

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CARDIOLOGIA

Disfunção Endotelial em Pacientes Submetidos
à Terapia com Nitroglicerina
e à Intervenção Coronária Percutânea

Paulo Ricardo Avancini Caramori

Orientador: Alcides José Zago

Co-orientador: Allan G. Adelman

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Medicina, área de concentração em
Cardiologia, para a obtenção do Título de Doutor.

C259d Caramori, Paulo Ricardo Avancini

Disfunção endotelial em pacientes submetidos à terapia com nitroglicerina e à intervenção coronária percutânea / Paulo Ricardo Avancini Caramori ; orient. Alcides José Zago ; co-orient. Allan G. Adelman. – Porto Alegre, 1999.

97 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina : Cardiologia.

1. Endotélio. 2. Nitroglicerina. 3. Angioplastia coronariana percutânea. 4. Stents. I. Zago, Alcides José. II. Adelman, Allan G. III. Título.

NLM: QS 532.5.E7

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedicatória

A devoção a um fragmento da realidade, ou a um aspecto da ciência, é quase invariavelmente associada a nossa retirada de outras áreas da vida.

Dedico este trabalho à Marlova, minha esposa e melhor amiga, que, com carinho e compreensão, apoiou minha dedicação a Parte, enquanto me estimulava a não esquecer do Todo.

Agradecimento Especial

Durante o período que estive na Universidade de Toronto, algumas pessoas tiveram uma profunda influência na minha formação clínica, científica e como indivíduo. Entre estas pessoas, destaco o Dr. Allan G. Adelman, uma pessoa brilhante e sincera, que dedicou boa parte de sua vida à pesquisa e à transmissão de conhecimentos médicos.

O Dr. Adelman nasceu em Montreal em 12 de outubro de 1936, precisamente 30 anos antes do meu nascimento. Ingressou como Professor de Medicina da Universidade de Toronto ainda jovem, dedicando-se inicialmente ao estudo da Miocardiopatia Hipertrófica. Subseqüentemente, participou ativamente do desenvolvimento de Cardiologia Intervencionista na Universidade de Toronto, como Co-diretor do Laboratório de Cateterismo Cardíaco do Toronto Hospital. Em 1991, foi um dos fundadores do Laboratório de Cateterismo Cardíaco do Mount Sinai Hospital, também filiado à Universidade de Toronto. Ele foi o diretor deste laboratório até o final de sua carreira, mantendo-o como um centro exclusivamente dedicado à pesquisa clínica. Durante sua vida, teve uma significativa produção intelectual e científica. O Dr. Adelman tinha uma mente ativa e inquisitiva, demonstrando um interesse genuíno pelo desenvolvimento científico e clínico de seus *fellows* e residentes.

Fui o último *fellow* do Dr. Adelman. Tive o privilégio de conviver com ele por aproximadamente dois anos, até seu afastamento por motivos de saúde. Por mais de um ano, Dr. Adelman lutou por sua vida, com a mesma intensidade que a viveu. Em 11 de maio de 1999, ele definitivamente nos abandonou. Em meu coração ficou a experiência que tive com ele e a saudade de meu grande mentor.

Al, muito obrigado. Descanse em Paz.

Agradecimentos

Aos meus pais, Nelson e Maria Teresa, agradeço o amor e a dedicação que sempre tiveram para com seus filhos, oferecendo orientação, estímulo e suporte para que realizassem seus sonhos.

Aos colegas e supervisores John D. Parker, Gary Newton e Charles Lazzam, agradeço pela orientação estímulo sincero durante a realização deste trabalho. Aos colegas Peter Seidelin e Valter Lima agradeço pelo apoio na realização destes estudos. Também agradeço aos membros do Cardiovascular Clinical Research Laboratory do Hospital Mount Sinai, Universidade de Toronto pela colaboração para a execução deste trabalho. Especialmente agradeço as enfermeiras Anne M. Schofield e Arlene Carter por coordenarem o trabalho de enfermagem e a Debbie Ham e Gwyn Prasad pelo auxílio administrativo.

Ao Curso de Pós-Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, nas pessoas de seus coordenadores durante a realização de meu doutorado, Dr. Jorge Pinto Ribeiro e Dr. Waldomiro Carlos Manfrói, agradeço a oferta das condições necessárias para que eu buscasse uma maior formação clínica e científica.

Também agradeço ao Dr. Alcides José Zago pela orientação e estímulo, durante a minha pós-graduação.

Ao CNPq, agradeço pelo concessão da bolsa Doutorado Sanduíche que possibilitou a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo	1
Summary	3
I. Introdução.....	6
II.Revisão da Literatura	9
O Endotélio na Homeostase Cardiovascular	9
A Função Vasomotora Endotelial.....	10
Fisiopatogenia da Disfunção Endotelial	16
Avaliação da Função Endotelial	18
Implicações Clínicas	23
III. Objetivos.....	28
IV. Efeitos da Terapia com Nitroglicerina na Função Vasomotora Endotelial	30
Introdução	30
Métodos	32
Resultados.....	37
Discussão	46
V. Função Vasomotora Endotelial Após Intervenções Coronarianas Percutâneas	52
Introdução	52
Métodos	53
Resultados.....	57
Discussão	64
VI. Discussão Geral	69
VII. Conclusões	72
VIII. Referências Bibliográficas.....	75
IX. Apêndice.....	92

Resumo

Introdução: A terapia com nitroglicerina está associada a modificações bioquímicas na vasculatura que podem levar à alterações na função endotelial. De modo análogo, as intervenções coronárias percutâneas causam intensa lesão mecânica na parede vascular que pode determinar disfunção endotelial.

Objetivos: Avaliar a resposta vasomotora ao vasodilatador dependente do endotélio, acetilcolina, em artérias coronárias de pacientes submetidos a terapia com nitroglicerina e de pacientes previamente submetidos a uma intervenção coronária percutânea.

Métodos: Quinze pacientes foram randomizados para receber 0,6 mg/hora de nitroglicerina transdérmica contínua (n = 8), ou para um grupo controle (n = 7), por cinco dias. Na manhã do quinto dia, angiografia quantitativa foi realizada, avaliando a resposta da artéria descendente anterior à infusão intracoronária de acetilcolina (concentração máxima 10^{-4} molar). O adesivo transdérmico foi, então, removido dos pacientes do grupo nitroglicerina e, três horas após, os procedimentos foram repetidos.

Para investigar a função endotelial após intervenções coronárias percutâneas, foram estudados 39 pacientes submetidos a uma intervenção coronária para uma estenose na artéria descendente anterior pelo menos 6 meses antes. Doze pacientes haviam sido tratados com *stents*, 15 com angioplastia por cateter balão e 12 com aterectomia direcionada. As respostas da artéria descendente anterior (intervida) e da artéria circunflexa (não intervida), à infusão de acetilcolina foram avaliadas por angiografia quantitativa.

Resultados: Nos dois estudos os grupos possuíam características angiográficas e fatores de risco para disfunção endotelial similares. No estudo dos efeitos da nitroglicerina, em vigência de tratamento, o grupo nitroglicerina apresentou maior constrição coronária em resposta à acetilcolina do que o grupo controle ($-19,6 \pm 4,2\%$

versus $-3,8 \pm 3,0\%$; $P = 0,01$). Três horas após a remoção do adesivo transdérmico, o grupo nitroglicerina continuou a apresentar maior vasoconstrição em resposta à acetilcolina, quando comparado ao grupo controle ($-24,1 \pm 5,9\%$ versus $-1,8 \pm 4,8\%$; $P < 0,01$). Quando as respostas à acetilcolina nos estudos da manhã e da tarde foram comparadas, o aumento na constrição coronária observado no grupo nitroglicerina foi maior que a modificação observada nos pacientes do grupo controle ($P < 0,05$).

No estudo dos efeitos de intervenções coronárias, a artéria descendente anterior desenvolveu constrição significativamente maior ($P = 0,02$) em pacientes que previamente haviam recebido *stents* ($21,8 \pm 4,3\%$), do que pacientes tratados angioplastia por cateter balão ($9,5 \pm 2,8\%$) ou com aterectomia direcionada ($9,1 \pm 3,6\%$). Em contraste, a infusão de acetilcolina resultou em leve constrição da circunflexa, similar entre os três grupos ($P = 0,47$). Análise de regressão múltipla identificou o implante prévio de *stent* como único preditor de maior constrição da descendente anterior ($P = 0,008$).

Conclusões: A terapia com nitroglicerina causa respostas vasomotoras coronárias anormais à administração do vasodilatador dependente do endotélio, acetilcolina. Esta resposta vasoconstritora é persistente por até três horas após a retirada da nitroglicerina. Estes achados têm implicações com respeito ao desenvolvimento de tolerância a nitratos e ao potencial para eventos adversos durante a retirada de nitroglicerina.

Entre pacientes que foram submetidos a uma intervenção coronária percutânea, foi observada disfunção endotelial mais grave após o implante de *stents* do que após uma angioplastia por cateter balão ou aterectomia direcionada. Estes achados podem ter implicações com respeito à progressão de aterosclerose em artérias coronárias submetidas a intervenções percutâneas, especialmente implante de *stents*.

Summary

Background. Nitroglycerin therapy is associated with specific biochemical changes in the vasculature that may lead to an increased vascular sensitivity to vasoconstrictors. Catheter-based coronary interventions are associated with extensive arterial wall injury that appears to be associated with a chronically abnormal endothelial function.

Objectives: 1) To investigate whether therapy with nitroglycerin would lead to abnormal coronary artery responses to the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine. 2) To assess the endothelial-dependent vasomotor function in non-restenotic coronary arteries more than 6 months following stent implantation, balloon angioplasty, and directional atherectomy.

Methods: Fifteen patients were randomized to continuous transdermal nitroglycerin, 0.6 mg/hour (n = 8), or no therapy (n = 7), for 5 days prior to a diagnostic catheterization. Patients had similar risk factors for endothelial dysfunction. Quantitative angiography was performed in the morning to measure the mean luminal diameter of the left anterior descending (LAD) in response to intracoronary acetylcholine (peak concentration, 10^{-4} molar). The transdermal preparation was removed from the nitroglycerin group and 3 hours later experimental procedures were repeated.

Thirty-nine patients, who were treated at least 6 months earlier with a coronary intervention for isolated proximal LAD stenosis, with no evidence of restenosis, were included in the study of the effects of coronary interventions on endothelial vasomotor function. Twelve patients had been stented, 15 had been treated with balloon angioplasty, and 12 had undergone directional atherectomy. The change in diameter of the intervened LAD, and the uninvolved circumflex coronary artery, in response to intracoronary acetylcholine were assessed by quantitative angiography.

Results: In both studies the groups had similar angiographic characteristics and risk factors for endothelial dysfunction. In the nitroglycerin study, in the morning, the nitroglycerin group experienced greater coronary constriction in response to acetylcholine infusion than those not receiving nitroglycerin ($-19.6 \pm 4.2\%$ versus $-3.8 \pm 3.0\%$; $P = 0.01$). Three hours later, the nitroglycerin group continued to display greater constriction to acetylcholine ($-24.1 \pm 5.9\%$) as compared to the non-nitroglycerin group ($-1.8 \pm 4.8\%$; $P < 0.01$). When morning and afternoon responses to acetylcholine were compared, the increase in coronary constriction in the nitroglycerin group was greater than the change observed in the non-nitroglycerin group ($P < 0.05$).

In the study of the effects of coronary interventions on endothelial vasomotor function, the LAD constricted significantly more ($P = 0.02$) in previously stented patients ($21.8 \pm 4.3\%$), as compared to patients previously treated with balloon angioplasty ($9.5 \pm 2.8\%$) or with directional atherectomy ($9.1 \pm 3.6\%$). In contrast, acetylcholine infusion resulted in mild constriction in the circumflex coronary artery which was similar in the three groups ($P = 0.47$). By multiple regression analysis, previous implant of a stent was the only significant predictor of LAD constriction ($P = 0.008$).

Conclusions: Therapy with nitroglycerin causes abnormal coronary vasomotor responses to the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine, which were persistent for up to 3 hours after nitroglycerin discontinuation. This nitrate associated vasomotor dysfunction has implications with respect to the development of nitrate tolerance and the potential for adverse events during nitrate withdrawal.

More severe endothelial dysfunction was observed long term after stenting as compared to balloon angioplasty or directional atherectomy. These findings may have implications with respect to the progression of atherosclerosis in coronary arteries subjected to percutaneous interventions.

Introdução

I. Introdução

O endotélio vascular foi considerado, por várias décadas, como sendo apenas uma camada unicelular que atuava como uma barreira semipermeável entre o sangue e o interstício. Recentemente, uma série de evidências tem demonstrado que o endotélio desempenha uma grande gama de importantes funções biológicas, participando de várias vias metabólicas e regulatórias. Além das funções especializadas, como troca de gases na circulação pulmonar e fagocitose na circulação hepática e esplênica, conhecidas a longa data, o endotélio vascular desempenha papéis universais na circulação, que incluem a participação no controle sobre a trombólise e a trombose, sobre o crescimento vascular, sobre as interações entre plaquetas e leucócitos com a parede vascular e sobre o tônus vasomotor.

O estudo da reatividade vasomotora dependente do endotélio produziu, ao longo dos anos, evidências científicas que são fundamentais para a compreensão do papel do endotélio em situações fisiológicas e patológicas. Em 1977, Moncada e colaboradores publicaram a primeira indicação de que o endotélio possuía um papel central no controle do tônus vascular, através da produção de substâncias vasoativas (1). Em 1980, Furchgott e Zawadzki (2) demonstraram, em uma preparação experimental em aorta de coelhos, o papel obrigatório que as células endoteliais desempenham no relaxamento vascular em resposta a efetores como a acetilcolina, postulando a existência de um fator de relaxamento vascular derivado do endotélio. Em 1987, dois grupos de pesquisadores, liderados pelos Drs. Ignarro (3) e Moncada (4), demonstraram que o fator de relaxamento derivado do endotélio era o óxido nítrico, um gás inodoro que até então era considerado apenas um poluente.

A disfunção endotelial foi caracterizada pela primeira vez em humanos em 1986 por Ludmer e colaboradores (5) que demonstraram que artérias coronárias ateroscleróticas contraem em resposta à infusão de acetilcolina intracoronária, enquanto coronárias normais apresentam dilatação. Em 1992, disfunção endotelial foi documentada por Celermajer e colaboradores (6) em crianças e adultos jovens hígidos, mas com fatores de risco para aterosclerose.

Em situações fisiológicas o endotélio mantém o tônus vasomotor reduzido, previne a adesão de leucócitos e plaquetas e inibe a proliferação de células musculares lisas vasculares. Em contrapartida, a disfunção endotelial parece desempenhar um papel patogênico no desenvolvimento inicial da aterosclerose (7 - 9) e de síndromes coronarianas instáveis (10), sendo associada aos fatores de risco para a doença aterosclerótica (11 -18), estando presente mesmo antes que o comprometimento vascular seja evidente (6, 19 - 21).

Estudos clínicos recentes demonstraram que alguns fármacos que reconhecidamente reduzem a incidência de eventos cardiovasculares, também melhoram a função endotelial (22 - 25). Por outro lado, intervenções clínicas tais como a administração continuada de nitratos orgânicos e as intervenções coronárias percutâneas podem estar associadas a efeitos adversos sobre o endotélio vascular. Nesta tese, discutiremos a função/disfunção endotelial e avaliaremos os efeitos destas duas intervenções clínicas sobre a função vasomotora endotélio-dependente em artérias coronárias.

Revisão da Literatura

II.Revisão da Literatura

O Endotélio na Homeostase Cardiovascular

O endotélio vascular pode ser considerado como um órgão heterogêneo e dinâmico que possui funções secretórias, sintéticas, metabólicas e imunológicas vitais para os seres humanos (26). O endotélio regula o fluxo de substâncias nutrientes, de diversas moléculas biologicamente ativas e de células sangüíneas através de todo o organismo humano. Ele é seletivamente permeável, possuindo receptores para várias moléculas na membrana celular, incluindo proteínas (fatores de crescimento, proteínas coagulantes e anticoagulantes), partículas de transporte de lipídios (LDL), metabólitos (óxido nítrico e serotonina) e hormônios (endotelina-1). O endotélio possui um papel central na regulação do tônus vascular e do fluxo sangüíneo, através da secreção e captação de substâncias vasoativas que agem de modo parácrino, contraindo ou dilatando leitos vasculares específicos em resposta a diversos estímulos.

O endotélio também possui importantes ações anticoagulantes, antiplaquetárias e fibrinolíticas. As células endoteliais são o maior sítio de reações envolvendo a trombina (27). Alguns dos estímulos que ativam as plaquetas (adenosina difosfato, adenosina trifosfato e trombina) também estimulam a liberação de prostaciclina pelo endotélio, inibindo a agregação plaquetária (1,28). As células endoteliais secretam o ativador do plasminogênio tecidual (29), que é um potente agente trombolítico de ampla utilização clínica, em resposta a estímulos como noradrenalina, vasopressina, trombina e estase vascular, provendo uma defesa contra a coagulação descontrolada. Outros fatores hemostáticos secretados pelo endotélio incluem o inibidor do fator de ativação do plasminogênio (PAI-1) o fator von Willebrand e a trombomodulina.

Quando o endotélio é estimulado por determinados fatores físicos ou químicos, a célula endotelial sofre modificações fenotípicas que determinam a sua transformação em uma superfície trombogênica. Existe um equilíbrio dinâmico entre estes dois estados, que frequentemente permite que a célula endotelial retorne ao seu estado basal, uma vez que o estímulo trombogênico tenha cessado.

Lesão ou ativação das células endoteliais, em resposta a diversos fatores patológicos, incluindo a aterosclerose, levam a modificações nas suas funções regulatórias. O endotélio passa a ser incapaz de manter a homeostase vascular, caracterizando-se então a disfunção endotelial. A disfunção do endotélio pode ser definida como um desequilíbrio entre os fatores relaxantes e constritores, entre os mediadores pró-coagulantes e anticoagulantes, ou entre substâncias estimuladoras e inibidoras do crescimento e proliferação celular (30).

A Função Vasomotora Endotelial

O endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vasomotor através da síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras – tais como o óxido nítrico, a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio – e pela liberação de substâncias vasoconstritoras – tais como a endotelina-1 e o fator de ativação plaquetária.

O óxido nítrico é, provavelmente, o principal modulador do tônus vasomotor em situações fisiológicas, sendo continuamente secretado em pequenas quantidades pelas células endoteliais (4,31), mantendo o tônus arterial reduzido nas circulações

sistêmica e pulmonar (32). A atividade vasodilatadora do óxido nítrico é devida a interações com o átomo de ferro do grupo prostético heme da guanilato ciclase, causando sua ativação e aumentando os níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (33). Nas células musculares lisas, isto reduz a concentração intracelular de cálcio e causa relaxamento vascular (34).

O óxido nítrico é um radical livre produzido pela oxidação da L-arginina para L-citrulina, através da óxido nítrico sintetase, uma enzima que apresenta pelo menos três isoformas (35). A óxido nítrico sintetase tipo III é uma enzima constitutiva das células endoteliais, que produz continuamente pequenas quantidades de óxido nítrico. Em contraste aos outros agentes vasomotores (prostaciclina, endotelina-1 e fator ativador plaquetário) que são sintetizados primariamente em resposta a fatores locais, a produção de óxido nítrico é regulada por diversos estímulos químicos e físicos. A óxido nítrico sintetase constitutiva das células endoteliais pode ser ativada por estímulos que incluem a trombina, a adenosina difosfato, a bradicinina, a substância P, os agonistas muscarínicos, as catecolaminas e a força de cisalhamento (12). A expressão do gene para esta sintetase é estimulada por estrógenos e pela força de cisalhamento. Duas outras isoformas da óxido nítrico sintetase são atualmente conhecidas: a forma constitutiva neuronal (tipo I) e a induzível (tipo II). A forma induzível tem sido observada em diversos tipos celulares, incluindo o músculo liso vascular, o endotélio e macrófagos. A óxido nítrico sintetase induzível é ativada por citocinas como a interleucina-1 β e o fator de necrose tumoral, podendo produzir grandes quantidades de óxido nítrico em processos inflamatórios.

A produção de óxido nítrico em resposta a catecolaminas, na presença de um endotélio normal, contrabalança os efeitos vasoconstritores alfa-adrenérgicos. Em contraste, quando o endotélio está disfuncionado há aumento na vasoconstrição coronária em resposta aos estímulos adrenérgicos (36, 37). O aumento na síntese de óxido nítrico produzida pela força de cisalhamento contribui para o fenômeno de vasodilatação mediado pelo fluxo, que é um importante mecanismo auto-regulatório fisiológico (38). A produção de óxido nítrico pode ser bloqueada *in vivo* por análogos da L-arginina, como o N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA). Tal bloqueio tem sido bastante útil no estudo do papel do óxido nítrico em situações fisiológicas e patológicas. A infusão de L-NMMA na circulação braquial humana leva a aumento na resistência vascular periférica, enquanto a infusão venosa causa um aumento na pressão arterial sistêmica. Estes achados indicam que a vasculatura está em estado constante de vasodilatação devido a liberação contínua de óxido nítrico (figura 2.1).

Além da modulação do tônus vasomotor, o óxido nítrico derivado das células endoteliais possui vários efeitos importantes na vasculatura. O óxido nítrico inibe a adesão, a ativação e a agregação plaquetária (39) e promove a desagregação plaquetária, em parte através de um mecanismo GMPc dependente. O óxido nítrico produzido em resposta a trombina inibe as plaquetas e modula a coagulação sangüínea. O óxido nítrico derivado de endotélio também inibe a adesão de leucócitos ao endotélio (40, 41), a migração (42) e proliferação (43) de células musculares lisas vasculares e estimula a migração e proliferação de células endoteliais (44).

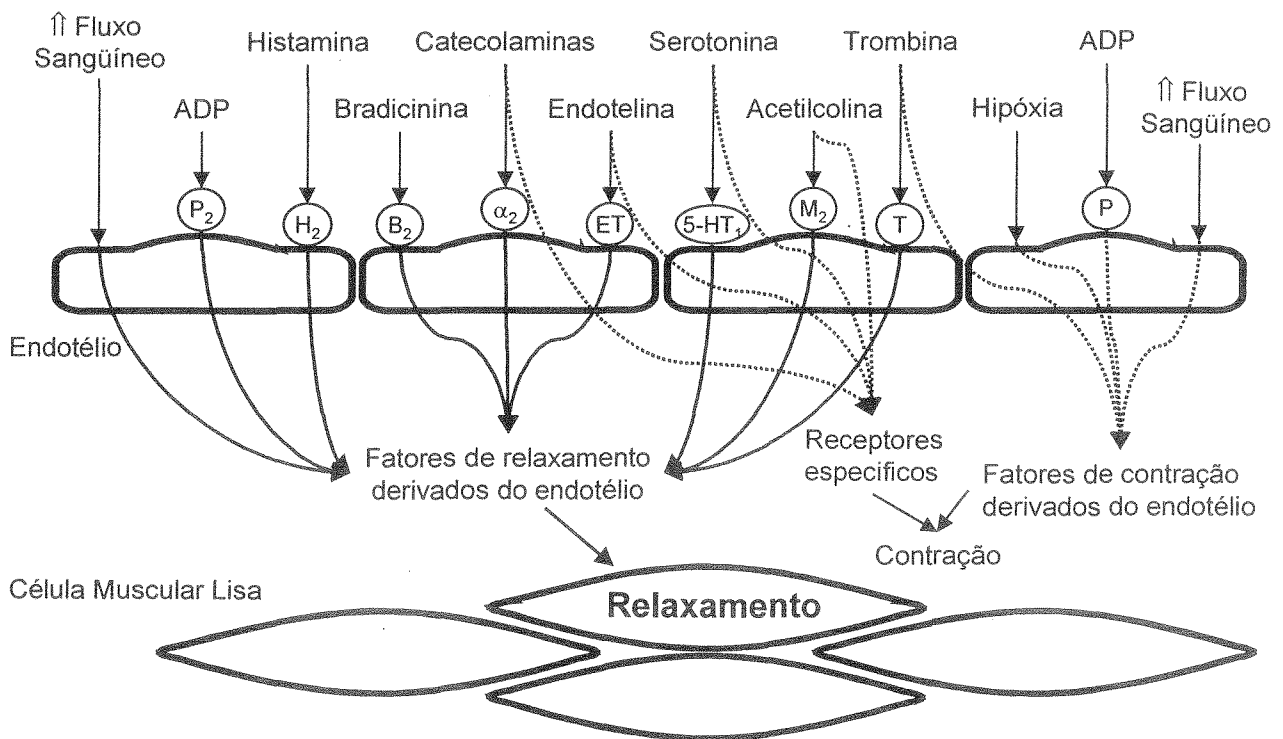


Figura 2.1: Diagrama descrevendo as ações de vários efetores no endotélio funcionalmente intacto. O estímulo de receptores ou a ação direta destes agentes levam a liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (óxido nítrico, prostaciclina) que causam dilatação das células musculares lisas vasculares. Por outro lado, as catecolaminas, a serotonina, a endotelina, a acetilcolina, a adenosina difosfato (ADP), a hipóxia e o estresse de cisalhamento (fluxo sangüíneo) podem causar contração das células musculares lisas vasculares. No endotélio funcionalmente intacto, há predomínio dos fatores de relaxamento derivados do endotélio. (H₂ receptor histamínico, α₂: receptor α-adrenérgico; 5-HT: receptor serotoninérgico; B: receptor da bradicinina; M: receptor muscarínico; P: receptor purinérgico; ET: receptor da endotelina; T: receptor da trombina).

A contribuição das células endoteliais para regulação do tônus vasomotor ainda envolve a produção de outros compostos vasodilatadores, que são a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio. A prostaciclina é sintetizada a partir do ácido araquidônico através da ciclo-oxigenase (1), sendo rapidamente produzida e liberada de células endoteliais (45) em resposta a fatores humorais e hemodinâmicos. Ela age sinergicamente com óxido nítrico, causando vasodilatação e inibição da agregação e adesão plaquetárias (46). Suas ações são mediadas através da estimulação da adenilato ciclase e aumento das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico nas células musculares lisas e nas plaquetas. A prostaciclina não parece ser continuamente produzida pelas células endoteliais (47), mas sintetizada em resposta a estímulos específicos como a bradicinina, a adenosina difosfato, a hipóxia e aumentos na força de cisalhamento.

O fator hiperpolarizante derivado do endotélio promove relaxamento da célula muscular lisa vascular através do aumento da condutância da membrana celular ao potássio (48). Este fator de relaxamento também é secretado em resposta à acetilcolina e bloqueado pela ouabaina, um inibidor da sódio/potássio ATPase. O fator hiperpolarizante derivado do endotélio ainda não foi isolado e seu papel fisiológico permanece incerto.

Em contrapartida, as células endoteliais produzem o vasoconstritor mais potente conhecido, que é a endotelina-1 (49). As endotelinas formam uma família de polipeptídeos produzidos por vários tipos celulares. Das três isoformas conhecidas, as células endoteliais parecem produzir apenas a endotelina-1. A endotelina-1 é um peptídeo de 21 aminoácidos formado a partir do seu precursor inativo a pró-endotelina-

1, que parece exercer um papel como regulador do fluxo sanguíneo arterial em condições normais e patológicas (50). Em respostas a estímulos como trombina, adrenalina, angiotensina II, hipóxia e força de cisalhamento aumentada, a endotelina-1 é liberada das células endoteliais, ligando-se a receptores específicos nas células musculares lisas vasculares, o que resulta em aumento na concentração intracelular de cálcio, levando à vasoconstrição (51). Os vasos intramiocárdicos são mais sensíveis à endotelina-1, sugerindo que este peptídeo tenha um papel maior no controle do fluxo sanguíneo. Interessantemente, no endotélio funcionalmente intacto, a endotelina estimula a produção de óxido nítrico e de prostaciclina, que, então, modulam as ações vasoconstritoras e reduzem a síntese da própria endotelina. Foram identificados dois tipos de receptores vasculares para a endotelina. O receptor ET_B é observado nas células endoteliais, sendo responsável pelo estímulo a formação de óxido nítrico e prostaciclina. Nas células musculares lisas são observados receptor ET_A e ET_B , mediando a contração e a proliferação destas células. Um grande número de antagonistas dos receptores da endotelina que foram desenvolvido nos últimos anos, estão sendo testados em estudos experimentais e clínicos.

O tromboxano A_2 e a prostaglandina H_2 são fatores constritores também secretados pelo endotélio. Estas substâncias ativam o receptor para tromboxano nas células musculares lisas e nas plaquetas, opondo-se aos efeitos do óxido nítrico e da prostaciclina. Entretanto, o papel destas substâncias na circulação coronariana não está claramente estabelecida. O fator de ativação plaquetário é outra substância com ação vasoconstritora sintetizada e liberada pelas células endoteliais em resposta a estímulos humorais e hemodinâmicos, que provavelmente participa de regulação do tônus vasomotor. Finalmente, o endotélio também expressa a enzima de conversão da

angiotensina, que é idêntica à quinase II que metaboliza a bradicinina. Portanto, a enzima de conversão também determina os níveis locais de bradicinina, a qual estimula a produção de óxido nítrico e prostaciclina. Além disso, enzima de conversão sintetiza a angiotensina que diretamente estimula a produção de endotelina.

Fisiopatogenia da Disfunção Endotelial

A disfunção endotelial pode ser determinada pela redução da disponibilidade de vasodilatadores derivados do endotélio, por um aumento local na concentração de substâncias antagonistas destes vasodilatadores ou por uma associação desses dois fatores (figura 2.2). Redução na síntese ou na disponibilidade local de óxido nítrico têm sido freqüentemente imputadas como as principais responsáveis pela disfunção endotelial em diversas situações clínicas. A liberação de óxido nítrico derivado do endotélio está diminuída em indivíduos com fatores de risco para doença arterial coronariana (6, 11,12), assim como em pacientes com aterosclerose coronariana estabelecida (5,52). Uma redução na disponibilidade vascular de óxido nítrico determina prejuízo na vasodilatação endotélio-dependente, aumento da agregabilidade plaquetária e da adesividade de monócitos no endotélio e influencia a proliferação das células musculares lisas vasculares, provavelmente contribuindo para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Em modelos animais de hipercolesterolemia, a inibição farmacológica da óxido nítrico sintetase acelera a aterosclerose (53), enquanto que um aumento na disponibilidade de óxido nítrico reduz a progressão da doença e pode até induzir regressão (54, 55).

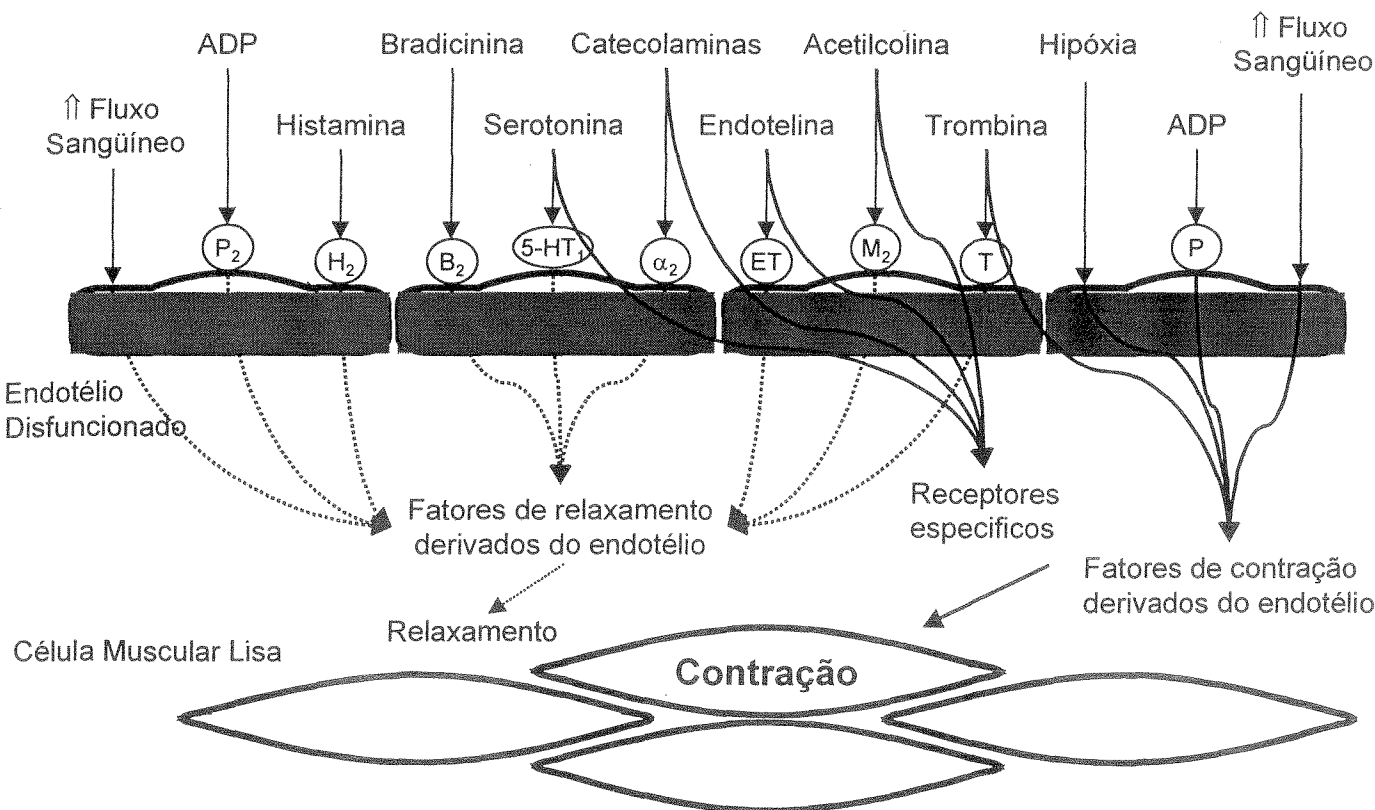


Figura 2.2: Diagrama descrevendo as ações de vários efetores no endotélio disfuncionado. Quando disfunção endotelial está presente, há uma redução na ação dos fatores de relaxamento derivados do endotélio, com predomínio de vasoconstrição. (H_2 receptor histamínico, α_2 : receptor α -adrenérgico; 5-HT: receptor serotoninérgico; B: receptor da bradicinina; M: receptor muscarínico; P: receptor purinérgico; ET: receptor da endotelina; T: receptor da trombina).

A inativação do óxido nítrico endotelial por radicais livres derivados de oxigênio pode ser um importante fator no desenvolvimento da disfunção endotelial (56). Estudos experimentais sugerem que os agentes antioxidantes possam restabelecer a função endotelial (57,58). A vitamina C, um potente antioxidante *in vivo* e *in vitro* (59) que inibe a peroxidação de lipídeos mediadas pelo ânion superóxido (60),

melhorara a função endotelial da artéria braquial em pacientes com doença arterial coronária (61), com diabete melito (62) e em tabagistas (63).

Um aumento nos inibidores endógenos da síntese de óxido nítrico também pode estar envolvido na gênese da disfunção endotelial. Especificamente na insuficiência renal, os níveis plasmáticos de análogos metilados da arginina (dimetilarginina assimétrica) estão significativamente aumentados, podendo competir com a L-arginina como substrato na síntese de óxido nítrico (64). Mais recentemente, foi demonstrado que a dimetilarginina assimétrica está elevada em indivíduos jovens com hipercolesterolemia e que este aumento é associado à disfunção vasomotora endotélio-dependente (65).

Outro mecanismo de disfunção vasomotora endotelial que tem sido freqüentemente observado é o aumento de endotelina-1. Concentrações plasmáticas elevadas de endotelina-1 têm sido relatadas no infarto do miocárdio, no choque cardiogênico, na angina instável, na doença arterial coronária em geral, na insuficiência cardíaca e na hipertensão essencial (66,67). Em estados de disfunção endotelial, tais como a aterosclerose, a ação da endotelina-1, sem a oposição do óxido nítrico, tende a promover vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas vasculares (68).

Avaliação da Função Endotelial

O método mais empregado para o estudo da função endotelial em estudos clínicos têm sido a avaliação da resposta vasomotora dependente do endotélio de artérias de condução e de vasos de resistência a estímulos farmacológicos ou a

modificações no fluxo sanguíneo. O estudo do controle endotelial do tônus vascular em humanos é limitado por vários fatores que necessitam ser considerado para adequada interpretação dos resultados. Estas limitações são relacionadas às intervenções farmacológicas e físicas utilizadas para estimular os mecanismos vasomotores dependentes do endotélio e aos métodos utilizados para mensurar a resposta vascular secundária a estas intervenções.

A maioria dos estudos clínicos tem avaliado a função endotelial em leitos circulatórios regionais, principalmente no antebraço ou na circulação coronária. A administração de agentes endotélio-dependentes a compartimentos circulatórios regionais permite que doses relativamente baixas sejam utilizadas. Com isso, espera-se que o agente administrado não desencadeie respostas reflexas sistêmicas. A ausência de modificações na pressão sanguínea e na frequência cardíaca são, normalmente, utilizadas como evidência de um efeito puramente regional. Contudo, efeitos sistêmicos discretos, com conseqüente ativação reflexa, podem ocorrer sem serem detectados. Além disso, a padronização das concentrações administradas *in vivo* é difícil de ser obtida, particularmente pela variabilidade do fluxo sanguíneo em condições basais e em resposta à administração do agente vasodilatador endotélio-dependente (69). Em relação à acetilcolina, sua concentração *in vivo* também é afetada pela ação de pseudocolinesterases circulantes. Finalmente, o papel fisiológico destes vários agentes ainda não foi claramente determinado.

A acetilcolina é o agente mais utilizado no estudo da função endotelial em estudos clínicos. Quando infundida na circulação coronária ou braquial de indivíduos normais, a acetilcolina causa vasodilatação e aumento no fluxo sanguíneo dose-

dependente. A vasodilatação é parcialmente mediada por este aumento no fluxo sanguíneo, que, por sua vez, é causado pela dilatação de arteríolas com redução na resistência periférica. A ação direta da acetilcolina nas células endoteliais, associada ao aumento de fluxo, leva à produção e liberação de óxido nítrico, causando redução do tônus muscular e vasodilatação. Em oposição a isto, a acetilcolina causa vasoconstrição pelo seu efeito direto nos receptores muscarínicos das células musculares lisas vasculares (70,71). Quando existe disfunção endotelial, há um desequilíbrio entre as ações dilatadora (mediada pelo endotélio) e constritora (mediada pelas células musculares lisas) da acetilcolina, predominando a vasoconstrição.

Outros agentes vasodilatadores endotélio-dependentes utilizados para a avaliação da função endotelial são a serotonina, a bradicinina e a substância P. Enquanto que a bradicinina e a substância P não possuem ação vasoconstritora, causando apenas vasodilatação endotélio-dependente, a serotonina possui um efeito duplo, similar a acetilcolina, determinando vasoconstrição por estímulo direto no músculo liso vascular. A atividade mental e a exposição ao frio, também podem ser utilizadas para o estudo da função vasomotora endotelial. Estes estímulos estão associadas a liberação de catecolaminas, que têm a sua ação vasoconstritora acentuada na presença de disfunção endotelial (36, 37).

Freqüentemente, a resposta vasomotora aos agentes dependentes do endotélio é comparada à resposta a vasodilatadores que atuam independentemente do endotélio, tais como o nitroprussiato de sódio ou a nitroglicerina. Estas substâncias agem por meio de uma via comum que é a produção ou liberação intracelular de óxido nítrico, levando à ativação da guanilatociclase e relaxamento da célula muscular lisa (72, 73).

A vasodilatação de artérias de condutância em resposta a aumentos no fluxo sanguíneo também tem sido utilizada como um indicador da função endotelial. Um dos estímulos mais comumente utilizados para aumentar o fluxo sanguíneo é a hiperemia reativa, que é determinada pela isquemia induzida pela interrupção temporária do fluxo sanguíneo arterial, ocasionando vasodilatação metabólica da microcirculação e de arteríolas. Aumentos de fluxo similares podem ser obtidos com a administração de adenosina ou de dipiridamol, que causam vasodilatação arteriolar. O exercício físico e a taquicardia induzida por marcapasso também podem ser utilizados para obtenção de aumentos de fluxo sanguíneo. A taquicardia induzida por marcapasso produz um aumento de fluxo de menor intensidade, associado à vasodilatação metabólica. O exercício físico causa uma complexa resposta fisiológica, que envolve a vasodilatação metabólica e liberação sistêmicas de catecolaminas. A utilização da resposta a um aumento de fluxo sanguíneo como índice de função endotelial é validada pela demonstração experimental de que a vasodilatação fluxo-dependente de artérias de condutância é determinada pela liberação de óxido nítrico a partir do endotélio (74-77).

A quantificação da vasodilatação ou vasoconstrição do conduto arterial em resposta a um estímulo pode ser realizada por técnicas radiográficas, ecográficas ou por pletismografia. A determinação da resposta das artérias coronárias de condutância a agentes endotélio-dependentes é obtida por injeção de contraste radiológico e medida do diâmetro coronário através da análise quantitativa dos angiogramas, preferentemente utilizando-se sistemas computadorizados. O estudo das variações de fluxo sanguíneo coronário secundárias a resposta endotélio-dependente da microcirculação requer a utilização de métodos invasivos como o Doppler intracoronário. Espasmo vascular, em

resposta à instrumentação coronária pelo cateter ou guia Doppler, pode dificultar a interpretação destas medidas.

Na circulação periférica, a função endotelial pode ser avaliada não invasivamente através resposta vasomotora da artéria braquial ou da microcirculação do antebraço, utilizando-se ultra-som ou pletismografia, respectivamente. As respostas da microcirculação periférica também podem ser avaliadas, de modo não invasivo, pela medida de fluxo sanguíneo pelo Doppler vascular. Poucos autores têm utilizado outros leitos vasculares como o membro inferior/artéria femoral para o estudo da função endotelial.

Além do relaxamento dependente do endotélio, outras funções endoteliais que podem ser investigadas em seres humanos incluem o estado do sistema vascular renina-angiotensina (78,79), as propriedades adesivas do endotélio relacionadas com leucócitos e plaquetas (80,81) e os fatores envolvidos na homeostase da trombose e fibrinólise (82). Neste sentido, os níveis circulantes de endotelina, bradicinina, prostaglandinas, fator von Willebrand, ativador do plasminogênio tecidual e das formas solúveis de moléculas de adesão da superfície celular, como selectina-E, selectina-P, ICAM-1 e VCAM-1, são potenciais indicadores de função endotelial. Entretanto o papel funcional de algumas dessas substâncias em seres humanos ainda não foi esclarecido. Além disso, o impacto que diferentes situações clínicas possuem nos níveis destas substâncias e na concentração das formas solúveis das moléculas de adesão permanece indeterminado.

Implicações Clínicas

As implicações da disfunção endotelial na doença cardiovascular não são totalmente entendidas. Contudo, há evidências convincentes de que a lesão e conseqüente disfunção do endotélio desempenha um papel patogênico no desenvolvimento inicial da aterosclerose (7 - 9) e, mais tardiamente, nas síndromes coronarianas instáveis (10). Disfunção endotelial têm sido associada a diversos fatores de risco para a doença aterosclerótica (11), incluindo a presença de hipercolesterolemia (12), tabagismo (13), hipertensão arterial (14), diabetes melito (15), história familiar de doença coronariana prematura (16), hiper-homocisteinemia (17) e envelhecimento (18).

Assim como a aterosclerose, a disfunção endotelial é precocemente evidenciada em bifurcações de artérias coronárias humanas (19). Quando aterosclerose coronariana está presente, a intensidade da disfunção endotelial está diretamente relacionada com a gravidade do comprometimento aterosclerótico (5). Em primatas, o desenvolvimento de aterosclerose induzida por dieta é precedido pela disfunção endotelial, enquanto a regressão da placa aterosclerótica é associada à normalização das respostas à acetilcolina (20). Também foi demonstrado que a disfunção endotelial precede o desenvolvimento de coronariopatia obstrutiva em pacientes receptores de transplante cardíaco (21). Até o momento, não há estudos longitudinais demonstrando que outros grupos de pacientes com disfunção endotelial desenvolverão aterosclerose.

Uma função fisiológica fundamental do endotélio é facilitar o fluxo sangüíneo, provendo uma superfície antitrombótica que inibe a adesão plaquetária e a formação de trombos. Como discutimos, a célula endotelial lesada ou ativada pode perder esta atividade anticoagulante e/ou adquirir propriedades pró-coagulantes. A pesar de que o

papel do endotélio na patogênese da trombose *in vivo* não ter sido claramente documentado, as evidências disponíveis apontam para a disfunção endotelial com fundamental no desenvolvimento de diversos distúrbios trombóticos, especialmente nas síndromes isquêmicas agudas

É provável que a disfunção endotelial, além estar envolvida no desenvolvimento da aterosclerose e de eventos isquêmicos agudos, potencialize o desenvolvimento de isquemia miocárdica mesmo na ausência de lesões ateroscleróticas obstrutivas, por impedir um aumento apropriado de fluxo sanguíneo em situações de estresse. Até 40% da resistência coronariana total reside em artérias de pequeno diâmetro (110 a 400 μ m) que não estão sob controle metabólico (83). Estas pequenas artérias podem influenciar importantemente a resistência coronária (84) e, conseqüentemente, a velocidade máxima de fluxo sanguíneo. Em condições fisiológicas o tônus vasomotor destas pequenas artérias está indiretamente acoplado as necessidades metabólicas, através da vasodilatação mediada pelo fluxo. Isto é, quando a vasodilatação das arteríolas causa um aumento no fluxo sanguíneo, o aumento resultante na força de cisalhamento aumentará a produção de óxido nítrico e dilatará as pequenas artérias (83, 85) levando a uma redução adicional na resistência periférica e aumento no fluxo sanguíneo. Quando disfunção endotelial está presente, a dilatação mediado pelo fluxo pode ser reduzida ou perdida em artérias de pequeno diâmetro, ocasionando aumentos subtotais no fluxo sanguíneo.

Em diversos estudos clínicos, a infusão intracoronária de vasodilatadores endotélio-dependentes tem sido associada ao desenvolvimento de angina em alguns pacientes com disfunção endotelial. Recentemente, Hasdai e colaboradores

demonstraram a presença de defeitos de perfusão detectados por ^{99m}Tc sestamibi, em pacientes que apresentaram redução no fluxo coronário em resposta à acetilcolina intracoronária (86). Entretanto, a relevância clínica destes achados é discutível, uma vez que, neste estudo, o radiofármaco foi administrado durante a infusão de acetilcolina. Em outro estudo, onde comparamos a resposta vasomotora a acetilcolina com os resultados de cintilografia miocárdica de esforço ou ecografia de estresse com dobutamina em pacientes livres de estenoses coronarianas significativas, não encontramos uma associação entre o desenvolvimento de vasoconstrição coronária e a presença de isquemia reversível (87).

A possível inabilidade em aumentar adequadamente o fluxo sangüíneo, associada à disfunção endotelial, tem sido imputada como um dos possível mecanismo de desenvolvimento de angina em pacientes com angina microvascular, ou síndrome X coronariana. Neste grupo de pacientes, demonstramos que a disfunção endotelial progride com o avançar da idade (88). Da mesma forma, a disfunção endotelial parece desempenhar um papel patogênico em diversas outras situações clínicas como na hipertensão arterial sistêmica e pulmonar, na insuficiência cardíaca e no choque séptico.

Estudos clínicos recentes demonstraram melhora da função endotelial com o uso de drogas que reconhecidamente reduzem a incidência de eventos cardiovasculares, tais como os inibidores da enzima de conversão (22), os hipolipemiantes orais (23, 24) e o ácido acetilsalicílico (25). Pelo menos parte do benefício clínico observado com estas intervenções terapêuticas provavelmente é relacionado à reversão da disfunção

endotelial. Estes estudos atestam o papel que a função endotelial desempenha na manutenção da homeostase vascular.

Em contrapartida, algumas intervenções clínicas podem estar associadas a efeitos adversos sobre o endotélio vascular. A administração continuada de nitratos orgânicos tem sido associada a modificações bioquímicas específicas na vasculatura que, por aumentar o estresse oxidativo, podem levar à disfunção endotelial. Por sua vez, as intervenções coronárias percutâneas determinam intensa lesão mecânica e inflamação crônica da parede vascular, que podem levar a alterações na função endotelial. A seguir, através de dois estudos clínicos, avaliaremos os efeitos destas intervenções sobre a função vasomotora endotélio-dependente em artérias coronárias.

Objetivos

III. Objetivos

Os objetivos desta tese foram os seguintes:

- 1) Investigar se a terapia com nitroglicerina levaria a uma resposta anormal das artérias coronarianas ao vasodilatador dependente do endotélio, acetilcolina.
- 2) Comparar as respostas vasomotoras à acetilcolina de artérias coronárias não reestenóticas, previamente submetidas a uma intervenção coronária percutânea prévia (angioplastia por cateter balão, aterectomia direcionada, ou implante de endopróteses coronarianas).

Efeitos da Terapia com Nitroglicerina
na Função Vasomotora Endotelial

IV. Efeitos da Terapia com Nitroglicerina na Função Vasomotora Endotelial

Introdução

Os nitratos orgânicos são importantes agentes na terapia da doença arterial coronariana e da insuficiência cardíaca. Administrados agudamente, os nitratos têm potentes efeitos hemodinâmicos e terapêuticos que resultam da vasodilatação dos leitos vasculares venoso e arterial. A maior limitação do uso dos nitratos é o desenvolvimento de tolerância, com perda da efetividade durante a terapia continuada. Apesar de que várias teorias concernentes ao mecanismo da tolerância tenham sido desenvolvidos, a sua causa permanece incerta (89,90). Em adição a esta incerteza, os nitratos orgânicos têm recentemente sido associados com uma sensibilidade vascular aumentada a vasoconstritores (91,92). O mecanismo desta hipersensibilidade permanece desconhecido, ainda que modelos animais tenham demonstrado que a exposição à nitroglicerina é associada com um aumento no conteúdo vascular de endotelina -1 e com um aumento na produção do ânion superóxido pelo endotélio (92,93). Digno de especial atenção é o trabalho de Heitzer e colabores, demonstrando que o tratamento com nitroglicerina aumenta a resposta vasoconstritora da artéria braquial humana à fenilefrina e à angiotensina-2 (94).

Estes achados sugerem que a terapia com nitratos possa modificar a resposta vascular na circulação coronariana e aumente sua sensibilidade à vasoconstrição. Tais respostas podem estar envolvidas na gênese da tolerância ao uso continuado de nitroglicerina e poderiam prover uma explicação para os efeitos adversos que têm sido relatados, subseqüentes à retirada da terapia com nitratos (95-99). Este estudo testa a

hipótese que a terapia com nitroglicerina aumentaria a sensibilidade das coronárias epicárdicas aos efeitos vasoconstritores da acetilcolina e que estes efeitos seriam exagerados, seguindo a interrupção da administração de nitroglicerina.

Métodos

População. Pacientes entre 35 e 75 anos de idade, encaminhados para angiografia coronária diagnóstica, participaram deste estudo. Os critérios de exclusão clínicos eram: hipertensão arterial sistêmica não controlada; insuficiência cardíaca congestiva sintomática ou disfunção ventricular esquerda grave; história de espasmo coronariano; infarto do miocárdio ou angina instável dentro de 30 dias da randomização; bloqueio atrioventricular de 2º ou 3º grau; revascularização coronária transluminal nos últimos 6 meses; qualquer revascularização prévia da artéria descendente anterior (DA); cirurgia de revascularização miocárdica; diabetes melito insulino-dependente e disfunção renal ou hepática clinicamente significativa.

Trinta e sete pacientes foram inicialmente arrolados. Um paciente retirou o consentimento previamente ao angiograma e um segundo foi excluído devido à anemia recentemente diagnosticada. No momento da angiografia coronária, vinte pacientes que apresentavam estenose do tronco da artéria coronariana esquerda maior do que 25% ou uma estenose maior do que 40% na DA foram excluídos por terem sido considerados de alto risco para a infusão de acetilcolina intracoronária, baseado na gravidade da doença arterial coronariana. Portanto, quinze pacientes completaram o protocolo.

Fatores de Risco para Disfunção Endotelial. A presença e o número total de fatores de risco conhecidos para disfunção endotelial foram avaliados em cada paciente. Estes fatores incluíam idade superior a 45 anos, sexo masculino, história de hipertensão, diabetes melito não insulino-dependente, hábito de fumar, história familiar

de doença arterial coronariana e colesterol total maior que 200 mg/dl. As concentrações dos lipídios séricos foram avaliadas em jejum no momento da angiografia coronária.

Protocolo de Estudo. Preparações transdérmicas de placebo não puderam ser obtidas. Portanto, os pacientes foram randomizados para receber nitroglicerina transdérmica contínua (Ciba-Geigy, Mississauga, Ontário, Canadá), 0,6 mg/h ou nenhuma terapia. O investigador permaneceu cego para a randomização. O adesivo de nitroglicerina era aplicado a cada manhã e substituído a cada 24 h por cinco dias. Pacientes que estavam sob terapia com nitratos de longa ação previamente à randomização tiveram esses medicamentos suspensos por pelo menos uma semana antes do dia do estudo. Outros vasodilatadores foram suspensos por 48 h antes do angiograma. Beta-bloqueadores foram suspensos por 24 h. Era permitido aos pacientes usar nitroglicerina sublingual se necessário para angina, porém nenhum estudo foi executado dentro de 6 h após o uso de nitratos. Suplementos de vitaminas C e E foram suspensos por 7 dias antes do estudo.

A cineangiocoronariografia diagnóstica foi executada na manhã do quinto dia, aproximadamente às 9 h. Naqueles pacientes randomizados para nitroglicerina, a preparação transdérmica foi deixada no local durante o estudo da manhã. A angiografia coronária foi executada com cateteres diagnósticos 7 Fr, usando a técnica de Judkins. Uma vez demonstrado que os pacientes eram angiograficamente adequados para o estudo, o ângulo radiológico que melhor demonstrasse os segmentos proximal e médio da artéria DA foi selecionado para cada paciente e utilizado para todos os angiogramas subseqüentes deste estudo. Frequência cardíaca, pressão arterial e eletrocardiograma foram monitorizados continuamente.

Os angiogramas coronarianos para análise quantitativa foram executados no estado controle e após infusões seriadas de acetilcolina. As soluções controle e acetilcolina foram infundidas ao fluxo de 1,25 ml/min durante 3 min no tronco da artéria coronária esquerda, via cateter diagnóstico, na seguinte seqüência: 1) controle: solução de glicose a 5% em água, o veículo para infusão de acetilcolina; 2) três infusões de acetilcolina nas concentrações progressivas de 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} molar, visando atingir concentrações intracoronárias de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} molar, respectivamente, assumindo-se um fluxo na coronária esquerda de 125 ml/min; 3) recontrole: solução de glicose a 5% em água. A angiografia coronária era repetida imediatamente após a finalização de cada infusão. Entre cada angiograma e o início da infusão subsequente, aguardava-se um período de 3 min para que eventuais modificações no tônus coronariano induzidas pelo meio de contraste radiológico fossem compensadas.

Imediatamente após a complementação do estudo da manhã, o adesivo de nitroglicerina era removido dos pacientes do grupo que receberam o tratamento ativo. Três horas após, todos os pacientes retornavam para o laboratório de cateterismo e eram submetidos a um protocolo de infusão intracoronária, idêntico ao da manhã, usando a mesma projeção e técnica radiográfica que havia sido utilizada. Após a angiografia de recontrole, uma dose de 100 µg de nitroglicerina era administrada como um *bolus* intracoronário e um angiograma final era executado.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Experimentação em Seres Humanos na Universidade de Toronto e consentimento informado foi obtido por escrito de todos os pacientes (vide apêndice).

Medidas Quantitativas. Os angiogramas da artéria coronária esquerda para o estudo foram executados através da injeção por bomba (Medrad, Phitisburg, PA, USA) de 9 a 12 ml (3-4 ml/s) de meio de contraste não iônico. A quantificação das dimensões coronarianas foi executada usando um sistema de detecção de bordas automatizadas (CMS, Newman, Holanda) utilizando técnica previamente descrita (100). Um quadro cineangiográfico de cada angiograma era selecionado no final da diástole ventricular pelo investigador, que era mantido cego para os grupos em estudo. O segmento mais longo, claramente visualizado, da porção proximal e média da DA era selecionado. No grupo nitroglicerina, o comprimento médio do segmento analisado foi de $4,3 \pm 0,6$ cm, enquanto no grupo controle o comprimento médio do segmento analisado foi $4,4 \pm 0,4$ cm. Os limites proximais e distais dos segmentos selecionados eram definidos por pontos de referência anatômica, para garantir a consistência da análise entre os angiogramas de cada paciente. O diâmetro luminal médio do segmento da DA em estudo foi determinado em cada angiograma. O cateter diagnóstico 7 Fr cheio com meio de contraste era filmado antes de cada estudo e usado para calibração. Todos os filmes foram analisados pelo mesmo investigador, cego para a randomização dos grupos. As medidas do diâmetro luminal coronariano executadas com este sistema apresentam uma variabilidade interobservador de 0,09 mm e intra-observador de 0,01 mm em análises repetidas do mesmo quadro cineangiográfico (100).

Análise Estatística. As características clínicas da população no momento da randomização foram comparadas através do teste t de Student não pareado para as variáveis contínuas. O teste exato de Fischer foi usado para comparar variáveis binárias. As modificações no diâmetro médio luminal da DA dos valores controle para cada dose de acetilcolina foram comparadas usando análise multivariada de variância com contrastes apropriados (Proc GLM, MAMOVA, SAS versão 6.11, SAS, Cary, Carolina do Norte, USA). Esse modelo permitiu a análise das diferenças da resposta à acetilcolina entre grupos, para os estudos da manhã e da tarde. Além disso, as diferenças entre grupos na resposta global à acetilcolina durante a manhã versus a resposta da tarde pôde também ser comparada. Finalmente, o procedimento também permitiu comparações univariadas entre os grupos na linha de base e em todos os pontos de estudo subseqüentes. As modificações no diâmetro luminal coronariano dentro de um mesmo grupo foram comparadas usando o teste t de Student pareado. Todas as comparações foram feitas para as modificações nos valores absolutos, assim como para as modificações percentuais a partir da linha de base. Um valor de $P < 0,05$ bi-caudal foi considerado significativa. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

Resultados

Características dos Grupos do Estudo. Oito pacientes foram randomizados para terapia com nitroglicerina (5 homens, idade 56 ± 4 anos) e 7 para o grupo controle (5 homens; idade 62 ± 3 anos). Não havia diferença significativa entre os grupos em termos fatores de risco conhecidos para disfunção endotelial (tabela 4.1). Todos os pacientes do grupo nitroglicerina e 6 pacientes no grupo controle possuíam aterosclerose coronária, com mínimas irregularidades na artéria descendente anterior. Por angiografia quantitativa, a estenose média da descendente anterior foi $8,8 \pm 2,8\%$ no grupo nitroglicerina e $12,9 \pm 6,0\%$ no grupo controle. Os grupos também foram similares em termos de medicações concomitantes no momento da randomização, com um paciente em cada grupo recebendo inibidores da enzima de conversão da angiotensina, suplementação com vitamina E e terapia de reposição de estrógenos (tabela 4.2). A frequência cardíaca e a pressão arterial basais foram similares nos dois grupos, tanto no estudo da manhã como no estudo da tarde (tabela 4.3).

Respostas Clínicas à Infusão de Acetilcolina. No estudo da manhã, 2 pacientes no grupo nitroglicerina desenvolveram angina, associado à vasoconstrição coronária moderada, durante a infusão da concentração máxima de acetilcolina. Em ambos os casos, a angina desapareceu com a interrupção da infusão, não sendo necessária a administração de nitroglicerina intracoronária. No estudo da tarde, após a retirada do adesivo de nitroglicerina, os mesmos 2 pacientes e um outro paciente desenvolveram angina em resposta à infusão máxima de acetilcolina no grupo nitroglicerina. Nestes 3 pacientes, a angina foi intensa, não melhorou com a interrupção da infusão de acetilcolina, sendo necessário a administração de nitroglicerina intracoronária. No grupo controle, não foi observada dor torácica durante as infusões de acetilcolina.

Tabela 4.1: Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

Característica	Grupo Nitroglicerina (n = 8)	Grupo Controle (n = 7)	P
Idade (anos)	56 ± 4	62 ± 3	0,22
Sexo (M/F)	5 / 3	5 / 2	1,0
História de hipertensão (n)	2	3	0,60
Diabete não insulino-dependente (n)	3	2	1,0
História familiar de DAC (n)	2	2	1,0
Colesterol total > 200 mg/dl (n)	3	4	0,62
História de tabagismo (n)			
Atual	1	1	1,0
Prévio	3	3	1,0
Número total de fatores de risco *	2,8 ± 0,5	3,3 ± 0,4	0,55
História de IM (n)	2	1	1,0
História de angioplastia coronária (n)	1	1	1,0
Colesterol sérico (mg/dl)			
Total	200,8 ± 9,65	208,5 ± 20,1	0,83
HDL	42,5 ± 3,9	46,3 ± 7,7	0,82
LDL	138,9 ± 11,6	127,4 ± 15,4	0,56
Triglicerídeos (mg/dl)	84,8 ± 14,1	134,2 ± 21,2	0,07

Os valores apresentados são média ± erro padrão ou número de pacientes. DAC denota doença arterial coronariana; HDL, lipoproteína de alta densidade; IM, infarto do miocárdio; LDL, lipoproteína de baixa densidade. * Fatores de risco incluem: idade > 45 anos, sexo masculino, história de hipertensão, diabete melito não insulino-dependente, história familiar de DAC, colesterol total > 200 mg/dl, tabagismo atual.

Tabela 4.2: Frequência cardíaca e pressão arterial nos grupo estudados

Característica	Grupo Nitroglicerina	Grupo Controle	P
Ácido acetilsalicílico	5	5	1,0
Inibidores da ECA	1	1	1,0
Reposição de estrógenos	1	1	1,0
Vitaminas C ou E	1	1	1,0
Hipolipemiantes orais	4	1	0,28

Tabela 4.3: Frequência cardíaca e pressão arterial nos grupo estudados

Característica	Grupo Nitroglicerina	Grupo Controle	P
<i>Estudo da manhã</i>			
Frequência cardíaca (bat./min)	80,0 ± 1,1	76,6 ± 3,54	0,34
Pressão arterial (mmHg)			
Sistólica	153 ± 8,1	159,1 ± 9,2	0,63
Diastólica	79,9 ± 1,2	75,7 ± 3,7	0,28
Média	104,2 ± 3,0	103,5 ± 4,9	0,90
<i>Estudo da tarde</i>			
Frequência cardíaca (bat./min)	85,0 ± 2,5	75,7 ± 7,7	0,25
Pressão arterial (mmHg)			
Sistólica	158,5 ± 10,2	161,0 ± 8,8	0,86
Diastólica	87,3 ± 2,7	77,4 ± 4,6	0,08
Média	111,0 ± 4,2	105,3 ± 5,2	0,41

Resposta Coronária à Acetilcolina. Durante o estudo da manhã, não houve diferença significativa entre os valores de diâmetro da DA após a infusão da solução controle entre os grupos nitroglicerina e controle ($2,35 \pm 0,14$ mm versus $2,21 \pm 0,13$ mm; $P = \text{NS}$). No grupo controle, não houve modificação significativa no diâmetro luminal médio da DA durante a infusão de acetilcolina. Em contraste, nos pacientes recebendo nitroglicerina transdérmica, houve uma diminuição no diâmetro luminal altamente significativa com a administração da dose máxima de acetilcolina ($2,35 \pm 0,14$ mm versus $1,89 \pm 0,15$ mm; $P < 0,01$) (figura 4.1). Esta diminuição no diâmetro luminal médio da DA foi significativamente diferente que a modificação observada no grupo controle ($P < 0,01$). Resultados similares foram observados quando as respostas foram expressas em percentagem (figura 4.2).

Na tarde, no grupo nitroglicerina, 3 horas após a remoção do adesivo transdérmico, o diâmetro controle da DA era significativamente menor que o diâmetro controle na manhã ($2,35 \pm 0,14$ mm versus $2,03 \pm 0,09$ mm; $P < 0,01$). No grupo que não recebeu nitroglicerina, não houve modificação no diâmetro da DA entre os dois períodos controle. No estudo tarde, novamente, não houve modificação significativa no diâmetro da DA em resposta à administração de acetilcolina intracoronária no grupo controle. No grupo nitroglicerina, três horas após a remoção do adesivo transdérmico, houve uma diminuição altamente significativa no diâmetro da DA em resposta à acetilcolina, nas concentrações 10^{-5} e 10^{-4} molar ($P < 0,05$ versus controle). Esta diminuição no diâmetro da DA foi significativamente diferente da observada no grupo controle ($P < 0,01$), (figura 4.1). Novamente, resultados similares foram observados quando as respostas foram expressas como modificação percentual (figura 4.2). No grupo nitroglicerina, o diâmetro da DA após a administração da dose máxima de

acetilcolina (10^{-4} molar) foi significativamente menor na tarde do que na manhã ($1,54 \pm 0,13$ mm versus $1,89 \pm 0,15$ mm; $P < 0,01$), enquanto que a resposta foi similar no grupo controle ($2,13 \pm 0,15$ mm versus $2,20 \pm 0,16$ mm; $P = 0,18$).

Quando as respostas à infusão da acetilcolina foram comparadas na manhã e na tarde, a análise entre os grupos revelou que o aumento na vasoconstrição coronária no grupo nitroglicerina foi significativamente diferente da modificação observada no grupo controle. Esta diferença foi aparente quando os dados foram analisados usando as medidas absolutas ou as modificações percentuais no diâmetro da DA ($P < 0,05$ para ambos). Em resposta ao *bolus* de nitroglicerina intracoronário, ambos os grupos apresentaram dilatação similar da DA ($14,8 \pm 2,0\%$ versus $16,2 \pm 5,4\%$; grupos nitroglicerina e controle, respectivamente; $P = \text{NS}$).

Na figura 4.3, é apresentada a variação absoluta no diâmetro luminal médio da DA em resposta às infusões intracoronárias de acetilcolina na concentração máxima para cada paciente. Na figura 4.4, é apresentada uma angiografia coronariana representativa de pacientes do grupo controle e do grupo nitroglicerina, no estado controle, durante a infusão de acetilcolina na dose máxima no estudo da manhã e no estudo da tarde.

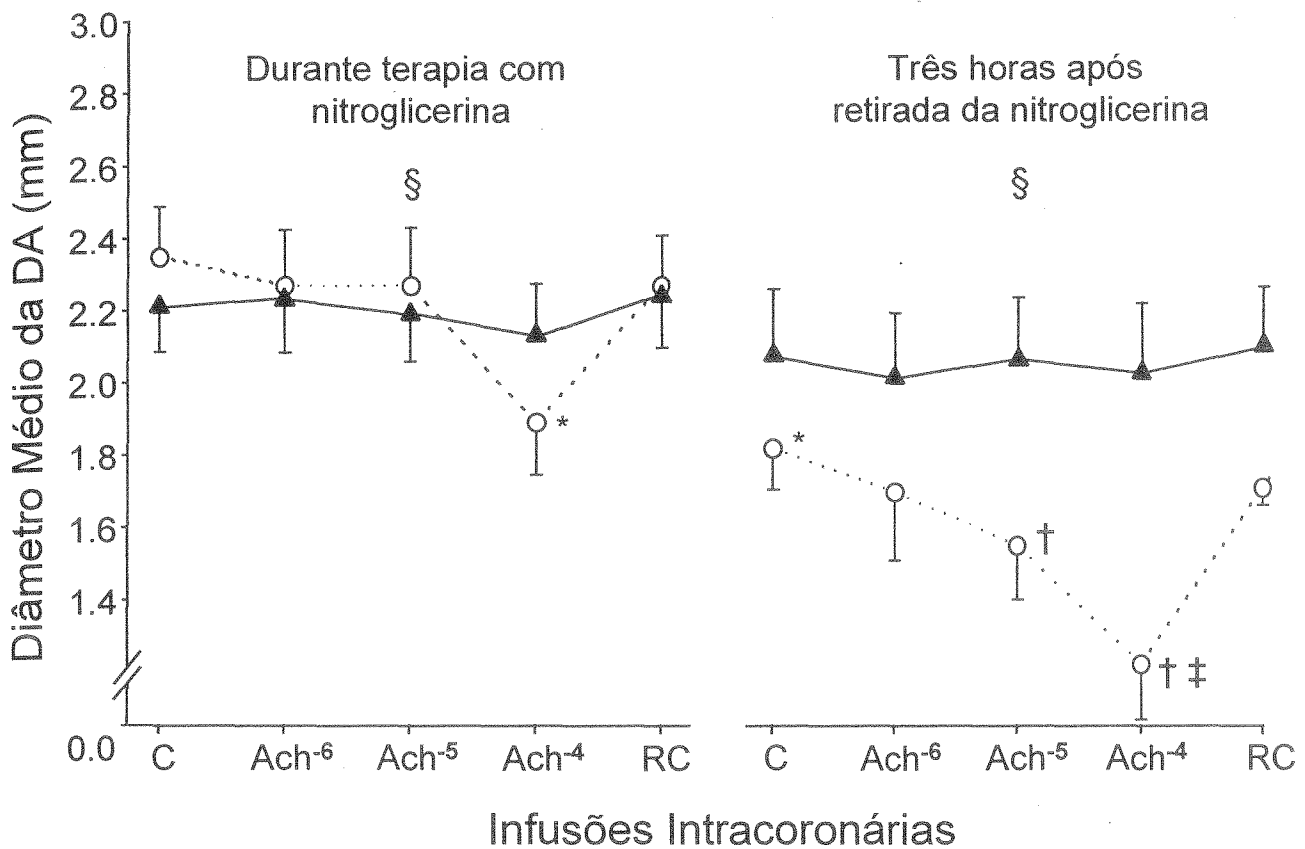


Figura 4.1: Variação absoluta no diâmetro luminal médio da artéria coronária descendente anterior (DA) durante as infusões intracoronárias. C, Ach⁻⁶, Ach⁻⁵, Ach⁻⁴ e RC indicam as infusões intracoronárias controle, de acetilcolina 10⁻⁶, 10⁻⁵ e 10⁻⁴ molar e recontrole, respectivamente. —○— = Grupo nitroglicerina. —▲— = Grupo controle. * $P < 0,01$ versus infusão controle da manhã; † $P < 0,01$ versus infusão controle da tarde; ‡ $P < 0,01$ versus Ach⁻⁴ manhã; § $P < 0,01$, grupo nitroglicerina versus grupo controle.

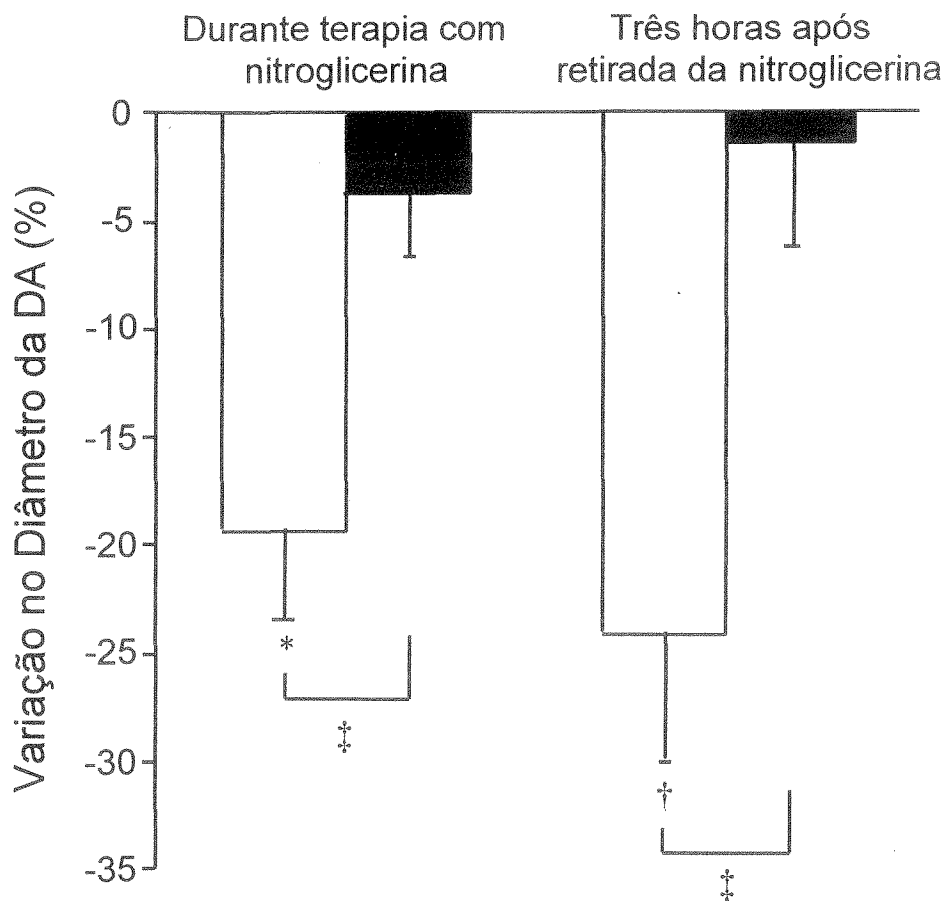


Figura 4.2: Modificação percentual no diâmetro luminal médio da artéria coronária descendente anterior (DA) a partir da linha de base, em resposta à infusão máxima de acetilcolina intracoronária (10^{-4} molar). □ = Grupo nitroglicerina. ■ = Grupo controle. * $P < 0,01$ versus controle da manhã; † $P < 0,01$ versus controle da tarde; ‡ $P < 0,05$, no grupo nitroglicerina versus grupo controle.

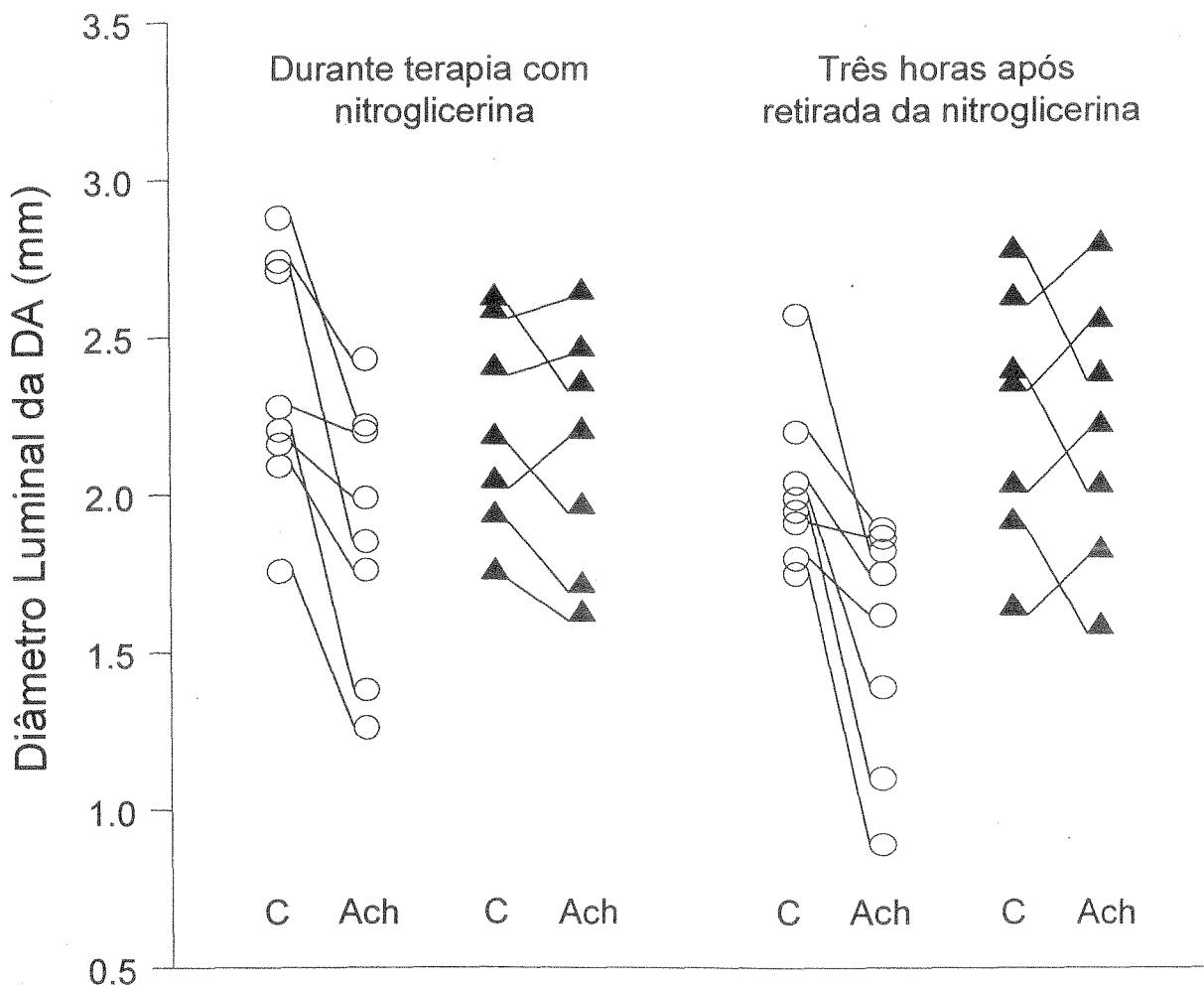


Figura 4.3: Variação absoluta no diâmetro luminal médio da descendente anterior (DA), em resposta às infusões intracoronárias para cada paciente. ○ = Grupo nitroglicerina. ▲ = Grupo controle. C e Ach indicam as infusões intracoronárias controle e de acetilcolina na concentração máxima.

Non-GTN

GTN

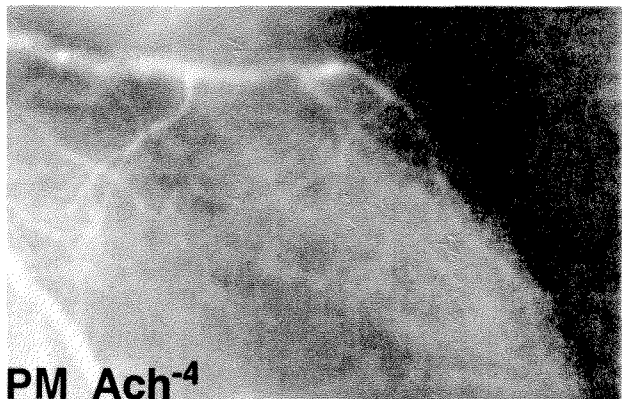
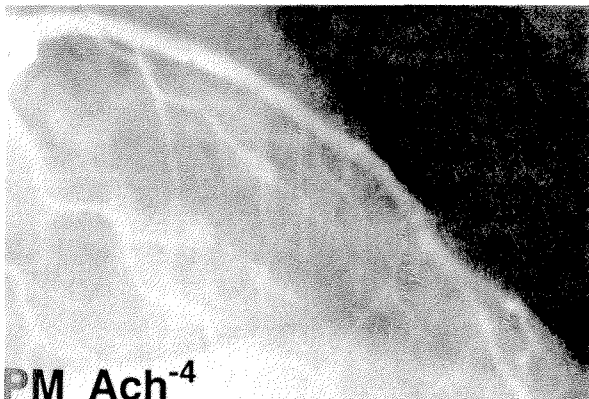
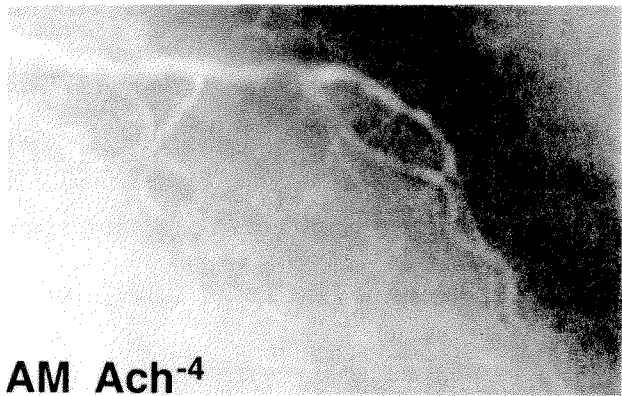
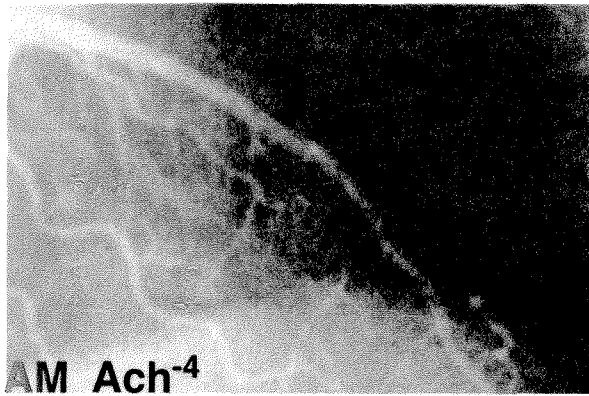
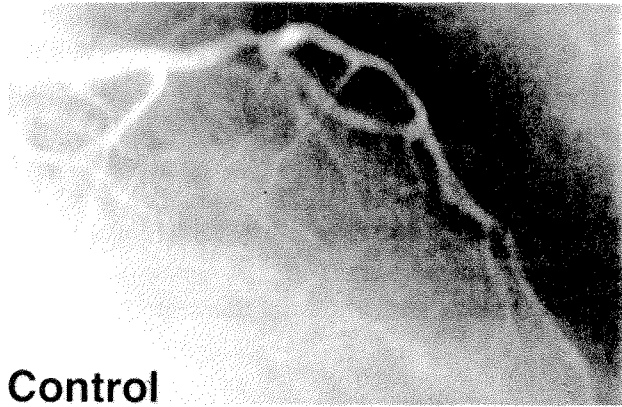
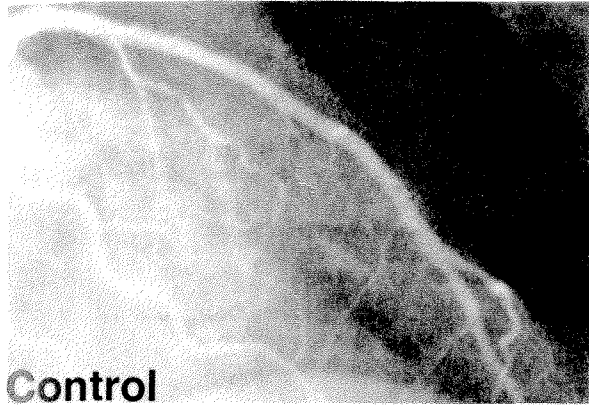


Figura 4.4: Angiografia coronariana representativa de pacientes do grupo controle (à esquerda, non-GTN) e do grupo nitroglicerina (à direita, GTN). Os angiogramas foram obtidos no momento do estudo controle da manhã (Control), durante a infusão de acetilcolina a 10^{-4} molar na manhã (AM Ach⁻⁴) e de acetilcolina 10^{-4} molar no momento do estudo da tarde (PM Ach⁻⁴).

Discussão

Este estudo demonstra que a terapia com nitroglicerina transdérmica está associada a uma vasoconstrição aumentada das coronárias epicárdicas em resposta à acetilcolina e que esta resposta foi persistente por 3 horas após a descontinuação da nitroglicerina. As respostas coronárias ao *bolus* de nitroglicerina demonstraram que vasodilatação independente do endotélio estava preservada em ambos os grupos.

Potenciais mecanismos da disfunção endotelial induzida por nitroglicerina

Vasoconstrição coronária em resposta à acetilcolina é um marcador aceito para disfunção endotelial que ocorre em várias situações patológicas (5,23,24,73,36,101-103). Uma função endotelial anormal parece estar associada com o desenvolvimento de aterosclerose e síndromes coronarianas instáveis (73). As causas da disfunção endotelial permanecem incertas, mas vários fatores de risco independentes têm sido identificados (11,73). O achado que a terapia com nitroglicerina está associada com vasoconstrição aumentada em resposta a um vasodilatador dependente do endotélio é singular e tem implicações clínicas potencialmente importantes.

O mecanismo da vasoconstrição coronária aumentada, em resposta à acetilcolina, durante a terapia com nitroglicerina não é conhecido. Esta resposta poderia resultar de um aumento na sensibilidade da célula muscular lisa vascular aos efeitos vasoconstritores da acetilcolina, ou de modificações metabólicas que reduziram a quantidade de óxido nítrico disponível em resposta à administração da acetilcolina, ou de uma combinação desses efeitos.

Recentemente, Münzel e colaboradores demonstraram que a terapia com nitroglicerina leva a um aumento na produção do ânion superóxido no endotélio da aorta de coelhos (93). Estes autores formularam a hipótese de que esta produção aumentada de radicais livres diminui os efeitos dos nitratos, através da inativação do óxido nítrico derivado da nitroglicerina. De maneira similar, este aumento na produção de radicais livres associado com a terapia com nitroglicerina poderia levar à inativação do óxido nítrico endotelial liberado pela acetilcolina. Outros estudos têm demonstrado que a exposição a nitratos aumenta a sensibilidade vascular a vários vasoconstritores (91,92). Em humanos, foi demonstrado que os vasos de resistência do antebraço são mais sensíveis aos efeitos vasoconstritores da fenilefrina e da angiotensina-2 durante a terapia com nitroglicerina intravenosa (94). Apesar de os mecanismos para esta hipersensibilidade não serem conhecidos, Münzel e colaboradores produziram evidências de que esta hipersensibilidade é mediada por uma produção autócrina aumentada de endotelina-1, um potente vasoconstritor peptídico que pode ter um papel na resposta vasomotora endotélio-dependente anormal, associada com a aterosclerose (92,104). Apesar de que não é possível concluir a respeito dos mecanismos da resposta coronária vasomotora anormal à acetilcolina demonstrada no presente estudo, os dados experimentais disponíveis consubstanciam estes achados.

Implicações clínicas

Outro importante resultado deste estudo é que a retirada da nitroglicerina pode causar um aumento adicional na sensibilidade da vasculatura coronariana aos efeitos vasoconstritores da acetilcolina. O menor diâmetro da DA durante a infusão máxima de acetilcolina à tarde foi associada com o desenvolvimento de angina no grupo nitroglicerina. Esta resposta vasomotora endotélio-dependente anormal das artérias

coronárias, subseqüente à descontinuação de nitroglicerina, pode ter um papel nas observações clínicas prévias, referentes aos efeitos da retirada de nitratos. Na indústria de munição (95,96) e em alguns estudos clínicos (97-99) a retirada da exposição ou terapia com nitratos foi associada a uma incidência aumentada de síndromes coronarianas agudas. Além disso, em pacientes com angina estável, tem sido claramente documentado que a retirada da terapia com nitroglicerina tem efeitos adversos na tolerância ao exercício que persistem por até 12 h (97,105,106). O presente estudo sugere que estas observações clínicas possam ser secundárias à modificação na função vasomotora coronariana, induzida pela terapia com nitroglicerina. Os mecanismos pelos quais a retirada de nitroglicerina pode causar um aumento adicional no efeito vasoconstritor da acetilcolina não é claro. Estes efeitos são provavelmente relacionados à persistência das modificações bioquímicas induzidas na vasculatura durante a administração de nitroglicerina que não são mais opostas pelos efeitos vasodilatadores do nitrato.

No grupo nitroglicerina, a retirada da terapia causou uma diminuição significativa no diâmetro coronariano nas medidas de controle entre a manhã e a tarde. A diminuição no diâmetro coronariano, seguindo a remoção da nitroglicerina transdérmica, poderia ter resultado de constrição rebote da artéria coronária. Alternativamente, esta constrição pode ser decorrente da simples reversão da dilatação coronariana continuada, que estaria sendo induzida de modo sustentado por nitroglicerina. Em modelos animais (107-109) e em humanos (110,111), há evidência de que o aumento inicial no diâmetro coronariano induzido por nitroglicerina é perdido durante 72 h de terapia contínua. Isto sugeriria que o grupo nitroglicerina teria

desenvolvido tolerância aos efeitos da nitroglicerina transdérmica e que a diminuição no diâmetro da DA, seguindo a remoção dos nitratos, representa um efeito rebote.

Limitações deste estudo

Potenciais limitações devem ser considerados nesta investigação. Considerando-se que as respostas endotélio-dependente à acetilcolina são relacionadas a fatores de risco (11), seria possível que as diferentes respostas entre os grupos nitroglicerina e controle fossem secundárias a desequilíbrios nas características clínicas entre os grupos. Apesar de que qualquer desequilíbrio potencial pudesse ter sido evitado usando um desenho de estudo do tipo cruzado, esta alternativa traria seus próprios problemas metodológicos (112) e seria associada a importantes limitações práticas e éticas, devido à necessidade de repetição da angiografia coronária. Contudo, como a randomização resultou em grupos similares em termos de fatores de risco, é pouco provável que as diferentes respostas encontradas sejam devidas a desequilíbrios nas características clínicas. Além disso, as respostas coronarianas à acetilcolina no grupo controle foram similares às respostas de mais de 100 pacientes com doença arterial coronariana recebendo acetilcolina intracoronária em doses similares no estudo TREND (22). Isto sugere que a vasoconstrição leve observada no grupo controle foi típica dessa população de pacientes e que a maior vasoconstrição observada no grupo nitroglicerina foi o resultado da administração do nitrato.

Nesta investigação, nitroglicerina transdérmica contínua foi utilizada e não é sabido se as respostas observadas à acetilcolina teriam sido diferentes se um regime intermitente tivesse sido utilizado. Independentemente, a terapia contínua com nitratos é utilizada em vários pacientes, particularmente no cenário clínico de angina instável.

Além disso, como há boa documentação de que regimes intermitentes estão associados com modificações na tolerância ao exercício e a eventos isquêmicos de rebote (97,98,105,106) é provável que uma terapia intermitente possa levar a modificações similares na função coronária vasomotora.

Conclusões

Nossos achados indicam que a administração continuada de doses clinicamente relevantes de nitroglicerina está associada a uma resposta vasoconstritora das artérias coronárias à acetilcolina, apesar de que a administração de baixas doses de nitroglicerina por curto período de tempo tenha demonstrado aumentar a resposta vasodilatadora à acetilcolina (113). Vários agentes farmacológicos têm demonstrado melhorar a função vasomotora endotelial (22-24,62,114,115). O presente estudo é o primeiro a demonstrar que um agente farmacológico comumente utilizado possa causar efeitos adversos na função vasomotora endotelial. Estas observações têm implicações significantes com respeito à utilização terapêutica de nitratos de longa ação.

Função Vasomotora Endotelial Após Intervenções
Coronarianas Percutâneas

V. Função Vasomotora Endotelial Após Intervenções Coronarianas Percutâneas

Introdução

Todas as intervenções coronárias percutâneas são associadas com extensa lesão da parede arterial (116). Apesar do endotélio aparentemente regenerar após lesão vascular experimental, a vasodilatação endotélio-dependente permanece alterada por um longo período após a reendotelização (117,118). De modo consistente com este fenômeno, estudos em humanos têm demonstrado uma atividade vasomotora dependente do endotélio anormal na artéria intervída vários meses após uma angioplastia coronária por cateter balão (119-121).

Os efeitos a longo prazo das diferentes intervenções coronárias percutâneas na função endotelial não são conhecidos. A gravidade da disfunção endotelial após uma intervenção coronária pode depender tanto da intensidade da injúria, como do tipo específico de intervenção percutânea. O implante de endopróteses coronárias, ou *stents*, pode causar uma lesão arterial mais grave (122,123) e uma resposta inflamatória mais intensa dentro da parede vascular do que outras modalidades de intervenções coronárias percutâneas (124,125) e estar associado com regeneração endotelial incompleta (126). Evidências experimentais recentes indicam que o implante de *stents* pode estar associado com uma disfunção endotelial mais grave e mais prolongada (127). Neste estudo, a resposta vasomotora dependente do endotélio foi avaliada vários meses após uma intervenção coronária com sucesso, incluindo pacientes submetidos a implante de *stents*, a angioplastia por cateter balão e a aterectomia direcionada.

Métodos

População. Pacientes que haviam sido submetidos a uma intervenção percutânea coronária com sucesso, para uma lesão única no segmento proximal da artéria descendente anterior (DA), pelo menos 6 meses antes, e que não apresentassem evidência clínica ou angiográfica de reestenose participaram deste estudo. Trinta e nove pacientes que haviam sido submetidos à angioplastia por cateter balão, aterectomia direcionada, ou implante de *stent* foram incluídos. Angioplastia por cateter balão foi executada através das técnicas padrões. Aterectomia direcionada foi executada usando um cateter de Simpson (Devices for Vascular Intervention, Redwood City, Califórnia, USA). Todos os pacientes que tiveram endopróteses coronárias implantadas receberam o *stent* Palmaz-Schatz de 15 ou 18 mm (Johnson & Johnson, Warren, New Jersey, USA), posicionado utilizando-se pressões elevadas ($17,8 \pm 0,6$ atm.).

Os critérios clínicos de exclusão foram os seguintes: qualquer procedimento de revascularização coronária desde a intervenção percutânea inicial; história de espasmo coronário; insuficiência cardíaca sintomática; diabetes melito insulino-dependente; e doença hepática ou renal clinicamente significativa. Os pacientes que, na angiografia diagnóstica realizada no momento do estudo, apresentavam qualquer lesão de diâmetro superior a 50% no sistema coronariano esquerdo foram também excluídos. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo comitê de experimentação em seres humanos da Universidade de Toronto e consentimento informado por escrito foi obtido de todos os pacientes (vide apêndice).

Protocolo de Estudo. Pacientes recebendo drogas vasodilatadoras ou beta-bloqueadoras tiveram estas medicações retiradas 48 h antes do estudo. O uso de

nitroglicerina sublingual era permitido se necessário para angina, mas nenhum estudo foi executado dentro de 6 h após a ingestão de nitratos. Suplementações vitamínicas foram descontinuadas por 7 dias.

Os fatores de risco para disfunção endotelial foram avaliados em todos os pacientes no momento do estudo. Estes fatores de risco incluíam: idade >45 anos, sexo masculino, diagnóstico prévio de hipertensão, diagnóstico prévio de diabetes melito não insulino-dependente, tabagismo atual, história familiar de doença coronariana prematura, e colesterol total > 200 mg/dl. Os níveis de lipídeos séricos foram avaliados em jejum no momento da realização do estudo.

Em todos os pacientes, o estudo foi executado às 9 h da manhã aproximadamente. A angiografia coronariana foi executada com cateteres diagnósticos 7 Fr, usando a técnica de Judkins. Uma vez demonstrado que os pacientes eram angiograficamente adequados para o estudo, o ângulo radiológico que melhor demonstrasse a artéria DA e circunflexa foi selecionado para cada paciente e utilizado para todos os angiogramas subseqüentes deste estudo. Frequência cardíaca, pressão arterial e eletrocardiograma foram monitorizados continuamente.

A cineangiografia quantitativa da artéria da coronária esquerda foi realizada através da injeção por bomba de 9-12 ml (3-4 ml/s) de meio de contraste não iônico no estado controle e após infusões seriadas de acetilcolina. As soluções foram infundidas a 1,25 ml/min durante 3 min na artéria coronária esquerda, via cateter diagnóstico na seguinte seqüência: 1) controle: solução de glicose 5%, o veículo para infusão de acetilcolina; 2) três infusões de doses progressivamente maiores de acetilcolina nas

concentrações de 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} molar, visando atingir concentrações intracoronárias de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} molar, respectivamente, assumindo-se um fluxo na coronária esquerda de 125 ml/min; 3) reconte: solução de glicose 5%. Entre cada angiograma e o início da infusão subsequente, aguardava-se um período de 3 min para que eventuais modificações no tônus coronariano induzidas pelo meio de contraste radiológico fossem compensadas.

Angiografia quantitativa foi executada usando um sistema de detecção de imagens automatizado (CMS, Newman, Holanda) como previamente descrito (100). As medidas do diâmetro luminal coronariano executadas com este sistema apresentam uma variabilidade interobservador de 0,09 mm e intra-observador de 0,01 mm em análises repetidas do mesmo quadro cineangiográfico. Utilizando-se o angiograma controle, foram selecionados um segmento longo, claramente visualizado, distal ao local da intervenção da descendente anterior e um segmento da artéria circunflexa, que não havia sido intervinda. Os limites proximais e distais dos segmentos selecionados eram referidos a marcas anatômicas precisas, para garantir a consistência da análise entre os angiogramas de cada paciente. O diâmetro luminal médio dos segmentos em estudo foi então mensurado em cada angiograma. O comprimento médio dos segmentos analisados foi de $25,3 \pm 1,98$ mm para a artéria descendente anterior e $18,6 \pm 1,79$ mm para circunflexa. Todos os filmes foram analisados pelo mesmo investigador, com experiência em angiografia quantitativa e cego para a intervenção previamente realizada.

Análise Estatística. As características angiográficas e clínicas da população foram comparadas utilizando-se análise de variância de entrada única, seguida pelo teste

de Student-Newman-Keuls para as variáveis contínuas, ou por análise de variância de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn para variáveis categóricas. Variáveis binárias foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Modificações no diâmetro luminal médio dos valores controle para as doses máximas de acetilcolina foram comparadas usando análise de variância não balanceada seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SAS versão 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Análise de regressão linear múltipla foi utilizada para avaliar os preditores de modificações no diâmetro luminal mínimo da DA em resposta à infusão máxima de acetilcolina. Um valor $P < 0,05$ bi-caudal foi considerado significativa. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

Resultados

Características Clínicas (tabela 5.1). Trinta e nove pacientes foram incluídos neste estudo: quinze pacientes previamente tratados com angioplastia por cateter balão, 12 previamente tratados com aterectomia direcionada e 12 com implante de *stents*. O tempo médio decorrido entre a intervenção coronária índice até a realização deste estudo foi $18,8 \pm 1,7$ meses.

Os grupos de estudo tiveram características clínicas similares. Um maior número de fumantes foi observado entre os pacientes submetidos à aterectomia ($P = 0,05$). Suplementos de vitaminas antioxidantes eram mais freqüentemente utilizados por pacientes que receberam *stents* ($P = 0,05$). Não houve diferença significativa quanto aos demais fatores de risco para disfunção endotelial entre os grupos. O escore de risco, composto pelo número total de fatores de risco para cada paciente, foi similar entre os grupos ($P = 0,44$).

Características Angiográficas (tabela 5.2). A angiografia quantitativa do segmento proximal da descendente anterior no momento da intervenção prévia foi similar nos três grupos. Imediatamente após a intervenção coronária, o grupo *stent* apresentava uma estenose residual significativamente menor ($P < 0,001$) e um ganho luminal significativamente maior ($P = 0,02$), quando comparado com outros grupos. No momento deste estudo, a porção proximal da descendente anterior tinha características angiográficas similares nos três grupos. Conforme o protocolo, nenhum paciente possuía estenose significante na descendente anterior. O percentual de estenose do segmento proximal da DA no momento do estudo foi de aproximadamente 20% nos

três grupos ($P = 0,98$). Doença arterial coronária de vaso único, comprometendo a artéria coronária direita, foi observada em dois pacientes que previamente haviam recebido *stents*, um paciente com angioplastia prévia e quatro com aterectomia prévia ($P = 0,47$).

Tabela 5.1: Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos grupos estudados.

Característica	Grupo Stent (n = 12)	Grupo Angioplastia (n = 15)	Grupo Aterectomia (n = 12)	P
Idade (anos)	56,6 ± 2,2	56,4 ± 2,0	58,7 ± 2,9	0,76
Sexo (M/F)	12/0	12/3	12/0	0,10
Hipertensão (n)	3	4	1	0,60
Diabete não insulino-dependente (n)	1	3	1	0,71
História familiar de DAC (n)	5	4	6	0,43
Colesterol total > 200 mg/dl (n)	2	3	4	0,56
Tabagismo atual (n)	2	5	8	0,05
Número total de fatores de risco	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,3	3,6 ± 0,3	0,44
Terapia medicamentosa (n)				
Vitaminas E ou C	5	2	0	0,05
Inibidores de ECA	3	1	2	0,47
Hipolipemiantes orais	6	4	3	0,43

Os valores apresentados são média ± erro padrão ou número de pacientes. Angioplastia denota angioplastia coronária por cateter balão; Aterectomia, aterectomia direcionada; DAC, doença arterial coronária; ECA, enzima conversora da angiotensina. Fatores de risco incluem: sexo masculino, idade > 45 anos, hipertensão, diabete melito não insulino-dependente, história familiar de DAC, colesterol total > 200 mg/dl e tabagismo atual.

Tabela 5.2: Angiografia quantitativa do segmento proximal da descendente anterior antes da intervenção, depois da intervenção e no momento da realização do estudo.

	Grupo Stent	Grupo Angioplastia	Grupo Aterectomia	P
<i>Antes da intervenção</i>				
Diâmetro de referência (mm)	3,11 ± 0,16	3,22 ± 0,11	3,11 ± 0,23	0,87
DLM (mm)	0,96 ± 0,13	0,98 ± 0,11	0,87 ± 0,05	0,73
Diâmetro da estenose (%)	69,1 ± 2,7	69,6 ± 3,0	72,0 ± 2,8	0,97
<i>Após a intervenção</i>				
DLM (mm)	2,85 ± 0,11	2,30 ± 0,15	2,57 ± 0,15	0,10
Diâmetro da estenose (%)	10,8 ± 2,5 *	30,0 ± 3,9	23,8 ± 3,2	< 0,001
Ganho luminal agudo (mm)	1,89 ± 0,10 †	1,17 ± 0,19	1,70 ± 0,25	0,02
<i>No momento do estudo</i>				
Diâmetro de referência (mm)	2,97 ± 0,13	2,84 ± 0,13	3,03 ± 0,21	0,70
DLM (mm)	2,38 ± 0,14	2,26 ± 0,13	2,40 ± 0,16	0,73
Diâmetro da estenose (%)	19,6 ± 3,0	20,4 ± 3,0	19,7 ± 3,3	0,98

Os valores apresentados são média ± erro padrão. Angioplastia denota angioplastia coronária por cateter balão; Aterectomia, aterectomia coronária direcionada; DLM, diâmetro luminal mínimo. * Grupo *stent* versus grupos angioplastia e aterectomia; † Grupo *stent* versus grupo angioplastia.

Respostas Clínicas à Infusão de Acetilcolina. Apenas três pacientes não toleraram a infusão de acetilcolina intracoronária na concentração 10^{-4} molar. Dois destes pacientes pertenciam ao grupo *stent* e 1 ao grupo angioplastia. Nestes pacientes, acetilcolina 10^{-5} molar causou constrição coronária grave, associada com angina de peito, que não melhorou com a interrupção da infusão de acetilcolina, sendo necessário a administração de nitroglicerina intracoronária.

Resposta Coronária à Administração de Acetilcolina (figuras 5.1, 5.2 e 5.3).

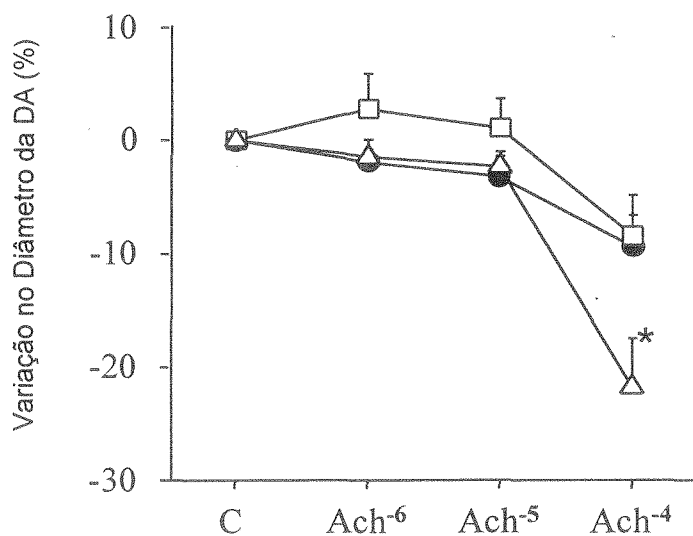
A administração de acetilcolina intracoronária determinou uma maior constrição na artéria descendente anterior distal ao sítio da intervenção em pacientes que tinham previamente recebido o implante de um *stent* ($21,8 \pm 4,3\%$), quando comparado aos pacientes que haviam sido submetidos à angioplastia ($9,5 \pm 2,8\%$) ou à aterectomia ($9,1 \pm 3,6\%$; $P = 0,02$) (figura 5.1). Todos os pacientes que haviam sido previamente submetidos a implante de *stent* apresentaram vasoconstrição da DA, enquanto os pacientes previamente submetidos à angioplastia por cateter balão e à aterectomia tiveram respostas variadas, alguns constrição e outros dilatação (figura 5.2). Em contraste, a resposta à acetilcolina da artéria circunflexa, que não havia sido intervinda, foi uma leve constrição similar em todos os grupos ($P = 0,47$).

A análise de regressão múltipla revelou que o implante prévio de um *stent* foi o único fator significativamente associado com vasoconstrição da DA à acetilcolina ($P = 0,008$). Não foram observadas relações significativas entre a resposta da DA e o ganho luminal com a intervenção, tempo decorrido desde o procedimento índice, número de fatores de risco, e resposta da artéria circunflexa (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Análise multivariada da modificação no diâmetro luminal da descendente anterior em resposta a infusão máxima de acetilcolina

Termo	Coefficiente (SEM)	P
Implante de <i>stent</i>	-9,07 (5,27)	0,008
Ganho luminal no procedimento original	-3,20 (3,23)	0,12
Tempo de seguimento	0,003 (0,008)	0,81
Número total de fatores de risco	-0,34 (2,17)	0,84
Resposta da artéria circunflexa à acetilcolina	0,19 (0,20)	0,35

A.



B.

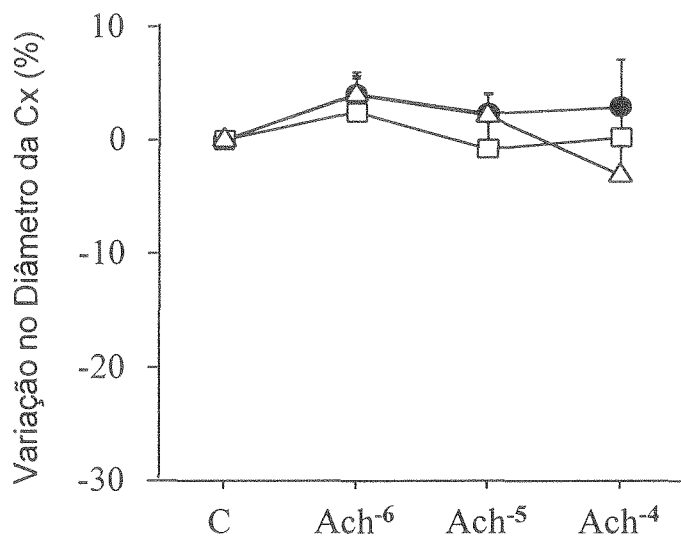


Figura 5.1: Modificação percentual no diâmetro luminal médio da artéria descendente anterior (DA) (painel A) e da artéria circunflexa (Cx) (painel B) a partir da linha de base, em resposta à infusão intracoronária de acetilcolina. * $P = 0,02$ versus angioplastia por cateter balão e aterectomia direcionada. —△— = Grupo *stent*. —●— = Grupo angioplastia por cateter balão. —□— = Grupo aterectomia direcionada.

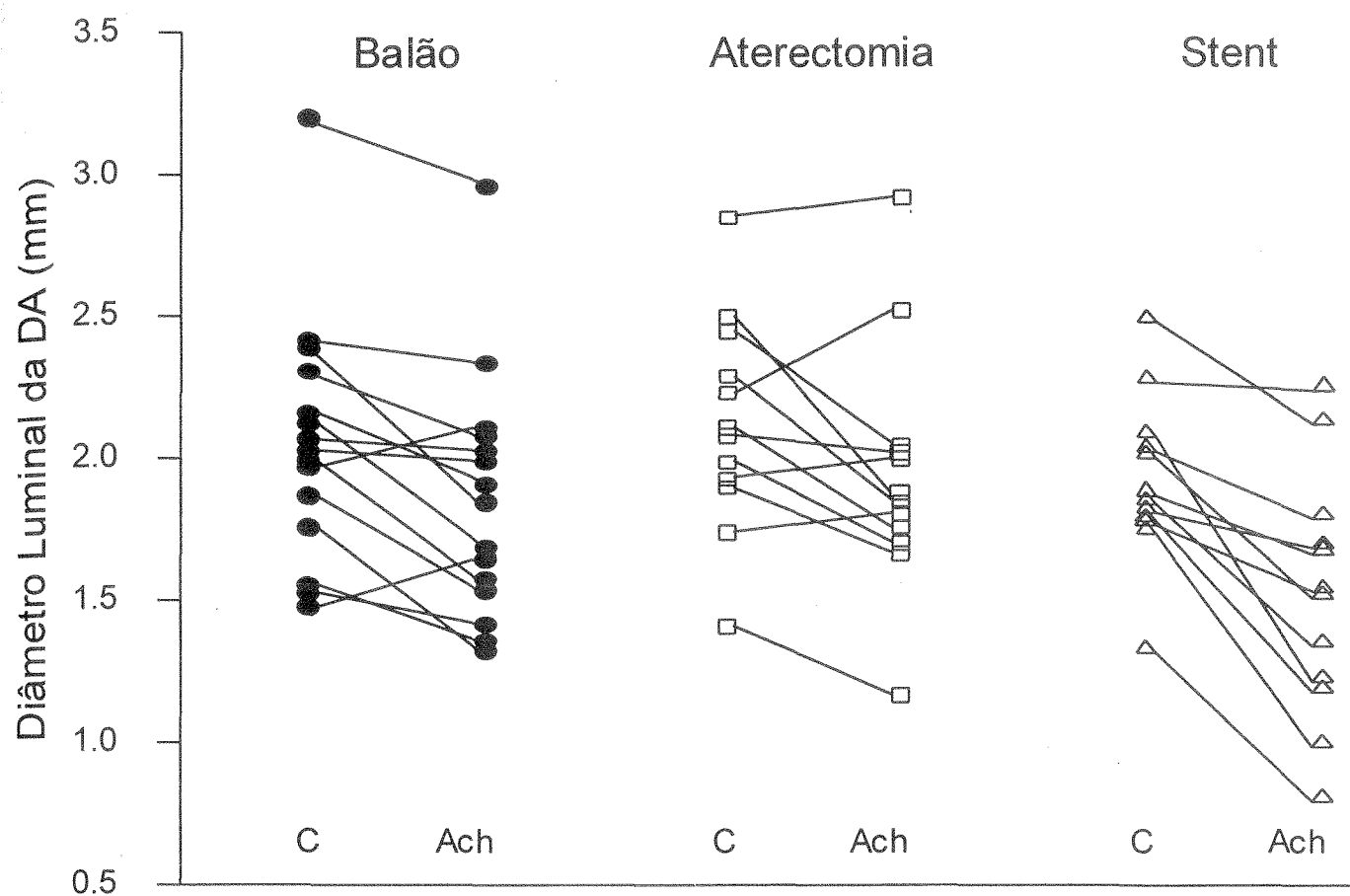


Figura 5.2: Variação absoluta no diâmetro luminal médio da artéria coronária descendente anterior (DA) durante as infusões intracoronárias. C e Ach indicam as infusões intracoronárias controle e de acetilcolina na concentração máxima. —●— = Grupo angioplastia por cateter balão. —□— = Grupo aterectomia direcionada. —△— = Grupo *stent*.

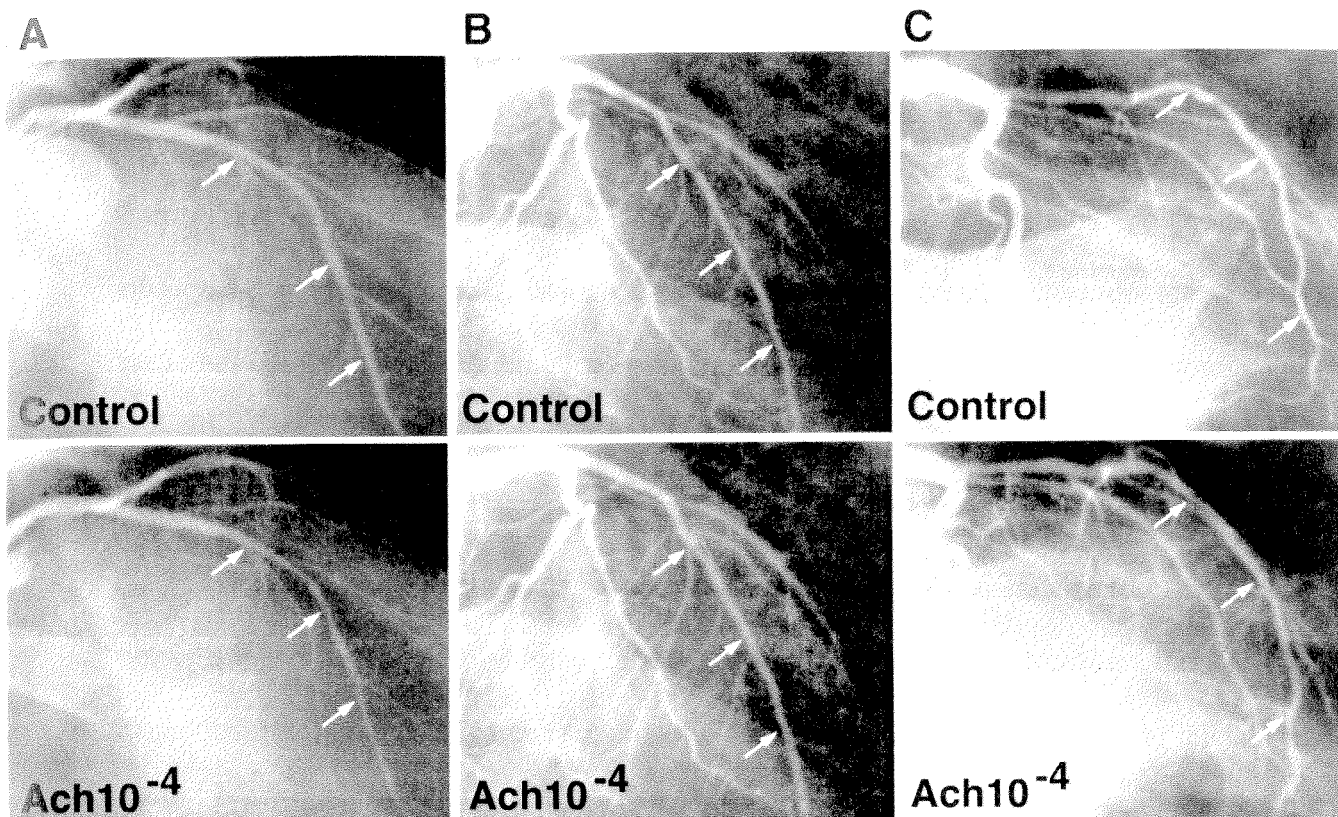


Figura 5.3: Angiografia coronária representativa de pacientes previamente tratados com implante de *stent* intracoronário (painel A), angioplastia por cateter balão (painel B) e aterectomia direcionada (painel C) no estado controle (Control) e após infusão de acetilcolina 10^{-4} molar (Ach 10^{-4}). As setas indicam a artéria descendente anterior submetida a intervenção.

Discussão

Este estudo examinou a função vasomotora endotélio-dependente de pacientes que haviam sido submetidos a uma intervenção coronária percutânea com sucesso no segmento proximal da artéria descendente anterior. Foi observado que, vários meses após a intervenção coronária, houve disfunção endotelial persistente na artéria coronária intervida. Uma vasoconstrição endotélio-dependente mais grave foi observada na descendente anterior de pacientes que receberam *stents* do que em pacientes que haviam sido submetidos a angioplastia por cateter balão ou à atrectomia.

Potenciais mecanismos da disfunção endotelial associada ao uso de *stents*

Em estudos experimentais, a disfunção endotelial secundária à lesão arterial persiste após a regeneração vascular ter ocorrido (117,118). A intensidade e a duração desta disfunção endotelial parece ser proporcional à gravidade da lesão vascular inicial (128). Em humanos, vários autores relataram uma resposta vasomotora endotélio-dependente anormal na artéria coronária intervida, por vários meses após uma angioplastia por cateter balão (119-121).

Neste estudo, observamos uma sensibilidade aumentada às propriedades vasoconstritoras da acetilcolina em artérias coronárias que previamente haviam recebido um *stent*. Resultados similares foram recentemente relatados em estudo experimental em artérias coronárias de suínos, onde o implante de *stent* foi associado com uma diminuição da integridade endotelial a longo prazo, quando comparado a angioplastia por cateter balão (127). Várias são as explicações possíveis para este achado. O implante de *stents* em artérias coronárias estenóticas é associado com um

maior ganho luminal que é seguido por uma resposta proliferativa mais intensa, quando comparado a outras intervenções percutâneas coronárias (122,123). Portanto, o implante de *stents*, provavelmente, causa uma lesão arterial mais grave, que pode parcialmente explicar uma maior disfunção endotelial. Adicionalmente, a recuperação da vasomotricidade endotélio-dependente após a lesão vascular é relacionada com a regeneração endotelial (129). Apesar de que endotelização completa seja observada após angioplastia por cateter balão (81,128), isto pode não ocorrer após o implante de *stents* (126,127). Grewe e colaboradores (126) demonstraram que as células que recobrem a superfície luminal de artérias coronárias humanas que receberam um *stent* apresentam características imunohistoquímicas diferentes das células endoteliais normais. Finalmente, está bem estabelecido que a angioplastia com cateter balão está associada a uma marcada resposta inflamatória em humanos (130). Evidências experimentais indicam que artérias coronárias que receberam *stents* apresentam infiltração neutrofílica e macrofágica na parede arterial mais acentuada do que artérias submetidas apenas à angioplastia por cateter balão (124,125,127). Uma vez que a ativação inflamatória local está associada com disfunção endotelial após a lesão vascular (81,131), uma resposta inflamatória aumentada à implantação de *stents* poderia também explicar a disfunção endotelial mais grave observada neste estudo.

Implicações clínicas

Desde a publicação dos estudos multicêntricos STRESS (132) e BENESTENT (133) que demonstraram redução de reestenose com o implante de *stents*, a técnica de utilização destas endopróteses sofreu modificações, que incluem o uso de pressões elevadas para implantação (134) e de agentes antiplaquetários em associações, dispensando a anticoagulação após o procedimento (135). Estes refinamentos técnicos

reduziram significativamente a incidência de oclusão subaguda, sangramento arterial e complicações vasculares (136, 137), que eram os principais limitantes clínicos para o uso de *stents*. Paralelamente, novos *stents* mais flexíveis foram desenvolvidos, facilitando o seu uso em situações anatômicas consideradas desfavoráveis. Com isso, o uso destas próteses endovasculares aumentou rapidamente para mais de 50% em vários laboratórios de cardiologia intervencionista (138, 139).

Entretanto, os *stents* são uma tecnologia ainda recente. Os primeiros resultados de implante de endopróteses em coronárias humanas foram publicados em 1987 por Sigwart (140) e seu uso tornou-se popular somente em 1995, após Colombo e colaboradores publicarem modificações técnica otimizando o implante destas endopróteses (134). Em vista disso, não há estudos randomizados com seguimento clínico e angiográfico a longo prazo de pacientes submetidos ao implante de *stents*. Com a exceção de alguns poucos estudos de coorte (141, 142, 143), a maior parte dos estudos publicados até o momento restringem seus resultados aos primeiros 6 a 12 meses após a intervenção coronária.

Portanto, não há descrição adequada da evolução do comprometimento aterosclerótico em artérias coronárias ou da ocorrência de eventos isquêmicos vários anos após o implante de *stents*. Da mesma forma não há relatos dos eventos clínicos a longo prazo, relacionados a artéria intervída nestes pacientes. Considerando-se que a disfunção endotelial precede por vários anos o desenvolvimento da aterosclerose e de síndromes coronarianas agudas, as potenciais implicações clínicas da disfunção endotelial mais grave após o implante de *stents* observada neste estudo somente poderão ser analisadas por estudos com seguimento clínico prolongado.

Limitações deste estudo

Devemos considerar algumas limitações inerentes a este estudo. O *stent* de Palmaz-Schatz foi o único utilizado em todos os pacientes. Não é sabido se nossos achados podem ser generalizados para outros *stents*. Os pacientes não foram randomizados para receber as várias formas de intervenção coronária. Apesar de que os grupos foram bem equilibrados em relação as características clínicas e fatores de risco para disfunção endotelial, não se pode excluir que fatores não reconhecidos tenham desviado os resultados. Além disso, é concebível que estes resultados sejam consequência de diferenças na função endotelial entre os grupos, já existentes no momento da realização da intervenção percutânea.

Conclusões

Este estudo demonstra disfunção endotelial mais grave, vários meses após o implante de *stents*, quando comparado a angioplastia por cateter balão ou a aterectomia direcionada. Evidências clínicas e experimentais sugerem que disfunção endotelial esteja implicada na aterogênese inicial e, mais tardiamente, na evolução da aterosclerose. Esses achados podem, portanto, ter implicações com respeito à progressão da aterosclerose em artérias coronárias submetidas à intervenção percutânea, especialmente ao implante de *stents*.

Discussão Geral

VI. Discussão Geral

O endotélio possui um papel central na homeostase vascular, por conseguinte, a disfunção endotelial provavelmente contribui para estados patológicos caracterizados por vasoespasmo, vasoconstrição, trombose excessiva, proliferação vascular anormal. De fato, deterioração do relaxamento vascular dependente do endotélio tem sido documentado em virtualmente todos os distúrbios cardiovasculares, incluindo hipercolesterolemia, diabete melito, hipertensão, insuficiência cardíaca e aterosclerose. Considera-se que a disfunção vasomotora reflita uma alteração global no endotélio, associada à deterioração de outras funções endoteliais, como a regulação das atividades antitrombótica, pró-fibrinolítica, da adesão leucocitária e da proliferação vascular. A disfunção endotelial parece preceder o desenvolvimento da aterosclerose, sendo evidente em indivíduos normais com fatores de risco para doença arterial coronária.

Nossos resultados demonstram que a terapia com nitroglicerina transdérmica está associada a uma vasoconstrição aumentada das coronárias epicárdicas em resposta à acetilcolina. Esta resposta vasomotora anormal está potencialmente associada ao desenvolvimento de tolerância e à ocorrência de eventos clínicos na retirada da terapia com nitroglicerina. A possibilidade de que o uso prolongado de nitratos orgânicos cause efeitos desfavoráveis quanto ao desenvolvimento de aterosclerose e de síndromes coronarianas agudas é uma especulação que não é adequadamente avaliada pelos estudos clínicos disponíveis. O achado de que um nitrato orgânico aumenta a vasoconstrição em resposta a um vasodilatador dependente do endotélio serve para enfatizar que ainda há muito para ser aprendido a respeito de uma forma de terapia que tem sido amplamente utilizada por mais de um século.

O desenvolvimento das endopróteses coronárias ou *stents* representa o maior avanço na cardiologia intervencionista desde a introdução da angioplastia por cateter balão. Os *stents* modificaram o padrão das intervenções coronárias por cateter, por permitirem que se obtenha um excelente resultado angiográfico imediato e uma menor incidência de reestenose. Contudo, os efeitos a longo prazo do uso destas próteses endocoronárias não são bem conhecidos. Da mesma forma, pouco esforço tem sido dedicado ao estudo da biocompatibilidade dos *stents*. O implante de *stents* leva a uma maior lesão vascular, maior inflamação e maior hiperplasia da íntima do que a angioplastia por cateter balão. Estes aspectos necessitam ser mais profundamente analisadas e melhor compreendidos. Os resultados deste estudo são uma indicação de que os efeitos a longo prazo do implante de endopróteses na vasculatura coronária podem ir além do desenvolvimento de reestenose e invocam cautela com o uso desta nova tecnologia.

Conclusões

VII. Conclusões

No primeiro experimento desta tese, a resposta das artérias coronárias epicárdicas à acetilcolina foi avaliada em pacientes randomizados para receber nitroglicerina transdérmica contínua ou para um grupo controle. Observou-se que:

1. Os pacientes tratados com nitroglicerina apresentaram uma vasoconstrição coronária mais intensa em resposta à acetilcolina;
2. Este efeito foi persistente por até três horas após a retirada do nitrato.

Este estudo demonstra que a terapia com nitroglicerina causa uma resposta vasomotora anormal nas artérias coronárias ao vasodilatador dependente do endotélio, acetilcolina. Estes achados têm implicações com respeito ao desenvolvimento de tolerância a nitratos e ao potencial para eventos adversos durante a retirada de nitroglicerina.

No segundo experimento, a resposta vasomotora à acetilcolina foi avaliada em artérias coronárias não reestenóticas de pacientes que, pelo menos 6 meses antes, haviam sido submetidos a uma intervenção percutânea na artéria coronária descendente anterior.

1. A descendente anterior apresentou constrição significativamente maior em pacientes que previamente haviam recebido *stents* do que em pacientes previamente tratados com angioplastia por cateter balão ou com aterectomia direcionada.*

2. Em contraste, a resposta da artéria circunflexa, que não havia sido intervida, foi similar nos três grupos.

A observação de uma disfunção endotelial mais grave após o implante de *stents* pode ter implicações com respeito a progressão de aterosclerose em artérias coronárias submetidas a intervenções percutâneas.

Referências Bibliográficas

VIII. Referências Bibliográficas

1. Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 1977;11:323-44.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
3. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987; 61:866-79.
4. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-6.
5. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315:1046-51.
6. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-5.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-9.
8. Choen R. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 105-128.
9. Schwartz SM, Gajdusek EM, Selden SC. Vascular wall growth control: the role of endothelium. *Arteriosclerosis* 1981;1:107-61.
10. Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, Ogawa H, Morikami Y, Obata K, Sakaino N. Effect of acetylcholine on the highly stenotic coronary artery: difference between the

- constrictor response of the infarct-related coronary artery and that of the noninfarct-related artery. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:752-758.
11. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81:491-7.
 12. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest* 1994;93:50-5.
 13. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilatation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88:2149-55.
 14. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-7
 15. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR . Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35:771-6.
 16. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation* 1997; 96:3378-83.
 17. Woo KS, Chook P, Lollin YI, et al. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 1997; 96:2542-44.

18. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Kuga T, Urabe Y, Takeshita A. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993; 88:77-81.
19. McLenachan JM, Vita JA, Fish RD, et al. Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points. *Circulation* 1990; 82:1169-73
20. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistad DD. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 1987; 80:1808-11.
21. Fish RD, Nabel EG, Selwyn AP, et al. Response of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine. *J Clin Invest* 1988; 81:21-31.
22. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 1996; 94:258-65.
23. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995; 332:488-93.
24. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995; 332:481-7.
25. Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97:716-720.
26. Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci* 1982;401:1-8.

27. Machovich R. Choices among the possible reaction routes catalyzed by thrombin. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 485:170-83.
28. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987; 18:234-9.
29. Hekman CM, Loskutoff DJ. Fibrinolytic pathways and the endothelium. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13:514-27.
30. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J. Cardiovascular Pharmacol* 1993; 22(suppl 4):S1-S4.
31. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller M, Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle cell contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986; 48:349-80.
32. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89:2035-40
33. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:3203-7.
34. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995;38:87-104.
35. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258:1898-902.
36. Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, et al. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med* 1991; 325:1551-6.
37. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, et al. Coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: Importance of the functional integrity of the endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1989;14:1181-90.

38. Loscalzo J, Vita JA. Ischemia, hyperemia, exercise, and nitric oxide. Complex physiology and complex molecular adaptations. *Circulation* 1994;90:2556-9.
39. Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990;265:19028-34.
40. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-5.
41. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-8.
42. Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney JF Jr, Welch GN, Loscalzo J. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 1995;96:2630-8.
43. Grag UC, Hassid A. Nitric oxide (NO) and 8-bromo-cyclic GMP inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83: 1974-78.
44. Fukuo K, Inoue T, Morimoto S, Nakahasi T, Yasuda O, Kitanni S, Sasanda A, Ogihara T. Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 95:669-72
45. Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3922-6.
46. Stamler JS, Vaughan DE, Loscalzo J. Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E₁, and nitroglycerin. *Circ Res* 1989;65:796-804.

47. FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 1983;67:1174-7.
48. Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:23-30.
49. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-63.
50. Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994;344:852-4.
51. Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S, Michelson A, Loscalzo J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem* 1999;274:14368-75.
52. Vita JA, Treasure CB, Ganz P, Cox DA, Fish RD, Selwyn AP. Control of shear stress in the epicardial coronary arteries of humans: impairment by atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14:1193-99.
53. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, et al. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Atheroscler Thromb* 1994; 14:753-9.
54. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, et al. Anti-atherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90:1168-72.
55. De Meyer GRY, Bult H, Üstünes L, et al. Effect of nitric oxide donors on neointima formation and vascular reactivity in the collared carotid artery rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:272-9.
56. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320:454-456.

57. Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran-Celantano J, Shwaery GT, Loscalzo J, Vita JA. Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11880-11884.
58. Keaney JF Jr, Xu A, Cunningham DC, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide production. *J Clin Invest* 1995; 95:2520-2529.
59. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidants vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994; 97(3A):5s-13s.
60. Frei B, England L, Ames, BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6377-6381.
61. Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF, Jr., Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 93:1107-13.
62. Ting H, Timimi F, Haley E, Roddy M, Ganz P, Creager M. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 95:2617-2622.
63. Heitzer T, Hanjörg J, Münzel T. Antioxidant Vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94:6-9.
64. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-5.
65. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for

- endothelial dysfunction : its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842-7.
66. Cernacek P, Stewart DJ. Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:562-7.
67. Shichiri M, Hirata Y, Ando K, Emori T, Ohta K, Kimoto S, Ogura M, Inoue A, Marumo F. Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension* 1990;15:493-6.
68. Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates. *Arteriosclerosis* 1990;10:1113-8.
69. Chowienczyk PJ, Cockcroft JR, Ritter JM. Blood flow responses to intra-arterial acetylcholine in man: effects of basal flow and conduit vessel length. *Clin Sci (Colch)* 1994;87:45-51.
70. Lefroy DC, Crake T, Uren NG, Davies GJ, Maseri A. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation* 1993;88:43-54.
71. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989;2(8670):997-1000.
72. Sinoway LI, Hendrickson C, Davidson WR Jr, Prophet S, Zelis R. Characteristics of flow-mediated brachial artery vasodilation in human subjects. *Circ Res* 1989;64:32-42.
73. Drexler H, Zeiher AM, Wollschlager H, Meinertz T, Just H, Bonzel T. Flow-dependent coronary artery dilatation in humans. *Circulation* 1989;80:466-74.

74. Holtz J, Forstermann U, Pohl U, Giesler M, Bassenge E. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6:1161-9
75. Cooke JP, Stamler J, Andon N, Davies PF, McKinley G, Loscalzo J. Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. *Am J Physiol* 1990;259(3 Pt 2):H804-12.
76. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250(6 Pt 2):H1145-9.
77. Hornig B, Maier V, Drexler H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1996;93:210-4.
78. Bank AJ, Kubo SH, Rector TS, Heifetz SM, Williams RE. Local forearm vasodilation with intra-arterial administration of enalaprilat in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1991;50:314-21.
79. Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 1993;87:1969-73.
80. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994;45:361-78.
81. Krejcy K, Schwarzacher S, Wolfgang F, Plesch C, Cybulsky MI, Weidinger FF. Expression of VCAM-1 in rabbit iliac arteries is associated with vasodilator dysfunction of regenerated endothelium following balloon injury. *Atherosclerosis* 1996;122:59-67.
82. Meidell RS. Southwestern Internal Medicine Conference: endothelial dysfunction and vascular disease. *Am J Med Sci* 1994;307:378-89.

83. Komaru T, Lamping KG, Eastham CL, Dellsperger KC. Role of ATP-sensitive potassium channels in coronary microvascular autoregulatory responses. *Circ Res* 1991;69:1146-51.
84. Chilian WM, Eastham CL, Marcus ML. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. *Am J Physiol* 1986;251(4 Pt 2):H779-88.
85. Ishibashi Y, Duncker DJ, Zhang J, Bache RJ. ATP-sensitive K⁺ channels, adenosine, and nitric oxide-mediated mechanisms account for coronary vasodilation during exercise. *Circ Res* 1998;82:346-59
86. Hasdai D, Gibbons RJ, Holmes DR, Higano ST, Lerman A. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. *Circulation* 1997;96:3390-5.
87. Glied M, Caramori PRA, Sasson Z, Adelman AG. Coronary Artery Endothelial Dysfunction is Not Associated with Reversible Myocardial Ischemia. *Journal of the American College of Cardiology* 1998; 31 (5 Suppl C): 100C.
88. Seidelin PH, Caramori PRA, Schampaert E, Gilbert BW, Adelman AG. Endothelial Dysfunction in patients with Angina-Like Chest Pain and Normal Coronary Arteries Is a Function of Age. *The Canadian Journal of Cardiology* 1997; 13 (Suppl C): 73C.
89. Packer M. What causes tolerance to nitroglycerine? The 100 year old mystery continues. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16:932-5.
90. Elkayam U. Tolerance to organic nitrates: evidence, mechanisms, clinical relevance, and strategies for prevention. *Ann Intern Med* 1991; 114:667-77.
91. Rydell EL, Axelsson KL. Adrenaline toxicity in mice: sensitization of alpha 1 adrenoreceptors by nitroglycerin. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1984; 55:73-7.

92. Münzel T, Giaid A, Kurz S, Stewart DJ, Harrison DG. Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:5244-8.
93. Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 1995; 95:187-94.
94. Heitzer T, Just H, Carsten B, Meinertz T, Olschewski M, Münzel T. Long-term nitroglycerin treatment is associated with supersensitivity to vasoconstrictors in men with stable coronary artery disease: Prevention by concomitant treatment with captopril. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:83-8.
95. Lange RL, Reid MS, Tresch DD, Keelan MH, Bernhard VM, Coolidge G. Nonatheromatous ischemic heart disease following withdrawal from chronic industrial nitroglycerin exposure. *Circulation* 1972; 66:666-78.
96. Morton WE. Occupational habituation to aliphatic nitrates and the withdrawal hazards of coronary disease and hypertension. *J Occup Med* 1977; 19:197.
97. DeMots H, Glasser SP. Intermittent transdermal nitroglycerin therapy in the treatment of chronic stable angina. *J Am Coll Card* 1989; 13:786-8.
98. Ferratini M, Pirelli S, Merlini P, Silva P, Pollavini G. Intermittent transdermal nitroglycerin monotherapy in stable exercise-induced angina: a comparison with a continuous schedule. *Eur Heart J* 1989; 10:998-1002.
99. Ferratini M. Risk of rebound phenomenon during nitrate withdrawal. *Int J Cardiol* 1994; 45:89-96.
100. Adelman AG, Cohen EA, Kimball BP, et al. A comparison of directional atherectomy with balloon angioplasty for lesions of the left anterior descending coronary artery. *N Engl J Med* 1993; 329:228-33.

101. Treasure CB, Vita JA, Cox DA, et al. Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1990; 81:772-9.
102. Treasure CB, Manoukian SV, Klein JL, et al. Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ Res* 1992; 71:776-81.
103. Makimattila S, Virkamaki A, Groop PH, et al. Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1996; 94:1276-82.
104. Lerman A, Holmes DR, Jr., Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC, Jr. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995; 92:2426-31.
105. Parker JD, Parker AB, Farrell B, Parker JO. Intermittent transdermal nitroglycerin therapy. Decreased anginal threshold during the nitrate-free interval. *Circulation* 1995; 91:973-8.
106. Parker JO, Amies MH, Hawkinson RW, et al. Intermittent transdermal nitroglycerin therapy in angina pectoris. Clinically effective without tolerance or rebound. Minitran Efficacy Study Group. *Circulation* 1995; 91:1368-74.
107. Stewart DJ, Holtz J, Bassenge E. Long-term nitroglycerin treatment: effect on direct and endothelium-mediated large coronary artery dilation in conscious dogs. *Circulation* 1987; 75:847-56.
108. Münzel T, Holtz J, Mulsch A, Stewart DJ, Bassenge E. Nitrate tolerance in epicardial arteries or in the venous system is not reversed by N-acetylcysteine in vivo, but tolerance-independent interactions exist. *Circulation* 1989; 79:188-97.

109. Münzel T, Bassenge E. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with high-dose enalapril retards nitrate tolerance in large epicardial arteries and prevents rebound coronary vasoconstriction in vivo. *Circulation* 1996; 93:2052-8.
110. Kai H, Yamamoto H, Noma M, et al. Effects of continuous intravenous infusion of isosorbide dinitrate on development of tolerance to vasodilating action in human epicardial coronary arteries. *Am Heart J* 1994; 128:230-6.
111. Münzel T, Heitzer T, Kurz S, et al. Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long-term nitroglycerin therapy in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:297-303.
112. Brown JB. The crossover experiment for clinical trials. *Biometrics* 1980; 36:69-79.
113. Schwarz M, Katz SD, Demopoulos L, Hirsch H, Yuen JL, Jondeau G, LeJemtel TH. Enhancement of endothelium-dependent vasodilation by low-dose nitroglycerin in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89:1609-1614.
114. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996; 97:22-8.
115. Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF, Jr., Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 93:1107-13.
116. Waller BF. Pathology of transluminal balloon angioplasty used in the treatment of coronary heart disease. *Hum Pathol* 1987;18:476-484.
117. Shimokawa H, Flavahan NA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibition of ergonovine-induced contraction is impaired in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *Circulation* 1989;80:643-650.

118. Cox RH, Haas KS, Moisey DM, Tulenko TN. Effects of endothelium regeneration on canine coronary artery function. *Am J Physiol* 1989; 257(5 Pt 2):H1681-H1692.
119. Suter TM, Buechi M, Hess OM, Haemmerli-Saner C, Gaglione A, Krayenbuehl HP. Normalization of coronary vasomotion after percutaneous transluminal coronary angioplasty ? *Circulation* 1992;85:86-92.
120. Mc Fadden EP, Bauters C, Lablanche JM, Quandalle P, Leroy F, Bertrand ME. Response of human coronary arteries to serotonin after injury by coronary angioplasty. *Circulation* 1993;88:2076-2085.
121. Vassanelli C, Menegatti G, Zanolla L, Molinari J, Zanutto G, Zardini P. Coronary Vasoconstriction in Response to Acetylcholine after Balloon Angioplasty: Possible Role of Endothelial Dysfunction. *Coronary Artery Disease* 1994;5:979-986.
122. Hanke H, Kamenz J, Hassenstein S, Oberhoff M, Haase KK, Baunbach A, Betz E, Karsch KR. Prolonged proliferative response of smooth muscle cells after experimental intravascular stenting. *European Heart J* 1995;6:785-93.
123. Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, Popma JJ, Satler LF, Pichard AD, Kenneth MK, Walsh C, Mackell P, Leon MB. Chronic arterial response to stent implantation: a serial intravascular ultrasound analysis of Palmaz-Schatz stents in native coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1134-9.
124. Kollum M, Kaiser S, Kinscherf R, Metz J, Kubler W, Hehrlein C. Apoptosis after stent implantation compared with balloon angioplasty in rabbits. Role of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2383-2388.
125. Hofma SH, Whelan DM, van Beusekom HM, Verdouw PD, van der Giessen WJ. Increasing arterial wall injury after long-term implantation of two types of stent in a porcine coronary model. *Eur Heart J* 1998;19:601-609.

126. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Pathogenesis of neointima-generation after coronary stent-implantation. Morphological findings in 18 stents. *Circulation* 1997;96:I-403 (abstr).
127. van Beusekom HMM, Whelan DM, Hofma SH, Krabbendam SC, van Hinsbergh VWM, Verdouw PD, van der Giessen WJ. Long-Term Endothelial Dysfunction Is More Pronounced After Stenting Than After Balloon Angioplasty in Porcine Coronary Arteries. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1109-1117.
128. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Gordon JB, Rennke HG, Hollenberg NK, Fallon JT, Ganz P, Cooke JP. Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation* 1990;81:1667-1679.
129. Meurice T, Bauters C, Auffray JL, Vallet B, Hamon M, Valero F, Van Belle E, Lablanche JM, Bertrand ME. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation* 1996;93:18:22.
130. Serrano CV Jr, Ramires JA, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:1276-83.
131. Merhi Y, L-Lacoste L, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* 1994;90:997-1002.
132. Fischmann DL, Leon MB, Baim DS, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994;331:496-501.

133. Serruys PW, De Jaegere P, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994;331:489-95.
134. Colombo A, Hall P, Makamura S, et al. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation* 1995;91:1676-88.
135. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996;334:1084-9.
136. Serruys PW, van Hout B, Bonnier H, et al. Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease. *Lancet* 1998;352:673-81. (erratum *Lancet* 1998;352:1478).
137. The EPISTENT Investigators. Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. *Lancet* 1998; 252:87-92.
138. Topol EJ. The stentor and the sea change. *J Am Coll Cardiol* 1995;71:307-08.
139. Rodriguez A, Ambrose JA. Do we require a cure for "stentmania"? *J Am Coll Cardiol* 1996;28:827-29.
140. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V et al. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *New Engl J Med* 1987; 326:701-6.
141. Kimura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Tamura T, Kaburagi S, Sawada Y, Sato Y, Yokoi H, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M. Three-year follow-up after implantation of metallic coronary-artery stents. *N Eng J Med* 1996; 334:561-6.

142. Laham RJ, Carrozza JP, Berger C, Cohen DJ, Kuntz RE, Baim DS. Long term (4-6-year) outcome of Palmaz-Schatz stenting: paucity of late clinical stent-related problems. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:820-6.

143. Eeckhout E, Goy JJ, Vogt P, Stauffer JC, Sigwart U, Kappenberger L. Complications and follow-up after intracoronary stenting: critical analysis of a 6-year single center experience. *Am Heart J* 1994; 127:262-72.

Apêndice

IX. Apêndice

1. Termo de consentimento utilizado para participação na pesquisa Efeitos da Terapia com Nitroglicerina na Função Vasomotora Endotelial:

Mount Sinai Hospital
Cardiovascular Clinical Research Laboratory
Research Consent Form

Effect of Nitroglycerin Withdrawal on Coronary Vasomotor Responses to Acetylcholine

Purpose

We would like permission to enrol you as a participant in a research study. You are a candidate for this study because you are going to have a diagnostic catheterization. The diagnostic catheterization is a clinical test that has been requested by your cardiologist. It is being performed to determine whether you have heart disease and/or to estimate its severity. It involves placing 2 small tubes into the artery and vein at the top of your right leg. Through these tubes, longer tubes will be passed to your heart so X-Ray pictures of the heart can be taken and the pressure within the heart measured.

The purpose of this study is to investigate the actions of a drug called nitroglycerin. Nitroglycerin compounds are a class of drugs that relax blood vessels and have been used for many years in patients with heart disease. When they are used for brief periods of time they are very effective. Unfortunately, when these drugs are used on a regular basis, they tend to stop working. Because of this these drugs are usually used intermittently. Unfortunately there is some evidence that such intermittent use is associated with the risk of heart attack during the drug free period. In this study we intend to carefully observe and document the body's response to the withdrawal of treatment with a common form of nitroglycerin therapy, the nitroglycerin patch (similar to a bandage) which is worn on the skin. This will be assessed by measuring the response your heart to a drug called acetylcholine. Acetylcholine is a hormone made by the body that usually causes heart arteries to dilate. In this study we will compare the response of your coronary arteries (the arteries which supply the heart muscle) to acetylcholine before and after the removal of nitroglycerin treatment.

Procedures

There are 2 separate parts to this research procedure. If you agree to participate in this research project you will be asked to read and sign this consent form. You will be given a supply of nitroglycerin patches or matching placebo (a placebo patch is a patch that looks as if it is the real nitroglycerin patch but does not contain any active drug). You will be asked to wear the patch continuously changing it each day at approximately 9 AM. After 5-7 days you will be admitted to Mount Sinai Hospital for you cardiac catheterization.

The research part of the catheterization will occur at the end of the regular catheterization. You will be notified when the diagnostic portion of the catheterization has been completed, and that the research portion is about to begin. You may withdraw your permission at this time, or any subsequent time, without effecting your medical care in any way.

At that point you will be given 3 small doses of the drug called acetylcholine directly into one of the arteries that supplies the heart muscle. This drug will be given through the same tube, which was used to take the X-Ray pictures of the heart arteries during the regular catheterization. At the end of each dose of acetylcholine a repeat X-Ray picture of the heart arteries will be taken.

At this point you will be moved to a waiting area outside the catheterization laboratory and the nitroglycerin patch that you are wearing will be removed. You will then rest for the next 4 hours. Subsequently you will be taken back to the catheterization laboratory. At that time the catheter (tube) which is used for the X-ray picture will be put back in place. A repeat X-Ray picture will be taken and then you will once again receive 3 doses of acetylcholine as was described above. At the end of each dose of acetylcholine repeat X-ray pictures will be taken.

At this point the study will be completed and you will recover from the angiogram in the usual way.

Risks and Discomforts

Nitroglycerin can cause headache although the headache usually goes away within a day or so but sometimes it does persist. You will be able to take regular tylenol for this headache if it is troublesome, or you may elect to discontinue the study if you find it to be severe. You may also develop lightheadedness from nitroglycerin if it causes your blood pressure to fall too much. This symptom usually goes away quickly if you lie down or if we reduce the dose. Other side effects from nitroglycerin are very unusual but can include nausea or an allergic reaction to the drug. Nausea is usually transient and may respond to reducing the dose and allergic symptoms will resolve after the medication is stopped. The nitroglycerin patch may leave an area of redness on your skin that may be somewhat tender but this response is uncommon and will go away on its own once the medicine is discontinued. The effect of these drugs during pregnancy is not well understood. You cannot participate in this study if you are pregnant. If you agree to take part in this investigation and you are of childbearing potential you must have an intrauterine device in place in order to be eligible.

Acetylcholine can cause a lowering of blood pressure and a slowing of heart rate. Since we will be using small doses this should not be a common occurrence. In addition, it is possible that acetylcholine could cause a narrowing of the coronary arteries. If this were to occur, the drug would be discontinued immediately and the narrowing reversed using nitroglycerin (which can relax coronary arteries).

The catheterization component of this investigation will require some additional time. The research component of the angiogram (the doses of acetylcholine) will take approximately 20 minutes and this will be done on 2 occasions. You will also have to remain in the laboratory for a 4-hour period between these 2 procedures. Therefore, the

experimental procedure will add approximately 5 hour to the length of time that you are in the hospital.

Fewer than one in a hundred patients experience problems as a result of catheterization, but potential problems can include bleeding, bruising, blood clots or infection. Even more rarely, heart attack or stroke can occur (in approximately 0.2% of cases); and on an extremely rare occasion, these can lead to death (in approximately 0.05% of cases). There will be some additional X-ray exposure during the investigation. The amount of additional X-Ray exposure is equivalent to what you would experience during a transatlantic flight.

Benefits

There will be no direct benefit to you as a result of this study.

All information obtained about you for the purposes of this investigation will be kept strictly confidential

Consent

I have had the opportunity to ask questions regarding the present study and have had my questions answered to my satisfaction. I understand that I am free to withdraw from this study at any time, and my withdrawal from the study will in no way alter any future care I may require.

I have read and understand the contents of this form. I will receive a copy of this form. I, the undersigned, consent to take part in this study.

Should I have any further questions, I may contact the investigator: Dr. John D. Parker (416 586-4794)

Date

Patient's Signature

Investigator's Signature

Witness's Signature

2. Termo de consentimento utilizado para participação no trabalho Função Vasomotora Endotelial Após Intervenções Coronarianas Percutâneas:

**Mount Sinai Hospital
Cardiovascular Clinical Research Laboratory
Research Consent Form**

Vascular Vasomotor Function After Remote Coronary Interventions

Purpose

You have been invited to participate in a research study because you have previously had a coronary angioplasty. Similar studies to the one we are now proposing have shown that after a successful angioplasty, the treated coronary artery may have an abnormal tendency to constrict. This may explain why some patients, who have no evidence of renarrowing (restenosis) continue to experience angina. In this study, we wish to investigate whether this tendency of coronary arteries to constrict is present after different kinds coronary angioplasties, such as stent implantation, balloon angioplasty, or directional atherectomy.

Study protocol

You are going to have a follow-up coronary angiogram (x-ray pictures of the arteries of your heart) to determine if the blockage in your coronary artery that was opened with an angioplasty procedure has recurred. The research part of the catheterization will occur at the end of the regular catheterization. You will be notified when the diagnostic portion of the catheterization has been completed, and that the research portion is about to begin. You may withdraw your permission at this time, or any subsequent time, without effecting your medical care in any way.

When the diagnostic angiogram has been completed, the ability of your heart arteries to relax will be tested. This will be assessed by measuring the response of your heart to a drug called acetylcholine. Acetylcholine is a hormone made by the body that usually causes heart arteries to dilate. Three small doses of acetylcholine will be given directly into one of the heart arteries through the same tube that was used to take the x-ray pictures of the heart arteries during the regular catheterization. An angiogram of the heart arteries will be taken after each dose of acetylcholine. When the study has been completed you will recover from the angiogram in the usual way.

Risks and Discomforts

The risk of a major complication (heart attack, stroke, or death) with the coronary angiogram is less than 1 in 1,500 in a patient like you that had no complications in previous angiograms and the obstruction in the coronary artery has been relieved. The risk of bruising in the groin or injury to the artery of the leg is less than 5 in 100.

The research component of this investigation will require some additional time (approximately 20 minutes). There will be some additional x-ray exposure during the investigation. The amount of additional x-ray exposure is equivalent to what you would experience during a transatlantic flight.

The effect of acetylcholine during pregnancy is not well understood. You cannot participate in this study if you are pregnant. If you agree to take part in this investigation and you are of childbearing potential you must have an intrauterine device in place in order to be eligible.

Acetylcholine can cause a lowering of blood pressure and a slowing of heart rate. Since we will be using small doses this should not be a common occurrence. In addition, it is possible that acetylcholine could cause a narrowing of the coronary arteries. If this were to occur, the drug would be discontinued immediately and the narrowing reversed using nitroglycerin (which can relax coronary arteries).

Benefits

There will be no direct benefit to you as a result of this study. This study should provide information about the response of the heart arteries to angioplasty procedures. This information could be used for the management of patients with heart disease in the future.

Only hospital staff involved in this study will have access to the information obtained about you for the purposes of this investigation. Your identity will remain confidential if material from your medical records is used for publication or education purposes.

Consent

I have had the opportunity to ask questions regarding the present study and have had my questions answered to my satisfaction. I am aware that participation in this research study is entirely voluntary and that refusal to participate or my withdrawal from the study at any time will not influence my medical care.

I have read and understand the contents of this form.
Should I have any further questions, I may contact the investigator: Dr. Allan G. Adelman (416 586-5284)

I, the undersigned, consent to take part in this study.

Date

Patient's Signature

Investigator's Signature

Witness's Signature