

---

# Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções

Maria Helena Catelli Carvalho, Dorothy Nigro, Virginia Soares Lemos,  
Rita de Cássia Aleixo Tostes, Zuleica Bruno Fortes

## Resumo

O endotélio sadio exerce funções anticoagulante, vasodilatadora e antiinflamatória que são essenciais para a manutenção da homeostasia. Em várias doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão arterial, ocorre disfunção endotelial. O endotélio normal tem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares mantendo a vasodilatação, inibindo a agregação plaquetária, a adesão leucocitária e a proliferação das células musculares lisas. Essas ações são exercidas principalmente pelo óxido nítrico, considerado o mais importante fator endotelial, ou EDRF (do inglês **E**ndothelial-**D**erived **R**elaxing **F**actor), ao lado da prostaciclina e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. O endotélio pode também gerar fatores contráteis conhecidos por EDCFs, como as endotelinas, a angiotensina II, as pros-

taglandinas vasoconstritoras e espécies reativas de oxigênio. A disfunção endotelial na hipertensão leva a desequilíbrio da produção/liberação dos fatores contráteis e relaxantes e: 1) provoca diminuição da geração de óxido nítrico/aumento das espécies reativas de oxigênio, aumentando dessa forma o tônus vascular; 2) contribui para o aumento da permeabilidade vascular levando à formação de edema subendotelial; 3) aumenta a expressão de moléculas de adesão com conseqüente aumento da aderência leucocitária à parede vascular; 4) acelera a coagulação intravascular; 5) aumenta a proliferação de células musculares lisas, levando à hipertrofia/hiperplasia da parede vascular. Torna-se evidente assim que o endotélio tem papel central na hipertensão, controlando a permeabilidade vascular, a adesão leucocitária, a proliferação de células musculares lisas, a coagulação e o equilíbrio entre fatores endoteliais (os EDRFs e os EDCFs).

**Palavras-chave:** Hipertensão arterial; Endotélio; Funções endoteliais.

Recebido: 20/10/00 – Aceito: 13/12/00

**Rev Bras Hipertens 8: 76-88, 2001**

## Introdução

O conhecimento sobre o endotélio está em constante evolução. Considerá-lo como camada inerte é hoje

obsoleto e mesmo o conceito de que é interface ativa entre o que está dentro e o que está fora do vaso sanguíneo está se tornando desatualizado. O endotélio não apenas

controla o tráfego de pequenas e grandes moléculas, e mesmo células inteiras, também mantém a estrutura da parede vascular. O endotélio controla a dilatação e a contração local,

---

*Correspondência:*

Maria Helena

Av. Prof. Dr. Lineu Prestes, 1524. 2º andar – sala 217 – Cidade Universitária  
CEP 05508-900 – São Paulo, SP

seja em resposta a alterações do fluxo sanguíneo ou a agentes vasoativos. O endotélio ainda contribui para a formação do coágulo na tentativa de reparar uma lesão vascular e também para remoção do mesmo se isso for necessário; promove o crescimento de novos vasos sanguíneos e a dilatação de ramos colaterais quando o sangue deve ser desviado para áreas isquêmicas; direciona ainda o sangue de capilares ou promove o fechamento destes quando não estão perfundidos.

O endotélio está estrategicamente situado na parede vascular para:

- atuar como sensor de alterações hemodinâmicas;
- transmitir sinais que recebe de células e da matriz extracelular;
- produzir mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte de células;
- manter as alterações adaptativas de forma que elas se adequem às exigências circulatórias.

O endotélio tem papéis múltiplos e importantes em eventos fisiológicos e fisiopatológicos como na hipertensão arterial.

## Endotélio e o controle do tônus vascular

O endotélio controla o tônus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina. Entre os fatores contráteis, os principais são a prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ), a tromboxana  $A_2$ , a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1) e os ânions superóxido ou espécies reativas de oxigênio (ROS).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio preciso entre a libe-

ração desses fatores, sendo a produção dos fatores relaxantes mais importante, sobrepujando o efeito dos agentes contráteis. No entanto, em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, esse equilíbrio é alterado com uma conseqüente atenuação dos efeitos vasodilatadores do endotélio. Essa diminuição aparente do relaxamento vascular dependente dos fatores endoteliais é chamada de disfunção endotelial.

Os mecanismos implicados na disfunção endotelial encontrada na hipertensão são multifatoriais e parecem depender do tipo de hipertensão desenvolvida, da sua duração e do leito vascular estudado. Os seguintes mecanismos foram propostos: 1) Diminuição na liberação de NO, prostaciclina e/ou EDHF; 2) sensibilidade diminuída do músculo liso vascular ao NO, prostaciclina e/ou EDHF; 3) disfunção na via de transdução de sinais dos fatores relaxantes endoteliais; 4) aumento da produção de  $PGH_2$ , tromboxana  $A_2$ , endotelina-1 e/ou dos ânions superóxido.

## Principais fatores endoteliais responsáveis pelo controle do tônus vascular

### Óxido nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram que o endotélio liberava um fator capaz de relaxar a musculatura lisa vascular<sup>1</sup>, que mais tarde foi identificado como sendo o  $NO^{2-5}$ . O NO desempenha um papel de fundamental importância na regulação do tônus vascular e da homeostasia, o que pode ser verificado através de várias observações: 1) a inibição da NO sintase (NOS) diminui drasticamente a vasodilatação dependente de endotélio, principalmente nos vasos de condutância; 2) a administração

aguda de inibidores da NOS pode produzir vasoconstrição, enquanto o tratamento crônico de ratos com esses compostos induz hipertensão arterial<sup>6</sup>; 3) camundongos que não possuem o gene da NOS endotelial (NOSe) apresentam pressão arterial mais elevada que seus controles<sup>7</sup>.

A biossíntese do óxido nítrico é feita pela NOS, uma enzima dimérica que contém um grupamento heme e requer as flavinas FAD e FMN, bem como o cofator pteridina (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina ( $H_4$ biopterina) para catalisar a oxidação da L-arginina<sup>8</sup>. A NOSe é uma enzima constitutiva ativada por um aumento na concentração intracelular de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ), induzido por agonistas como a acetilcolina, catecolaminas, ATP, substância P, Ang II, ou por estímulos físicos, como a força de cisalhamento (*shear stress*;<sup>9</sup>). A ativação da NOSe também pode acontecer independentemente de um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  via mecanismos dependentes da tirosina kinase (para revisão, consultar a referência 10).

O relaxamento da musculatura lisa vascular pelo NO envolve a estimulação da enzima guanilil ciclase solúvel com o conseqüente aumento na produção de GMP cíclico<sup>11</sup>. Este, por sua vez, estimula a quinase dependente de GMP cíclico (PKG) que por diversos mecanismos promove um relaxamento da musculatura lisa vascular. A PKG pode ativar canais de  $K^+$  induzindo hiperpolarização ou estimular a saída de  $Ca^{2+}$  do citoplasma da célula, o que leva à vasodilatação<sup>12</sup>. A PKG pode, igualmente, diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao  $Ca^{2+}$ , diminuindo a contração muscular<sup>12</sup>. A ativação de canais de  $K^+$  diretamente pelo NO sem envolver a participação do GMP cíclico também já foi descrita<sup>13</sup>.

### Prostaciclina

A contribuição da prostaciclina para a vasodilatação dependente de

endotélio é usualmente pequena. Sua ação depende da presença de receptores específicos na parede das células musculares lisas vasculares. A estimulação dos receptores da prostaciclina leva a uma estimulação da adenilil ciclase produzindo um aumento de AMP cíclico e estimulação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) no músculo liso vascular. A PKA tem um efeito semelhante a PKG, podendo ativar canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimula a saída de  $Ca^{2+}$  do citosol inibindo a maquinaria contrátil.

### **Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)**

Além do NO e da prostaciclina, o endotélio vascular produz um terceiro fator relaxante que produz hiperpolarização no músculo liso vascular, resistente a inibidores da ciclooxigenase e da NOS<sup>14-17</sup>. Esse tipo de relaxamento dependente do endotélio é observado sem nenhum aumento nos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) nas células musculares lisas<sup>18-21</sup>. A contribuição do EDHF para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nas grandes artérias<sup>22</sup>.

Apesar do importante papel fisiológico que desempenha no controle do tônus vascular, a identidade química do EDHF até hoje é desconhecida e a possibilidade da existência de vários EDHFs já foi levantada<sup>23</sup>. Alguns estudos apontam os ácidos epoxieicosatrienóicos, metabólitos do ácido araquidônico derivados da citocromo P450 monooxigenase, como prováveis candidatos<sup>24</sup>. Outros estudos sugeriram que nas artérias mesentérica e coronária de rato, o EDHF seria a anandamida<sup>25-27</sup>, um derivado do ácido araquidônico suspeito de ser o ligante endógeno dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub><sup>28</sup>. Finalmente, várias outras

moléculas como monóxido de carbono, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio<sup>20</sup> também foram descritas como tendo efeitos hiperpolarizantes dependentes do endotélio vascular. O efeito vasodilatador do EDHF é mediado pela ativação de canais de  $K^+$  na musculatura lisa vascular que hiperpolariza a membrana e diminui a concentração de  $Ca^{2+}$  no interior da célula muscular lisa do vaso. O tipo de canal de potássio ativado ainda não está completamente elucidado, mas canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  parecem estar envolvidos<sup>30</sup>.

### **Prostaglandinas vasoconstritoras**

Em condições fisiológicas a prostaciclina, prostaglandina vasodilatadora, é o principal metabólito endotelial derivado do ácido araquidônico gerado pela via da ciclooxigenase<sup>23</sup>. No entanto, também existe a formação de pequenas quantidades de prostanóides vasoconstritores como a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) e o tromboxane A<sub>2</sub><sup>31</sup>. Em circunstâncias normais, o efeito vasoconstritor da PGH<sub>2</sub> e do tromboxane A<sub>2</sub> é mascarado pelo efeito vasorrelaxante da prostaciclina, do NO e do EDHF<sup>32</sup>.

### **O tromboxane espécies reativas do oxigênio**

O nosso organismo utiliza o O<sub>2</sub> e reações de oxidação para o fornecimento de energia e para a defesa contra invasores. A maioria do O<sub>2</sub> utilizado no metabolismo aeróbico é reduzida diretamente a H<sub>2</sub>O pelo complexo citocromo oxidase, que evita a formação de produtos intermediários. No entanto, uma série de intermediários oxigenados reativos é formada através de uma outra via que envolve a produção do radical livre O<sub>2</sub><sup>-</sup> (ânion superóxido) pela redução de um elétron do oxigênio molecular<sup>33</sup>. O O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode agir como um agente oxidante, sendo reduzido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou como agente redutor, doando o seu elétron extra ao NO para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).

Em condições fisiológicas, a quantidade de enzima superóxido dismutase (SOD) assegura que a primeira reação ocorra preferencialmente<sup>34</sup>. Contudo, em condições de estresse oxidativo quando as células são expostas a níveis excessivos de espécies oxigenadas reativas, quantidades significativas de O<sub>2</sub><sup>-</sup> reage com o NO para formar ONOO<sup>-</sup><sup>35</sup>. Nesse caso, haverá uma diminuição da biodisponibilidade de NO endotelial, diminuindo o seu efeito vasorrelaxante, somado ao próprio efeito vasoconstritor do O<sub>2</sub><sup>-</sup><sup>36-37</sup>, além das conseqüências deletérias do ONOO<sup>-</sup><sup>34</sup>.

Existem evidências na literatura de que em condições patológicas, como na hipertensão arterial, a produção de NO não é alterada, mas sim a sua biodisponibilidade devido à inativação oxidativa resultante da excessiva produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> na parede vascular<sup>38</sup>. Dessa forma, seria o equilíbrio entre o NO e O<sub>2</sub><sup>-</sup> mais importante do que os níveis absolutos de cada um sozinho.

### **Endotelinas**

Endotelinas (ETs) são peptídeos de 21 aminoácidos produzidos por vários tecidos. Foram inicialmente descritas por Hickey et al. que demonstraram a presença de uma substância vasoconstritora no sobrenadante de células endoteliais em cultura<sup>39</sup> e, a seguir, caracterizadas por Yanagisawa et al.<sup>40</sup>.

Três diferentes isoformas de ETs estão identificadas, ET-1, ET-2, ET-3, e vários são os estímulos que aumentam os níveis de RNAm do pré-pró-peptídeo ET-1 pelas células endoteliais: trombina, adrenalina, Ang II, bradiginina, hipóxia, lipoproteínas de alta e baixa densidade, insulina, isquemia, tensão de cisalhamento e fatores de crescimento<sup>39</sup>. A ET-1 é secretada principalmente na direção abluminal e atua de maneira autócrina e parácrina em células próximas, como células

musculares lisas, células do miocárdio e células do tecido conectivo.

Três subtipos de receptores para ET foram clonados: ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> e ET<sub>C</sub> e, através de ensaios farmacológicos, alguns subtipos foram identificados: ET<sub>A1</sub>, ET<sub>A2</sub>, ET<sub>B1</sub> e ET<sub>B2</sub>. O subtipo ET<sub>A</sub> apresenta maior afinidade para ET-1, é expresso principalmente em células dos músculos liso vascular e cardíaco, enquanto o subtipo ET<sub>B</sub>, com afinidade para as 3 isoformas de ET, é expresso em células endoteliais, renais e também no músculo liso vascular. Ambos os subtipos pertencem às superfamília de receptores acoplados às proteínas que ligam nucleotídeos de guanina (proteínas G). Sua ativação promove despolarização

da membrana plasmática, aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>, contração vascular, liberação de fatores endoteliais, síntese de DNA e crescimento celular (figura 1), como será posteriormente discutido<sup>39</sup>.

A ET-1 é o mais potente vasoconstritor descrito até o momento, tanto em vasos de maior calibre<sup>40</sup> quanto na microcirculação<sup>41</sup>. As ETs promovem vasodilatação em artérias isoladas e também *in vivo*. Essa vasodilatação é dependente da presença do endotélio vascular e mediada pela ativação de receptores ET<sub>B</sub> na célula endotelial (Figura 1).

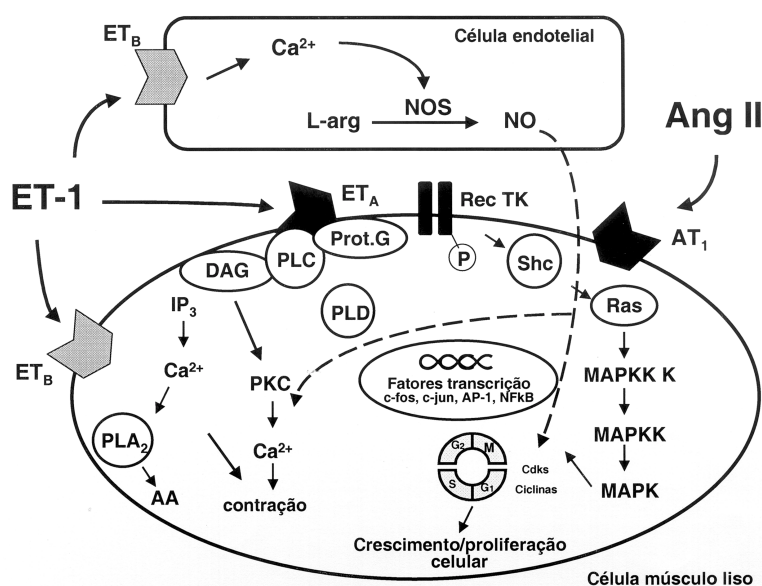
Camundongos nos quais o gene da ET-1 foi deletado ou impedido de se expressar apresentam má formação

dos tecidos craniais, com alterações nas mandíbulas, e também má formação cardiovascular, incluindo interrupção do arco aórtico, alterações da formação da artéria subclávia e septo ventricular, além de retardamento do desenvolvimento do endocárdio<sup>42</sup>, o que sugere envolvimento das ETs na formação do sistema cardiovascular. A ausência de ET-1 promove elevação da pressão arterial, e não diminuição como seria esperado, o que pode ser explicado pelas condições de hipóxia, hipercapnia e conseqüente ativação do sistema simpático a que estes animais estão submetidos. Correção da hipóxia promove normalização da pressão arterial nesses animais.

A isoforma ET-3 e os receptores ET<sub>B</sub> são importantes para o desenvolvimento normal dos neurônios mioentéricos, uma vez que camundongos *knock-out* para ET-3 e para receptores ET<sub>B</sub> desenvolvem megacolon aganglionar. Recentemente, foi demonstrado que os receptores ET<sub>B</sub> conferem proteção ao sistema cardiovascular. Ratos *knock-out* para receptores ET<sub>B</sub> exibem agravamento da hipertensão induzida por desoxicorticosterona e sal e também hipertrofia cardíaca e vascular muito mais acentuada.

## Angiotensina II

A Ang II é um peptídeo derivado da proteína precursora angiotensinogênio através da ação seqüencial de várias enzimas. Na via clássica do sistema renina-angiotensina (SRA), o angiotensinogênio é clivado pela enzima renina gerando angiotensina I (Ang I) que, por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) originando a Ang II. Essas reações ocorrem no plasma e em vários tecidos como rins, cérebro, glândulas adrenais, ovários, músculo liso vascular e células endoteliais. Existem outras vias para formação de Ang II que não envolvem ação da ECA. Três subtipos de receptores



**Figura 1** – A estimulação de receptores ET-1 ou de receptores Ang II em células musculares lisas ativa várias vias de sinalização: 1) ativação de proteínas que se ligam a nucleotídeos de guanina (prot. G) e da enzima fosfolipase C (PLC) que cliva fosfolípídeos de membrana gerando diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), moléculas que promovem aumento de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular e ativação da proteína quinase C (PKC); 2) ativação de receptores tirosina quinase (rec.TK) que promove fosforilação e ativação da proteína Shc que, por sua vez, ativa uma proteína G de baixo peso molecular (Ras), responsável pela ativação da cascata de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK). Esses eventos intracelulares modificam a curto ou longo prazo as funções celulares, gerando, por exemplo, contração ou crescimento/proliferação dessas células. O NO promove efeitos opostos tanto sobre o tônus como sobre a proliferação celular, modulando a atividade de proteínas que promovem extrusão de Ca<sup>2+</sup> ou proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular como Cdk (proteínas quinases dependentes de ciclina) e ciclinas, como descrito no texto.

para Ang II são conhecidos até o momento:  $AT_{1A}$ ,  $AT_{1B}$  e  $AT_2$ . A maioria dos efeitos fisiológicos da Ang II é mediada pela ativação de receptores do subtipo  $AT_1$ , enquanto poucos efeitos, geralmente opostos àqueles desencadeados pela ativação de  $AT_1$ , têm sido atribuídos à ativação de receptores  $AT_2$ . Os receptores para Ang II também pertencem à super família de receptores acoplados a proteínas G e, no caso dos receptores  $AT_1$ , o acoplamento ocorre via proteínas Gq. Conseqüentemente, a estimulação de receptores  $AT_1$  ativa a PLC, aumenta os níveis de DAG e  $IP_3$ , eleva a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular e promove ativação de várias quinases modulando as funções celulares. A Ang II também estimula o crescimento celular através de fosforilação de tirosina quinase e conseqüente ativação de proteínas envolvidas na transcrição do DNA (Figura 1). Entre as ações da Ang II podemos citar contração e proliferação de células do músculo liso vascular, aumento da contratilidade e indução de hipertrofia cardíaca, estimulação da secreção de aldosterona e liberação de vasopressina,

aumento da descarga do sistema nervoso simpático, inibição da liberação de renina, entre outras<sup>43,44</sup>.

### Disfunção endotelial e tônus vascular na hipertensão arterial

Na maioria dos modelos experimentais de hipertensão arterial a vasodilatação dependente de endotélio é severamente reduzida<sup>45,46</sup>. No entanto, os mecanismos envolvidos em tal disfunção endotelial variam bastante dependendo do modelo utilizado. Na aorta e nas artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) existe um aumento na liberação de fatores endoteliais contráteis derivados da ciclooxigenase (ex.:  $PGH_2$ ) em resposta à acetilcolina e à Ang II<sup>47-50</sup>. Já em ratos Dahl, que desenvolvem hipertensão arterial sensível ao sal, a diminuição da vasodilatação dependente de endotélio não é devida a um aumento na secreção de fatores contráteis endoteliais, mas sim a uma diminuição da responsividade das células musculares lisas vasculares ao NO<sup>51</sup>. Uma diminuição na produção de NO, conseqüente a uma diminuição da atividade da NOSe, também foi descrita nesse tipo de rato<sup>52</sup>. Ao

contrário, em SHR, existe um aumento na atividade basal da NOS dependente de  $Ca^{2+}$ <sup>53-55</sup>, mesmo que a vasodilatação dependente de endotélio esteja diminuída, conforme discutido acima. Apesar da maior produção de NO basal, uma diminuição na expressão e atividade da guanilil ciclase solúvel foi descrita no músculo liso vascular de SHR<sup>56,57</sup>. Diminuição da atividade, mas não da expressão, da guanilil ciclase em ratos transgênicos do tipo mRen-2 também foi descrita<sup>58</sup>.

Uma redução na liberação do EDHF também pode estar envolvida na disfunção endotelial encontrada na hipertensão arterial, uma vez que a vasodilatação em SHR dependente do EDHF encontra-se diminuída<sup>59</sup>.

Pesquisas recentes apontam para um importante papel do  $O_2^-$  na fisiopatologia da hipertensão arterial. Aumento da produção de  $O_2^-$  foi demonstrado em células endoteliais e segmentos de aorta de SHR estimulados com Ang II. No último modelo, tratamento com a enzima SOD normalizou a produção de  $O_2^-$  na aorta e a pressão arterial<sup>38</sup>. Na microcirculação de SHR, a diminuição do relaxamento dependente de endotélio por estimulação com a acetilcolina ocorre concomitantemente ao aumento da produção de  $O_2^-$ <sup>35,60,61</sup>. A utilização de técnicas que permitem a medida direta do NO nas células endoteliais e anéis de aorta de ratos hipertensos mostrou uma diminuição da liberação de NO após estimulação com o ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187, sendo esta diminuição corrigida pela SOD<sup>60,62</sup>. Esses resultados sugerem que reações entre o NO e  $O_2^-$  são importantes na diminuição da vasodilatação dependente de endotélio na hipertensão. Existem evidências de que o aumento na formação de  $O_2^-$  está associado à insuficiente interação da NOS constitutiva com a tetrahydrobiopterina<sup>63</sup>.

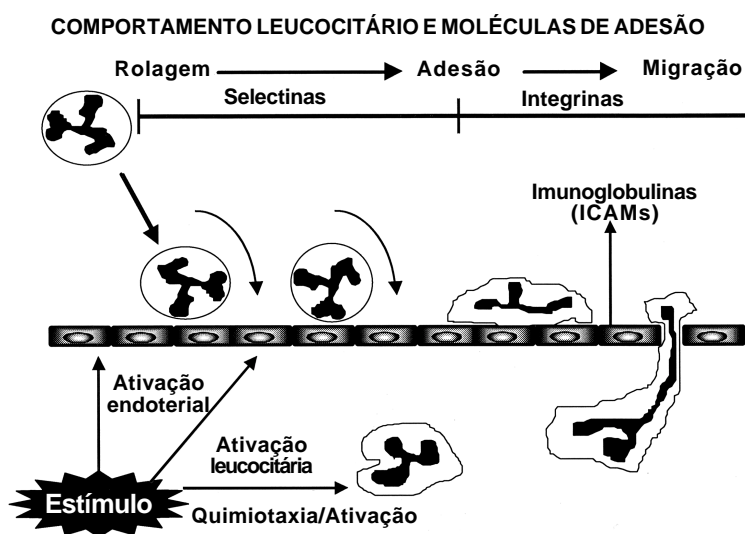


Figura 2. Esquema representativo do comportamento leucocitário.

## Endotélio e o controle do crescimento da parede vascular

Entre os principais fatores endoteliais responsáveis pelo controle da proliferação vascular citam-se o NO, a ET-1 e a Ang II.

### Óxido nítrico

O NO modula o crescimento de células musculares lisas por mecanismos dependentes e independentes de GMP cíclico<sup>64,65</sup>. O NO inibe o crescimento de células musculares lisas e esse efeito é mediado pela inibição de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular como Cdks (proteínas quinases dependentes de ciclina) e ciclinas (proteínas sem atividade enzimática, cujas concentrações variam de maneira cíclica, que ativam as Cdks), bem como pela ativação da proteína p21<sup>Cip1</sup> (inibidor de Cdk)<sup>66,67</sup> (Tabela 1).

Doadores de NO têm sido utilizados para demonstrar os efeitos antipro-

liferativos do NO nas células de músculo liso. Análogos da L-arginina que inibem a atividade da NOS e, conseqüentemente, a produção de NO, como o L-NAME, também têm sido utilizados para se investigar os efeitos do NO. A administração de L-NAME em ratos aumenta a pressão arterial, mas não causa hipertrofia cardíaca nem alterações significativas na estrutura vascular<sup>68,69</sup>. Como a inibição da NOS por si só levaria a aumento da hipertrofia vascular e cardíaca, alguns autores sugerem que o L-NAME tem efeitos antiproliferativos independentemente da sua ação inibitória sobre a NOS. Esse efeito antiproliferativo parece ser específico para o L-NAME, uma vez que não foi observado para outros inibidores como L-NMMA e aminoguanidina<sup>70</sup>.

ONO, além de inibir a proliferação de células musculares lisas, inibe a produção de níveis basais de colágeno, inibe a divisão celular e a produção de matriz extracelular estimuladas por ET-1 e Ang II, além de estimular apoptose, efeitos estes dependentes de GMP cíclico<sup>71,72</sup>.

## Endotelina-1

A ET-1 é considerada um mitógeno fraco em vários tipos celulares, mas é um potente agente indutor de crescimento/mitogênese em condições específicas ou em associação com fatores de crescimento<sup>73</sup>.

ET-1 estimula a transição da fase G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub> no ciclo celular, aumentando a síntese de DNA. Entre os mecanismos intracelulares ativados pela ET-1 podemos citar a estimulação de várias quinases, incluindo a quinase S6 que fosforila uma das subunidades ribossomais; a proteína tirosina quinase pp60<sup>c-src</sup>, e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As MAPKs são fosforiladas e ativadas pelas quinases que reconhecem MAPKs (MAPKKs), que por sua vez são ativadas por outra quinase (MAPKK K), após ativação de proteínas G como a Ras. As MAPKs podem ser agrupadas em quatro grandes subfamílias: ERK1/2 (proteína quinase regulada por sinais extracelulares), JNK/SAPK (proteínas quinases c-jun ou ativadas por estresse), p38 e proteínas quinases reguladas por c-fos. Após sua fosforilação e ativação, as MAPKs ativam vários substratos que estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular (Figura 1), como proteínas envolvidas na ativação do processo de transcrição (Elk, TAL1, RNA polimerase) e translação (PHAS1), proteínas envolvidas no rearranjo estrutural de outras proteínas (proteínas associadas a microtúbulos), bem como proteínas que ativam enzimas secundárias (quinase S6 ribossomal, tirosina hidroxilase/fosfatase)<sup>74-76</sup>.

A ET-1 também influencia a deposição de matriz extracelular por estimular a síntese de colágeno, por diminuir a atividade de collagenases e metaloproteinases e por regular a migração e adesão celular através da indução de moléculas de adesão<sup>75</sup>.

Mediadores anticoagulantes	
<i>Fatores solúveis</i>	
Prostaciclina	Inibição da função plaquetária
EDRF(NO)	Inibição da aderência e agregação plaquetárias
TPA	Principal mediador da fibrinólise endógena
<i>Fatores ligados à superfície</i>	
Trombomodulina promove ativação da proteína C	Altera a especificidade do substrato que
Proteína S	Promove inativação do fator V <sub>a</sub> e VII <sub>a</sub>
Heparan sulfato	Cofator da antitrombina III
Ecto-ADPase	Inativa ADP e inibe a agregação plaquetária
Mediadores pró-coagulantes	
<i>Fatores solúveis</i>	
Fator de von Willebrand	Promove adesão plaquetária e é carregador do fator VIII
PAI-1	Inativa tPA
<i>Fatores ligados à superfície</i>	
Fator tecidual	Cofator do fator VII <sub>a</sub>
Fator V <sub>a</sub>	Promove atividade protrombinase do fator X <sub>a</sub>

**Tabela 1** – Mediadores endoteliais da hemostasia

## Angiotensina II

A Ang II atua como mitógeno em células de músculo liso vascular através da ativação de várias vias de sinalização, incluindo fosfolipase C (PLC), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e fosfolipase D (PLD), bem como pela ativação de um grande número de quinases: tirosina quinases, MAPKs, quinase c-src, Janus e receptores com atividade de tirosina quinase<sup>77</sup>.

A Ang II estimula fatores de transcrição como a proteína ativadora-1 (AP-1), ativadores de transdução de sinal e transcrição (STATs) e o fator nuclear kappa B (NFkB)<sup>78,79</sup>, (Figura 1). Vários trabalhos demonstram que os efeitos proliferativos da Ang II são mediados pela ativação de receptores AT<sub>1</sub> e que a ativação de receptores AT<sub>2</sub> pela Ang II contribui para a inibição do crescimento celular e estimulação de apoptose, sendo um mecanismo contra-regulatório da ativação de AT<sub>1</sub>.

## Disfunção endotelial e proliferação vascular na hipertensão arterial

A proliferação e migração direcionada de células vasculares e a habilidade do sistema vascular em modificar sua geometria de acordo com as condições do microambiente (remodelamento vascular) são fatores-chave no desenvolvimento de doenças cardiovasculares como arteriosclerose, restenose após angioplastia transluminal das coronárias e hipertensão arterial.

A hipertensão arterial está associada a alterações não só na função mas também nas propriedades mecânicas e estruturais de grandes e pequenas artérias. Essas alterações podem ser observadas nas células endoteliais, células musculares lisas, matriz extracelular, até mesmo na camada adventícia e contribuem para as complicações observadas na

hipertensão arterial crônica. Em artérias de grande calibre geralmente observa-se hipertrofia com aumento da rigidez de componentes do meio extracelular, enquanto que em artérias de resistência as células de músculo liso se rearranjam diminuindo o lúmen arteriolar, mas sem alterações de volume celular (remodelamento eutrófico). Em casos mais severos de hipertensão (hipertensão maligna) pode ser observado remodelamento associado a aumento de volume celular (remodelamento hipertrófico). O remodelamento vascular geralmente é acompanhado por aumento de matriz extracelular, particularmente por aumento da deposição de colágeno.

A camada endotelial atua como uma interface sinalizadora para as forças hemodinâmicas na regulação do remodelamento estrutural crônico. O estresse mecânico ativa várias vias de sinalização das quais participam canais iônicos, interação de integrinas entre células e matriz extracelular, ativação de várias tirosina quinases, produção de vários fatores de crescimento e fatores vasoativos, incluindo Ang II, ET-1 e NO. O aumento de fluxo através de pequenas artérias aumenta a produção de tecido conectivo e promove hipertrofia da camada média, através da proliferação de células endoteliais e musculares lisas. O endotélio de microvasos apresenta aumento da produção de radicais superóxido, provavelmente pela ação da xantina-oxidase, e estes podem, por sua vez, induzir/estimular a interação leucócitos-endotélio e a expressão de moléculas de adesão. A infiltração de leucócitos pelo endotélio inicia uma cascata de eventos inflamatórios envolvendo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e metaloproteínas de matriz, como será discutido posteriormente.

Em modelos animais, antagonistas ET-1 diminuem significativamente o grau de lesão da camada neoíntima

em artérias carótidas submetidas a angioplastia, o que representa um potencial terapêutico para essas drogas na prevenção do espessamento da camada íntima associado com lesões vasculares. Por sua vez, antagonistas AT<sub>1</sub> ou inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), como enalapril, aumentam a fragmentação do DNA internucleossomal (indicação de apoptose), diminuem a massa aórtica, o número de células de músculo liso e a síntese de DNA em animais hipertensos. No caso dos antagonistas AT<sub>1</sub>, esses efeitos são bloqueados com a administração de PD123319, antagonista AT<sub>2</sub>.

Devemos ressaltar que, enquanto os ensaios em animais experimentais oferecem informações valiosas a respeito dos mecanismos vasculares locais desses peptídeos vasoativos e de seus antagonistas, vários ensaios clínicos são necessários para testar a habilidade dessas drogas em interferir com tais mecanismos. Primeiramente, porque os efeitos dessas drogas podem variar em diferentes espécies animais; segundo porque em ensaios experimentais geralmente essas drogas são utilizadas previamente ou durante a instalação do processo de lesão vascular, o que não é o caso nos ensaios clínicos, por exemplo, após restenose por angioplastia ou no tratamento da hipertensão arterial.

## Endotélio e o controle da expressão de moléculas de adesão

A aderência e a subsequente migração de leucócitos circulantes para a camada íntima é mecanismo precoce e importante para o início e a progressão da aterogênese. Está bem estabelecido que a hipertensão é fator de risco para a doença aterosclerótica, entretanto o mecanismo preciso é ainda pouco claro. Sugere-se que o denominador comum de todos os fatores

de risco para aterosclerose, entre eles a hipertensão, é a estimulação da quimiotaxia e a adesão leucocitária às células endoteliais<sup>80,81</sup>.

A adesão de leucócitos é coordenada por interações complexas entre glicoproteínas presentes na superfície dos leucócitos e seus correspondentes receptores nas células endoteliais. Muitas moléculas de adesão foram descobertas e elas podem ser subdivididas em três grupos: a família das selectinas: E- (ELAM-1), P- (GMP-140) e a L-selectina (LECCAM); o grupo das integrinas: LFA-1 e MAC-1 (CD11a/CD18 e CD11b/CD18); e a superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM) (ver tabela 1). A interação inicial entre leucócito e endotélio é de baixa afinidade e se manifesta como comportamento de rolar dos leucócitos. As selectinas são a família de moléculas que mediam esse comportamento. A L-selectina está normalmente expressa em muitos leucócitos circulantes enquanto seu ligante somente está presente no endotélio ativado. L-selectina deve ser destacada da superfície do leucócito ativado para que se possa passar para a etapa seguinte que é a de aderir firmemente (ficar estacionário) ao endotélio (etapa importante para o processo de transmigração endotelial; figura 2). Na etapa de aderência são expressas na superfície do leucócito as  $\beta 2$  integrinas (CD11a, CD11b, CD11c que se ligam ao CD18) que interagem com as moléculas da superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM-1)<sup>83,84</sup>.

Quando o endotélio é ativado em resposta a doenças inflamatórias, agudas ou crônicas, por citocinas e no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, a expressão dessas moléculas aumenta marcadamente. Isoformas solúveis dessas moléculas estão presentes na circulação e tem sido demonstrado que estão aumentadas em várias doenças, entre elas a

hipertensão. O aparecimento dessas moléculas no plasma pode ser resultado da ruptura de sua ligação à superfície endotelial. Como a expressão dessas moléculas está sujeita a controle rigoroso, pois migração exagerada pode ser danosa, o nível aumentado das formas solúveis pode refletir inflamação/ativação endotelial e aumento da expressão na superfície celular<sup>85,86</sup>.

### **Controle da expressão de moléculas de adesão na hipertensão arterial**

Demonstrou-se recentemente que na progressão do dano vascular na hipertensão essencial, renovascular e na hipertensão maligna há aumento dos níveis circulantes de P-selectina, e em menor extensão E-selectina, enquanto os níveis de VCAM-1 somente estão aumentados no dano vascular severo e agudo incluindo a hipertensão maligna<sup>87</sup>. Certos autores têm proposto que tanto as selectinas quanto as ICAMs podem ser indicadores de dano vascular na hipertensão<sup>88,89</sup>.

Um dos possíveis mecanismos que tem sido proposto para explicar o aumento da adesividade do endotélio na hipertensão é a força de cisalhamento. Entretanto, outros fatores podem também contribuir, como a Ang II e a ET-1, que aumentam a expressão de moléculas de adesão na hipertensão. Por outro lado, o NO liberado das células endoteliais pode diminuir a expressão de moléculas de adesão, provavelmente inibindo a atividade do I $\kappa$ B (inibidor do NF $\kappa$ B), que é potente ativador de VCAM-1, MCP-1 e MCSF. O estresse oxidativo pode, por fosforilação do I $\kappa$ B, liberar o NF $\kappa$ B e assim aumentar a expressão dessas moléculas. Portanto, tem-se o controle da expressão de moléculas de adesão pelo sistema NO/ROS. Desequilíbrio desse sistema, por diminuição da NOS

ou aumento de ROS, pode contribuir para o aumento da expressão de moléculas de adesão como ocorre na hipertensão<sup>90</sup>.

### **Endotélio e o controle da permeabilidade a macromoléculas**

A manutenção da função de barreira do endotélio vascular é crítica para a homeostasia e essa função pode ser comprometida por mediadores inflamatórios, citocinas ou oxidantes<sup>91-94</sup>. Além disso, aumento da permeabilidade a fluidos e a macromoléculas ocorre também pelo aumento da pressão intravascular encontrado na hipertensão arterial. Ao lado da expressão e secreção de fatores de crescimento e envolvimento na migração aumentada de células na parede vascular, esse é outro mecanismo pelo qual alteração da função endotelial contribui para a proliferação do músculo liso e formação da matriz extracelular.

Alteração da permeabilidade da camada endotelial na hipertensão, diabetes e/ou hiperlipidemia causa aumento do fluxo de substâncias da circulação para a parede vascular; entre essas se destaca a LDL que tem papel importante na aterogênese, da qual a hipertensão é um dos principais fatores de risco. Nas fases iniciais da hipertensão tem se demonstrado também aumento do transporte de albumina; isso parece ser devido à diminuição da função endotelial que provoca o aumento de permeabilidade, provavelmente por alteração do citoesqueleto endotelial. Sugeriu-se ainda existir correlação entre microalbuminúria e disfunção endotelial na hipertensão essencial. Entretanto, isso parece pouco provável pois a perda glomerular de albumina é devida a alterações da expressão da matriz de lâmina basal.



É possível que a disfunção endotelial na hipertensão essencial contribua indiretamente para a microalbuminúria por alterar a expressão de matriz no endotélio alterado<sup>85</sup>. Além disso, o NO pode, via GMPc, diminuir a permeabilidade vascular por diminuir os níveis de  $Ca^{2+}$  necessários para que ocorra a saída de material intravascular para o interstício. Alterações endoteliais que comprometem o sistema do NO podem provocar ou contribuir para o aumento de permeabilidade a macromoléculas na hipertensão<sup>95</sup>.

## Endotélio e o controle da agregação plaquetária

Em condições normais, o endotélio forma uma superfície não trombogênica que impede a aderência de plaquetas e de outras células sanguíneas, bem como a ativação da cascata da coagulação. Essa propriedade de tromborresistência não é ainda completamente compreendida. Atualmente uma série de fatores coagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários são responsabilizados por essa propriedade. O

endotélio está em estreito e constante contato com agentes gerados na corrente circulatória que podem colocar em risco a integridade dos vasos sanguíneos e a homeostasia dos constituintes sanguíneos. Está se tornando cada vez mais claro e aceito o conceito de que o endotélio representa mecanismo de defesa potente contra esses agentes e para isso expressa uma série de moléculas, constituindo-se essa em uma das suas principais funções como vasoprotetor e tromborresistente. Algumas dessas moléculas são expressas constitutivamente, enquanto outras são produzidas em resposta a estímulos. Algumas são expressas na superfície endotelial e outras são liberadas.

Entre as moléculas importantes fisiologicamente para suprimir a ativação plaquetária e a interação plaqueta-parede vascular encontram-se a ecto-ADPase, que é expressa na superfície endotelial, a prostaciclina ( $PGI_2$ ) e o NO, que são secretados e agem de forma parácrina. O endotélio normal é capaz de manter nível basal constante de  $PGI_2$ , enquanto a

produção basal de NO ainda não está clara. Os estímulos que mantêm a síntese de  $PGI_2$  e NO constitutivamente são muitos, incluindo trombina, histamina, força de cisalhamento e mediadores lipídicos. A atividade ADPásica da superfície endotelial conferida pela ecto-ADPase é importante na degradação de ADP proveniente da agregação plaquetária, o que indica que essa enzima pode ter papel fisiológico importante limitando a extensão da agregação plaquetária.

Entre as moléculas envolvidas no controle da coagulação incluem-se a trombosmodulina, moléculas semelhantes à heparina, fator de von Willebrand, proteína S e inibidor do fator tecidual, todas elas sintetizadas pelo endotélio e presentes na superfície endotelial. Além disso, o endotélio é o principal sítio de síntese e secreção do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) após estímulos como trombina, força de cisalhamento entre outros, e que promove a fibrinólise. Para controlar a atividade do tPA o endotélio produz ainda o inibidor da atividade tPA (ver tabela 2 e para maiores detalhes<sup>93</sup>.

**Tabela 2** – Moléculas de adesão leucócito-endotélio

Molécula de adesão (no endotélio)	Família	Receptor leucocitário	Família	Célula
E-selectina (ELAM-1)	Selectina	Sid-Le <sup>x</sup> Glicoproteína	Oligossacarídeos	Neutrófilos Célula T Monócitos
P-selectina (GMP-140)	Selectina	Sidil-Le <sup>x</sup> Glicoproteína	Oligossacarídeos	Neutrófilos Monócitos
ICAM-1	Imunoglobulina	LFA-1/MAC-1	$\beta_2$ integrina	Todos os leucócitos
VCAM-1	Imunoglobulina	VLA-4	$\beta_1$ integrina	Linfócitos Monócitos Basófilos Eosinófilos
LAM-1 ligante(s) (GliCam-1; CD 34)	Glicoproteínas semelhantes a mucina	L-selectina (LAM-1)	Selectina	Neutrófilos Linfócitos Monócitos

Moléculas de adesão leucocitária.

## Disfunção endotelial e controle da agregação plaquetária na hipertensão arterial

Danos ou disfunção endotelial tem papel fundamental nas desordens trombóticas. Perda das propriedades protetoras associada à expressão de moléculas procoagulantes ou protrombóticas na matriz subendotelial e/ou ao endotélio mal funcionando desloca o equilíbrio hemostático para trombose<sup>96-98</sup>.

As manifestações clínicas e patológicas de desordens vasculares trombóticas após dano vascular diferem

com o vaso sanguíneo afetado, tipo de dano, fluxo sanguíneo e força de cisalhamento. Nas desordens arteriais trombóticas, as artérias de tamanho médio são agredidas cronicamente por lípidos da dieta, tabagismo, hipertensão, diabetes melito e agentes virais e imunológicos. Há evidências crescentes mostrando que na fase inicial a célula endotelial responde a agressões acelerando a produção de substâncias protetoras. Entretanto, se a agressão é crônica ou severa, há dano endotelial e suas propriedades protetoras são prejudicadas. Além disso, a disfunção endotelial pode induzir a atividade procoagulante. Interações entre lipopro-

teínas, plaquetas e monócitos e as células da parede vascular e as proteínas levam a alterações complexas que provocam aterosclerose, hiperplasia da íntima e trombose aguda.

Concluindo, as células endoteliais produzem uma série de moléculas capazes de inibir a reatividade das plaquetas e a coagulação sanguínea, de modular a fibrinólise e de estimular a tromborresistência. Ativação crônica e severa das células endoteliais pode resultar em diminuição da produção dessas moléculas protetoras com conseqüente expressão de moléculas protrombóticas e proinflamatórias.<sup>93,96,97</sup>

### Abstract

#### Arterial hypertension: endothelium and multiples functions

The healthy endothelium normally displays anticoagulant, vasodilatory and anti-inflammatory activities that play a central role in homeostasis. Dysfunction of the endothelium is a common feature of various cardiovascular diseases such as arterial hypertension. A normal endothelium protects against the development of vascular lesions by maintaining vasodilation and inhibiting platelet aggregation, leukocyte adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells. This can be achieved by the release of EDRFs (Endothelium-Derived Relaxing Factors) such as nitric oxide, prostacilin and endothelium-derived hyperpolarizing factor. The endothelium also produces contractile factors, the so called

EDCFs, the main compounds being prostaglandin H<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>, the endothelins and superoxide anions. Endothelium dysfunction in hypertension can 1) lead to decreased generation of NO/increase of reactive oxygen species, thereby diminishing vasodilation and increasing vascular tone, 2) contribute to an increase in cell permeability leading to intimal edema, 3) increase the expression of adhesion molecules and as a consequence the adherence of leukocytes to the vessel wall, 4) accelerate intravascular blood coagulation, 5) increase the proliferation of smooth muscle cells. From the above-mentioned mechanisms it is evident that the endothelium plays a central role in hypertension. Alterations in cell permeability, adhesion of leukocytes, proliferation of smooth muscle cells, coagulation and an imbalance in the EDRFs/EDCFs release seem to be important in this disease.

**Keywords:** Arterial hypertension; Endothelium; Endothelial functions.

Rev Bras Hipertens 1: 76-88, 2001

### Referências

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 299: 373-6, 1980.
2. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9, 1987.
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-6, 1987.
4. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis factor is inorganic nitrite and endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM (ed.). *Vasodilation*. New York, Raven, 401-4, 1988.

5. Myers PR, Guerra JR, Harrison DG. Release of NO and EDRF from cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 256: H1030-H1037, 1989.
6. Cowan CL, Cohen RA. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and independent responses. *Am J Physiol* 261: H830-H835, 1991.
7. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-42, 1991.
8. Huang PL, Huang Z, Mashino H, Block KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-42, 1995.
9. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-6, 1988.
10. Mayer B, Andrew P. Nitric oxide synthase: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358: 127-33, 1998.
11. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 43: 532-41, 1999.
12. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res* 52: 352-7, 1983.
13. Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 23: 1141-7, 1994.
14. Bolotina BM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PG, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-3, 1994.
15. Nagao T, Vanhoutte PM. Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 107: 1102-7, 1992.
16. Garland CJ, McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesentery artery. *Br J Pharmacol* 105: 429-35, 1992.
17. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 1082-90, 1996.
18. Mombouli JM, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 18: 252-6, 1997.
19. Taylor SG, Southerton JS, Weston AH, Baker JRJ. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *Br J Pharmacol* 94: 853-63, 1988.
20. Mombouli JV, Illiano S, Nagao T, Vanhoutte PM. The potentiation of bradykinin-induced relaxations by perindoprilat in canine coronary arteries involves both nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* 71: 137-44, 1992.
21. Garcia-Pascual A, Labadia A, Jimenez E, Costa G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K<sup>+</sup> conductance. *Br J Pharmacol* 115: 1221-30, 1995.
22. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 100: 2793-9, 1997.
23. Vanhoutte PM. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. The Netherlands, Harwood Academic Publishers, 1-305, 1999.
24. Popp R, Bauersachs, Sauer E, Hecker M, Fleming I, Busse R. The cytochrome P450 monooxygenase pathway and nitric oxide-independent relaxations. In: Vanhoutte PM (ed.). *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. The Netherlands, Harwood Academic Publishers, 65-71, 1999.
25. Randall MD, Alexander SPH, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 114-20, 1996.
26. Randall MD, Kendall DA. Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. *Eur J Pharmacol* 335: 205-9, 1997.
27. Randall MD, McCulloch AI, Kendall DA. Comparative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat isolated mesentery. *Eur J Pharmacol* 333: 191-7, 1997.
28. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372: 686-91, 1994.
29. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106: 1521-30, 2000.
30. Vanhoutte PM, Félétou M. Existence of multiple endothelium-derived hyperpolarizing factor(s)? In: Vanhoutte PM (ed.). *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. The Netherlands, Harwood Academic Publishers, 303-5, 1999.
31. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293-331, 1979.
32. Mombouli J-M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31: 61-74, 1999.
33. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension* 34: 539-45, 1999.
34. Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. In: Packer L (ed.). *Methods of enzymology*. San Diego, Academic Press Inc, 229-40, 1994.
35. Rubany GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: H822-H827, 1986.
36. Auch-Schweik W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radical are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13: 859-64, 1989.
37. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 23: 229-35, 1994.
38. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species:

- pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43: 562-71, 1999.
39. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46: 328-415, 1994.
  40. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-5, 1988.
  41. Fortes ZB, DE Nucci G, Garcia-Leme J. Effects of endothelin-1 on arterioles and venules in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 13: 200-1, 1989.
  42. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368: 703-10, 1994.
  43. Krieger EM, Santos RAS. Angiotensinas. Aspectos fisiológicos. *Hipertensão* 1(1): 7-10, 1998.
  44. Wood AJJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *Drug Therapy* 334: 1649-54, 1996.
  45. Carvalho, MHC, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Cordellini S. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. *J Hypertens* 5: 377-82, 1987.
  46. Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 18: 87-9, 1995.
  47. Fortes ZB, Nigro D, Scivoletto R, Carvalho MHC. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor released in arterioles of deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *J Hypertens* 8: 1043-8, 1990.
  48. Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Scivoletto R, Oliveira MA, Carvalho MHC. Effect of indomethacin on the microvessel reactivity of two-kidney one-clip hypertensive rats. *Arch Int Pharmacol* 316: 75-89, 1992.
  49. Ge T, Hugues H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H<sub>2</sub> in the SHR aorta. *Circ Res* 76: 1003-10, 1995.
  50. Côrtes SF, Andriantsitohaina R, Stoclet JC. Alterations of cyclo-oxygenase products and NO in responses to angiotensin II of resistance arteries from the spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol* 119: 1635-41, 1996.
  51. Lüscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in normotensives and hypertensives Dahl-rats. *Hypertension* 9: 157-63, 1987.
  52. Hayakawa H, Raij L. Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. *Hypertension* 31: 266-70, 1998.
  53. Hayakawa H, Raij L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* 29: 235-41, 1997.
  54. Qiu HY, Henrion D, Benessiano J, Heymes C, Tournier B, Lévy BI. Decreased flow-induced dilation and increased production of cGMP in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32: 1098-103, 1998.
  55. Dantas APV, Franco MCP, Fortes ZB, Scivoletto R, Nigro D, Carvalho MHC. Estrogen, but not progesterone or luteinizing hormone, modulates the generation of vasoconstrictor prostanoids in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 18(4): S212, 2000.
  56. Bauersachs J, Bouloumié A, Mülsch A. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and, in superoxide anion production. *Cardiovasc Res* 37: 772-9, 1998.
  57. Kojda G, Kottenberg K, Hacker A, Noack E. Alterations of the vascular and the myocardial soluble guanylate cyclase/cGMP-system induced by long-term hypertension in rats. *Pharm Acta Helv* 73: 27-35, 1998.
  58. Jacke K, Witte K, Huser L, Behrends S, Lemmer B. Contribution of the renin-angiotensin system to subsensitivity of soluble guanylyl cyclase in TGR(mREN2)27 rats. *Eur J Pharmacol* 403: 27-35, 2000.
  59. Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 70: 660-9, 1992.
  60. Tschudi MR, Mesaros S, Lüscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 27: 32-5, 1996.
  61. Jameson M, Dai FX, Lüscher TF, Skopeck J, Diederich A, Diederich D. Endothelium-derived contracting factors in resistance arteries of young spontaneously hypertensive rats before development of overt hypertension. *Hypertension* 21: 280-8, 1993.
  62. Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S. Role of superoxide in depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 26: 854-7, 1995.
  63. Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 101: 1530-7, 1998.
  64. Garg UC, Hassid A. Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide generating vasodilators. *Am J Physiol* 257(1 pt 2): F60-6, 1989.
  65. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83(5): 1774-7, 1989.
  66. Guo K, Andres V, Walsh K. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 257(1 pt 2): 2066-72, 1998.
  67. Ishida A, Sasaguri T, Kosaka C, Nojima H, Ogata J. Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272(15): 10050-7, 1997.
  68. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27): 2002-12, 1993.
  69. Deng LY, Thibault G, Schiffrin EL. Effect of hypertension induced by nitric

- oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens* 15(3): 527-37, 1993.
70. El Mabrouk M, Singh A, Touyz RM, Schiffrin EL. Antiproliferative effect of L-NAME on rat smooth muscle cells. *Life Sc* 67: 1613-23, 2000.
  71. Rizvi MA, Myers PR. Nitric oxide modulates basal and endothelin-1-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels. *J Mol Cell Cardiol* 29(7): 1779-89, 1997.
  72. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 79(4): 748-56, 1996.
  73. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ETA receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis* 146(2): 351-9, 1999.
  74. Schieffer B, Drexler H, Ling BN, Marrero MB. G-protein-coupled receptors control vascular smooth muscle cell proliferation via pp60c-src and p21ras. *Am J Physiol* 272 (6 Pt 1): C2019-30, 1997.
  75. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelins. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 (Suppl 3): S2-13, 1998.
  76. Douglas AS, Ohlstein EH. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J Vasc Res* 34: 152-64, 1997.
  77. Freeman EJ. The angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells involves a phospholipase D-mediated signalling mechanism. *Arch Biochem Biophys* 374(2): 363-70, 2000.
  78. Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 212(1-2): 155-69, 2000.
  79. Haendeler J, Berk BC. Angiotensin II-mediated signal transduction. Important role of tyrosine kinases. *Reg Pept* 95(1-3): 1-7, 2000.
  80. De Caterina R, Basta G, Dell'Omo G et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2646-54, 1997.
  81. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leuc Biol* 67: 591-602, 2000.
  82. Libby P, Aikawa M, Kinlay S, Selwin A, Gawz P. Lipid lowering improves endothelium functions. *Int J Cardiol* 74: S3-70, 2000.
  83. Henricks PAJ, Nijkamp FP. Pharmacological modulation of cell adhesion molecules. *Eur J Pharmacol* 344: 1-13, 1998.
  84. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Brit J Pharmacol* 126: 537-50, 1999.
  85. Haller H. Hypertension, the endothelium and the pathogenesis of chronic vascular disease. *Kid Blood Press Res* 19: 166-71, 1996.
  86. Verhaar MC, Beutler JJ, Gaillard CA et al. Progressive vascular damage in hypertension is associated with increased levels of circulating s-selectin. *J Hypertens* 16: 45-50, 1998.
  87. DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF et al. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens* 10: 1335-41, 1997.
  88. Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today* 14: 506-12, 1993.
  89. Komatsu S, Panes J, Russel JM, et al. effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension*, 29: 683-89, 1997.
  90. McQuaid M, Keenan AK. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp Phys* 82: 369-76, 1997.
  91. Neal CR, Michel CC. Opening in frog microvascular endothelium induced by high intravascular pressures. *J Phys* 492: 39-52, 1996.
  92. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Ann Rev Med* 47: 315-31, 1996.
  93. Chien S, Fan F, Lee MM, Handley, DA. Effects of arterial pressure on endothelial transport of macromolecules. *Biorheology* 21: 631-41, 1984.
  94. Kurose I, Kubes P, Wolf R et al. Inhibition of nitric oxide production. Mechanism of vascular albumin leakage. *Circ Res* 73: 164-71, 1993.
  95. Lip GYH, Beevers DG. Abnormalities of rheology and coagulation in hypertension. *J Hum Hypertens* 8: 693-701, 1994.
  96. Lee AJ. The role of rheology and hemostatic factor in hypertension. *J Hum Hypertens* 11: 767-76, 1997.
  97. Lip GYH. Target organ damage and the prothrombotic state in hypertension. *Hypertension* 36: 975-77, 2000.