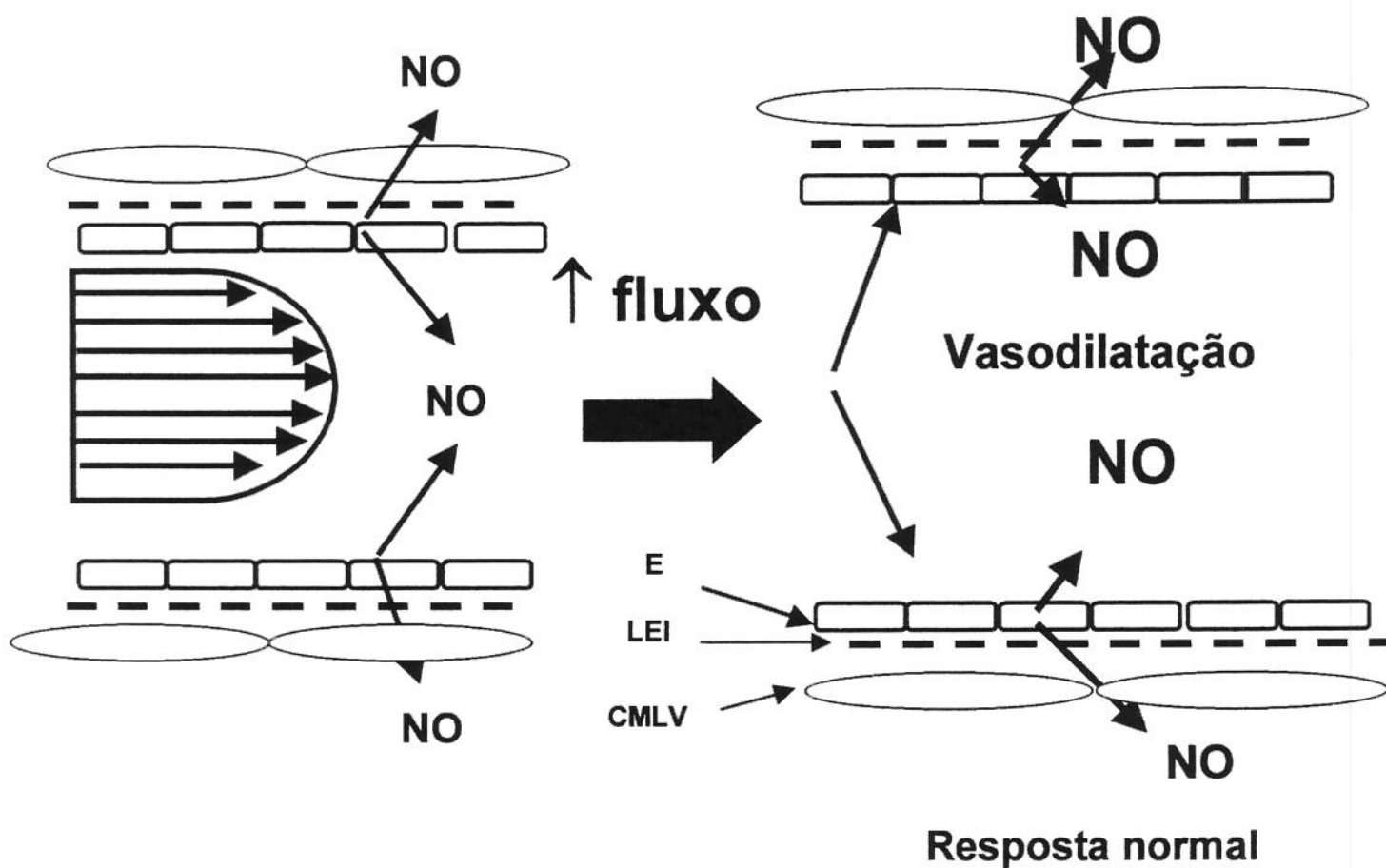


Figura 2: Vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta normal. Esquema representativo da vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta normal, promovida pelo aumento da síntese, liberação e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) na camada muscular lisa vascular. E, endotélio; CMLV, célula muscular lisa vascular; LEI, lâmina elástica interna.

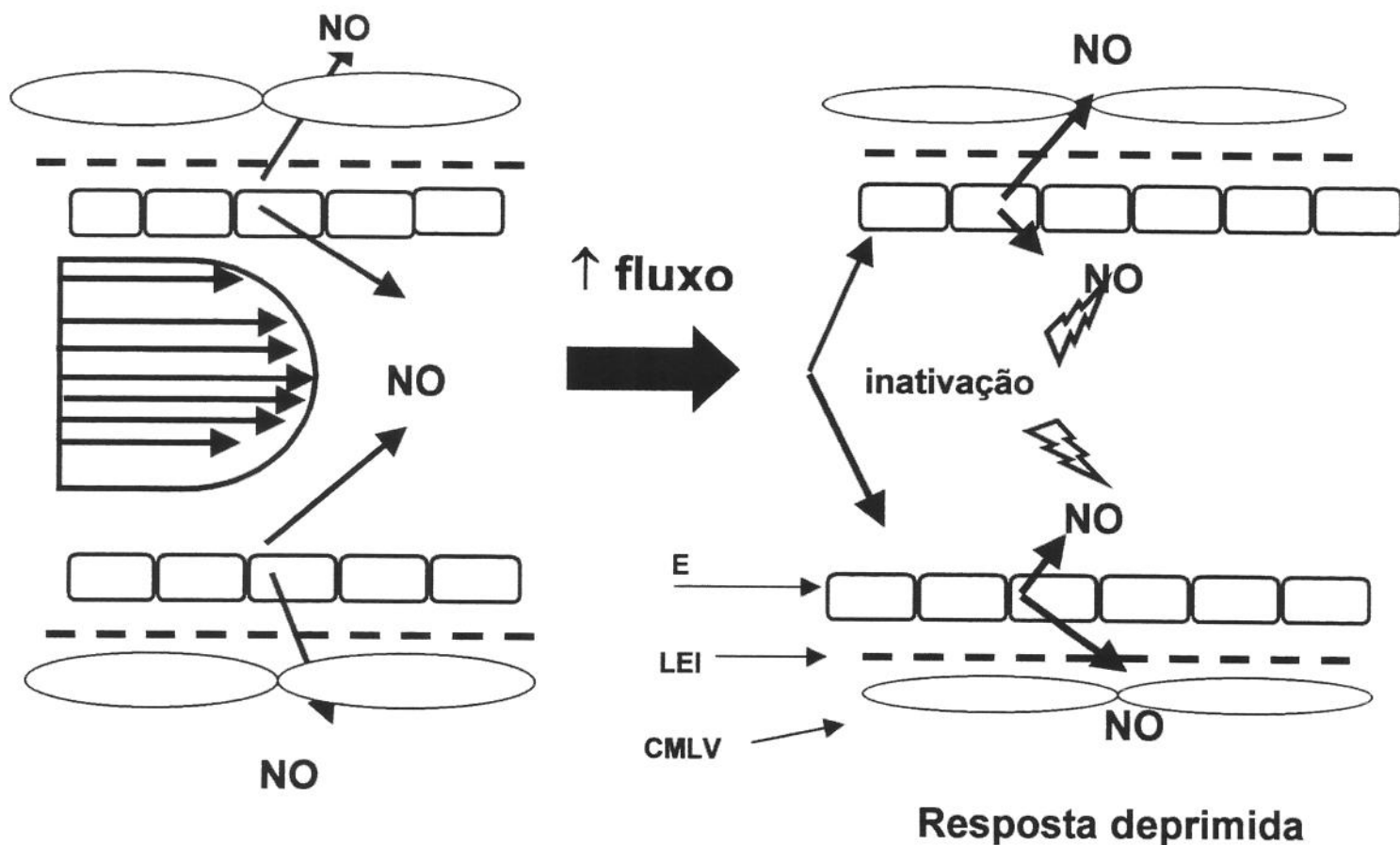


Figura 3: Vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta deprimida. Esquema representativo da vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta deprimida, promovida pela diminuição da síntese, liberação e/ou biodisponibilidade (inativação) do óxido nítrico (NO) na camada muscular lisa vascular. E, endotélio; CMLV, célula muscular lisa vascular; LEI, lâmina elástica interna.

1.7. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Quando exposto a fatores de risco, como, tabagismo, diabetes melito e/ou, hipertensão arterial, o endotélio apresenta alterações funcionais, denominadas genericamente de disfunção endotelial (DREXLER, 1997; COOKE & DZAU, 1997, DE ARTIMANO & GONZALES, 1999; MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999; DREXLER & HORNIG, 1999; SHIMOKAWA, 1999).

As células endoteliais estão disfuncionantes em vários tipos de doença vascular e na hipertensão arterial. Usualmente, essa disfunção é expressa como ‘alteração do relaxamento dependente do endotélio’ causada, principalmente, por redução da liberação e/ou ação dos fatores dilatadores derivados do endotélio, podendo também ocorrer liberação de fatores constritores derivados do endotélio contribuindo dessa forma, para disfunção endotelial.

A disfunção endotelial seria um marcador precoce dessa lesão e elemento-chave na patogênese da aterosclerose. Mais ainda, as recentes demonstrações da reversibilidade da disfunção endotelial levantam a possibilidade de sua interferência na progressão da doença e/ou no restabelecimento da função endotelial normal, diminuindo o risco de eventos cardiovasculares (VITA *et al.*, 1990; BOULANGER, 1999; LI & FÖRSTERMANN, 2000).

1.8. AVALIAÇÃO DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A avaliação não invasiva da função endotelial, por meio de ultra-sonografia de alta resolução e do estudo “Doppler” do fluxo arterial, vem sendo utilizada, ultimamente, com bastante acurácia e reprodutibilidade (CELERMAJER *et al.*, 1992, 1993, 1994; SORENSEN *et al.*, 1995). Ela pode ser realizada antes e após qualquer intervenção física ou farmacológica, otimizando a demonstração das alterações e dos efeitos da exposição a fatores de risco para doença aterosclerótica cardiovascular. Sobretudo, há ainda excelente correlação hemodinâmica e laboratorial, como relatam os trabalhos citados anteriormente

de Celermajer e colaboradores e de outros grupos (JOANNIDES *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1995).

Uma importante consequência da disfunção endotelial é a inabilidade de liberação dos fatores de relaxamento derivados do endotélio. A disfunção endotelial pode ser avaliada de forma não invasiva, quantificando-se a resposta da artéria braquial ao estímulo mecânico, como a resposta à hiperemia reativa (aumento do fluxo provocado por vasodilatação dependente do endotélio), ou após estímulo farmacológico de substâncias vasodilatadoras, como a nitroglicerina, cuja ação é direta sobre a musculatura lisa vascular. Através do uso do ultra-som “Doppler” de alta resolução, o grau da disfunção é expresso em diferença percentual de acréscimo do diâmetro e de fluxo da artéria braquial, comparando-se os valores obtidos em repouso, durante a primeira amostragem, com os registrados pós estímulo mecânico e/ou farmacológico (CELERMAJER *et al.*; 1996; CLARKSON *et al.*, 1997).

1.9. RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES DA REATIVIDADE VASCULAR E MEDIADORES VASOATIVOS

A relação entre os níveis circulantes de alguns mediadores, relacionados ao endotélio (tromboxano A₂, NO, GMP cíclico e outros) e a disfunção vascular encontrada em indivíduos portadores de risco cardiovascular aumentado, permanece incerta (SUNG *et al.*, 1997; HIGASHI *et al.*, 1997; MORENO *et al.*, 1998; ANASTASIOU. MEGAS, ATHANASIOS, 1998), não havendo, na literatura, estudos conclusivos relacionando alterações da vasodilatação mediada pelo fluxo, aos níveis circulantes de substâncias vasoativas.

2. OBJETIVOS

Os objetivos, deste trabalho, são:

A - Avaliar o grau de disfunção vascular (dependente e não-dependente do endotélio) presente em indivíduos sádios, tabagistas, diabéticos e hipertensos.

B - Determinar e comparar os níveis plasmáticos de: nitritos e nitratos, GMP cíclico e tromboxano B₂ nos grupos de pacientes mencionados acima.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (ver Anexo 1).

3.2. SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS

Foram estudados 60 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos divididos em quatro grupos (tamanho amostral estimado em 15 voluntários por grupo).

3.2.1. Grupos de voluntários:

Grupo 1 – Controle - Constituído de indivíduos sadios normotensos, não- tabagistas, não-diabéticos e não-dislipidêmicos.

Grupo 2 – Tabagistas - Composto por tabagistas habituais com consumo diário médio > 20 cigarros por dia, por mais de 10 anos, sem evidências clínicas de doença cardíaca hipertensiva e/ou diabetes.

Grupo 3 – Diabéticos – incluindo pacientes diabéticos tipo 2 não- compensados (glicemia elevada > 140 mg/dl e hemoglobina glicosilada > 8.0%) e duração da doença > 3 anos, sem evidências de cetoacidose e/ou hiperosmolaridade.

Grupo 4 – Hipertensos – Constituído por indivíduos hipertensos não-controlados, fora de situações de emergência no momento do exame (critério do “Sixth Joint National Committee” - USA (1997) e do III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial (1998).

Os participantes deste estudo foram selecionados entre pacientes do Instituto de Cardiologia Rio Preto e do Centro de Endocrinologia Diabetes e Obesidade, ambos de São José do Rio Preto-SP. O grupo-controle foi formado por voluntários. Todos os voluntários preencheram um questionário padrão para avaliação de fatores de risco em relação à doença arterial coronariana e foram extensivamente informados a respeito da natureza do estudo. Assinaram o termo de consentimento informado (Anexo 2), o qual, obrigatoriamente, foi avaliado e aprovado, previamente, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

3.2.2. Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão: presença de cardiopatia isquêmica, valvulopatias, insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas importantes, nefropatias, hepatopatias, uso de drogas que afetem a função vascular, tais como: estatinas, inibidores da síntese de prostaglandinas, vitaminas e anticoncepcionais (nos últimos 2 meses) e uso de ácido acetil salicílico (nos últimos 7 dias).

3.2.3. Avaliação clínica

Todos os voluntários foram submetidos à avaliação clínica, exame físico completo e investigação de antecedentes familiares para doença cardiovascular. Esses indivíduos foram inicialmente cadastrados através de um questionário no qual constava idade, sexo, peso, altura e números de cigarros consumidos por dia, além de um eletrocardiograma e dos resultados de exames bioquímicos de sangue. Os participantes não receberam qualquer medicação nos últimos sete dias e não ingeriram bebidas alcoólicas nas 24 horas anteriores ao estudo.

3.2.4. Exames laboratoriais complementares

3.2.4.1. Glicemia em jejum e hemoglobina glicosilada

Foram coletadas amostras de sangue venoso de indivíduos em jejum para dosagem dos níveis séricos de glicemia e porcentagem de hemoglobina glicosilada. A total.

3.2.4.2. Perfil lipídico

Foram coletadas amostras de sangue venoso de indivíduos em jejum para dosagem dos níveis séricos de colesterol total, LDL colesterol e triglicérides. O sangue coletado, cerca de 20 ml por vez, foi distribuído em dois tubos de ensaio, sem anticoagulante, e centrifugado, por 10 minutos a 3.000 rpm, para separação do soro. Uma parte do soro foi destinada à dosagem dos níveis de colesterol, LDL e triglicérides. O soro restante foi mantido separado e congelado em tubos de *Ependorff* para posterior contra-prova.

3.2.4.3. Função renal

A avaliação da função renal foi realizada através da dosagem sangüínea de uréia e de creatinina a partir da amostra coletada previamente.

3.2.4.4. Hematócrito e hemoglobina

Foram também determinados os níveis de hematócrito e hemoglobina.

3.2.4.5. Transferases e função hepática

A avaliação da função hepática foi realizada através da quantificação dos níveis séricos de alanina e aspartato transferase.

3.3. PROTOCOLO DE PESQUISA

3.3.1. Vasodilatação mediada pelo fluxo - hiperemia reativa

Os voluntários de todos os grupos foram submetidos à pesquisa da reatividade vascular dependente do endotélio de forma não invasiva, com ultra-som *Doppler* de alta resolução, usando equipamento marca ATL-HDI (“Advanced Technologies Laboratories – High Definiton Image”) e transdutor vascular linear de alta resolução, frequência de 7 MHz, (“Seattle, Washington, EUA”), acoplado a microcomputador para estudo dinâmico da função cardíaca e vascular.

Todas as imagens armazenadas foram registradas em papel fotográfico, gravadas em videocassete Super VHS, digitalizadas e armazenadas em disco magnético removível para análise posterior, por dois observadores independentes.

O diâmetro da artéria braquial foi medido quatro vezes consecutivamente, usando o marcador do equipamento ultra-som “Doppler”. As medidas foram tomadas a partir da interface lúmen/parede arterial, no sentido: parede anterior para posterior no final da diástole. O diâmetro médio foi calculado a partir de quatro ciclos cardíacos incidentes com a onda R do ECG. As mudanças do diâmetro da artéria braquial (em porcentagem) foram comparadas ao primeiro diâmetro basal (100%).

O volume de fluxo sanguíneo foi calculado multiplicando-se a integral da velocidade no tempo (VTI) do traçado espectral de fluxo *Doppler* corrigido para o ângulo pela frequência cardíaca e pela área seccional transversa da artéria braquial ($3,1416 \times r^2$).

Antes do início da primeira mensuração, o participante teve de permanecer em repouso absoluto, deitado em decúbito dorsal horizontal, comodamente instalado por um período de 10 a 15 minutos. Foram coletadas amostras de sangue venoso (20 ml cada amostra) para quantificação das substâncias vasoativas em estudo (nitritos/nitratos, GMP cíclico e tromboxano B₂). A seguir, foi realizado o corte ultra-sonográfico longitudinal da artéria braquial, aproximadamente 5 a 15 cm acima do cotovelo até obter-se uma imagem nítida da artéria braquial em corte longitudinal. O quadro central da artéria pôde ser identificado claramente e as camadas íntimas anterior e posterior puderam ser bem delimitadas e a zona de transmissão ou zona focal foi ajustada para a profundidade desejada.

Nos casos de grande dificuldade, a zona de transmissão focal foi modificada, visualizando-se a parede proximal o mais nitidamente possível. Para avaliação da parede distal, foram aumentados os ganhos em profundidade, evidenciando-se a linha “m” (interface média-adventícia). Foi então otimizada a imagem da interface lúmen/parede arterial e a seguir a imagem magnificada e, assim, padronizados os parâmetros de operação da máquina, que, uma vez regulados, não foram alterados durante todo o exame.

Quando uma posição satisfatória do transdutor foi obtida, o suporte do transdutor (“holder-probe”), criado para este estudo, foi fixado adequadamente. ao braço que permaneceu na mesma posição durante todo o estudo, apoiado numa braçadeira confortável especialmente desenhada para esta finalidade.

O estudo foi iniciado com a mensuração, em repouso, do diâmetro da artéria braquial. A seguir, as curvas espectrais das velocidades de fluxo foram obtidas com “Doppler pulsado” (pw), o cursor do sinal foi posicionado a um ângulo de 70 graus em relação à parede arterial e a amostra-volume de 1.5 cm foi direcionada à região central da luz do vaso para obtenção do traçado espectral do “Doppler”.

Posteriormente, o estímulo mecânico foi provocado pela aplicação de um manguito pneumático no braço da artéria braquial em estudo e insuflado até atingir 250-300 mmHg, permanecendo nesta situação durante 4-5 minutos, quando foi desinsuflado, promovendo então a dilatação dependente de fluxo (hiperemia reativa).

A segunda mensuração foi iniciada com a desinsuflação do manguito. Inicialmente o traçado espectral do “Doppler” foi registrado nos primeiros 15 segundos pós desinsuflação e, logo após, a mensuração do diâmetro da artéria braquial foi realizada até 90 segundos após a desinsuflação do manguito para avaliação da variação percentual do diâmetro da artéria braquial (SINOWAY *et al.*, 1989).

Após descanso de 15 minutos para permitir a recuperação vascular, foi realizada a terceira mensuração, denominada fase de recuperação, com a técnica e os parâmetros de avaliação descritos acima.

Finalmente, foi realizada a estimulação farmacológica com nitroglicerina, vasodilatador, que, atuando diretamente na musculatura lisa vascular, provoca dilatação arterial não-dependente do endotélio.

A última mensuração foi realizada 3 a 4 minutos após a administração de nitroglicerina sublingual. Foram, então, realizados os mesmos cortes ultra-sonográficos bidimensionais, o estudo “Doppler” e as imagens armazenadas, como descritas anteriormente (Figura 4).

Após a verificação do estado geral do participante, este foi liberado e posteriormente informado dos resultados de seu teste.

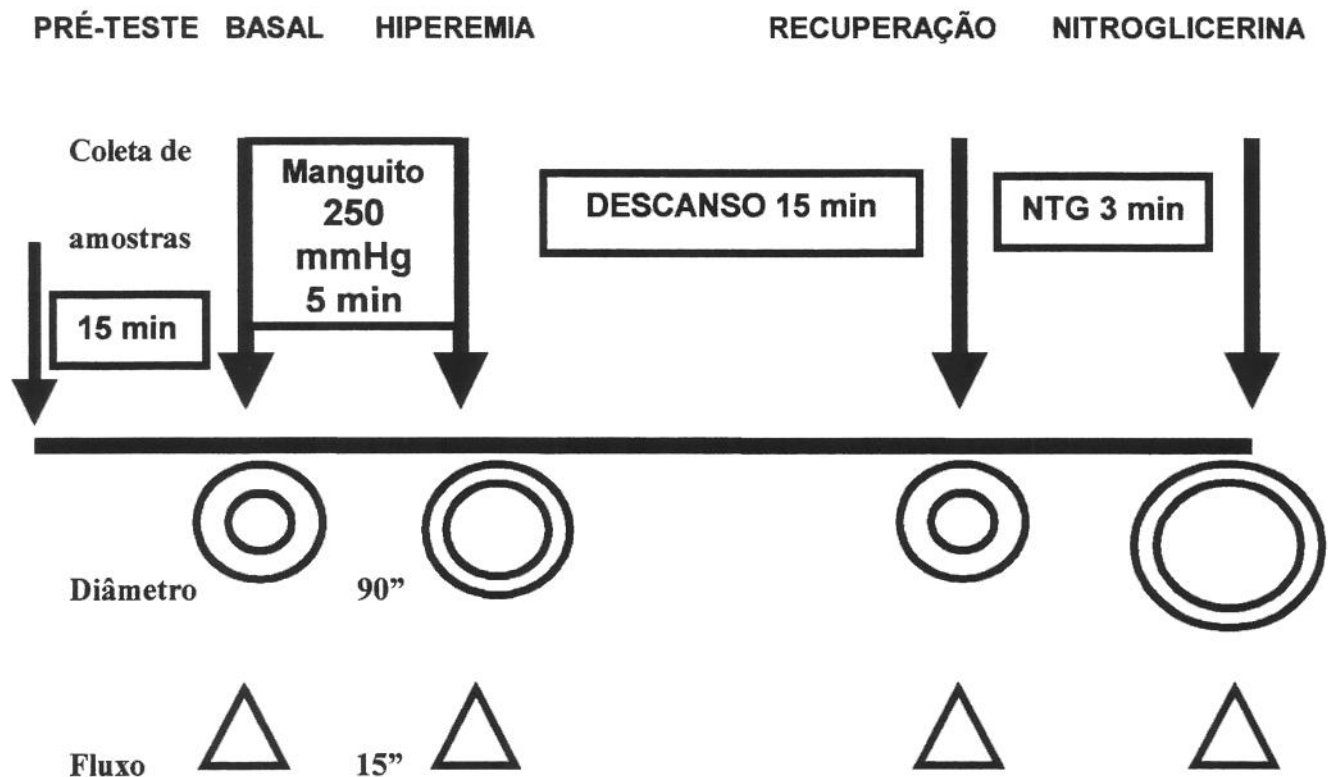


Figura 4: Protocolo de pesquisa. Esquema representativo do protocolo de pesquisa, utilizado para avaliação da vasodilatação dependente (pós-estímulo mecânico – hiperemia reativa) e não-dependente do endotélio (pós-estímulo farmacológico com nitroglicerina sublingual) da artéria braquial.

3.3.2. Coleta de amostras e métodos analíticos

Foram coletadas, durante a fase pré-teste, amostras de sangue venoso de todos os participantes para quantificação dos níveis plasmáticos de nitritos e nitratos, tromboxano B₂ e GMP cíclico (GMPc).

3.3.2.1. Nitritos e nitratos

O “kit” utilizado (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA) foi desenvolvido para medir a concentração total de nitratos e nitritos em fluidos biológicos e, também, em derivados da produção de NO pela enzima NOs, sob condições controladas no ensaio.

Os nitritos e nitratos são produtos finais estáveis da reação de NO com oxigênio molecular. A proporção de nitritos e nitratos é variável e não pode ser determinada exatamente. Portanto, o melhor indicador da produção de óxido nítrico é a soma de nitritos e nitratos. O “kit” para determinação de nitritos e nitratos proporcionou um método acurado e conveniente para a medida da concentração total de nitritos e nitratos por meio de um simples processo em duas etapas:

Primeira etapa: Determinação de nitritos pela reação de Griess.

Segunda etapa: Para a quantificação de nitratos foi necessária a conversão enzimática prévia de nitratos em nitritos e a determinação da concentração total de nitritos presentes na amostra. Subtraindo-se o valor da concentração de nitritos presentes na amostra previamente quantificada obteve-se a concentração de nitratos presentes. O método é bastante simples: um grande número de amostras pode ser processado em curto espaço de tempo, o que o torna bastante apropriado para aplicação de rotina em laboratórios de pesquisa (MOSHAGE, *et al.*, 1995).

3.3.2.2. Tromboxano B₂

Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos de ensaio, contendo EDTA. O plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -20⁰ C até o ensaio. Amostras de plasma foram purificadas, usando-se colunas de fase reversa: Sep-Pack C₁₈ (Waters Co., Mildfor, MA, EUA) e os níveis plasmáticos de tromboxano B₂ (metabolito do TX-A₂) foram determinados, usando-se “kit” comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA, Cayman Chemical Co.).

Esse ensaio utilizou 500 µl de plasma de sangue venoso e foi baseado na competição entre tromboxano B₂ livre (TX-B₂) e um rastreador de TX-B₂ (TX-B₂ ligado a uma molécula de acetilcolinesterase), com um número limitado de TX-B₂-específico aos sítios de ligação do anti-soro de coelho. A concentração do rastreador permanece constante, enquanto a de TX-B₂ livre varia. O complexo anti-soro TX-B₂ (o livre de rastreador) liga-se ao anticorpo monoclonal de coelho previamente fixado à cuba, que é lavada para remover reagentes indesejáveis e à qual é adicionada reagente de Ellman (que contém o substrato para a acetilcolinesterase). O produto dessa reação enzimática tem coloração amarela e absorve comprimentos de onda de 420 nm no espectrofotômetro.

3.3.2.3. GMP cíclico

Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos de ensaio, contendo EDTA para determinação dos níveis plasmáticos de GMP cíclico, usando-se “kit” comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA, Cayman Chemical Co.).

O plasma foi separado por centrifugação a 800g por 20 minutos e armazenado a - 20°C até ser analisado.

Inicialmente, a amostra de plasma foi extraída com etanol e o sobrenadante foi evaporado a seco com jato de nitrogênio. A amostra seca foi reconstituída com solução tampão do “kit” de ensaio ELISA e este realizado, seguindo as instruções do fabricante.

Esse ensaio foi baseado na competição entre GMPcíclico (GMPc) e um rastreador de GMPc (GMPc ligado a uma molécula de acetilcolinesterase) com um número limitado de GMPc - específico aos sítios de ligação do anti-soro de coelho.

A concentração do rastreador permanece constante enquanto a de GMPc livre varia, conseqüentemente, o GMPc rastreador, que está apto a ligar-se ao anti-soro de coelho, é inversamente proporcional à concentração de GMPc completamente livre. Esse complexo anti-soro-GMPc (o livre ou o rastreador) liga-se ao anticorpo monoclonal de coelho, previamente fixado na placa, que foi lavada para remover reagentes indesejáveis e,

a seguir, teve adicionado o reagente de Ellman (que contém o substrato para acetilcolinesterase). O produto dessa reação enzimática de coloração amarela foi lido em absorvência de 420 nm.

A intensidade da coloração, determinada espectrofotometricamente, foi proporcional ao resultado do GMPc rastreador, que é inversamente proporcional ao resultado do GMPc livre, presente durante a incubação.

3.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os valores individuais do estudo ultra-som “Doppler” de cada fase do estudo (repouso, pós-dilatação mediada pelo fluxo [hiperemia reativa] e pós nitroglicerina) foram agrupados de acordo com o grupo pesquisado (controle, tabagistas, diabéticos e hipertensos) e comparados entre si. Em seguida, foram correlacionados aos níveis plasmáticos de nitritos e nitratos, tromboxano B₂ e GMP cíclico por meio de estatística paramétrica.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1. Estatística paramétrica

A análise exploratória dos perfis individuais e em grupo, dos níveis de glicemia, hemoglobina glicosilada, colesterol total, LDL colesterol, hematócrito, hemoglobina, uréia, creatinina, transferases hepáticas, desidrogenases e creatinina fosfoquinase, consistiu na avaliação de cada um desses parâmetros na condição em jejum. Foi calculada a média e o desvio-padrão da média, definidos os valores máximo e mínimo, e os perfis referentes ao primeiro quartil (valor da amostra ordenada que deixa 25% dos valores abaixo dela) e ao terceiro quartil (valor da amostra ordenada que deixa 75% dos valores abaixo dela).

3.5.2. Estatística descritiva

A análise descritiva da reatividade vascular, manifestada por meio da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial) ou farmacológico (nitroglicerina sublingual), bem como a variação do fluxo no segmento examinado, frente aos estímulos, foi expressa em variação percentual média e desvio-padrão. A avaliação dos quatro grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA), para medidas independentes e, para medidas repetidas, o teste de comparação de Dunnet.

Os marcadores farmacológicos estudados: nitritos, nitratos, tromboxano B₂ e GMP cíclico, foram expressos em média, considerando-se o erro padrão da média para cada grupo e comparado-se os valores médios entre os grupos.

4. RESULTADOS

4.1. PERFIL CLÍNICO

Os resultados individuais detalhados (níveis pressóricos, hábito e frequência de tabagismo, perfil bioquímico), referentes ao perfil clínico e laboratorial de todos os voluntários estudados, podem ser encontrados no Anexo 3 (Tabelas A-H). As principais características de cada grupo encontram-se na Tabela 1.

Com relação à idade não houve diferença significativa entre os grupos controle, tabagista, diabético não compensado e hipertenso não controlado.

Não houve diferença significativa para peso, altura, índice de massa corporal, níveis pressóricos (PAS – PAD) e tabagismo entre os grupos controle e diabético. Os níveis pressóricos médios sistólico e diastólico do grupo hipertenso não controlado foram maiores e compatíveis com o grau de classificação.

Quanto ao hábito de fumar, os indivíduos tabagistas foram caracterizados como tabagistas de grau importante, evidenciando diferença significativa quando comparados aos grupos controle, diabético e hipertenso.

Tabela 1: Características clínicas dos quatro grupos experimentais estudados.

	Controle	Tabagistas	Diabéticos	Hipertensos
Idade (a)	43,3±12,1	43,9±8,1	53,1±9,7	52,8±9,7
Peso (kg)	76,5±18,4	75,5±14,4	76,4±17,2	88,7±20,5
Altura (cm)	168,2±7,2	163,5±11,5	163,1±10,7	169,7±6,4
IMC (kg/m²)	27±6	29±4	28±5	30±6
PAS (mmHg)	126±13	127±15	133±13	159±10
PAD (mmHg)	80±4	81±12	83±10	107±8
FC (bpm)	80±13	70±10	84±18	76±15
Tabagismo (cigarros/dia)	0	22,3±6,2	0	0
N	15	15	15	15
	(10M, 5F)	(7M, 8F)	(7M, 8F)	(10M, 5F)

Os valores são expressos em média ± DP.

4.2. PERFIL BIOQUÍMICO

Os níveis médios de glicemia e hemoglobina glicosilada total entre os grupos controle, tabagista e hipertenso não evidenciaram diferença estatisticamente significativa. O grupo diabético mostrou níveis elevados e compatíveis com os critérios do protocolo de pesquisa.

Os níveis médios de colesterol total, LDL colesterol, triglicérides, creatinina, uréia, hemoglobina, hematócrito, transferases hepáticas desidrogenase láctica e creatinina fosfoquinase verificados nos grupos controle, tabagista, diabético não compensado e hipertenso não controlado não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si (Tabela 2).

Tabela 2: Valores bioquímicos dos quatro grupos experimentais estudados.

	Controle	Tabagistas	Diabéticos	Hipertensos
Glicemia (mg/dl)	89,6±11,2	91,6±16,3	225,7±42,7	103,7±14,2
Hb glicosilada (% Hb total)	7,1±0,7	7,1±1,0	10,9±1,6	7,0±0,1
Colesterol total (mg/dl)	215,6±34,2	180,1±37,0	221,8±45,3	199,2±30,9
LDL colesterol (mg/dl)	132,6±31,6	101,7±35,4	150,0±54,9	116,8±25,0
Triglicérides (mg/dl)	168,2±71,9	183,0±71,4	185,4±82,6	162,4±74,7
Creatinina (mg/dl)	0,82± 0,08	0,82±0,08	0,9±0,3	0,9±0,2
Uréia (mg/dl)	36,4±8,3	36,4±8,3	32,5±13,4	34,2±7,6
Hemoglobina (g/100 ml)	14,6±1,0	14,6±1,0	13,1±1,3	14,4±1,7
Hematócrito (%)	45,0±3,2	45,0±3,2	40,4±4,4	44,0±4,4
AST (mg/dl)	27,2±6,0	27,2±6,0	19,5±10,0	25,3±3,6
ALT (mg/dl)	27,4±5,6	27,4±6,0	16,3±3,1	29,3±8,5
DHL (mg/dl)	257,0±33,0	327,2±32,5	348,3±8,7	269,9±147,8
CPK (mg/dl)	99,4±32,2	79,3±15,0	109,8±62,7	139,3±76,3
N	15	15	15	15

Os valores são expressos em média ± DP.

4.3. REATIVIDADE VASCULAR

4.3.1. Variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial – dilatação mediada pelo fluxo)

Os valores da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós- compressão do braço (vasodilatação dependente do fluxo - hiperemia reativa) observados através de técnica Doppler-ultra-sonográfica de alta resolução nos grupos controle, tabagista, diabético não compensado e hipertenso não controlado são apresentados na Tabela 3 (Coluna A) e Figura 5.

A variação percentual média do diâmetro da artéria braquial nos grupos tabagista de grau importante, diabético tipo 2 não compensado e hipertenso não controlado foi significativamente menor que no grupo-controle.

Não houve diferença significativa entre os grupos tabagista, diabético não- compensado e hipertenso não-controlado.

4.3.2. Variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina sublingual)

Os valores da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (0,4 mg nitroglicerina sublingual), avaliados por meio da técnica Doppler-ultra-sonográfica de alta resolução, nos grupos controle, tabagista, diabético não-compensado e hipertenso não-controlado, são apresentados na Tabela 3 (Coluna B) e Figura 6.

A variação percentual média da artéria braquial no grupo tabagista não evidenciou diferença significativa em comparação ao grupo controle. Os grupos diabético não-compensado e hipertenso não-controlado, evidenciou diferença significativa em relação ao grupo controle.

A comparação entre os grupos diabético não-compensado e hipertenso não- controlado não mostrou diferença significativa.

4.3.3. Variação percentual do fluxo da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial)

Os valores da variação percentual do fluxo da artéria braquial pós-compressão do braço (vasodilatação dependente do fluxo - hiperemia reativa), avaliados por meio da técnica Doppler-ultra-sonográfica de alta resolução nos grupos controle, tabagista, diabético não-compensado e hipertenso não-controlado, são apresentados na Tabela 3 (Coluna C).

Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.3.4. Variação percentual do fluxo da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina sublingual)

Os valores da variação percentual do fluxo da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina sublingual), obtidos através da técnica Doppler-ultra-sonográfica de alta resolução nos grupos controle, tabagista, diabético não-compensado e hipertenso nãocontrolado, são apresentados na Tabela 3 (Coluna D).

Não houve diferença significativa entre o grupo-controle e os grupos tabagista, diabético não-compensado e hipertenso não-controlado.

Tabela 3: Variação percentual do diâmetro e fluxo da artéria braquial

Grupos	Diâmetro						Fluxo					
	(A) Hiperemia			(B) NTG			(C) Hiperemia			(D) NTG		
	X	DP	EPM	X	DP	EPM	X	DP	EPM	X	DP	EPM
CONTROLE	12,6	3,6	0,9	25,3	8,5	2,2	122,6	70,0	18,1	49,8	45,7	11,8
TABAGISTAS	8,0*	2,5	0,6	25,0	7,3	1,9	86,7	50,1	12,9	39,1	35,5	9,2
DIABÉTICOS	5,8*	2,7	0,7	17,7*	7,1	1,8	65,2	58,4	15,1	22,6	14,1	6,5
HIPERTENSOS	7,2*	3,3	0,9	16,8*	6,9	1,8	47,0	27,2	6,9	30,2	25,1	6,5

p < 0,05 vs controle

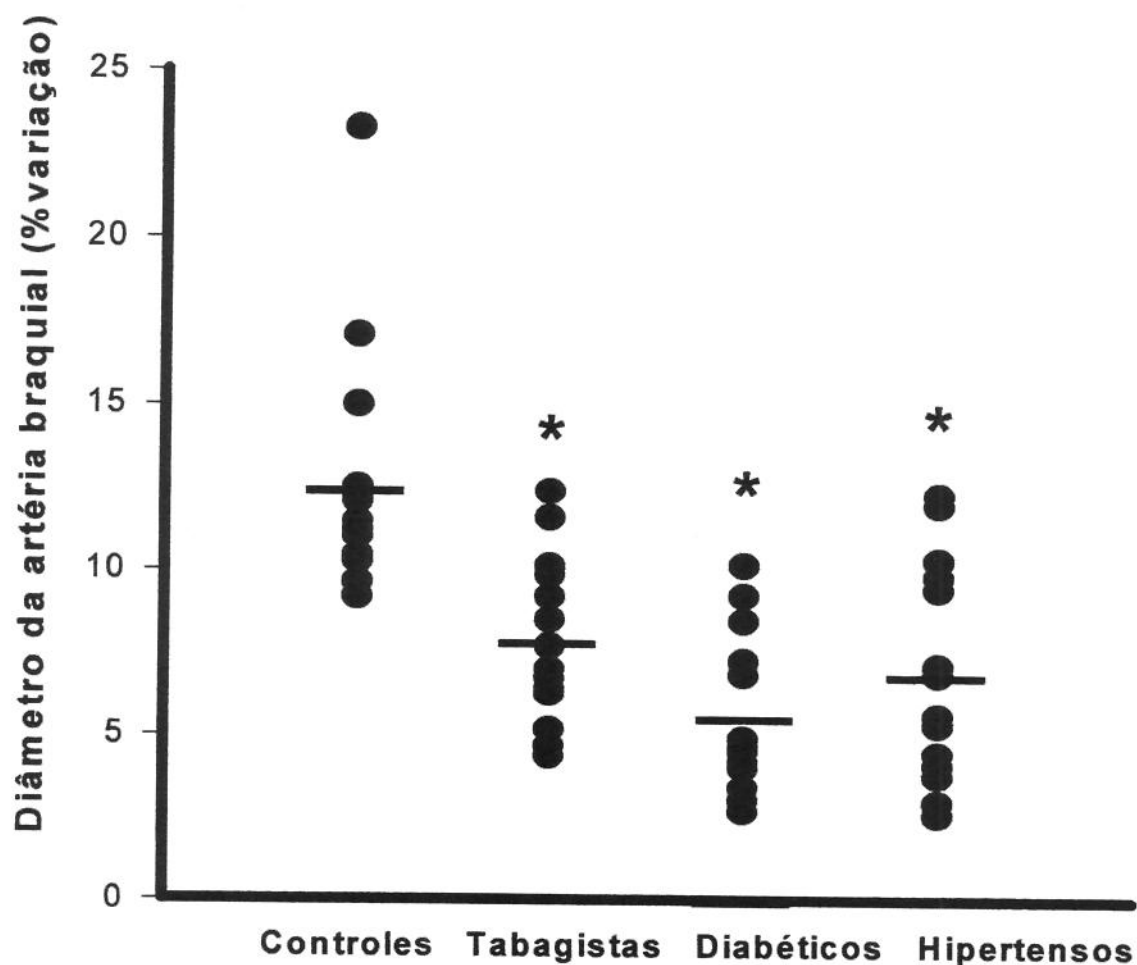


Figura 5: Distribuição da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial – dilatação mediada pelo fluxo). Foram avaliados quatro grupos: Controle, $n = 15$; Tabagistas, $n=15$; Diabéticos tipo 2 não-compensados, $n = 15$ e Hipertensos não-controlados, $n = 15$, * $p < 0,005$ vs controle.

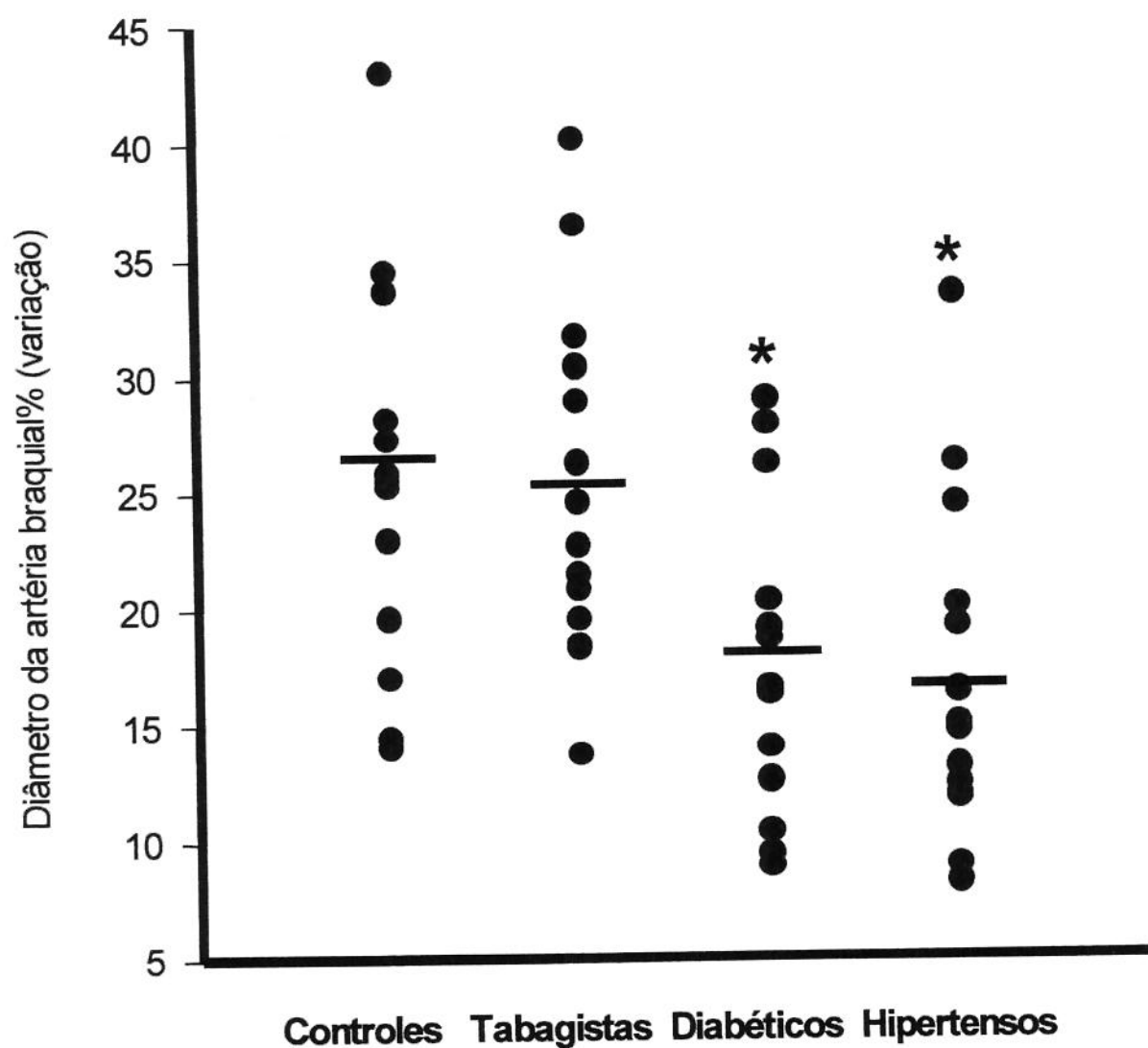


Figura 6: Distribuição da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina 0,4 mg sublingual). Foram avaliados quatro grupos: Controle, n = 15; Tabagistas, n = 15; Diabéticos não-compensados, n = 15 e Hipertensos não-controlados, n = 15 * p < 0,05 vs controle.

4.3.5. Concentrações plasmáticas de nitritos e nitratos

A Tabela 4 mostra os níveis plasmáticos de nitritos e nitratos nos grupos controle, tabagista, diabético e hipertenso. Apenas o grupo diabético se mostrou diferente do grupo-controle.

Tabela 4: Concentrações plasmáticas de nitritos e nitratos, tromboxano B₂ e GMP cíclico

	Controle	Diabéticos	Tabagistas	Hipertensos
Nitritos/Nitratos (μM)	98±57	266*±106	125±50	82±45
TromboxanoB ₂ (pg/ml)	422±210	550±427	624±804	456±408
GMP cíclico (pg/ml)	2,1±0,3	1,9±0,4	1,4±0,4	1,9±0,3

Os valores são expresso em média ± DP p < 0,05 vs controle

4.3.6. Concentrações plasmáticas de tromboxano B₂

As concentrações plasmáticas de tromboxano B₂ são apresentadas na Tabela 4. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.3.7. Concentrações plasmáticas de GMP cíclico

As concentrações plasmáticas de GMP cíclico são apresentadas na Tabela 4. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram: 1) Tabagistas de grau importante, diabéticos tipo 2 não-compensados e hipertensos não-controlados mostraram grau semelhante de prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio; 2) A vasodilatação não-dependente do endotélio está preservada em tabagistas de grau importante, enquanto diabéticos tipo 2 não-compensados e hipertensos não-controlados apresentam comprometimento da vasodilatação induzida por nitroglicerina; 3) Somente diabéticos tipo 2 não-compensados apresentaram aumento da concentração plasmática de nitritos e nitratos em comparação ao grupo-controle.

Apesar da maior severidade dos fatores de risco presentes nos pacientes envolvidos no presente estudo, os resultados da vasodilatação dependente do endotélio foram semelhantes a estudos prévios publicados anteriormente para diabéticos compensados e hipertensos controlados (HIGASHI *et al.*, 1998; GOODFELLOW *et al.*, 1996; IYAMA *et al.*, 1996; CLARKSON *et al.*, 1997; JIANG *et al.*, 1997; POREDOS *et al.*, 1999). Entretanto, a vasodilatação não-dependente do endotélio está diminuída em diabéticos não compensados e hipertensos não controlados, achado não relatado em estudos publicados previamente.

O grupo de tabagistas do presente estudo demonstrou resposta anormal da dilatação dependente do endotélio, mediada pelo fluxo, em concordância com estudos descritos previamente por CELERMAJER (1992). Por outro lado, a resposta preservada à nitroglicerina (vasodilatação não-dependente do endotélio), encontrada no presente estudo, está de acordo com os resultados publicados por MOTOYAMA *et al.*, (1997) e não demonstrados por CELERMAJER (1994). Além disso, publicações prévias do nosso grupo, demonstrando vasodilatação reduzida em resposta à bradicinina e resposta normal ao nitroprussiato de sódio em tabagistas de grau importante, corroboram os achados descritos para o grupo tabagista do presente estudo (CHALON *et al.*, 1999).

A alteração da vasodilatação dependente do endotélio, induzida pelo tabagismo, está provavelmente relacionada à diminuição da biodisponibilidade de NO. As recentes observações reforçam o papel dos radicais livres de oxigênio como agentes causadores da disfunção endotelial e da diminuição dos produtos finais no metabolismo do NO. (MC VEIGH *et al.*, 1996). Esta hipótese é sustentada, especialmente, pelos achados que

mostram que a vitamina C reverte a alteração da vasodilatação dependente do endotélio em tabagistas crônicos (MOTOYAMA *et al.*, 1997).

A disfunção endotelial com reatividade normal do músculo liso vascular em tabagistas é também associada a mecanismos tóxicos diretos da nicotina, monóxido de carbono, ânions superóxido e aumento do stresse oxidativo que diminuem a biodisponibilidade de NO. A nicotina, por sua vez, também altera a expressão das moléculas de adesão, os fatores de migração dos monócitos dependentes da cicloxigenase (COX), principalmente, tromboxano A₂ e a síntese de DNA, interferindo dessa forma nos fenômenos de síntese/reparação, proliferação celular e citotoxicidade.

Alguns trabalhos prévios relatam redução das concentrações plasmáticas de NO, induzida pelo tabagismo e relacionada à severidade do hábito de fumar (NODE *et al.*, 1997). Os achados do presente estudo não mostraram diferença estatisticamente significativa nas concentrações plasmáticas de nitritos e nitratos quando comparadas ao controle. Futuros estudos serão necessários para melhor compreensão sobre o local e a natureza da alteração da biodisponibilidade de NO em tabagistas.

A resposta normal (não-dependente do endotélio induzida pela nitroglicerina), encontrada em tabagistas, é concordante com os achados de CHALON *et al.*, (1999) que, estudando venodilatação pós-estímulo com o agonista bradicinina e a avaliação da resposta não-dependente do endotélio com nitroprussiato de sódio em tabagistas, demonstraram resposta normal em tabagistas de grau importante. Provavelmente essa resposta está associada à ausência de alterações estruturais na parede vascular, não havendo, portanto, uma barreira à penetração e à ação do NO sobre a célula muscular lisa, permitindo assim ação plena dos doadores de NO, como a nitroglicerina. Esses resultados foram também coincidentes com outra observação, feita por MORENO *et al.*, (1998), que evidenciou normalização da alteração da venodilatação induzida por bradicinina, em tabagistas de grau importante, 24 h após cessação do tabagismo.

O grupo de pacientes diabéticos tipo 2 não-compensados mostrou resposta atenuada à dilatação dependente e não-dependente do endotélio. Este resultado do presente estudo foi concordante com o trabalho realizado por MC VEIGH, BRENNAN, JOHNSON,

(1992), em pacientes diabéticos tipo 2 compensados, que mostrou alteração da vasodilatação, induzida por acetilcolina (dependente do endotélio) e por nitroprussiato de sódio (não-dependente do endotélio).

Esses resultados sugerem, portanto, que a alteração da vasodilatação dependente do endotélio, em pacientes diabéticos tipo 2, pode ser secundária ao aumento da inativação do NO, ou à incapacidade do NO de atuar sobre a guanilato ciclase solúvel para promover formação de GMP cíclico e, conseqüentemente, relaxamento do músculo liso vascular dependente do endotélio.

A disglícemia leva ao aumento do estresse oxidativo e da formação de produtos finais da glicação não enzimática. Estes aumentam, por sua vez, a inativação do NO e promovem modificação oxidativa das lipoproteínas (COSENTINO & LUSCHER 1998). Diabetes melito também altera o metabolismo das lipoproteínas, levando à hipertrigliceridemia associada à diminuição da concentração de HDL colesterol e ao aumento das partículas pequenas e densas de LDL colesterol com colesterol total normal ou discretamente aumentado. (WATTS & PLAYFORD 1988; SOWERS & LESTER 1999). Através da elevação do cálcio intracelular, a hiperglicemia estimula a síntese de NO que, na presença de ânions peróxido, é convertido rapidamente em peroxinitrito (potente molécula oxidante), contribuindo para a perpetuação do estresse oxidativo (TESFAMARIAM & COHEN, 1992; HOGAN, CERAMI, BUCALA 1992; GIUGLIANO, CERIELLO, PAOLISSO, 1996; HONING *et al.*, 1998).

Os pacientes diabéticos tipo 2, não-compensados, apresentaram níveis plasmáticos de nitritos e nitratos aumentados de forma estatisticamente significativa, enquanto o segundo mensageiro, GMP cíclico, não apresentou aumento correspondente, achados estes que corroboram o conceito de aumento do estresse oxidativo para explicar a alteração do relaxamento dependente do endotélio e a hiporreatividade do músculo liso vascular evidenciados no presente estudo. Considerando que, provavelmente, os mecanismos primários envolvidos sejam: aumento da formação de radicais livres de oxigênio; aumento da formação de produtos finais da glicação não enzimática da glicose; produção anormal de fatores de crescimento vascular derivados do endotélio (VEGF) e um aumento dos fatores pró-inflamatórios como descritos anteriormente, essas

anormalidades promoveriam alterações morfológicas e funcionais das células que compõem a parede e o músculo liso vascular, com conseqüente modificação da vasodilatação dependente e não-dependente do endotélio neste grupo de pacientes.

O último grupo estudado, o de pacientes hipertensos não-controlados, apresentou acentuada diminuição da vasodilatação dependente e não-dependente do endotélio quando comparado ao controle, de forma similar às descrições publicadas, previamente, por PANZA *et al.*, (1990) em pacientes com hipertensão arterial essencial controlada. Por outro lado, a dilatação não-dependente do endotélio também estava prejudicada neste grupo de pacientes, achado não descrito anteriormente, o que pode sugerir que a severidade dessa condição não influenciou o grau de disfunção endotelial. Essa hipótese reforça a sugestão de que a disfunção endotelial atua isoladamente e, por si mesma, como marcador de aumento de risco cardiovascular, e não como fator que cria um aumento do risco cardiovascular (ELLIOT, 1998; TADEI *et al.*, 1998).

A contribuição do NO na regulação do tono vascular em humanos foi confirmada por estudos, usando-se pletismografia para mensuração do fluxo sanguíneo e a técnica da perfusão com agonistas (PANZA *et al.*, 1990; PANZA *et al.*, 1993). Foi confirmada também pela demonstração de que a inibição da síntese de NO resulta em redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio (PANZA, 1997; FORTE *et al.*, 1997).

Os níveis plasmáticos de nitritos/nitratos encontrados nos grupos controle, tabagistas de grau importante e hipertensos não-controlados foram semelhantes entre si, enquanto no grupo de diabéticos tipo 2, não-compensados esses níveis foram elevados, como descritos anteriormente.

Os níveis plasmáticos de GMP cíclico foram similares nos quatro grupos, reforçando, portanto, a idéia de que a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio é causada pela redução da biodisponibilidade de NO. Por outro lado, a resposta do músculo liso vascular a doadores de NO exógeno encontra-se prejudicada em diabéticos tipo 2 não-compensados e hipertensos não-controlados, sugerindo que a hiporresponsividade da musculatura vascular lisa aos doadores de NO (TADEI *et al.*, 1997) está associada a

mecanismos relacionados com o envelhecimento e com as alterações do padrão de fluxo, modificações do “shear stress” e as oscilações da pressão de pulso, promovendo anormalidades bioquímicas da via L-arginina-NO (principalmente em jovens) e da via dependente da ciclooxigenase (meia-idade), com aumento do estresse oxidativo, da atividade da ciclooxigenase, da proliferação das células musculares lisas e da atividade pró-inflamatória.

Finalmente, níveis plasmáticos similares de tromboxano B₂, observados nos quatro grupos, contrastam com os estudos prévios que mostraram aumento da excreção urinária de tromboxano B₂. Essas diferenças, provavelmente, refletem limitações metodológicas de dosagens simples em amostras plasmáticas (DOTEVALL *et al.*, 1992).

Outros estudos futuros serão necessários para esclarecer os mecanismos relacionados às alterações da reatividade vascular dependente do endotélio em resposta a estímulos mecânicos como, por exemplo, a dilatação mediada pelo fluxo, encontrada nos três grupos estudados, assim como, explicar as diferenças de resposta vascular a doadores de NO observadas no presente trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

6. CONCLUSÕES

A reatividade vascular dependente do endotélio está deprimida em tabagistas de grau importante, diabéticos tipo 2 não-compensados e hipertensos essenciais não-controlados;

A reatividade vascular não-dependente do endotélio está diminuída em diabéticos e hipertensos, mas não em tabagistas.

Apenas diabéticos apresentaram níveis plasmáticos aumentados de nitritos e nitratos, avaliados como marcadores de síntese e liberação de NO;

Os níveis plasmáticos de GMP cíclico e tromboxano B₂ não apresentaram diferenças significativas entre os quatro grupos, e não se correlacionaram com alterações funcionais da reatividade vascular.

7. SUMMARY

Cigarette smoking, non-insulin-dependent diabetes mellitus and essential hypertension are established risk factors for atherosclerosis and premature cardiovascular disease. Heavy smokers, uncompensated diabetics and patients with uncontrolled essential hypertension show impaired arterial vasodilatation which results from endothelial dysfunction, a key factor in early atherogenesis. We evaluated the brachial artery diameter and flow in response to mechanical (endothelium-dependent) and pharmacological (endothelium-independent) stimuli in healthy subjects and in groups with smoking, non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) and essential hypertension. Nitrite/nitrate, cGMP and thromboxane B2 levels were quantified.

Sixty patients (34M and 26F) aged 22-65 years old ($\bar{x}=48.3$) were classified into four groups: 1) Controls- $n=15$, 2) Heavy smokers- $n=15$, 3) Uncompensated diabetics- $n=15$ (glycemia >140 mg/dl and glycosylated haemoglobin >8.0 %), and 4) Patients with uncontrolled essential hypertension - $n=15$.

Brachial artery diameter was measured by a high resolution ultrasound technique before and after reactive hyperemia and glyceryl trinitrate (Nitrostat, 0.4 mg) administration.

Heavy smokers, uncompensated diabetics and uncontrolled hypertensive patients showed impaired flow-dependent vasodilatation ($8.0 \pm 2.5\%$, $5.7 \pm 2.5\%$ and $7.2 \pm 3.3\%$, respectively) compared to the controls ($12.0 \pm 3.3\%$) ($P < 0.001$). Smokers had a normal endothelium-independent response compared to the controls ($25.0 \pm 78.3\%$ vs $25.5 \pm 9.2\%$). Uncompensated diabetics and patients with uncontrolled essential hypertension had an impaired endothelium independent response ($17.2 \pm 6.8\%$ and $16.9 \pm 6.9\%$, respectively) compared to the controls ($25.5 \pm 9.2\%$) ($P < 0.005$). The levels of cGMP and thromboxane B2 were not different in the four groups, but nitrite/nitrate concentrations also were increased in diabetics compared to the controls (266 ± 47 μ M vs 125 ± 22 μ M) ($P < 0.005$).

Smokers, uncompensated diabetics and uncontrolled hypertensive patients showed a similar endothelium-dependent response, but only smokers had unimpaired endothelium-independent functions.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, J.- Nitrate therapy in cardiovascular disease. In PANZA J.A .; CANNON M.R.O. – **Endothelium nitric oxide and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications**, Armonk, NY Futura, 1999. p293-312.
- ADAMS, M.K.; ROBINSON, J.N.R.; MCCREDIE, R.; SEALE, J.P.; SORENSEN, KE, DEANFIELD, J.E.; CELERMAJER, D.S. - Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **32**:123–127, 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. - Consensus development conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes. **Diabetes Care**, **21**:1551 – 1559, 1998.
- ANASTASIOU, E.; MEGAS, J.; ATHANASIOS, S. - Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. **Diabetes Care**, **21**:2111-2115, 1998.
- ANDERSON, T.; UEHATA, A.; GERHARD, M.; MEREDITH, I.; KNAB, S.; DELAGRANGE, D.; LIEBERMAN, E.; GANZ, P.; CREAGER, M.; YEUNG, A.; SELWYN, A. - Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. **J. Am. Col. Cardiol.**, **26**:1235-1241, 1995.
- AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z.S.; VANHOUTTE, P.M. – Thromboxane A₂ receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. **Hypertension**, **15**:699-703, 1990.
- AUERBACH, O.; HAMMOND, E.C.; GARFINKEL, L. - Smoking in relation to atherosclerosis of the coronary arteries. **N. Engl. J. Med.**, **273**:775-779, 1965.
- BARRET-CONNOR, E. - Does hyperglycemia really cause coronary heart disease?. **Diabetes Care**, **20**:1620-1623, 1997.
- BASSENGE, E.; HEUSCH, G. - Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **110**:77-165, 1990.

- BASSENGE, E.; MÜNZEL, T. – Consideration of conduit and resistance vessels in regulation of blood flow. **Am. J. Cardiol.**, **62**:40E-44E, 1988.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A.- Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:1620-1624, 1990.
- BERLINER, J.A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; WATSON, A.D.; LUSIS, A.J. - Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. **Circulation**, **91**:2488-2496, 1995.
- BOULANGER, C.M. - Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target. secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **31**:39-49, 1999.
- BRUNZELL, J.D.; HOKANSON, J.E. - Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance. **Diabetes Care**, **22**:C10-C13, 1999.
- CARLSON, L.A.; BOTTIGER, L.E. - Risk factors for ischemic heart disease in men and women. Results of the 19-year follow-up of the Stockholm Prospective Study. **Acta Med Scand**, **218**:207-211, 1985.
- CELERMAJER, D.S.; MARK, R.; ADAMS, M.B.; CLARKSON, P.; ROBINSON, J.; MCCREDIE, R.; DEANFIELD, J.E.; DEANFIELD, D. - Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. **N. Engl. J. Med.**, **334**:150-154, 1996.
- CELERMAJER, D.S.; SORENSEN, K.; BULL, C.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J. Endothelium-dependent dilatation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **24**:1468-1474, 1994.

- CELERMAJER, D.S.; SORENSEN, K.E.; GEORGAKOPOULOS, D.; BULL, C.T.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J.E. - Cigarette smoking is associated with a dose dependent and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilatation in healthy young adults. **Circulation**, **88**:2149-2155, 1993.
- CELERMAJER, D.S.; SORENSEN, K.E.; GOOCH, V.M.; SPIEGELHALTER, D.J.; MILLER, O.I.; SULLIVAN, I.D.; LLOYD, J.K.; DEANFIELD, J.E. - Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. **Lancet**, **340**:1111-1115, 1992.
- CHALON, S.; TEJURA, B.; MORENO, Jr.H.; URAE, A.; BLASCHKE, T.F.; HOFFMAN, B.B. - Role of nitric oxide in isoprenaline and sodium nitroprusside-induced relaxation in human hand veins. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **47**:91-98, 1999.
- CLARKSON, P.; CELERMAJER, D.E.; DONALD, A.E.; SAMPSON, M.; SORENSEN, K.E.; ADAMS, M.; YUE, D.K.; BETTERIDGE, D.J.; DEANFIELD, J.E. - Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and LDL-cholesterol levels. **J Am Coll Cardiol**, **28**:573-579, 1996.
- CLARKSON, P., CELERMAJER D.S.; POWE A.J.; DONALD, A.E.; HENRY, R.M.A.; DEANFIELD, J.E. - Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. **Circulation**, **96**:3378-3383, 1997.
- COHEN, R.A.; VANHOUTTE P.M. - Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, **92**:3337-3349, 1995.
- COOKE, J.P.; DZAU, V.J. - Derangements of the nitric oxide synthase pathway, - arginine and cardiovascular disease. **Circulation**, **96**:379-382, 1997.
- COOKE, J.P.; DZAU, V.J. - Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. **Annu. Rev. Med.**, **48**:489-509, 1997.
- COSENTINO, F.; LÜSCHER, T.F. - Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **32**(Suppl 3):S54-S61, 1998.

- COUTINHO, M.; GERSTEIN, H.C.; WANG, Y.; YUSUF, S. - The relationship between glucose and incident cardiovascular events. **Diabetes Care**, **22**: 233, 1999.
- DATTILO, J.B.; MAKHOUL, R.G. - The role of nitric oxide in vascular biology pathobiology. **Ann. Vasc. Surg.**, **11**:307-314, 1997.
- DE ARTIMANO, A.A.; GONZALES, V.L. - Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. **Pharmacol. Res.**, **40**:113-124, . 1999.
- DE CATERINA, R. - Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. **Curr. Opin. Lipid.**, **11**:9-28, 2000.
- DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H.B. - Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J. Clin. Invest.**, **96**:60-68, 1995.
- DESPRÈS, J.P.; LAMARCHE, B.; MAURIÈCE, P.; CANTIN, B.; DAGENAIS, G.R.; MOORJANI, S.; LUPIEN, P.J. - Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. **N. Engl. J. Med.**, **334**:952-957, 1996.
- DOTEVALL, A.; RÂNGEMARK, C.; ERIKSSON, E.; KUTTI, J.; WDAENVIK, H.; WENNEMALN, A. - Cigarette smoking increases thromboxane A₂ formation without affecting platelet survival in young healthy females. **Thromb. Haemost.**, **68**(5):593-588, 1992.
- DREXLER, H. - Endothelial dysfunction: clinical implications. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, **39**:287-324, 1997.
- DREXLER, H.; HORNIG, B. - Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target . endothelial dysfunction in human disease. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **31**:51-60, 1999.
- DUNN, N.R.; FARAGHER, B.; THOROGOOD, M.; DECASTACKER, L.; MACDONALD, T.M.; MCCOLLUM, C.; THOMAS, S.; MANN, R. - Risk of myocardial infarction in young female smokers. **Heart**, **82**:581-583, 1999.

- DZAU, V.J.- Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15 (Suppl. 5):S59 -S64, 1990.
- EASTMAN, R.C.; KEEN, H. - The impact of cardiovascular disease on people with diabetes: the potential for prevention. **Lancet**, 350:29-32, 1997.
- ECKERL, HR. - Natural history of macrovascular disease and classic risk factor for atherosclerosis. **Diabetes Care**, 22(Suppl 3):C21-C24, 1999.
- ELLIOT, H.L. - Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: risk factor, risk marker, or surrogate end point?. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 32(Suppl 3):S74-S77, 1998.
- FERRO, C.J.; WEBB, D.J. - Endothelial dysfunction and hypertension. **Drugs**, 53(Suppl I):30-41, 1997.
- IORE, M.C. - Trends in cigarette smoking in the United States; the epidemiology of tobacco use. **Med. Clin. N. Am.** 76:289-303, 1992.
- FLAVAHAN, N.A.; VANHOUTTE, P.M. - Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. **Am. J. Hypertens.**, 8:28S-41S, 1995.
- FOO LEONG, L.S.H.; BLANN, A.D.; LIP, G.Y.H. - The detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. **Int. J. Cardiol.**, 61:171-174, 1997.
- FORTE, P.; COPLAND, M.; SMITH, L.M.; MILNE, E.; SUTHERLAND, J.; BENJAMIN, N. - Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. **Lancet**, 349:837-842, 1997.
- FREEDMAN, D.S.; GRUCHOW, H.W.; WALKER, J.A.; JACOBSEN, S.J.; ANDERSON, A.J.; SOBOCINSKI, K.A.; BARBORIAK, J.J. - Cigarette smoking and non-fatal infarction in women: is the relation independent of coronary artery disease?. **Br. Heart J**, 62:273-280, 1989.
- FUNG, H.L.; CHUNG, S.J.; BAUER, J.A. - Biochemical mechanisms of organic nitrate action. **Am. J. Cardiol.**, 70:4B-10B, 1992.

- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.B. - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-376, 1980.
- GE, T.; HUGHES, H.; JUNQUERO, D.C.- Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-I and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. **Circ. Res.**, **76**:1003-1010, 1995.
- GIANINI, S.D. - Fatores de risco na aterogenese. In QUINTÃO E.C.R. - **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro. Qualitymark, 1992. p.125-36.
- GIMBRONE, M.A.JR.; NAGEL, T.; TOPPER, J.N. - Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. **J. Clin. Invest.**, **99**:1809-1813, 1997.
- GIMBRONE, M.A.Jr.; TOPPER, J.N. - Biology of the vessel wall: endothelium. In KENNETH, R.; CHIEN, M.D. - **Molecular basis of cardiovascular disease**. Philadelphia; Saunders, 1999. p331-348.
- GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. - Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: which role for oxidative stress?. **Metabolism**, **44**:363-366, 1995.
- GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. - Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, **19**:257-267, 1996.
- GOLIKORSKY, M.S.; TSUKAHARA, H.; MAGAZINE, H.; ANDERSEN, T.T.; MALIK, A.V.; BAHOU, W.F. - Determination of endothelin signalling: role of nitric oxide. **J. Cell. Physiol.**, **158**:485-494, 1994.
- GOODFELLOW, J.; RAMSEY, M.W.; LUDDINGTON, L.A.; JONES, C.J.H.; COATES, P.A.; DUNSTAN, F.; LEWIS, M.J.; OWENS, D.R.; HENDERSON, A.H. - Endothelium and inelastic arteries: an early marker of vascular dysfunction in non-insulin dependent diabetes. **Br. Med. J.**, **312**:744-745, 1996.

- GOTTLIEB, S.; FALLAVOLLITA, J.; MCDERMOTT, M.; BROWN, M.; EBERLY, S.; MOSS, A.J. - Cigarette smoking and the age at onset of a first non-fatal myocardial infarction. **Coron. Artery Dis**, **8**:687-694, 1994.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, L.; SKIPPER, P.L.; WISHNOCK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. - Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, **126**:131-138, 1982.
- HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B. - Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **72**:2994-2998, 1975.
- HE, J.; VUPPUTURI, S.; ALLEN, K.; PREROST, M.R.; HUGHES, J.; WHELTON, P.K. - Passive smoking and the risk of coronary heart disease: a meta-analysis of epidemiologic studies. **N. Engl. J. Med.**, **340**:920-926, 1999.
- HIGASHI, Y.; OSHIMA, T.; SASAKI, N.; ISHIOKA, N.; NAKANO, Y.; OZONO, R.; YOSHIMURA, M.; ISHIBASHI, K.; MATSUURA, H.; KAJIYAMA, G. - Relationship between insulin resistance and endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **Hypertension**, **29**:280-285, 1998.
- HJERMANN, I.; VELVE-BYRE, K.; HOLME, I.; LEREN, P. - Effect of diet and smoking on the incidence of coronary heart disease: report from the Oslo Study Group of a randomised trial in healthy men. **Lancet**, **8259**:1303-1310, 1981.
- HOGAN, M.; CERAMI, A.; BUCALA, R. - Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, **90**:1110-1115, 1992. HONING, M.L.H.; MORRISON, P.J.; BANGA, J.D.; STROES, E.S.G.; RABELINK, T.J. - Nitric oxide availability in diabetes mellitus. **Diabetes Metab. Rev.**, **14**:241-249, 1998.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANT

- HUMPHREY, P.P.; HALLET, P.; HORNBY, E.J.; WALLIS, C.J.; COLLINGTON, E.W.; LUMLEY, P. - Pathophysiological actions of thromboxane A₂ and their pharmacological antagonism by thromboxane receptor blockade with GR32191. **Circulation**, **81**(suppl 1):I42-I52; discussion I 59-60, 1990.
- IGNARRO, L.; MURAD, F. - Nitric oxide: biochemistry, molecular biology, and therapeutic implications. **Advances In Pharmacology**. NY: Academic Press 1995.
- IYAMA, K.; NAGANO, M.; YO, Y.; NAGANO, N.; KAMIDE, K.; HIGAKI, J.; MIKAMI, H.; OGIHARA, T. - Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. **Am. Heart J.**, **132**:779-782, 1996.
- JIANG, L.; SHAO-PING, Z.; XIANG-PING, L.; QI-CHANG, Z.; MEI, G.; SHU-KUN, L. - Non-invasive detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. **Int. J. Cardiol.**, **61**:165-169, 1997.
- JOANNIDES, R.; HAEFELI, W.E.; LINDER, L.; RICHARD, V.; BAKKALI, E.H.; THUILLEZ, C.; LUSCHER, T.F. - Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation in human peripheral conduit arteries *in vivo*. **Circulation**, **91**:1314-1319, 1995.
- KANNEL, W.B. - Update on the role of cigarette smoking in coronary artery disease. **Am. Heart J.**, **101**:319-328, 1981.
- KANNEL, W.B. - Lipids, diabetes and coronary heart disease insights from The Framingham Study. **Am. Heart J.**, **110**:1100-1107, 1985.
- KANNEL, W.B. - Hypertension and other risk factors in coronary heart disease. **Am. Heart J.**, **114**:918-925, 1987.
- KANNEL, W.B. - Hypertension as a risk factor for cardiac events-epidemiologic results of long-term studies. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **21**(Suppl 2):S27-S37, 1993.
- KANNEL, W.B. - Historic perspectives on the relative contributions of diastolic and systolic blood pressure elevation to cardiovascular risk profile. **Am. Heart J.**, **138**:205-210, 1999.

- KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T. - Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on The Framingham Study. **Ann. Int. Med.**, **90**:85-91, 1979.
- KANNEL, W.B.; D'AGOSTINO, R.B.; BELANGER, A.J. - Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: insights from the Framingham Study: **Am. Heart J.**, **113**:1006-1010, 1987.
- KANNEL, W.B.; MCGEE, D.L. - Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham Study, **JAMA**, **241**:2035-2038, 1979.
- KANNEL, W.B.; MCGEE, D.; GORDON, T. - A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. **Am. J. Cardiol.**, **38**:46-51, 1976.
- KIELY, J.M.; CYBULSKY, M.I.; LUSCINSKAS, F.W.; GIMBRONE, A.Jr. - Immunoselective targeting of an anti-thrombin agent to the surface of cytokine-activated vascular endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **15**:1211-1218, 1995.
- KOMOZI, K.; VANHOUTE P.M. - Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Blood Vessels**, **27**:238-245, 1990.
- KRITZ, H.; SCHMID, P.; SINZINGER, H. - Passive smoking and cardiovascular risk: **Arch. Intern. Med.**, **155**:1942-1948, 1995.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. - Nitric oxide an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**:4651-4655, 1991.
- LAURINDO, F.R.M.; LUZ, P.L.; PILEGGI, F. - Endotélio: funções normais e papel na aterosclerose. **In** SOCESP CARDIOLOGIA ATUALIZAÇÃO E RECICLAGEM. São Paulo, Atheneu Editora. 1994, p245-254.
- LEKAKIS, J.; PAPAMICHAEL, C.; VEMMOS, C.; NANAS, J.; KANTOYANIS, D.; STAMATELOPOULOS, S.; MOULOPOULOS, S. - Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. **Am. J. Cardiol.**, **79**:529-531, 1997.

- LEVIN, E.R. - Mechanisms of disease: endothelins. **N. Engl. J. Med.**, **333**:356-363, 1995.
- LI, H.; FÖRSTERMANN, U. – Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. **J. Pathol.**, **190**:244-254, 2000.
- LOSCALZO, J. – Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. **Am. J. Cardiol.**, **70**:18B-22B, 1992.
- LUSCHER, T.F.; BARTON, M - Biology of the endothelium. **Clin. Cardiol.**, **20 (SupplIII)**:II3-II10, 1997.
- MATTSEN, E.; KOHLER, T.; VERGIL, S. - Gene expression of nitric oxide synthase increases and intimal hyperplasia regresses with increased blood flow in baboons. **J. Vasc. Res.**, **33(Suppl 1)**:256, 1996.
- MCBRIDE, P.E. - The health consequences of smoking: cardiovascular diseases. **Med. Clin. N. Am.**, **76**:333-354, 1992.
- MCVEIGH, G.E.; BRENNAN, G.M.; JOHNSON, G.D. - Impaired endothelium-dependent and independent vasodilatation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, **35**:771-776, 1992.
- MCVEIGH, G.E.; LEMAY, L.; MORGAN, D.; COHN, J.N. - Effects of long-term cigarette smoking on endothelium-dependent responses in humans. **Am. J. Cardiol.**, **78**:668-672, 1996.
- MEADE, T.W.; IMESON, J.; STIRLING, V. - Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. **Lancet**, **2**:986-988, 1987.
- MEHTA, J.L.; ROBERTS, A. - Human vascular tissues produce thromboxane as well as prostacyclin. **Am. J. Physiol.**, **244**:R839-R844, 1983.

- MILEI, J.; GRANA, D.R. - Mortality and morbidity smoking-induced cardiovascular diseases: the necessity of the cardiologist's involvement and commitment. **Int. J. Cardiol.**, **67**:95-109, 1998.
- MJOS, O.D. - Lipid effects of smoking. **Am. Heart J.**, **115**:272-275, 1988.
- MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE P.M. - Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). Up-dating the unknown. **Trends Physiol.**, **18**:252-256, 1997.
- MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P.M. - Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **31**:61-74, 1999.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**:109-142, 1991.
- MONCADA, S.; VANE, J.R. - Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.**, **30**:293-331, 1979.
- MORENO, Jr, H.; CHALON, S.; URAE, A.; TANGPHAO, O.; ABIOSE, A.K.; HOFFMAN, B.B.; BLASCHKE, T.F. - Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. **Am. J. Physiol.**, **275**:H1040-H1045, 1998.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R.; JANSEN, P.L.M. - Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. **Clin. Chem.**, **41**(6):892-896, 1995.
- MOTOYAMA, T.; KAWANO, H.; KUGIYAMA, K.; HIRASHIMA, O.; OHGUSHI, M.; YOSHIMURA, M.; OGAWA, H.; YASUE, H. - Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C. **Am. J. Physiol.**, **273**:H1644-H1650, 1997.

- MULTIPLE RISK FACTOR INTERVENTION TRIAL RESEARCH GROUP: - Mortality rates after 10.5 years for participants in the multiple risk factor interventional trial. Findings related to a priory hypothesis of the trial. **JAMA**, **263**: 1795-1801, 1990.
- MURAD, F. - Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function: introduction and some historical comments. **Adv. Pharmacol.**, **26**:1-5, 1994.
- MURAD, F. - The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. **JAMA**, **276**:1189-1192, 1996.
- NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS. Annual summary of births, marriages, divorces and deaths, United States 1994. **Monthly Vital Statistics Report**, **43**:13, 1995.
- NODE, K.; KITAKAZE, M.; YOSHIKAWA, H.; KOSAKA, H.; HARI, M. - Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. **Am. J. Cardiol.**, **79**:1538-1541, 1997.
- NOWAK, J.; MURRAY, J.J.; OATES, J.; FITZGERALD, G.A. - Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. **Circulation**, **76**:6-14, 1987.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. - Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327**:524-526, 1987.
- PANZA, J.A. - Endothelial dysfunction in essential hypertension. **Clin. Cardiol.**, **20**(Suppl II):II26-II30, 1997.
- PANZA, J.A.; CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A. - Role of the endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation**, **87**:1468-1474, 1993.

- PANZA, J.A.; QUYYUMI, A.A.; BRUSH Jr, E.; EPSTEIN, S.E. - Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, **323**:22-27, 1990.
- PARISH, S.; COLLINS, R.; PETO, R.; YOUNGMAN, L.; BARTON, J.; JAYNE, K.; CLARKE, R.; APPLEBY, P.; LYON, V.; CEDERHOLM-WILLIAMS, S.; MARSHALL, J.; SLEIGHT, P. - Cigarette smoking, tar yields, and non-fatal myocardial infarction: 14,000 cases and 32,000 controls in the United Kingdom. The International Studies of Infarction Survival (ISIS) collaborators. **BMJ**, **311**:471-477, 1995.
- PETO, R.; LOPEZ, A.D.; BOREHAN, J.; THUN, M.; HEATH Jr, C. - Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. **Lancet**, **339**:1268-1278, 1992.
- POREDOS, P.; OREHEK, M.; TRATNIK, E. - Smoking is associated with dose-related increase of intima media thickness and endothelial dysfunction. **Angiology**, **50**:201-208, 1999.
- REAVEN, G.M. - Role of insulin resistance in human disease. Banting Lecture, **Diabetes**, **37**:1595-1606, 1988.
- ROSENBERG, L.; SHAPIRO, S.; KAUFMAN, D.W.; SLONE, D.; MIETTINEN, O.S.; STOLLEY, P.D. - Cigarette smoking in relation to the risk of myocardial infarction in young women. Modifying influence of age and predisposing factors. **Int. J. Epidemiol.**, **9**:57-63, 1980.
- ROSS R. - Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interaction with blood components. **Arteriosclerosis**, **2**:293, 1981.
- ROSS, R. - The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, **362**:801-809, 1993.

- ROSS, R.; FAGGIOTTO, A.; BOWEN-POPE, D.; RAINES, E. - The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. **Circulation**, **70**:77-82, 1984.
- ROSS, R.; GLOMSET, J.A. - The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). **N. Engl. J. Med.**, **295**: 369-377, 1976a.
- ROSS, R.; GLOMSET, J.A. - The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). **N. Engl. J. Med.**, **295**:420-425, 1976b.
- RUBANYI, G.M.; POLOKOFF, N.A - Endothelin: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacol. Rev.**, **46**:325-415, 1994.
- RUDERMAN, N.B.; HAUDENSCHILD, C. - Diabetes as an atherogenic factor. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, **26**:373-412, 1984.
- SCHÖR, K. – Prostacyclin (prostaglandin I₂) and atherosclerosis, **In** RUBANYI, G.M.; DZAU, V. **The endothelium in clinical practice. Source and target of novel therapies**, Marcel Dekker, Inc. New York, p 1-42, 1997.
- SHERMAN, C.B. - Health effects of cigarette smoking. **Clin. Chest Med**, **12**:643-658, 1991.
- SHIMOKAWA, H. - Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **31**:23-37, 1999.
- SHIGE, H.; ISHIKAWA, T.; SUZUKAWA, M.; ITO, T.; NAKAJIMA, K.; HIGASHI, K.; AYAORI, M.; TABATA, S. - Endothelium-dependent flow mediated vasodilation in the postprandial state in type 2 diabetes mellitus. **Am. J. Cardiol.**, **84**:1272-1274, 1999.
- SIMONIESCU, M.; SIMONIESCU, N. - Functions of the endothelial cell surface. **Annu. Rev. Physiol.**, **48**:279-293, 1986.

- SINOWAY, L.I.; HENDRICKSON, C.; DAVIDSON W.R.JR.; PROPHET, S.; ZELIS, R. – Characteristics of flow-mediated brachial artery vasodilation in human subjects. **Circ. Res.**, **64**:32-42, 1989.
- SORENSEN, K.E.; CELERMAJER, D.S.; SPIEGELHALTER, D.S.; GEORGAKOPOULUS, D.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J.E. - Non-invasive measurement of endothelium-dependent arterial responses in man: accuracy and reproducibility. **Br. Heart J.**, **74**:247-253, 1995.
- SOWERS, J.R.; LESTER, M.A. - Diabetes and cardiovascular disease. **Diabetes Care**, **22**:C14-C19, 1999.
- STANTON, A.; GLANTZ, S.A.; PARMLEY, W.W. - Passive smoking and heart disease. **JAMA**, **273**:1047-1051, 1995.
- STEENLAND, K.- Passive smoking and the risk of heart disease. **JAMA**, **267**:94-99, 1992.
- STEINER, G. - Risk factors for macrovascular disease in type 2. **Diabetes Care**, **22**:C6-C9, 1999.
- STERN, M. - Natural history of macrovascular disease in type 2 diabetes. Role of insulin resistance. **Diabetes Care**, **22**(Suppl 3):C2–C5, 1999.
- SUNG, B.H.; WILSON, M.F.; IZZO Jr, J.L.; RAMIREZ, L.; DANDONA, P. – Moderately obese, insulin resistant women exhibit abnormal vascular reactivity to stress. **Hypertension**, **30**:848-853, 1997.
- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SALVETTI, A. - Endothelial function and arterial hypertension. **Ann. Ital. Med. Int.**, **10**:85S-90S, 1995.
- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SALVETTI, A. - Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **32**(Suppl 3):S41–S47, 1998.

- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; MATTEI, P.; GHIADONI, L.; FASOLO, C.B.; SUDANO, L.; SALVETTI, A. - Hypertension causes premature ageing of endothelial function in humans. **Hypertension**, **29**:736-743, 1997.
- TESFAMARIAM, B.; COHEN, R.A. - Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. **Am. J. Physiol.**, **263**:H321-H326, 1992.
- TRAUB, O.; BERK, B.C. - Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **18**:677-685, 1998.
- TURNER, R.C.; MILLNS, H.; NEIL, H.A.W.; STRATTON, M.; MANLEY, S.E.; MATTHEWS, R.; HOLMAN, R. - Risk factor for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. United Kingdom Prospective Diabetes Study. **Br. Med. J.**, **316**:823-828, 1998.
- VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. - Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **Lancet**, **2**:997-1000, 1989.
- VANE, J.R.; ÄNGGÅRD, E.E.; BOTTING, R.M. - Mechanisms of disease: regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.**, **323**:27-36, 1990.
- VANHOUTTE, P.M. - The other endothelium-derived vasoactive factor(s). **Circulation**, **87(suppl)**:V9-V17, 1993.
- VANHOUTTE, P.M. - Endothelium dysfunction in hypertension. **J. Hypertens.**, **14**:S83-S93, 1996.a
- VANHOUTTE, P.M. - **Endothelium-derived hyperpolarizing factor**. The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 1-338, 1996.b
- VANHOUTTE, P.M. - Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. **Eur. Heart J.**, **12**(Suppl E):25-32, 1999.

- VITA, J.A.; TREASURE, C.B.; NABEL, E.G.; MCLENACHAN, J.M.; FISH, R.D.; YEUNG, A.C.; VEKSTEIN, V.I.; SELWYN, A.P.; GANZ, P. - Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. **Circulation**, **81**:491-497, 1990.
- VOGEL, R.A. - Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review, **Clin. Cardiol.**, **20**:426-432, 1997.
- WALDMAN, A.S.; MURAD, F. - Cyclic GMP: Synthesis and function. **Pharmacol. Rev.**, **39**:163-175, 1994.
- WALPOLA, P.L.; GOTLIEB, A.I.; CYNULSKY, M.I.; LANGILLE, B.L. - Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **15**:2-10, 1995.
- WATTS, G.F.; PLAYFORD, D.A. - Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. **Atherosclerosis**, **14**:17-30, 1988.
- WENNMALM, A.; BENTHIN, G.; GRANSTROM, E.F.; PERSSON, L.; PETERSSON, A.S.; WINELL, S. - Relation between tobacco use and urinary excretion of thromboxane A₂ and prostacyclin metabolites in young man. **Circulation**, **83**:1698-1704, 1991.
- WILLIAMS, S.B.; CUSCO, J.A.; RODDY, M. A.; JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, M.A. - Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **27**:567-574, 1996.
- WU, K.K. - Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. **J. Formos. Med. Assoc.**, **95**:661-666, 1996.
- WU, K.K.; THIAGARAJAN, P. - Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. **Annu. Rev. Med.**, **47**:315-331, 1996.

- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S. - A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332:411-415, 1988.
- ZATZ, R.; BAYLIS, C. - Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension**, 32:958-964, 1998.

9. ANEXOS



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 XX 19 7888936
fax 0 XX 19 7888925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

Campinas, 03 de outubro de 2.000

**PARECER CONSUBSTANCIADO
PESQUISA Nº 180/99**

I-IDENTIFICAÇÃO

-TÍTULO: ESTUDO DA REATIVIDADE VASCULAR E MARCADORES DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM HIPERTENSOS, DIABÉTICOS E TABAGISTAS.

-PESQUISADOR: Heitor Moreno Júnior

-INSTITUIÇÃO: Farmacologia/FCM/UNICAMP

II-OBJETIVOS

Quantificar o grau de disfunção vascular através de um estudo de ultra-som com Doppler de alta resolução e correlacionar este com os níveis plasmáticos de óxido nítrico, tromboxane A₂, e outros indicadores em indivíduos saudáveis, hipertensos, diabéticos e tabagistas.

III-SUMÁRIO

Cerca de 60 voluntários, 12-15 por grupo, serão classificados como controles, hipertensos (graus I, II e III), tabagistas habituais e diabéticos não euglicêmicos. Em um período de quatro horas, cada voluntário será submetido a quatro testes com o ultra-som – um inicial, um durante o estímulo mecânico, um após a recuperação deste e um logo após a administração de um estimulante farmacológico. Simultaneamente em cada etapa, serão tomados 20 ml de sangue no total para posterior avaliação das quantidades plasmáticas de óxido nítrico e seus metabólitos, tromboxane A₂, peroxidase lipídica, glutathione redutase, ICAM e VCAM. Os dados obtidos serão avaliados estatisticamente para a correlação entre os vários grupos.

IV-COMENTÁRIOS DO RELATOR

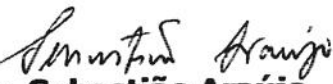
Após os devidos esclarecimentos, o projeto atende a resolução 196/96, sendo que os aspectos éticos foram inseridos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, O Consentimento Informado Adicional para Mulheres com Potencial de Engravidar, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP, em 15 de fevereiro de 2000.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

CONSENTIMENTO DOS VOLUNTÁRIOS.

**ESTUDO DA REATIVIDADE VASCULAR EM TABAGISTAS,
DIABÉTICOS E HIPERTENSOS**

DATA __/__/__

CARTA DOS DIREITOS DO VOLUNTÁRIO EM PESQUISA MÉDICA

Os indivíduos que participam da pesquisa médica adquirem certos direitos. Esses direitos incluem:

a) Informações e explicações a respeito:

Dos procedimentos, aparelhos e drogas a serem utilizados;

Da natureza e proposta da pesquisa;

De possíveis desconfortos e riscos que possam possivelmente ocorrer ou aos quais possam estar sujeitos;

De possíveis benefícios advindos da pesquisa;

De outras alternativas de tratamento que possam lhes ser vantajosas;

Da evolução da pesquisa e dos resultados referentes a si próprio.

b) Encaminhamento a tratamento médico, caso complicações ocorram;

c) Fazer questões a respeito dos experimentos ou procedimentos envolvidos;

d) Serem instruídos de que o consentimento para participar do estudo pode ser retirado a qualquer momento, inclusive sem justificativas, sem prejuízo do tratamento/seguimento do voluntário por parte da instituição de saúde;

e) Receberem uma cópia deste consentimento datada e assinada pelo pesquisador e/ou seus auxiliares autorizados para tal;

f) Consentirem ou não em participar do estudo sem qualquer coerção ou outro tipo de influência por parte de elementos envolvidos na pesquisa;

Assinatura do voluntário

Data

Assinatura do investigador ou testemunha

CONSENTIMENTO INFORMADO

Você está convidado a participar de um estudo sobre o hábito de fumar, como o diabetes melito e a hipertensão arterial afetam a resposta dos vasos sanguíneos em humanos. Nós estudaremos se a resposta dos vasos sanguíneos é modificada pelo tabagismo, níveis de glicose elevados no sangue e níveis pressóricos elevados nestas condições.

Se você decidir participar no estudo, o Dr. Heitor Moreno Jr. ou Dr. Juan Carlos Yugar Toledo, ou outros médicos da equipe descreverão detalhadamente o estudo a você. Você será submetido a um estudo da função dos vasos sanguíneos, descrito a seguir:

Exame ultra-sonográfico da artéria do braço, seguido de compressão do braço com manguito de aparelho de pressão convencional durante 5 minutos, liberação do manguito, após este período, e descanso por quinze minutos para permitir a completa recuperação funcional do vaso em estudo. Finalmente será administrada nitroglicerina sublingual. A nitroglicerina é usualmente prescrita para pacientes portadores de angina do peito, podendo causar como efeitos colaterais a cefaléia e a hipotensão (menos freqüentemente).

Se você é mulher em idade reprodutiva, tem que estar usando método anticoncepcional (pílula ou DIU) por pelo menos 3 meses antes do estudo ou ter sido submetida à cirurgia de esterilização. Isto é para que se tenha certeza de que você não está grávida e não ficará grávida durante todo o estudo. Você deve também estar ciente de que mesmo o mais efetivo dos métodos anticoncepcionais tem um pequeno risco de permitir a gravidez.

Enquanto participando deste estudo, você não deve tomar parte em outro projeto de pesquisa sem a aprovação dos pesquisadores envolvidos nos estudos.

Após o período de 4 horas, você poderá alimentar-se e deambular normalmente, retornando em seguida ao lar.

Amostras de sangue seriadas serão coletadas durante o estudo. O volume total de sangue a ser coletado durante o período total de estudo (6 meses) não será superior a 400 ml.

Este estudo poderá resultar em uma melhor compreensão dos efeitos do hábito de fumar, do diabetes e da hipertensão arterial sobre os vasos sanguíneos.

NÓS NÃO PODEMOS GARANTIR QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTE ESTUDO.

Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade, entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e da identidade dos voluntários envolvidos nela.

Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Dr. Juan Carlos Yugar Toledo (fone: 017-227-3057).

Todos os tipos de tratamento ou diagnóstico médico, experimentais ou não, envolvem algum risco de prejuízo à saúde. O estudo será realizado em ambiente ambulatorial, portanto com os recursos disponíveis para atendimento de possíveis emergências. Apesar de todas as precauções, complicações podem ocorrer decorrentes de sua participação no estudo. Nesse caso, você será encaminhado para assistência médica. A duração prevista do estudo será de 18 meses.

A SUA ASSINATURA, EM CADA PÁGINA DESTE DOCUMENTO, SIGNIFICA QUE: VOCÊ LEU E ENTENDEU AS INFORMAÇÕES ACIMA; VOCÊ DISCUTIU O ESTUDO COM O INVESTIGADOR PRINCIPAL E/OU SUA EQUIPE; VOCÊ DECIDIU PARTICIPAR DO ESTUDO COM BASE NAS INFORMAÇÕES FORNECIDAS; UMA CÓPIA DESTE CONSENTIMENTO FOI DADA A VOCÊ.

Assinatura do voluntário

Data

Assinatura do investigador ou testemunha

TABELAS A-H

Tabela A – Parâmetros referentes às variáveis analisadas no grupo-controle

	Média	Desvio-Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Idade	43,3	12,02	64	27	34,75	50,75
Peso	76,5	18,37	116	53	63,25	81,25
Altura	168,2	7,21	180	157	160,75	174,25
IMC	27	6	45	19	24	28
PAS	126,4	12,78	150	110	120	140
PAD	80,3	4,14	90	70	80	80
FC	79,8	12,63	98	55	75	90
Cigarros/dia	0	0	0	0	0	0

Tabela B. Níveis séricos de exames bioquímicos avaliados no grupo-controle

	Média	Desvio-Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Glicemia	89,56	11,17	109	72	82,75	98,50
Hb.Glicosilada	7,05	0,68	8	6,4	6,65	7,45
Colest. Total	215,56	34,15	270	170	183,75	241,00
LDL colest.	132,63	31,60	170	91	104,00	162,50
Triglicérides	168,20	71,87	283	69	104,50	241,75
Creatinina	0,82	0,08	0,9	0,7	0,78	0,90
Uréia	36,40	8,26	47	28	29,50	44,00
Hemoglob.	14,62	0,99	15,4	13,3	13,68	15,33
Hematócrito	44,96	3,15	41,10	46,70	41,78	47,45
AST	27,20	5,97	21	26	22,50	31,50
ALT	27,40	5,59	20	30	22,25	31,50
Gama GT	24,60	8,08	15	26	18,00	29,25
DHL	257,00	33,00	234	241	237,25	271,25
CPK	99,40	32,20	60	114	68,50	121,50

Tabela C - Parâmetros referentes às variáveis analisadas no grupo tabagistas

	Média	Desvio- Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Idade	43,87	8,14	59	22	42	48,75
Peso	75,47	14,37	105	53	64	86,50
Altura	163,47	11,46	183	150	154,50	166,75
IMC	29	4	34	21	26	33
PAS	127,14	14,90	160	110	110	140
PAD	81,07	11,63	110	65	70	86
FC	70,60	10,18	92	58	63,25	74
Cigarros/dia	22,3	6,23	30	15	16,3	30

Tabela D - Níveis séricos de exames bioquímicos avaliados no grupo tabagistas.

	Média	Desvio- Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Glicemia	91,6	16,33	124	72	77	101
Hb.Glicosilada	7,1	0,99	7,8	6,0	6,4	7,6
Colest. Total	180,1	37,03	230	100	156,5	204,0
LDL colest.	101,7	35,44	136	44	65,5	134,0
Triglicérides	183	71,36	343	85	150,25	209,75
Creatinina	0,9	0,23	1,0	0,7	0,7	1,0
Uréia	30,7	4,18	35	25	26	34
Hemoglob.	16,2	1,3	17,9	15,0	15,2	17,15
Hematócrito	49,1	3,96	54,5	46,0	46,15	52,05
AST	24,7	8,52	36	12	19,50	32,50
ALT	30,6	32,91	65	17	20,25	35,50
Gama GT	40,1	58,91	114	21	23,75	32,75
DHL	327,2	32,51	418	259	289,0	355,0
CPK	79,3	15,01	131	49	55,0	104,25

Tabela E - Parâmetros referentes às variáveis analisadas no grupo diabéticos

	Média	Desvio- Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Idade	53,08	9,73	65	41	43,00	62,75
Peso	76,39	17,18	121	55	64,75	85,25
Altura	163,08	10,67	182	150	155,00	174,25
IMC	28	5	41	22	25	30
PAS	132,69	13,33	150	110	127,50	141,25
PAD	80,2	10,10	100	70	80,00	90,00
FC	84,31	17,59	123	60	73,25	96,00
Cigarros/dia	0	0	0	0	0	0

Tabela F - Níveis séricos de exames bioquímicos avaliados no grupo diabéticos

	Média	Desvio- Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Glicemia	225,67	42,73	302	172	193,00	253,75
Hb.Glicosilada	10,86	1,64	12,5	8,5	9,3	12,25
Colest. Total	221,75	45,33	291	175	181,00	263,00
LDL colest.	150,00	54,89	240	76	114,50	193,50
Triglicérides	185,38	82,53	311	59	135,00	252,00
Creatinina	0,9	0,25	1,4	0,7	0,9	5,40
Uréia	32,50	13,40	55	21	22,00	44,00
Hemoglob.	13,1	1,30	14,4	11,8	12,13	14,08
Hematócrito	40,43	4,37	45	36,3	37,23	43,76
AST	19,50	10,02	39	11	14,00	20,00
ALT	16,33	3,08	18	10	14,00	20,00
Gama GT	42,40	37,40	106	11	17,76	56,50
DHL	348,33	28,66	379	308	319,00	372,00
CPK	109,83	62,73	179	37	55,00	179,00

Tabela G - Parâmetros referentes às variáveis analisadas no grupo hipertensos

	Média	Desvio- Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Idade	52,8	9,70	65	40	44,5	62,75
Peso	88,67	20,47	125	57	78	109
Altura	169,7	6,40	183	160	165,50	174,25
IMC	30	06	42	21	25	35
PAS	159,33	10,10	180	140	150	170
PAD	106,67	7,48	120	90	101,25	110,0
FC	76,27	15,01	109	54	66	87
Cigarros/dia	0	0	0	0	0	0

Tabela H - Níveis séricos de exames bioquímicos avaliados no grupo hipertensos

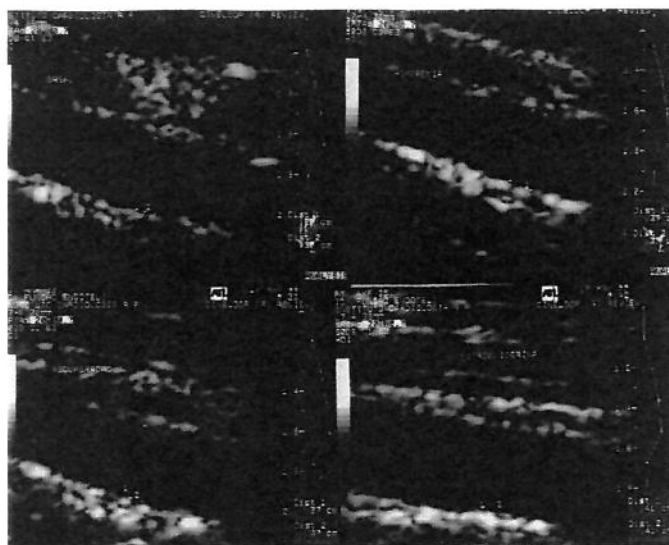
	Média	Desvio- Padrão	Máximo	Mínimo	25%	75%
Glicemia	103,67	14,24	127	82	94,0	117,50
Hb.Glicosilada	7,00	0,14	7,1	6,9	6,9	7,1
Colest. Total	199,17	30,92	240	149	172,0	22,5
LDL colest.	116,75	24,97	157	79	94,5	129,5
Triglicérides	162,36	74,64	296	74	106,25	201,5
Creatinina	0,9	0,21	1,4	0,7	0,77	0,92
Uréia	34,2	7,54	51	37	28,75	38,0
Hemoglob.	14,4	1,74	16,4	12,5	12,8	16,03
Hematócrito	44,02	4,45	48,6	38,1	41,1	48,38
AST	25,29	3,50	30,0	21,0	22,25	28,5
ALT	29,29	8,48	43,0	20,0	24,0	36,25
Gama GT	45,33	42,61	130,0	17,0	23,0	46,0
DHL	269,86	147,79	463,0	58,0	143,75	381,0
CPK	139,33	76,32	248,0	52,0	64,0	202,0

**FOTOGRAFIAS DE CONTROLES, TABAGISTAS,
DIABÉTICOS, HIPERTENSOS**

CONTROLES

Basal

Recuperação

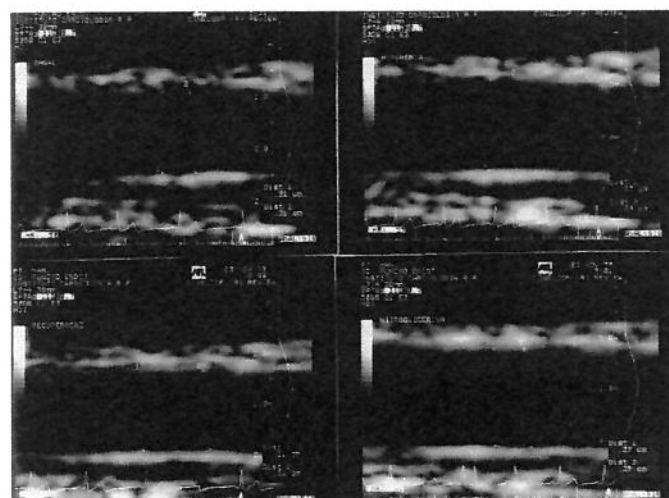


Hiperemia

NTG

Basal

Recuperação

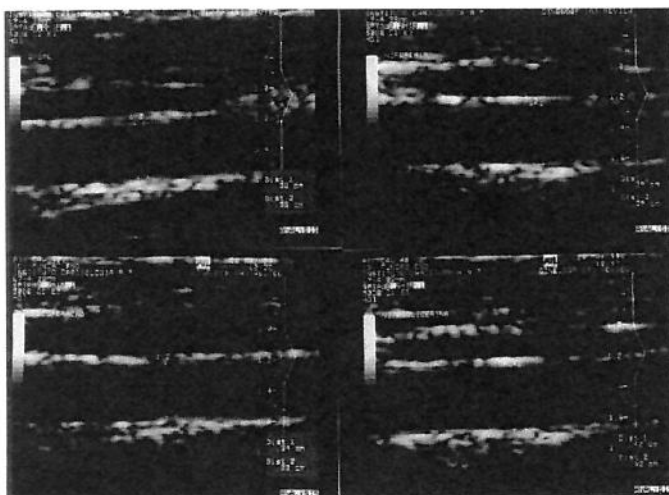


Hiperemia

NTG

Basal

Recuperação



Hiperemia

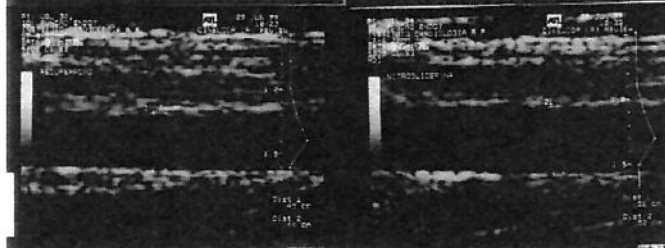
NTG

Basal



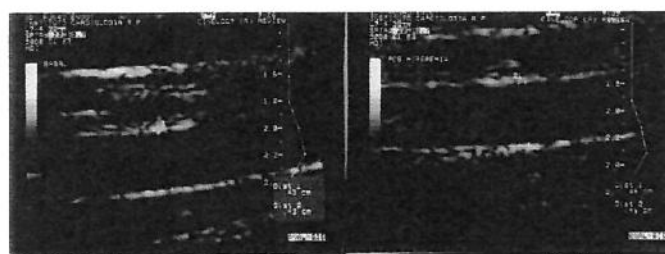
Hiperemia

Recuperação



NTG

Basal



Hiperemia

Recuperação



NTG

Basal



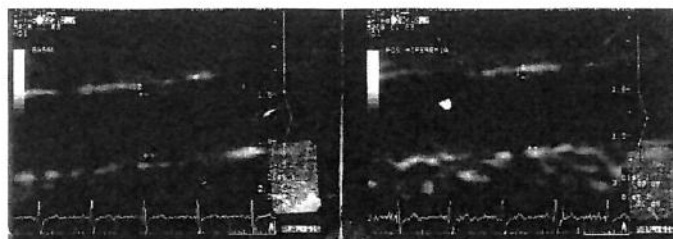
Hiperemia

Recuperação



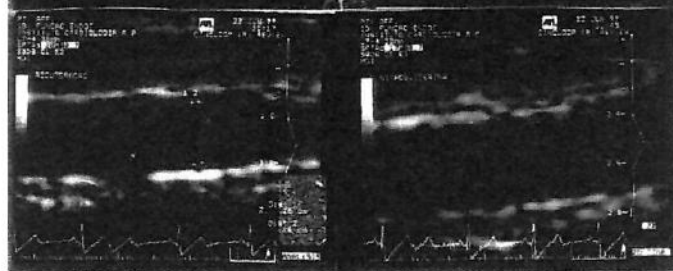
NTG

Basal



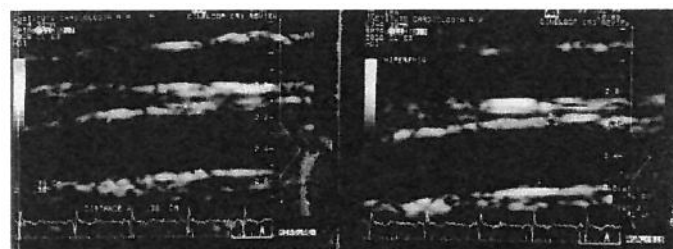
Hiperemia

Recuperação



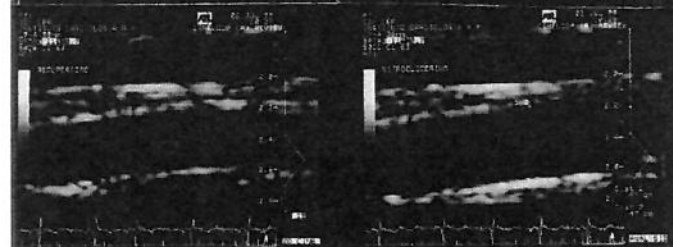
NTG

Basal



Hiperemia

Recuperação



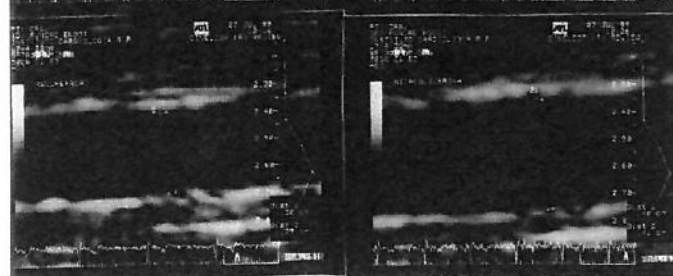
NTG

Basal

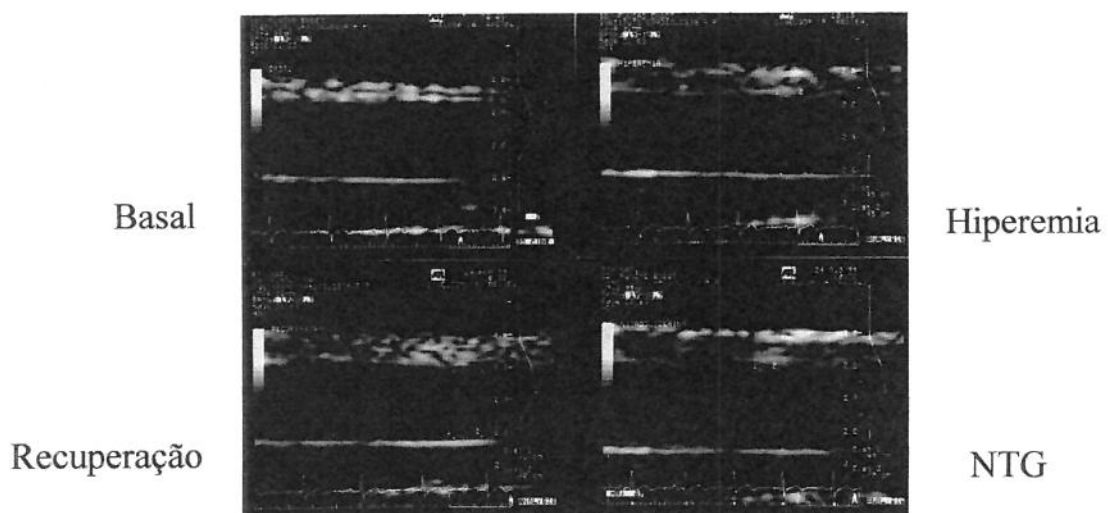
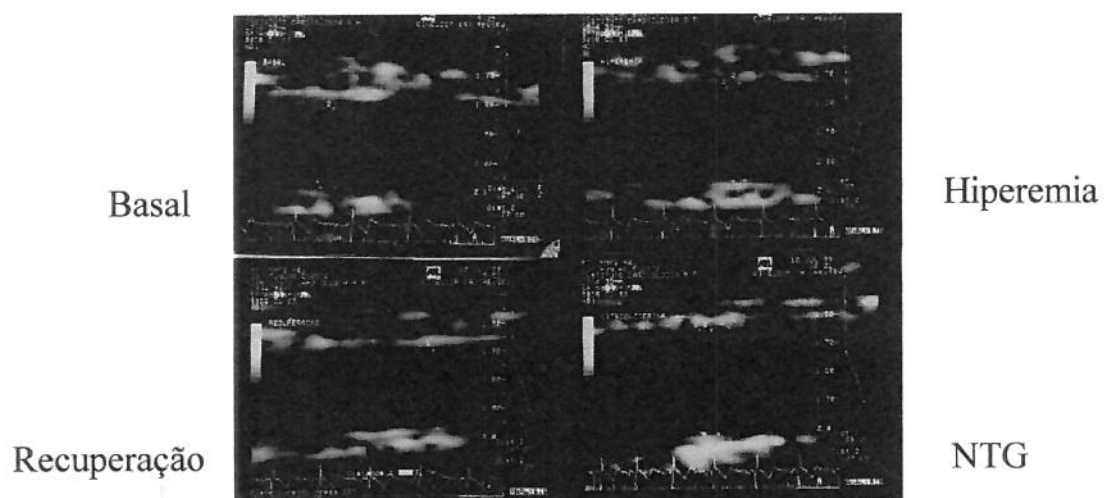
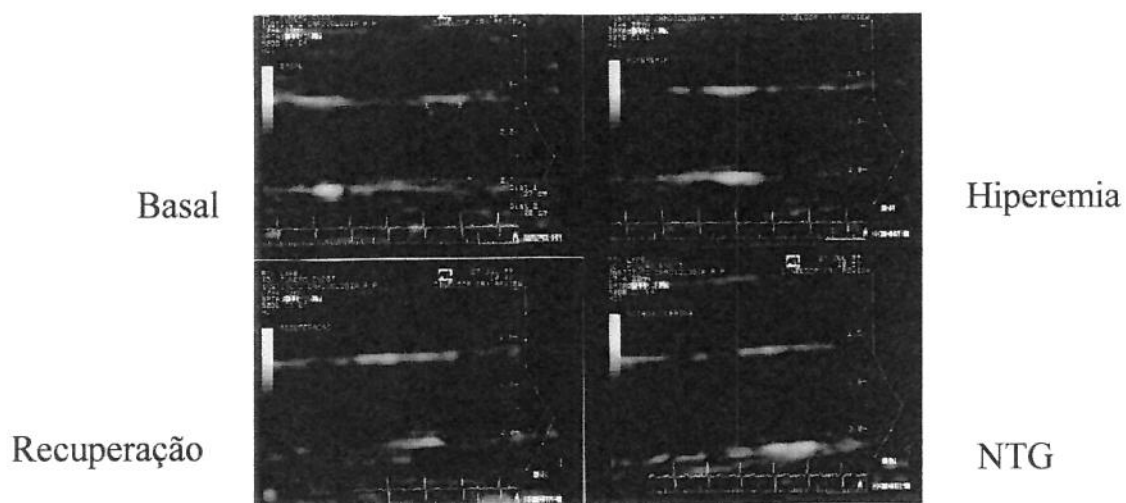


Hiperemia

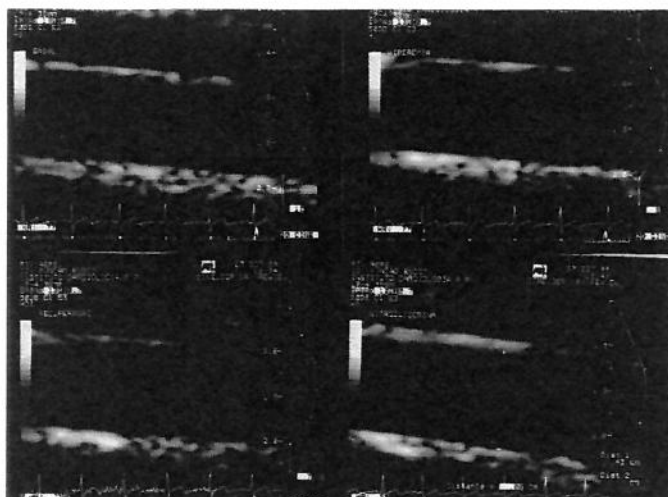
Recuperação



NTG



Basal

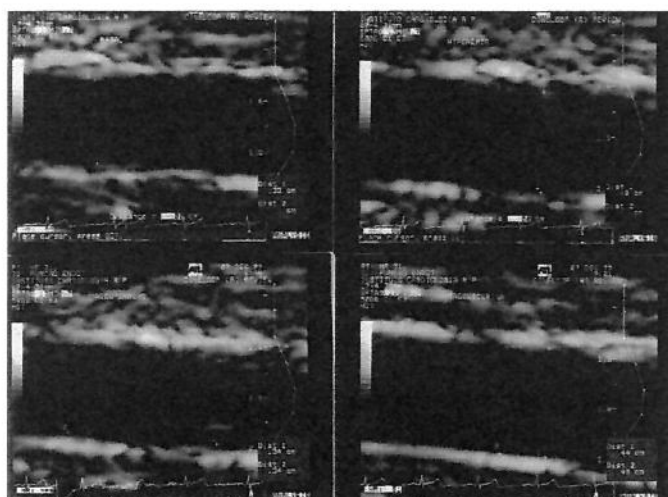


Hiperemia

Recuperação

NTG

Basal

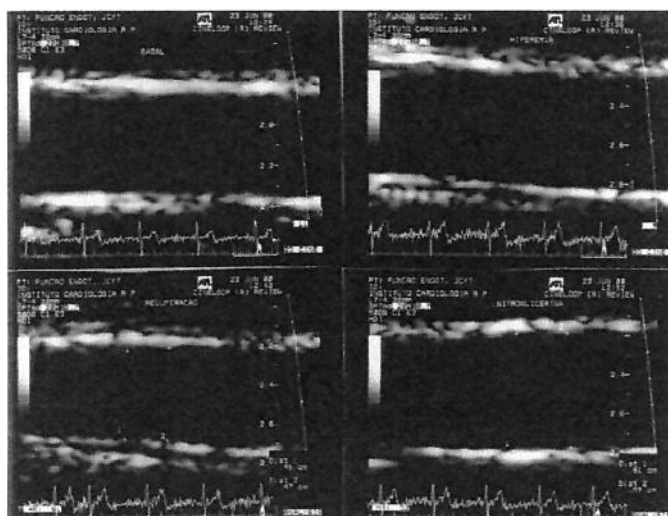


Hiperemia

Recuperação

NTG

Basal

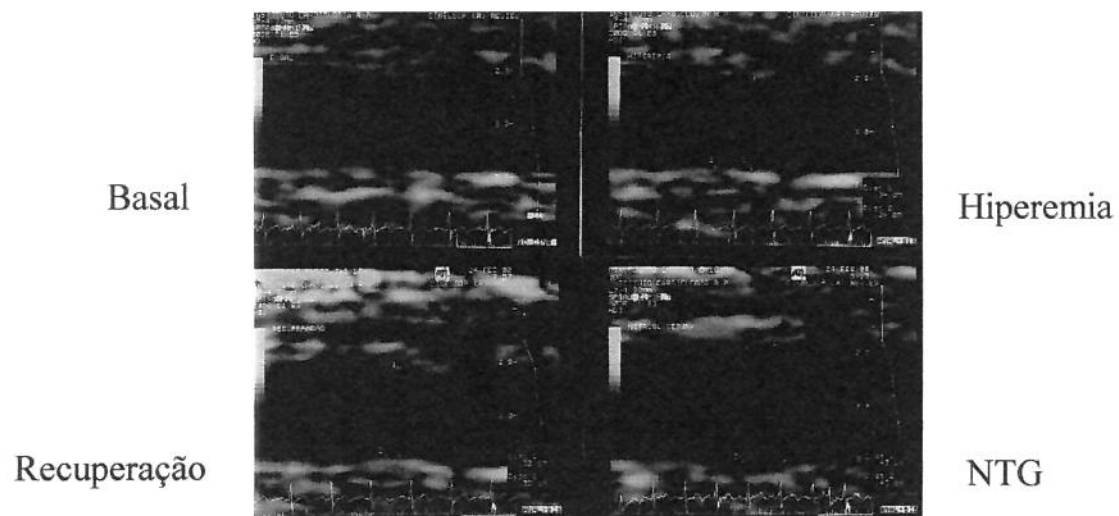
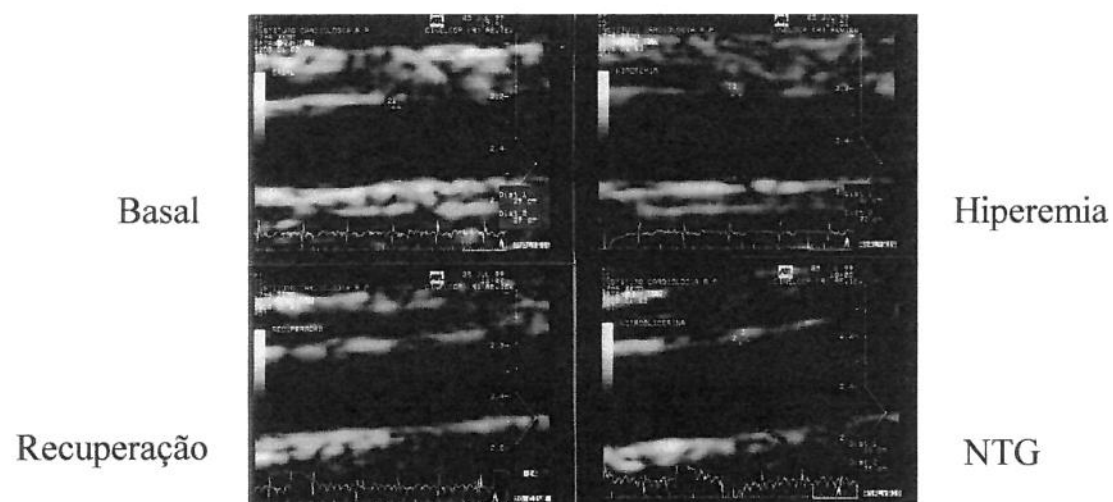
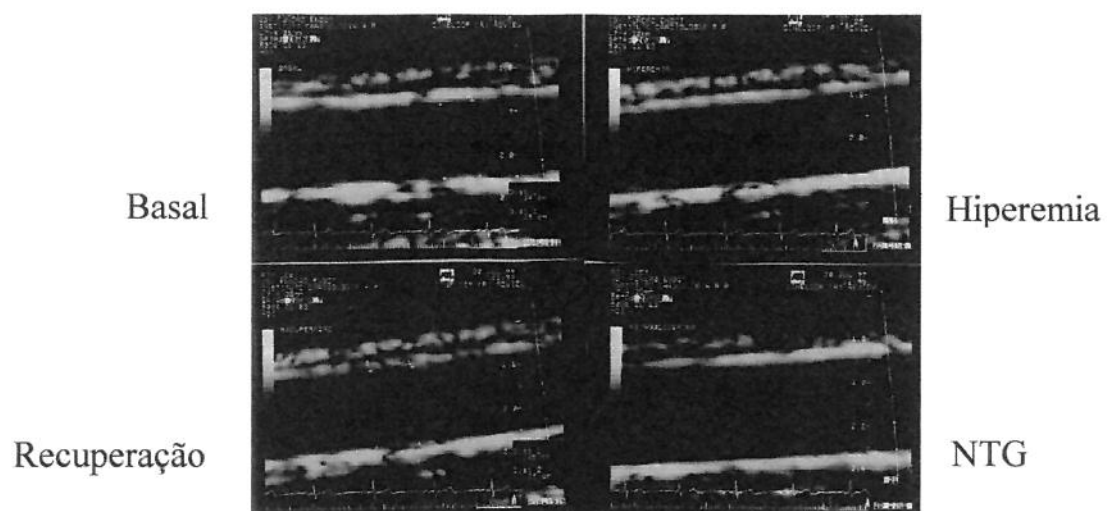


Hiperemia

Recuperação

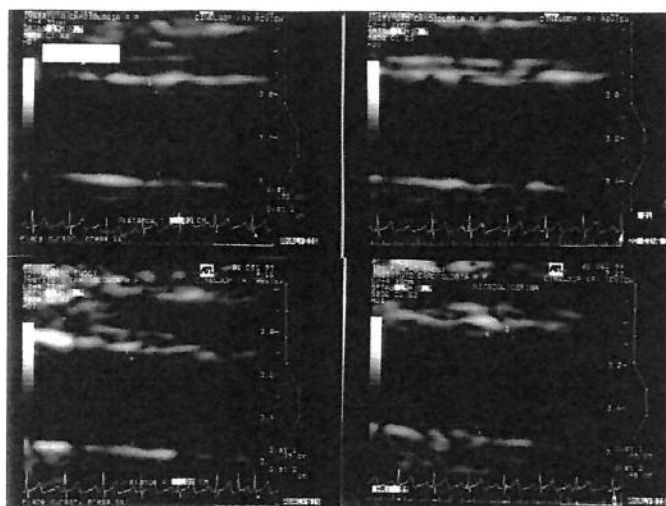
NTG

TABAGISTAS



Basal

Recuperação

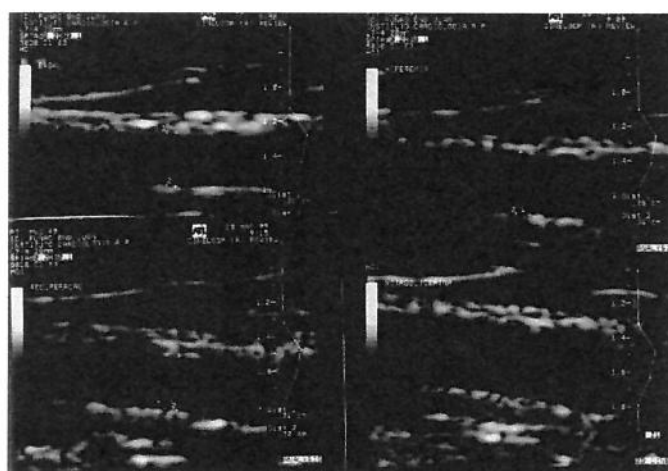


Hiperemia

NTG

Basal

Recuperação

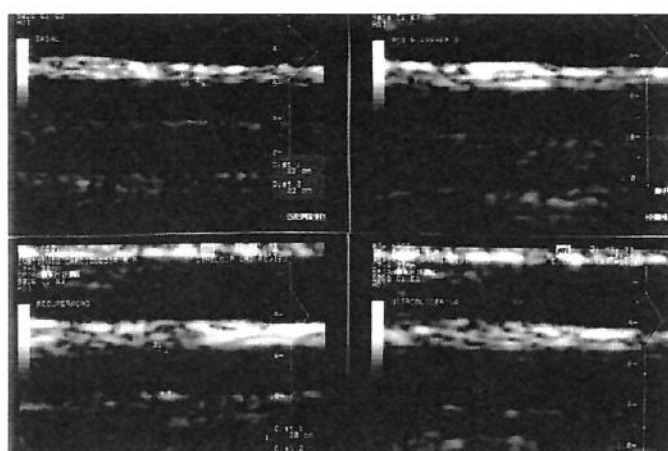


Hiperemia

NTG

Basal

Recuperação



Hiperemia

NTG

Basal



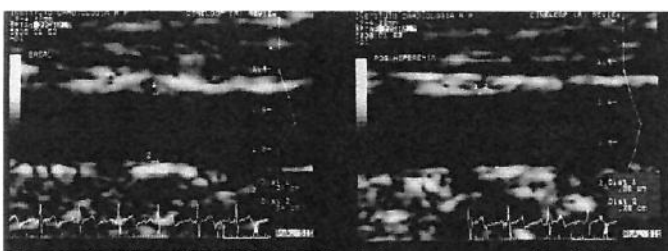
Hiperemia

Recuperação



NTG

Basal



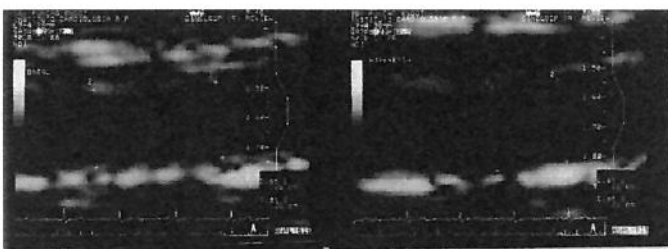
Hiperemia

Recuperação



NTG

Basal



Hiperemia

Recuperação



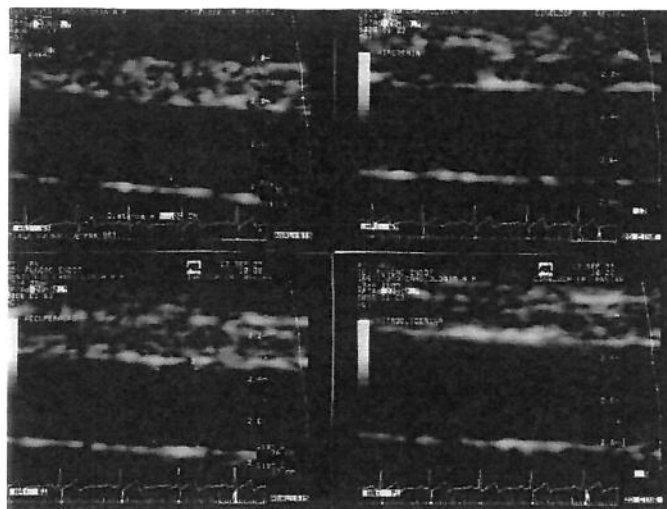
NTG

Basal

Hiperemia

Recuperação

NTG

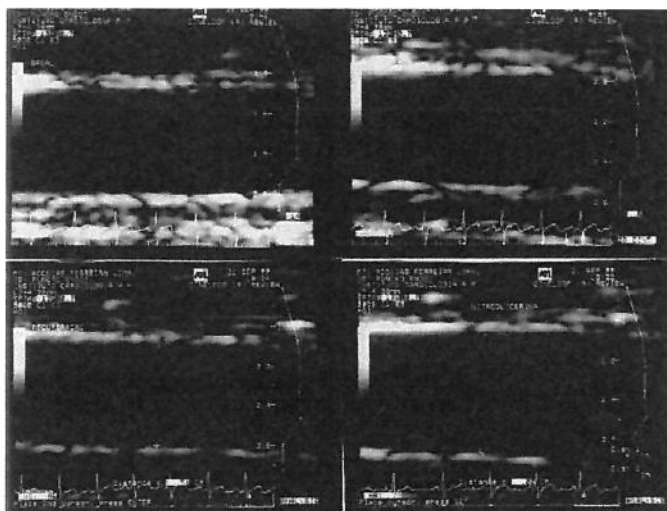


Basal

Hiperemia

Recuperação

NTG

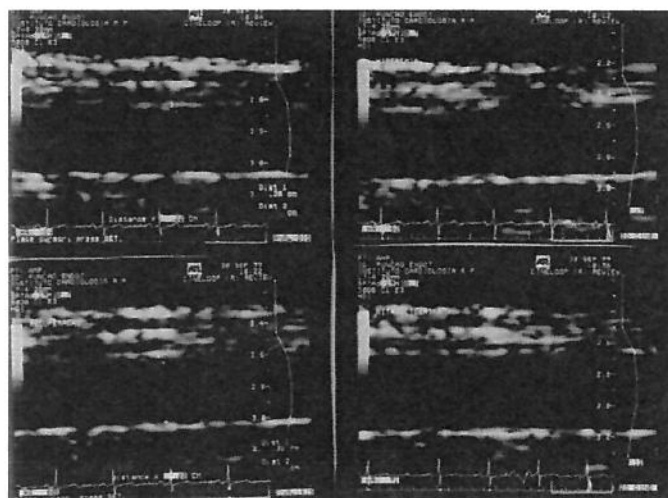


Basal

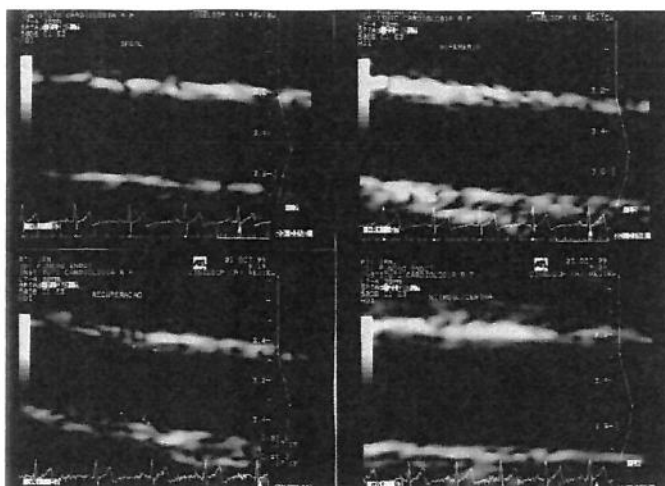
Hiperemia

Recuperação

NTG



Basal

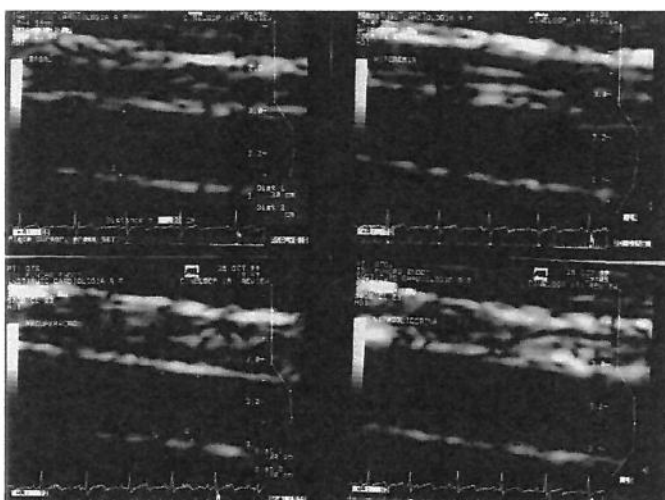


Hiperemia

Recuperação

NTG

Basal

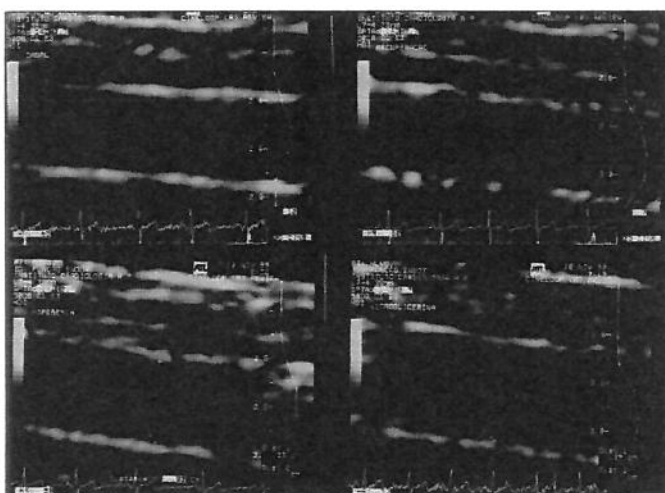


Hiperemia

Recuperação

NTG

Basal

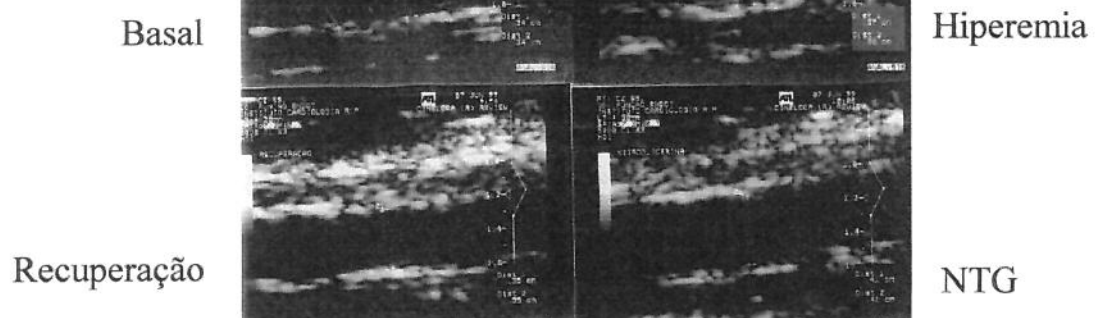
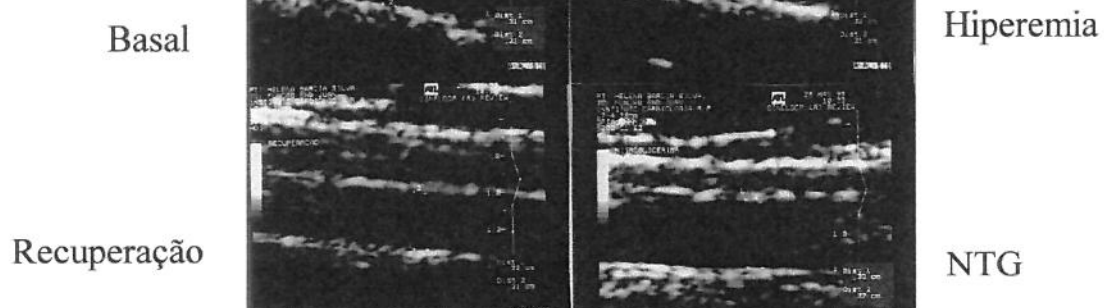
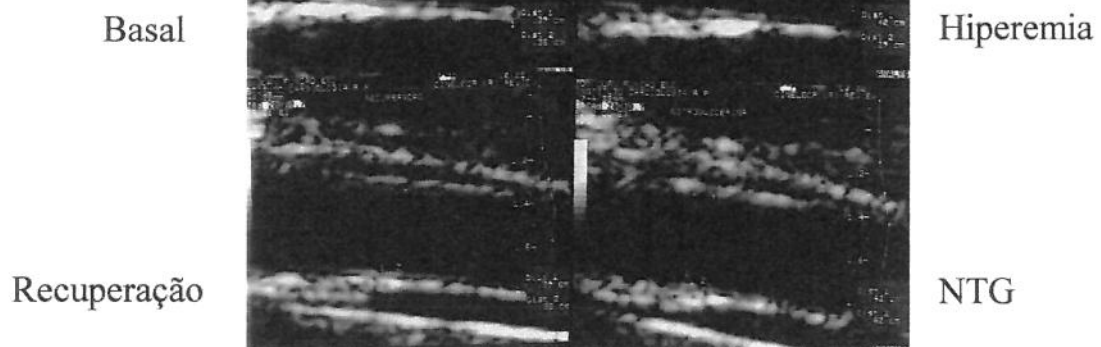


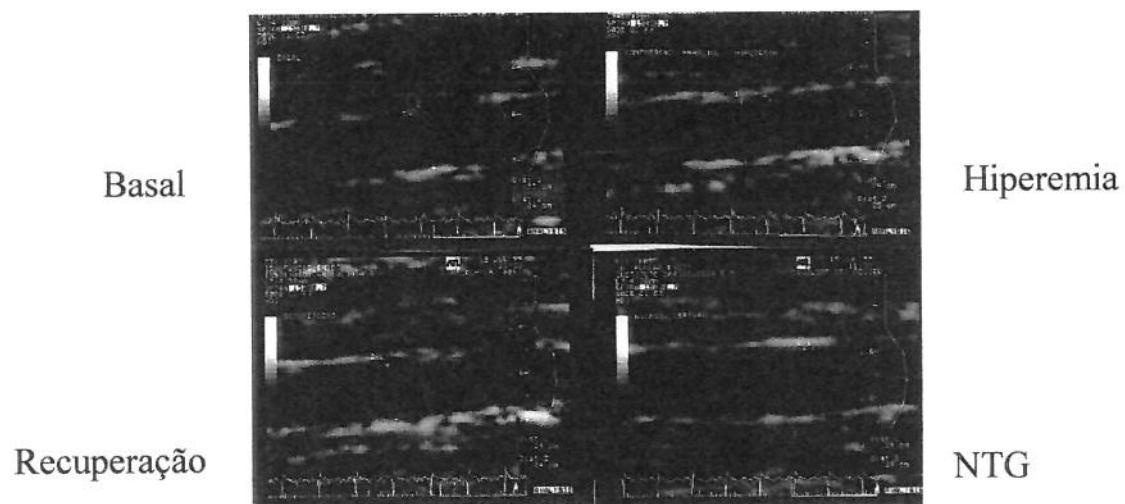
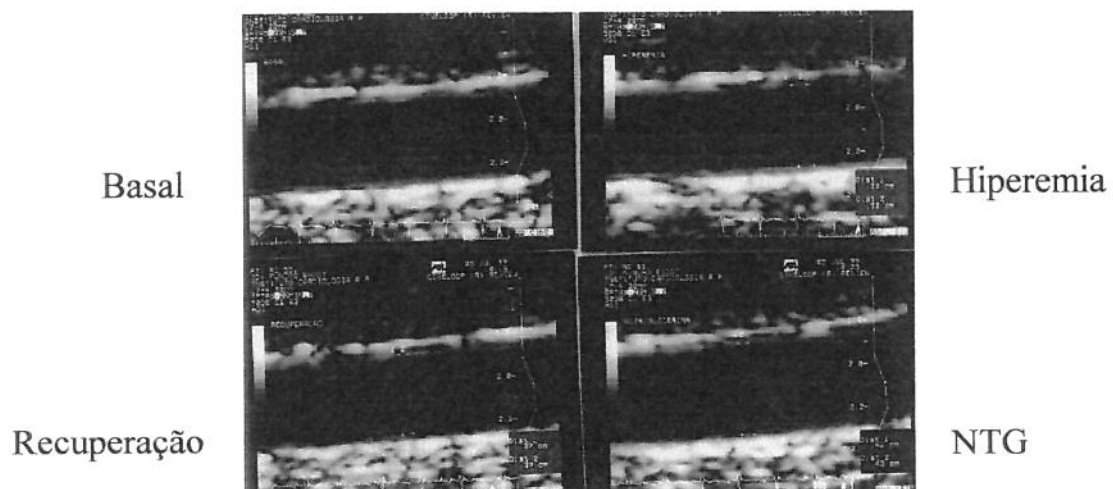
Hiperemia

Recuperação

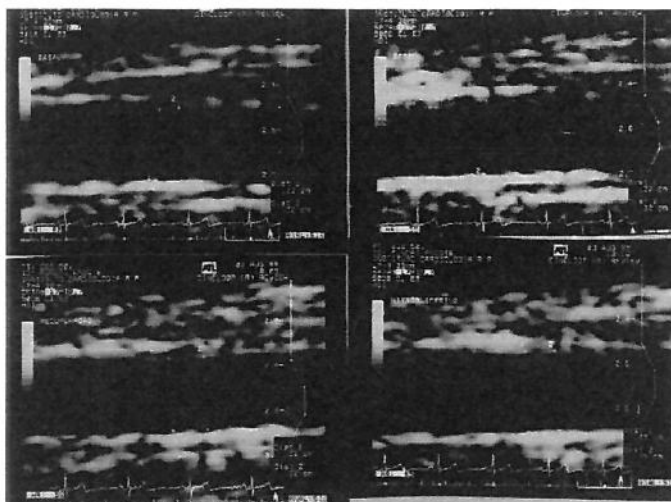
NTG

DIABÉTICOS





Basal

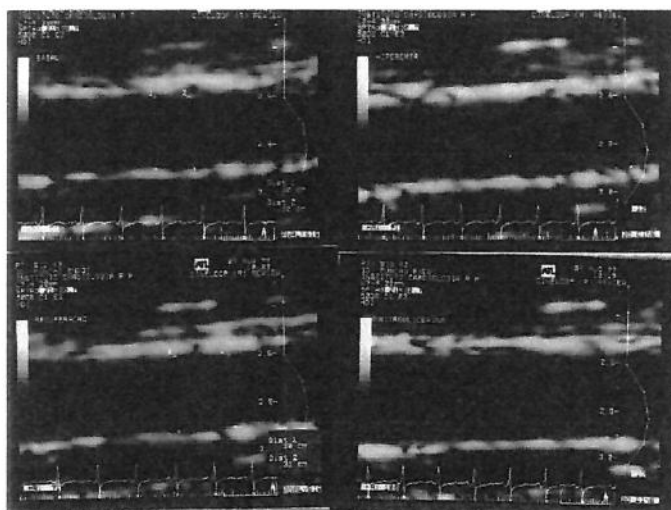


Hiperemia

Recuperação

NTG

Basal

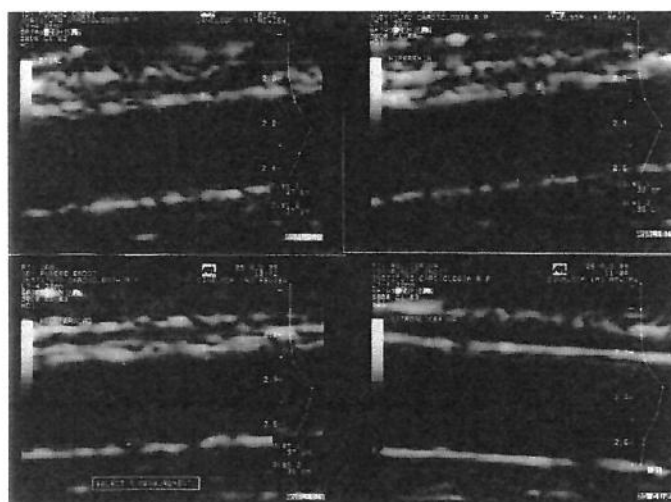


Hiperemia

Recuperação

NTG

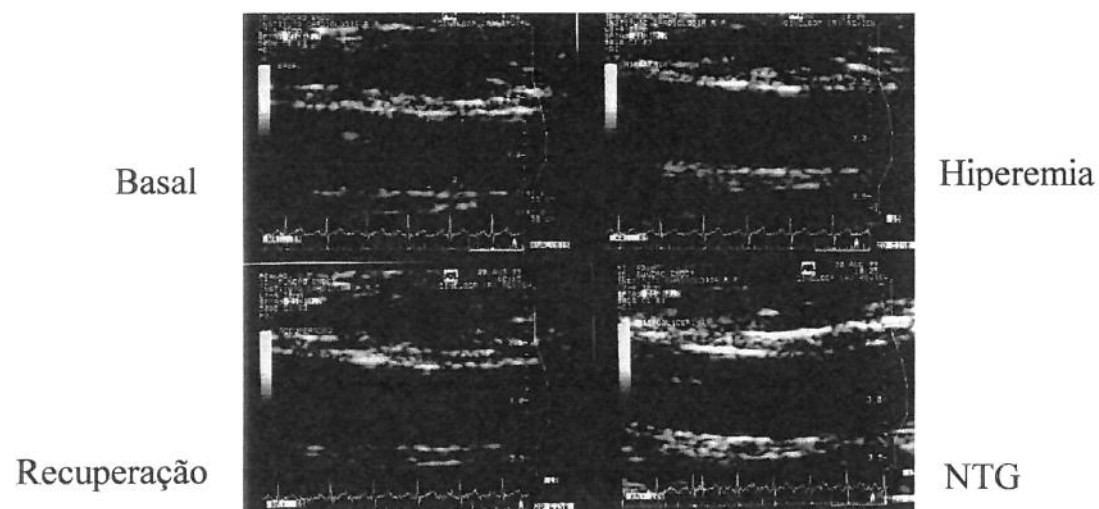
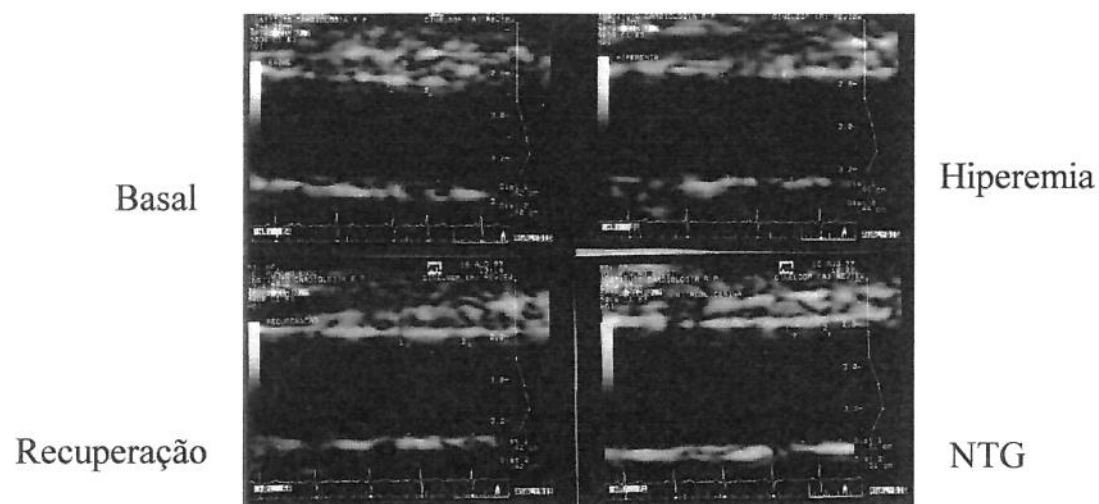
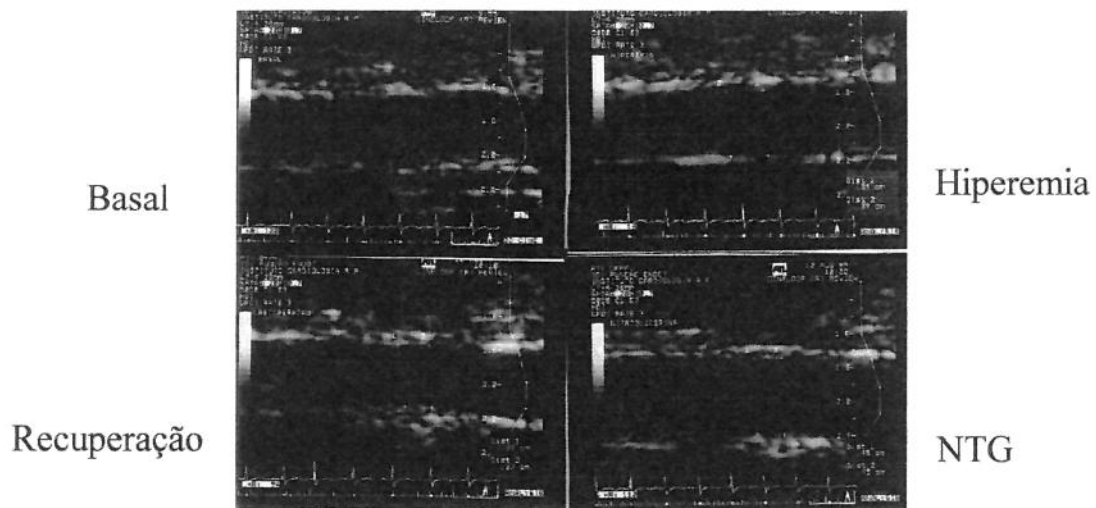
Basal



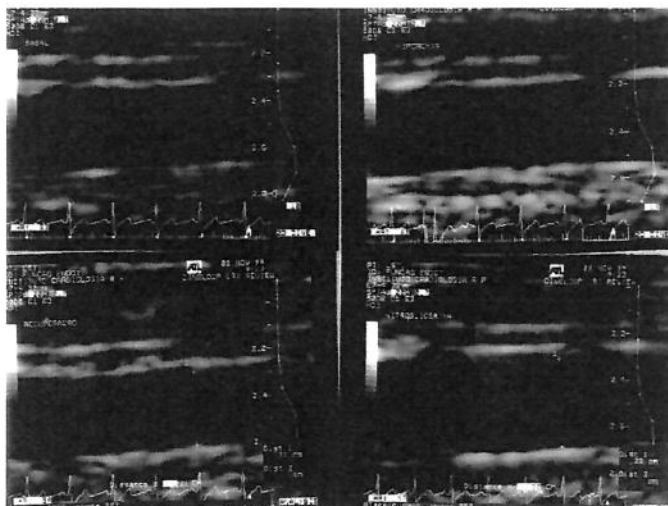
Hiperemia

Recuperação

NTG



Basal



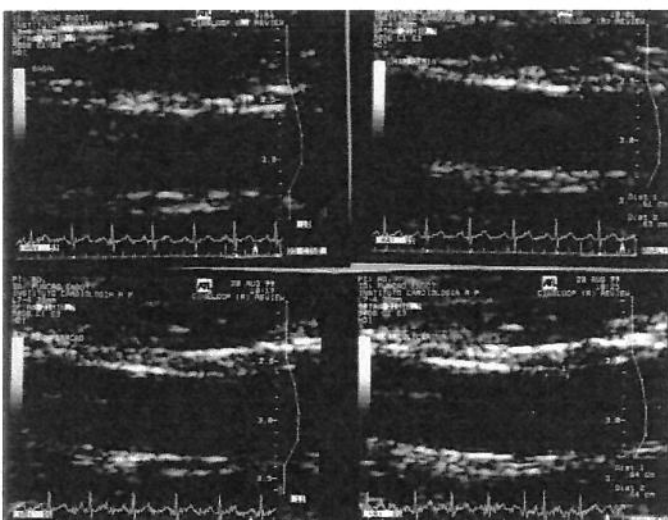
Hiperemia

Recuperação



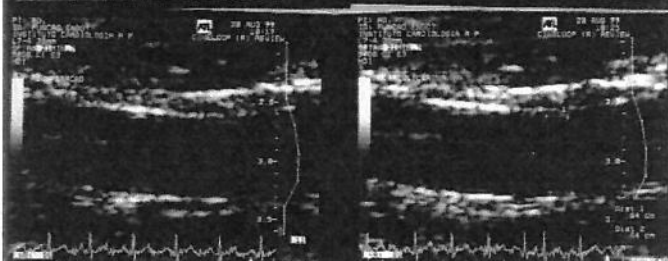
NTG

Basal



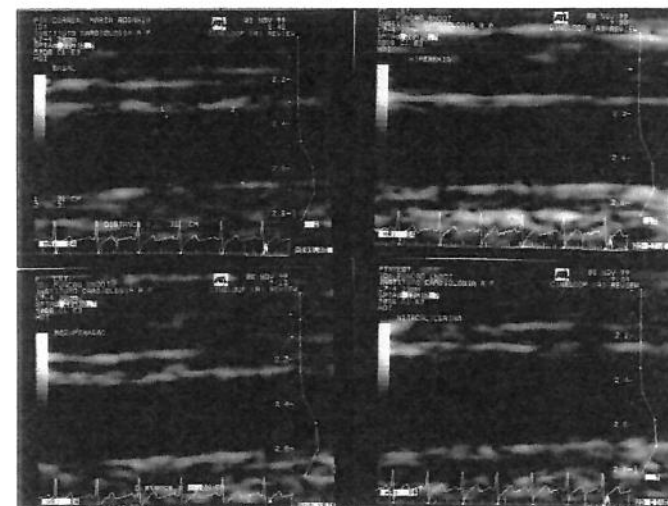
Hiperemia

Recuperação



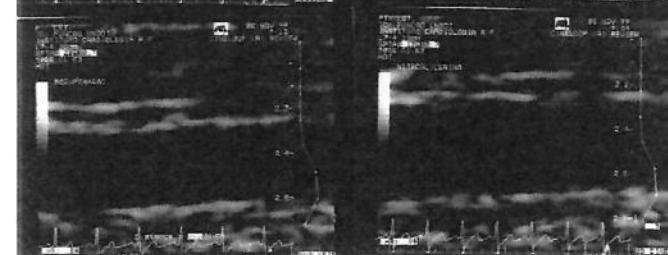
NTG

Basal



Hiperemia

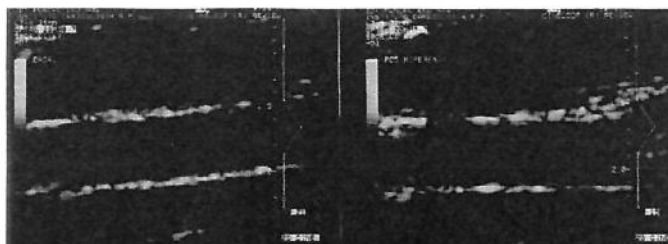
Recuperação



NTG

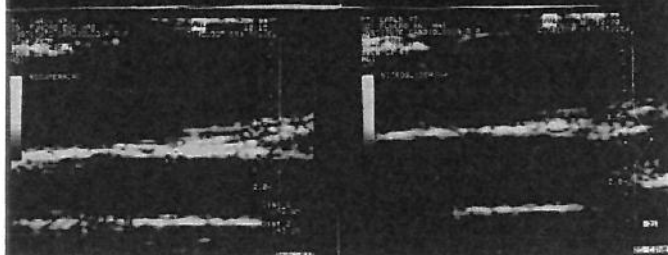
HIPERTENSOS

Basal



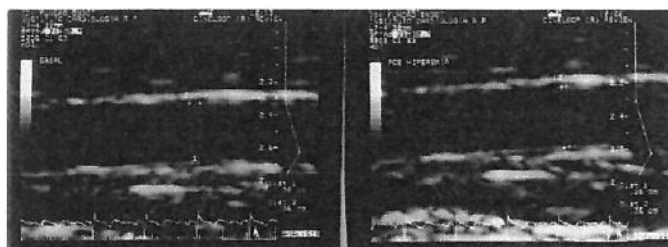
Hiperemia

Recuperação



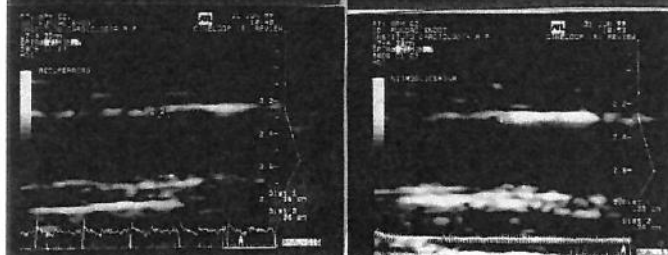
NTG

Basal



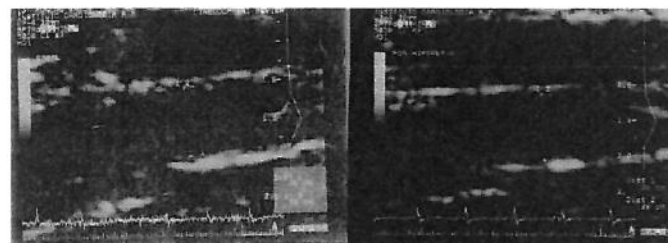
Hiperemia

Recuperação



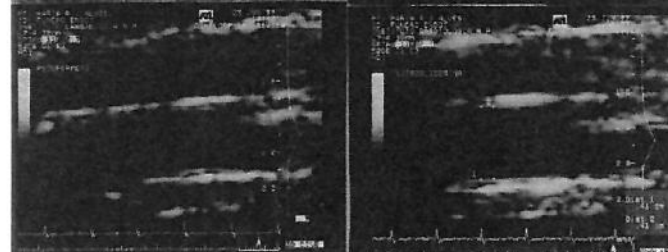
NTG

Basal

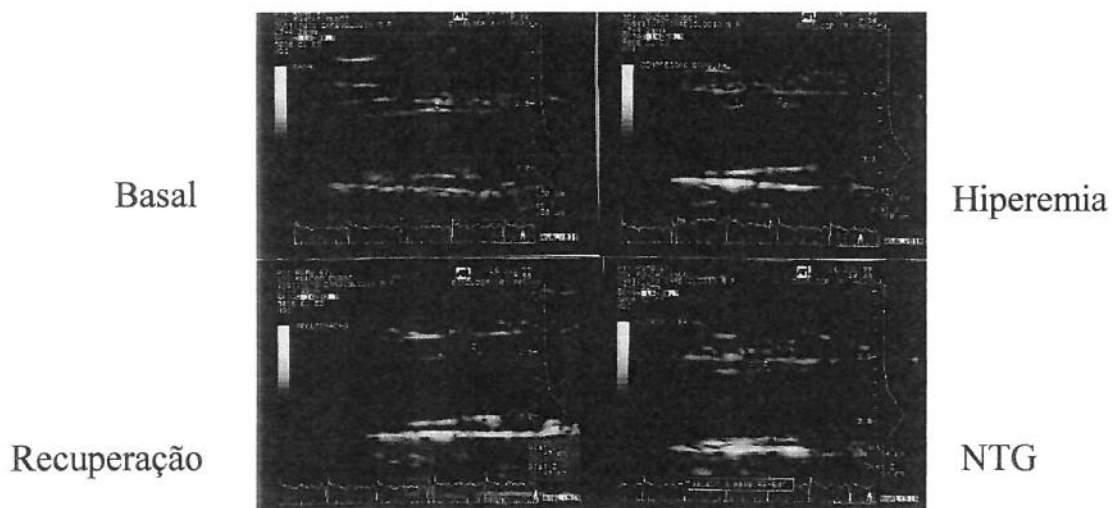
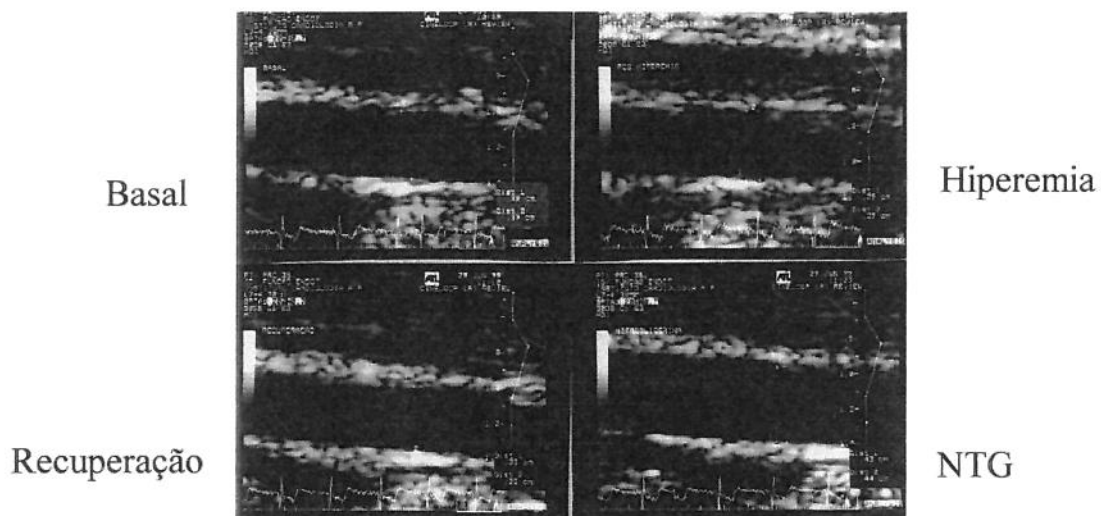
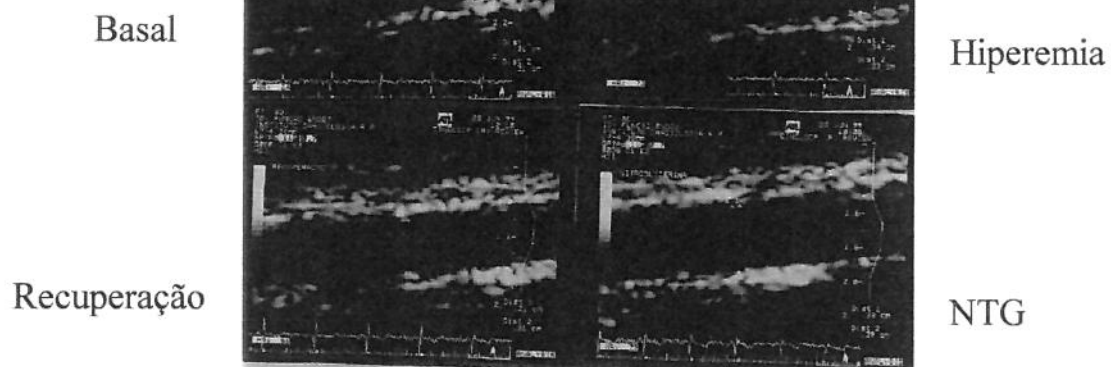


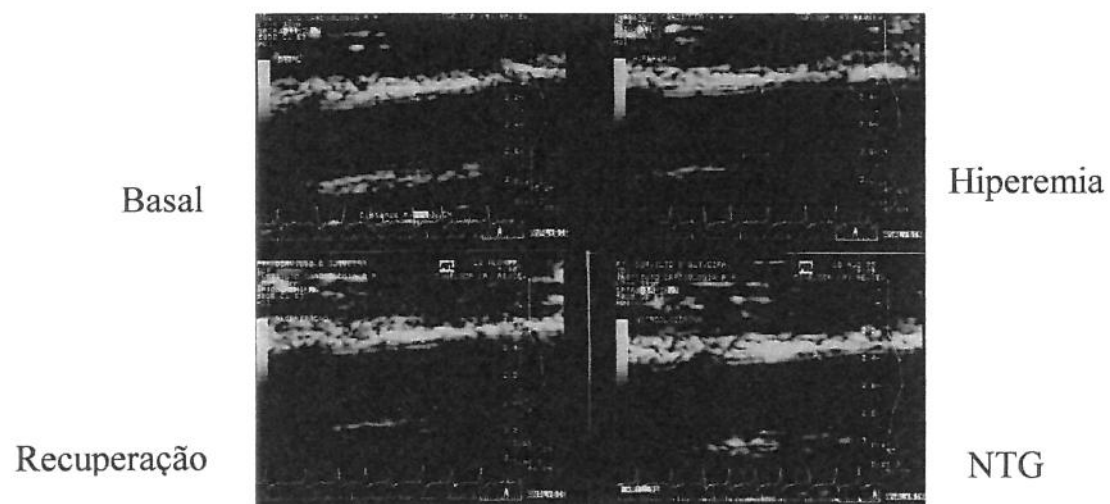
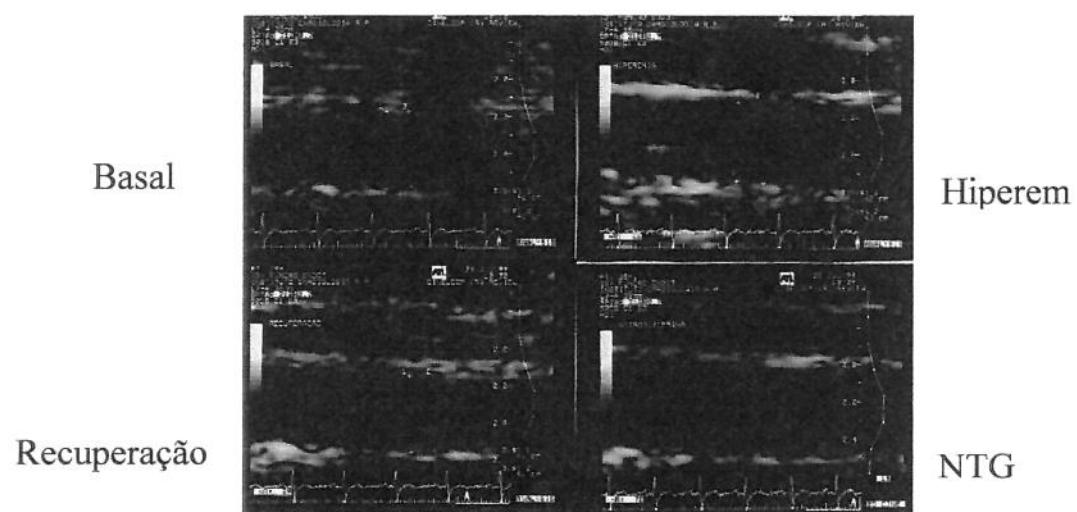
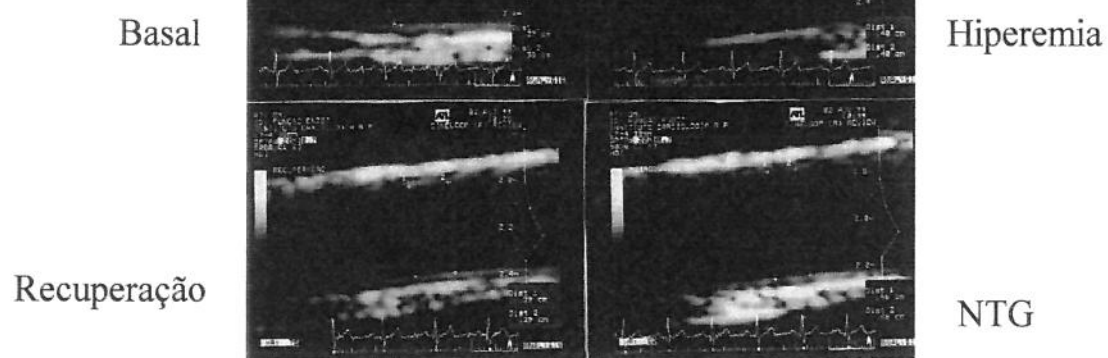
Hiperemia

Recuperação

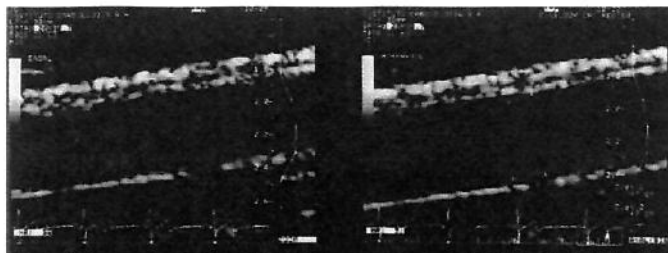


NTG

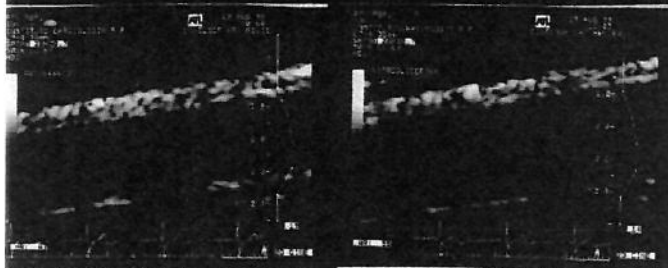




Basal



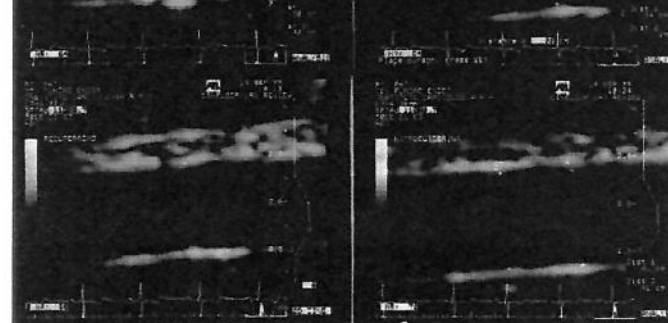
Hiperemia



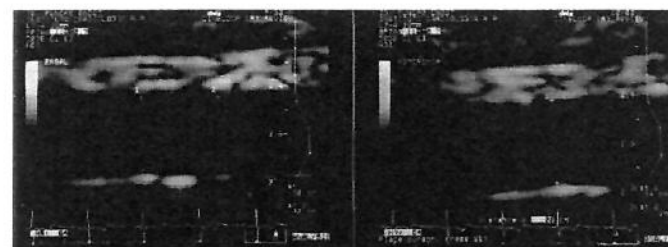
Recuperação



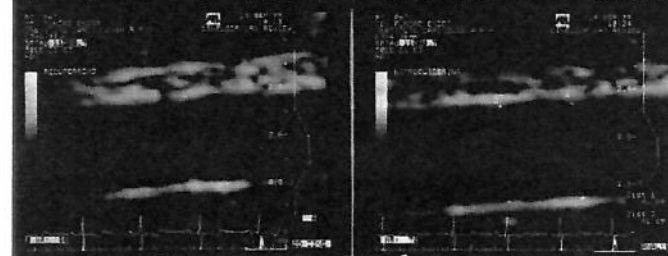
NTG



Basal



Hiperemia

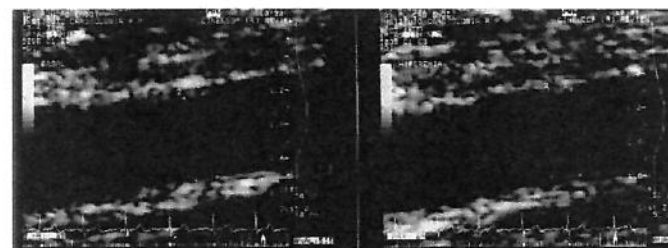


Recuperação

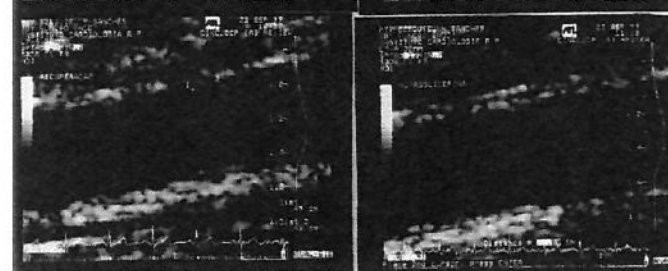


NTG

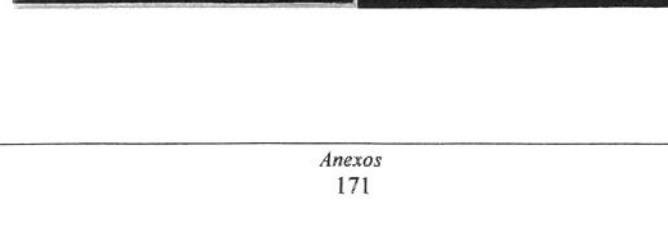
Basal



Hiperemia



Recuperação



NTG

