

# Propriedades Anti-Aterogênicas do Fator Relaxante Derivado do Endotélio (óxido nítrico)

Germán Iturry-Yamamoto, Alexandre Alderete Alves, Paulo Dornelles Picon

Porto Alegre, RS

O endotélio, mais que simples barreira natural que separa os constituintes da parede dos elementos do sangue, é órgão secretor que libera diversas substâncias, muitas delas com efeitos antagonistas, como fatores que promovem o crescimento de células do músculo liso vascular e outras, que o inibem, substâncias pró e antiagregantes plaquetárias, vasodilatadoras e vasoconstritoras, pró e antifibrinolíticas<sup>1-3</sup>. A homeostase da parede vascular resulta do equilíbrio desta atividade secretora.

São apresentadas a seguir as evidências da literatura sobre as propriedades do fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) e sua similitude com o óxido nítrico (NO), os efeitos do FRDE, do precursor e doadores de NO sobre as plaquetas, polimorfonucleares, monócitos e células de músculo liso vascular; a interação do NO com espécies reativas de oxigênio e lipoproteínas, além de outras propriedades farmacológicas destas substâncias, propriedades estas que indicam que o FRDE cumpre um papel importante na homeostase da parede vascular.

## Disfunção endotelial

O termo disfunção endotelial é empregado para definir as situações em que o endotélio perdeu sua propriedade vasoprotetora, representando a etapa inicial de vários processos de lesão vascular, como a injúria mecânica, hipercolesterolemia, aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, entre outros<sup>4-6</sup>. Do ponto de vista farmacológico, a disfunção endotelial consiste numa resposta paradoxal à administração de acetilcolina ou a de outro vasodilatador dependente do endotélio, causando vasoconstrição e queda do fluxo sanguíneo no vaso estudado<sup>7,8</sup>. São vários os mecanismos propostos para explicar esta reatividade vascular anormal, entre eles, menor síntese e liberação do FRDE-NO pelo endotélio<sup>9,10</sup> ou inativação do mesmo mediada, principalmente, pelo radical superóxido ou por produtos da lipoperoxidação<sup>11-14</sup>.

A resposta vascular coronária alterada está relacionada com a presença de fatores de risco para doença coronária,

como hipercolesterolemia, hipertensão, idade, aterosclerose instituída, diabetes mellitus<sup>15-20</sup>, podendo ocorrer também após angioplastia no segmento distal ao procedimento<sup>21</sup>. A disfunção endotelial está também envolvida na patogênese da síndrome X<sup>22,23</sup>, angina vasoespástica<sup>24</sup> e, provavelmente, na gênese da dor anginosa em pacientes com artérias angiograficamente normais<sup>25</sup>. Ocorre também em pacientes com insuficiência cardíaca<sup>26</sup>, podendo ser também indicativa de doença coronária pós-transplante<sup>27</sup>.

Em vários estudos, tanto em humanos como em animais, a administração de L-arginina, precursora do NO, corrige esta disfunção<sup>17,19,28-32</sup>, mesmo quando administrada após a formação da estria gordurosa na parede vascular<sup>33</sup>. Já outros não conseguiram demonstrar este efeito<sup>34</sup>. Segundo Otsuji e col<sup>35</sup>, a atenuação da disfunção endotelial pela L-arginina depende do grau de progressão do processo aterosclerótico, melhorando-a em estados não avançados da doença, não tendo efeito nos estágios mais avançados. Várias drogas, como os hipolipemiantes<sup>36-40</sup>, antioxidantes<sup>40</sup>, e inibidores da enzima de conversão<sup>41,42</sup>, teriam efeito benéfico sobre a disfunção endotelial.

## A via L-arginina-óxido nítrico

O FRDE, liberado pela célula endotelial<sup>7</sup>, foi identificado como sendo o NO<sup>43</sup> ou molécula similar<sup>44</sup>. A importância da síntese do FRDE-NO a partir da L-arginina, a chamada via L-arginina-NO, baseia-se no fato de que são vários os tecidos que têm a propriedade de síntese do FRDE-NO, entre eles o endotélio, e que esta molécula cumpre importantes funções no organismo<sup>45</sup>. Esta síntese, a partir da L-arginina, é devida à ação da enzima constitutiva NO sintase endotelial (NOSe), que é estimulada por vários agentes<sup>46-48</sup> (quadro I).

Quadro I - Ativadores da NO sintase<sup>46-48</sup>

Acetilcolina
Bradicina
Substância P.
Ionóforo de cálcio A23187
Trombina
Tromboxano A2
Leucotrienos
Histamina
Endotelina
Plaquetas agregadas
Shear stress do fluxo sanguíneo

Hospital de Clínicas de Porto Alegre-UFRGS e Departamento de Farmacologia da UFRGS e da Universidade de Passo Fundo

Correspondência: Germán Iturry Yamamoto - Serviço de Cardiologia do HCPA - Rua Ramiro Barcelos, 2350 - 2º - S/2061 - 90035-003 - Porto Alegre, RS

Recebido para publicação em 6/6/97

Aceito em 27/8/97

Quadro II - Mecanismos protetores do óxido nítrico

Ação vasodilatadora
Efeito antiagregante plaquetário
Efeito antioxidante
Inibição da lipoperoxidação
Inibição da liberação de radical superóxido pelos polimorfonucleares
Inibição da quimiotaxia de leucócitos
Inibição da expressão de moléculas de adesão
Inibição da proliferação e diferenciação de macrófagos
Inibição da mitogênese e proliferação de células musculares lisas
Inibição da proliferação da íntima
Inibição da liberação de componentes da matriz extracelular
Inibição da lipoperoxidação

Além da NOSe, foram descritas pelo menos duas outras isoenzimas, a NO sintase constitutiva de células do sistema nervoso (NOSn) e algumas células epiteliais; e uma outra, induzível, presente em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células musculares lisas e hepatócitos (NOSi), que, quando expostas a endotoxinas bacterianas ou citocinas, liberam por um tempo prolongado grandes quantidades de NO, fenômeno implicado na patogênese da hipotensão e da disfunção contrátil do miocárdio no choque séptico<sup>49,50</sup>.

O FRDE-NO foi descrito inicialmente como um potente vasodilatador<sup>7</sup>, que atua através da ativação da guanilato ciclase do músculo liso vascular, aumentando os níveis de GMPc<sup>51</sup>. Estudos posteriores demonstraram que o FRDE-NO atua também sobre vários processos implicados na patogênese da aterosclerose e da trombose, como a adesão e agregação plaquetária, a formação de radicais livres de oxigênio (RLO<sub>2</sub>), a ativação de polimorfonucleares (PMNs), a oxidação das lipoproteínas, a mitogênese e proliferação de células de músculo liso vascular, e a proliferação da íntima, entre outros (quadro II).

### Atividade antiplaquetária do FRDE-NO e doadores de NO

Azuma e col<sup>52</sup> demonstraram pela primeira vez que o FRDE tem a propriedade de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico. Posteriormente, o grupo do Dr Moncada demonstrou que o FRDE tem um efeito antiagregante plaquetário semelhante ao NO exógeno, que este efeito é potencializado tanto pela co-administração da superóxido dismutase (SOD), enzima que leva à dismutação do ânion superóxido, assim como por um inibidor seletivo da GMPc fosfodiesterase; já a hemoglobina (Hb), que tem uma alta afinidade pelo NO, inibe este efeito antiplaquetário<sup>53</sup>. O FRDE e o NO exógeno causam também a desagregação plaquetária e, tanto a ação antiagregante como a desagregante do FRDE e do NO, são potencializadas pela prostaciclina<sup>54</sup>. Moncada e col<sup>55</sup> demonstraram também que o FRDE tem um efeito inibitório sobre a adesão plaquetária ao endotélio vascular, que é potencializado pela SOD e inibido pela Hb.

O efeito antiagregante plaquetário do NO está relacio-

nado à ativação da guanilato ciclase intraplaquetária<sup>56,57</sup>, o que leva a um incremento de 3',5'-monofosfato de guanosina (GMPc) intraplaquetário, o que, por sua vez, causa a redução do cálcio intracelular e, subsequentemente, menor ligação de fibrinogênio ao receptor formado pelo complexo glicoproteína plaquetária IIb/IIIa<sup>58</sup>. Assim, o NO atuaria também na via final da ativação plaquetária denominada de coesão plaquetária que culmina com a formação de pontes de fibrinogênio entre os receptores IIb/IIIa de duas ou mais plaquetas<sup>59</sup>.

Tem-se analisado também o efeito antiplaquetário de doadores e precursores de NO. Inicialmente, esta ação foi descrita em estudos *in vitro*, com o uso de altas concentrações de nitratos<sup>60-63</sup>, mas também com concentrações próximas às terapêuticas<sup>64</sup>. Em outros estudos, realizados *in vivo* e *ex vivo*, esta atividade antiagregante dos nitratos foi obtida com a aplicação de doses terapêuticas<sup>57,61,65,66</sup>. A nitroglicerina reduz também a adesão das plaquetas à parede vascular após lesão mecânica profunda da mesma<sup>67</sup>.

Mais recentemente, foi estudada a atividade antiplaquetária do precursor do NO e de novos doadores. A administração de L-arginina ou de um doador exógeno de NO (nitroprussiato de sódio), em modelo experimental em cães, retarda a formação do trombo intracoronário e a reoclusão após trombólise, além de inibir, significativamente, a agregação plaquetária *ex vivo*<sup>68</sup>.

O tratamento de plaquetas com albumina sérica bovina nitrosada (ASB-NO) causou uma redução significativa da adesão plaquetária, o que, segundo os autores, pode representar um efeito antitrombótico desta molécula<sup>69</sup>. Além disso, a administração local de ASB-NO provoca uma redução na adesão plaquetária após lesão vascular, assim como uma diminuição significativa da proliferação intimal<sup>70</sup>.

Kaul e col<sup>71</sup> descrevem o efeito antitrombótico de um novo doador de NO: N,N'-dimetil-hexanediamina (DMHD/NO). Comparado com o nitroprussiato de sódio, o DMHD/NO tem uma maior atividade antitrombótica. Este mesmo doador inibe a formação de trombo e a agregação plaquetária sobre artérias lesadas mecanicamente, quando perfundidas com sangue de pessoas normais ou de pacientes com hipercolesterolemia<sup>72</sup>.

Estudos iniciais em humanos com a administração de altas doses de L-arginina por via oral mostraram que esta inibe significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP; já a vasodilatação dependente do endotélio e parâmetros hemodinâmicos não foram afetados pelo tratamento<sup>73,74</sup>.

A administração intracoronária de S-nitrosoglutatona (GSNO), outro doador de NO, em pacientes submetidos à angioplastia, inibe a ativação plaquetária com menor expressão de P-selectina e de glicoproteína IIb/IIIa<sup>75</sup>. O uso de nitroglicerina e S-nitrosoglutatona reduziu significativamente a expressão destas moléculas de adesão em plaquetas de pacientes com infarto agudo do miocárdio e angina instável<sup>76</sup>.

Foi também avaliado o efeito dos inibidores da NO sintase sobre as plaquetas. A administração de L-NAME em modelo experimental causa microtromboembolismo

coronário em áreas hipoperfundidas; efeito este que é prevenido pela administração concomitante de L-arginina<sup>77</sup>.

O pré-tratamento com L-NAME aumenta a deposição plaquetária sobre a camada média da aorta e a adesão de neutrófilos sobre o endotélio tanto em condições de alto quanto de baixo *shear stress*<sup>78</sup>.

Para Chen e Mehta, o efeito ativador das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sobre as plaquetas é devido a menor disponibilidade de L-arginina, precursor do NO, e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) se contrapõem a este efeito através do aumento da atividade da NOS<sup>79</sup>.

Em resumo, o FRDE-NO intervém em todas as fases da ativação plaquetária, inibindo a formação de trombo.

### Efeitos do FRDE-NO sobre os radicais livres de oxigênio

Existe na literatura uma controvérsia sobre o papel do NO como oxidante ou antioxidante. Por um lado, este tem a propriedade de inativar o radical superóxido<sup>80,81</sup>, e vice-versa<sup>13</sup>. Por outro, nos experimentos de Beckman e col<sup>82</sup>, a reação de NO com radical superóxido levou à formação de peroxinitrito o qual por sua vez se degrada gerando o radical hidroxila e o radical dióxido de nitrogênio, ambos com potente ação oxidante. Neste contexto, Hogg e col<sup>83</sup> mostram que a geração simultânea de NO e superóxido leva à oxidação de LDL, o que representaria um mecanismo de oxidação das mesmas *in vivo*. No entanto, o mesmo grupo de pesquisadores, em um outro trabalho, determinou que, em ausência de ânion superóxido, o NO tem a capacidade de inibir a oxidação de LDL<sup>84</sup>. Este efeito antioxidante do NO seria através da interrupção da cadeia autocatalítica da peroxidação lipídica iniciada pelas espécies ativas de oxigênio<sup>85</sup>. Portanto, a concentração de ânion superóxido seria um fator crítico no comportamento biológico do NO: em situações nas quais aquele está presente em excesso, o efeito antioxidante do NO é suprimido, sendo gerado peroxinitrito, um potente pró-oxidante.

Segundo Radi e col<sup>86</sup>, o NO teria uma ação antioxidante através dos seguintes mecanismos: 1) ligação com o ferro presente em compostos que participam das reações oxidativas, inibindo as reações radicalares mediadas por este metal; 2) reação com outros radicais intermediários, tanto na fase líquida como na lipídica, terminando reações oxidativas. Ressalta-se o fato de que a constante *k* de reação do NO com lipoperóxidos é muito maior do que a *k* da reação destes com o alfa-tocoferol, antioxidante clássico de terminação de cadeia; 3) nos casos em que a lesão biológica esteja especificamente relacionada à toxicidade do ânion superóxido, sua reação "redirecionaria" esta toxicidade através da formação do radical peroxinitrito, que, por sua vez, poderia ser decomposto por mecanismos menos tóxicos ou mais eficientes. O consumo do radical superóxido pela reação com o NO reduziria também a formação de peróxido de hidrogênio, uma outra espécie ativa de oxigênio que participa do estresse oxidativo na parede vascular.

Clancy e col<sup>87</sup> determinaram também que o NO inibe a síntese de radical superóxido pelos polimorfonucleares (PMNs) atuando sobre a NADPH oxidase, o que poderia ser um mecanismo adicional de proteção, evitando a formação daquele em uma fonte importante como são os PMNs, não se descartando a possibilidade de que esta inibição ocorra também em outras células.

O tratamento de coelhos com dieta rica em colesterol ou com dieta hipercolesterolêmica, mais um inibidor da NOS (L-NAME), aumenta a produção de radical superóxido em anéis aórticos; já em coelhos tratados com dieta rica em colesterol e L-arginina, a produção de radical superóxido retorna aos níveis iniciais. Além disso, o relaxamento vascular colinérgico dependente de endotélio foi parcialmente restabelecido neste último grupo de animais; os autores sugeriram que a L-arginina normaliza a função endotelial aumentando a produção de NO e diminuindo a inativação do mesmo pelo radical superóxido<sup>88</sup>.

Drenger e col<sup>89</sup> demonstraram que a inativação da proteína Gi-2 endotelial causa um aumento na produção de ânion superóxido pelas células endoteliais, sugerindo que a disfunção endotelial, que ocorre nas etapas iniciais do processo aterosclerótico, está relacionada com a inativação daquela proteína, o que, por sua vez, causaria um aumento da síntese de radicais livres por esta via, podendo ser este um mecanismo de aceleração do processo aterosclerótico.

A liberação do FRDE, biologicamente ativo, pode depender também da atividade da SOD. A pré-incubação da aorta de coelhos com dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor desta enzima, causa importante redução do relaxamento dependente de endotélio à acetilcolina e ao cálcio ionoforo A23187; já o pré-tratamento com inibidores da catalase e inibidores da síntese de glutatião não causaram alterações neste tipo de relaxamento<sup>90</sup>. Resultados similares foram obtidos com o tratamento de artérias coronárias bovinas com DETC que produziu completa inibição do relaxamento a acetilcolina e a nitrovasodilatadores, sem causar a inibição do relaxamento ao ácido aracdônico. Houve também um aumento da produção de radical superóxido nos vasos tratados<sup>91</sup>.

A administração de SOD ou um análogo sintético de baixo peso molecular em modelo experimental de injúria vascular reduz significativamente as variações cíclicas do fluxo, além de causar uma menor formação de trombo no local de lesão<sup>92</sup>.

A inibição, em pacientes com aterosclerose não avançada, da xantina-oxidase, uma das enzimas responsáveis pela síntese de radical superóxido, melhora a vasodilatação dependente de endotélio, reforçando a idéia de que o ânion superóxido, através da inativação do NO, contribui para a alteração do relaxamento dependente do endotélio<sup>93</sup>.

A aplicação tópica de SOD e catalase em animais tornados diabéticos produz normalização da resposta arteriolar à acetilcolina, o que sugere que a produção de RLO<sub>2</sub> tem papel importante na patogênese da disfunção endotelial em vasos de animais diabéticos<sup>94</sup>.

Em contraposição, segundo García e col<sup>95</sup>, a adminis-

tração de SOD Cu-Zn não altera a resposta à acetilcolina em pacientes com hipercolesterolemia, sugerindo que a disfunção endotelial não se deva à inativação do NO pelo ânion superóxido, mas, não descartam a possibilidade desta ocorrer intracelularmente, já que a SOD Cu-Zn penetra em pequenas proporções na célula.

Estudos iniciais mostram que a L-arginina, em concentrações similares às obtidas após administração por via oral, inibe a oxidação de LDL *in vitro*, podendo ser este um mecanismo adicional de proteção contra o processo aterosclerótico<sup>32</sup>.

Em resumo, há evidências de que o ânion superóxido inativa o NO, alterando a função endotelial, e que a inibição da síntese daquele ou o uso de “varredores” de radicais livres poderia reverter esta situação. O NO teria propriedades antioxidantes inibindo a síntese de superóxido em nível celular; interagindo com metais que participam de reações radiculares; promovendo reações de terminação do processo oxidativo e interagindo com o radical superóxido.

### Efeitos do FRDE-NO e dos doadores de NO sobre os leucócitos

É conhecido o papel das células brancas na patogênese da aterosclerose<sup>96-98</sup>. Diversos estudos analisaram a ação exercida pelo FRDE-NO sobre monócitos e leucócitos polimorfonucleares.

Vários doadores de NO inibem diversas funções dos PMNs, como a síntese de leucotrieno B<sub>4</sub>, a quimiotaxia, degranulação e a liberação de radical superóxido, processos estes envolvidos na aterogênese<sup>87,99</sup>. O NO inibe também a adesão de PMNs, o que estaria relacionado à capacidade de inativar o ânion superóxido<sup>80</sup>, além de inibir a expressão de moléculas de adesão (E-seletina, VCAM-1) induzida por citocinas no endotélio<sup>100</sup>.

A exposição prévia de células endoteliais ao *shear stress* induz a síntese de NO, o qual por sua vez, reduz a adesão de monócitos ao endotélio, efeito revertido com o uso de um inibidor da NOS<sup>101</sup>.

A suplementação com L-arginina atenua a adesão de monócitos ao endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos<sup>102,103</sup>, já a administração crônica de um inibidor da NOS aumenta marcadamente esta adesão e acelera a lesão aterosclerótica<sup>102</sup>. Este efeito inibidor da adesão de monócitos ao endotélio é compartilhado por doadores de NO (SPM 5185) e pelo NO endógeno<sup>104</sup>.

Doadores de NO reduzem a expressão, induzida por citocinas, de moléculas de adesão em células endoteliais humanas<sup>105,106</sup>. Um outro doador (CAS 1609) causou também uma menor adesão de leucócitos ao endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos, além de reduzir significativamente a expressão de moléculas de adesão<sup>107</sup>.

ONO modula também a expressão do um fator quimiotático para monócitos (MCP-1 *monocyte chemoattractant protein 1*): a inibição da produção basal de NO aumenta a expressão do mRNA deste fator, já a adição do NO exógeno a diminui<sup>108</sup>.

Diversos doadores de NO inibem a expressão do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), envolvido na regulação da proliferação e diferenciação das células espumosas na lesão aterosclerótica<sup>109</sup>.

Portanto, o FRDE-NO tem um efeito inibitório sobre diversas funções dos leucócitos, além de modular a expressão de moléculas de adesão, de fatores quimiotáticos e de moléculas que controlam a proliferação e diferenciação de células espumosas na lesão aterosclerótica.

### Efeitos do FRDE-NO e dos doadores de NO sobre as células de músculo liso vascular

Foi demonstrado que vários vasodilatadores geradores de NO inibem a mitogênese e a proliferação de células de músculo liso vascular em ratos<sup>110</sup>.

O uso crônico de um doador indireto de NO, o dinitrato de isossorbida (DNIS), em porcos tornados ateroscleróticos, inibe a proliferação de células de musculatura vascular e induz a NOS nas células endoteliais, restaurando a liberação normal de NO<sup>111</sup>. Já em modelo de injúria vascular com balão, o DNIS não inibiu o espessamento intimal, mesmo sendo administrado previamente à indução da lesão e em altas doses; entretanto, um novo doador de NO, o FK 409, teve um efeito significativo, mesmo quando administrado a partir do dia da indução da injúria, provavelmente devido à inibição da proliferação de células musculares lisas<sup>112</sup>. Um outro doador de NO (espermina/NO - Sp/NO), liberado localmente, mostrou-se também efetivo ao inibir a proliferação celular e o espessamento intimal após injúria vascular com balão<sup>113</sup>. A administração de NO por inalação crônica reduz significativamente a proliferação intimal após lesão mecânica<sup>114</sup>.

Substâncias geradoras de NO exercem também uma inibição dose-dependente sobre a síntese de proteína total e colágeno em células de músculo liso vascular<sup>115,116</sup>.

Uma outra importante observação é feita nos trabalhos de Cayatte e col<sup>117</sup> e de Naruse e col<sup>118</sup>: a administração crônica de inibidores da NO sintase em coelhos tratados com dieta rica em colesterol acelerou significativamente a formação da neointima, denotando um efeito antiproliferativo do NO.

Portanto, o FRDE-NO é capaz de controlar a formação da neointima ao inibir a mitogênese e a proliferação celular e a síntese de colágeno pelas células musculares lisas.

### Outros mecanismos protetores do FRDE-NO e dos doadores de NO

O mononitrato-5 de isossorbida, um doador indireto de NO, em altas concentrações, tem efeito anticomplementar sobre ambas as vias de ativação da cascata de complemento<sup>119</sup>, podendo inibir, assim, a formação de produtos da ativação deste com propriedades deletérias, como fatores quimiotáticos, anafilotoxinas, ou o complexo lítico de membrana. Há evidências de que o sistema de complemento exerce um efeito ativador sobre as plaquetas<sup>120</sup> e que estaria implicado no processo de aterosclerose<sup>121</sup>.

Irokawa e col<sup>122</sup> mostram que o tratamento de células endoteliais com inibidores da síntese de NO causa uma inibição da expressão de sulfato de heparan nestas células, o que sugere que o NO pode atuar sobre o sistema de coagulação através da regulação da expressão daquela.

## O FRDE-NO e o vaso lesado

É reconhecido atualmente que a ruptura da placa aterosclerótica e a subsequente trombose arterial são fenômenos críticos para o estabelecimento das síndromes isquêmicas agudas<sup>123,124</sup>. A lesão mecânica da parede vascular leva a uma disfunção endotelial por um tempo prolongado<sup>6,125</sup>. Há controvérsias sobre a patogênese desta alteração da função endotelial. Alguns autores indicam haver uma redução crônica na expressão da NOS endotelial (NOS<sub>e</sub>) após injúria vascular<sup>126</sup>. Já outros comprovaram sua normalização após 21 dias, sugerindo que a disfunção endotelial seja produto de alterações de eventos pós-transcrição<sup>127</sup>. Srivatsa e col<sup>128</sup> corroboraram que, após injúria vascular experimental, há uma expressão importante da NOS tipo III no endotélio que cobre o local da lesão a partir do 6º dia após desendotelização, com certo aumento da expressão nas células de músculo liso vascular da camada média. Uma expressão máxima da NOS<sub>e</sub> ocorreu nos macrófagos e células mesenquimais da neointima no 14º dia após injúria. Os autores sugerem que o NO pode ter um papel regulador da hiperplasia neointimal após injúria vascular, podendo exercer um efeito citostático. A neovascularização entre a neointima e adventícia parece também estar precedida pela expressão de NOS<sub>e</sub>.

Por outro lado, o vaso lesado e os elementos celulares do sangue ativados sintetizam citocinas, como a interleucina 1- $\beta$  e o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , os quais, por sua vez, aumentam a expressão da NOS induzível (NOS<sub>i</sub>)<sup>129</sup>, enzima que leva à síntese de NO por outros componentes da parede vascular que não o endotélio, como as células de músculo liso vascular<sup>130-133</sup>, podendo ocorrer então um aumento na síntese de NO após injúria vascular<sup>134,135</sup>.

O NO sintetizado pela ativação da NOS<sub>i</sub> poderia então prevenir o vasoespasm e inibir a adesão e agregação plaquetária, assim como a adesão de PMNs, e a proliferação de células de músculo liso vascular, afirmação baseada no trabalho de McNamara e col<sup>136</sup> segundo o qual a modulação da atividade da NOS induzível pode controlar a progressão da lesão da íntima após desendotelização; a administração crônica de L-arginina em animais submetidos a desendotelização aórtica reduziu a hiperplasia da íntima de forma significativa. Em modelo de indução de aterosclerose pela administração de dieta rica em colesterol, a administração crônica simultânea do precursor de NO teve um efeito antiaterogênico, prevenindo o espessamento da íntima tanto na aorta como nas coronárias<sup>30, 137</sup>. Mais recentemente, esse mesmo grupo demonstrou que a administração de L-arginina por 10 semanas, em animais tratados previamente com dieta rica em colesterol e na vigência da mesma, é capaz de causar a regressão da lesão aterosclerótica. Este efeito correlacionou-se com o aumento da liberação de NO e a re-

dução da síntese do radical superóxido pelo vaso. Entretanto, na 13ª semana de tratamento com L-arginina, o efeito antiaterogênico foi perdido na metade dos animais<sup>138</sup>.

O trabalho de Preik-Steinhoff e col<sup>139</sup> mostra a capacidade das células endoteliais de repor rapidamente seu *pool* de arginina, sugerindo que a administração de L-arginina poderia normalizar a capacidade de vasodilatação dependente do endotélio dos vasos afetados pelo processo aterosclerótico, o que de fato foi demonstrado por Otsuji e col<sup>35</sup>: a infusão do aminoácido reverteu a vasoconstrição induzida pela acetilcolina em pacientes com estágios não avançados de aterosclerose.

Ainda neste contexto, existem evidências de que a depleção de L-arginina induz a geração de RLO<sub>2</sub> pela NOS em células isoladas<sup>140</sup>, o que permite inferir que outro efeito benéfico da suplementação crônica de L-arginina seria a inibição desta outra fonte de radicais livres em células sanguíneas e da parede vascular.

No entanto, o efeito antiaterogênico da L-arginina em modelo experimental é limitado, dependendo do tempo de administração, local de indução do processo aterosclerótico e do sexo. A administração crônica do aminoácido em coelhos tratados com dieta rica em colesterol causou uma elevação significativa dos níveis plasmáticos de arginina nas primeiras 7 semanas, retornando aos níveis iniciais após a 14ª semana; o processo aterosclerótico foi inibido somente na porção da aorta descendente em animais do sexo masculino, não o sendo na aorta ascendente; já nas fêmeas este efeito antiaterogênico não foi demonstrado<sup>141</sup>.

Diversos trabalhos sugerem também que o NO exógeno pode modular a proliferação de células endoteliais na parede vascular lesada. O nitroprussiato de sódio induz a síntese de DNA em culturas de células endoteliais isoladas, efeito que é compartilhado por outros doadores indiretos de NO como a nitroglicerina e o DNIS, embora com diferente intensidade<sup>142</sup>. O efeito da substância P sobre a angiogênese, sobre o crescimento de células endoteliais e sua migração, é potencializado por doadores de NO e inibido por bloqueadores da NOS<sup>143</sup>. O tratamento das mesmas com outros doadores de NO induz também a proliferação das mesmas<sup>144,145</sup>.

Ademais, como já foi mencionado, a administração de doadores de NO inibe significativamente a hiperplasia da íntima em modelos de injúria vascular<sup>70,112,113</sup>.

Portanto, a lesão vascular causa inicialmente uma menor síntese de NO pela parede do vaso, que pode ser restaurada e inclusive aumentada 6-7 dias após. A diminuição inicial da síntese de NO pode ser modificada pela administração imediata do precursor e doadores de NO, podendo estes promover a proliferação de células endoteliais no vaso lesado e inibir a proliferação neointimal.

## O fator relaxante derivado do endotélio e as lipoproteínas plasmáticas

As LDL, tanto nativas como oxidadas, causam uma disfunção endotelial, levando a uma perda das proprieda-

des vasodilatadora e antitrombótica do endotélio; os mecanismos não estão definidos, podendo envolver a alteração de processos de transdução do sinal do receptor endotelial, já quando a concentração de lipoproteínas aumenta, estas podem causar um tipo de disfunção menos seletiva<sup>12,146</sup>.

Sabe-se também que as LDL oxidadas (LDL-ox) têm a propriedade de bloquear a formação do FRDE<sup>147-149</sup>, ou inativá-lo<sup>150</sup>, suprimindo assim o seu efeito vasodilatador<sup>151</sup> e, provavelmente, o efeito antiagregante plaquetário, além de inibir a formação de GMPc<sup>152</sup>. Por outro lado, Liao e col<sup>153</sup> determinaram que o tratamento de células endoteliais com LDL-ox reduz a expressão da NOS, resultado inverso ao obtido em outro estudo, onde as LDL-ox e a lisofosfatidilcolina provocaram um aumento da expressão do RNA mensageiro da NOS constitutiva em células endoteliais da aorta de bovino. Este efeito não foi compartilhado pelas LDL nativas e HDL<sup>154</sup>, resultado confirmado por Hirata e col<sup>155</sup>. Segundo esses autores, a disfunção endotelial em vasos ateroscleróticos não seria devida a uma redução da expressão da NOS constitutiva.

O estresse oxidativo pode contribuir para a disfunção

endotelial na hipercolesterolemia e aterosclerose. A aplicação de antioxidantes preserva a ação do FRDE em modelo experimental de aterosclerose<sup>156</sup>, já o uso simultâneo de lovastatina e probucol em pacientes com dislipidemia melhora significativamente a função endotelial após um ano de tratamento<sup>40</sup>. Ademais, em condições experimentais, o NO tem a capacidade de reduzir a peroxidação das LDL<sup>84,157</sup>.

Resumindo, o NO parece cumprir papel importante na proteção da parede vascular, através de sua propriedade vasodilatadora, antiagregante plaquetária, sua ação sobre monócitos e polimorfonucleares neutrófilos, as células de músculo liso vascular e, provavelmente, outros mecanismos, objeto de intensas pesquisas, podendo, portanto, implicar em opções terapêuticas, como o uso do precursor e doadores de NO na prevenção e no tratamento da doença aterosclerótica.

### Agradecimentos

À CAPES, ao Ministério de Educação e Cultura e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio financeiro.

### Referências

1. Vane JR, Ånggard EE, Botting RM - Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.
2. Davies MG, Hagen PO - The vascular endothelium: a new horizon. *Ann Surg* 1993; 218: 593-609.
3. Batlouni M, Ramires JA - Importância do endotélio na doença arterial coronária e na aterogênese. *Arq Bras Cardiol* 1994; 62: 255-70.
4. Rubanyi GM - Reversal of hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction by L-arginine. *Circulation* 1991; 83: 1118-20.
5. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H - Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. *J Clin Invest* 1993; 92: 652-62.
6. Abela GS, Picon PD, Friedl SE et al - Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1995; 91: 776-84.
7. Furchgott RF, Zawadzki JV - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
8. 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.
9. Cohen RA, Zitzman KM, Haudenschild CC, Cunningham LD - Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circ Res* 1988; 63: 903-10.
10. Shimokawa H, Vanhoutte PM - Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res* 1989; 64: 900-14.
11. Minor RL, Myers PR, Gerra RJ, Bates JN, Harrison DG - Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990; 86: 2109-16.
12. Galle J, Mülsch A, Busse R, Bassege E - Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of EDRF. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 198-203.
13. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S - Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454-6.
14. Kugiyama K, Bucay M, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD - Oxidized LDL impairs endothelium-dependent arterial relaxation. *Circulation* 1989; 80(suppl II): II-279.
15. Egashira K, Inou T, Hirooka Y et al - Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993; 91: 29-37.
16. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE - Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1468-74.
17. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP et al - Nitric Oxide activity in the human coronary circulation: the impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995; 95: 1747-55.
18. Preik M, Kelm M, Schoebel F et al - Selective impairment of nitric oxide dependent vasomotion in young adults with familiar hypercholesterolemia. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-513.
19. Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch M, Schofield PM - Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *Circulation* 1995; 92: I-K.
20. Clarkson P, Celermajer, Yue D et al - Endothelial dysfunction in insulin-dependent diabetes relates to the duration of disease and the LDL-cholesterol level. *Circulation* 1995; 92: I-107.
21. Lima VC, Newton GE, Cohen EA, Adelman AG - Persistent endothelial dysfunction after coronary intervention. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-294.
22. Goodfellow J, Ramsey MW, Luddington LA, Jones CJH, Lewis MJ, Henderson AH - Systemic endothelial dysfunction in patients with syndrome X. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-573.
23. Chauhan A, Mullins PA, Taylor G, Petch MC, Schofield PM - Endothelium-dependent and independent coronary vasodilatation in syndrome X. *Br Heart J* 1995; 73(suppl 3): 73.
24. Kugiyama K, Yasue H, Yoshito I, Okumura K - Deficiency in nitric oxide bioactivity at spasm sites of epicardial coronary arteries in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 130A.
25. Tousoulis D, Davies G, Lefroy DC, Haider AW, Crake T - Variable coronary vasomotor responses to acetylcholine in patients with normal coronary arteriograms: evidence for localized endothelial dysfunction. *Heart* 1996; 75: 261-266.
26. Goodfellow J, Ramsey MW, Luddington LA, Jones CJH, Lewis MJ, Henderson AH - Chronic heart failure (CHF) causes endothelial dysfunction in the absence of major risk factors for atheroma. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-574.
27. Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, Charbonneau F, Ganz P, Selwyn AP - Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at one year post-transplant. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-294.
28. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H - Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991; 338: 1546-50.

29. Cooke JP, Andon NA, Girerd XL, Hirsch AT, Creager MA - Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991; 83: 1057-62.
30. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME - Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90: 1168-72.
31. Dubois-Randé JL, Zelinsky R, Roudot F et al - Effects of infusion of L-arginine into the left anterior descending coronary artery on acetylcholine-induced vasoconstriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Am J Cardiol* 1992; 70: 1269-75.
32. Philis-Tsimikas A, Witztum JL - L-arginine may inhibit atherosclerosis through inhibition of LDL oxidation. *Circulation* 1995; 92: 1422-13.
33. Cissek MB, Morton T, Kappagoda T - Delayed L-arginine supplementation normalizes endothelial dysfunction. *Circulation* 1995; 92: 1-365.
34. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA - Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 844-50.
35. Otsuji S, Nakajima O, Waku S et al - Attenuation of acetylcholine-induced vasoconstriction by L-arginine is related to the progression of atherosclerosis. *Am Heart J* 1995; 129: 1094-100.
36. Penny W, Rockman H, Bhargava V et al - Improvement of endothelium-dependent coronary vasomotion by cholesterol lowering. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-513.
37. Leung WH, Lau CP, Wong CK - Beneficial effect of cholesterol-lowering on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic patients. *Lancet* 1993; 341: 1496-500.
38. Egashira K, Hirooka Y, Kai H, et al - Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolaemia. *Circulation* 1994; 89: 2519-24.
39. Treasure CB, Blein 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.
40. 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.
41. Mancini GBJ, Henry GC, Macaya C et al - Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease (TREND). *Circulation* 1996; 94: 258-65.
42. Schlaifer JD, Wargovich TJ, Pepine CJ, Mancini J, O'Neil B, Henry GC - Is coronary microvascular endothelial dysfunction reversible? Six month effects of quinapril on coronary flow. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 130A.
43. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S - Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 523-6.
44. Myers PR, Minor RL Jr, Guerra RJ, Bates JN, Harrison DG - Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990; 345: 161-3.
45. Moncada S, Higgs A - The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
46. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S - Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6.
47. Dinerman JL, Metha JL - Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 207-22.
48. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM - Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H1145-H7.
49. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS et al - Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994; 23(part 2): 1121-31.
50. Bhagat K, Vallance P - Inducible nitric oxide synthase in the cardiovascular system. *Heart* 1996; 75: 218-20.
51. Ignarro LJ - Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Res* 1989; 65: 1-21.
52. Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S - Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1986; 88: 411-15.
53. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S - Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 181-7.
54. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S - The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639-646.
55. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S - Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 7: 1057-8.
56. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ - Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 1981; 57: 946-55.
57. Gerzer R, Drummer C, Karenbrock B, Heim JM - Inhibition of platelet activating factor-induced platelet aggregation by molsidomine, SIN-1, and nitrates in vitro and ex vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14(suppl. 1): S115-S119.
58. Loscalzo J - Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. *Am J Cardiol* 1992; 70: 18B-22B.
59. Harker LA - Platelets and vascular thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 1006-7.
60. Schafer AI, Alexander RW, Handin RI - Inhibition of platelet function by organic nitrate vasodilators. *Blood* 1980; 55: 649-54.
61. De Caterina R, Giannesi D, Crea S et al - Inhibition of platelet function by injectable isosorbide dinitrate. *Am J Cardiol* 1984; 53: 1683-7.
62. Ahlner J, Andersson RGG, Alxelsson KL, Bunnfors I, Wallentin L - Effects of dipyridamole on the glyceryl trinitrate-induced inhibition of coronary artery muscle tone and platelet aggregation in relation to cyclic nucleotide metabolism. *Acta Pharmacol Toxicol* 1985; 57: 88-95.
63. De Caterina R, Giannesi D, Bernini W, Mazzone A - Organic nitrates: direct antiplatelet effects and synergism with prostacyclin. *Thromb Haemost* 1988; 59: 207-11.
64. Chirkov YY, Naujalis JL, Barber S et al - Reversal of human platelet aggregation, by low concentrations of nitroglycerin "in vitro" in normal subjects. *Am J Cardiol* 1992; 70: 802-6.
65. De Caterina R, Lombardi M, Bernini W et al - Inhibition of platelet function during in vivo infusion of isosorbide mononitrates: relationship between plasma drug concentration and hemodynamic effects. *Am Heart J* 1990; 119: 855-62.
66. Diodati J, Théroux P, Latour JG, Lacoste L, Lam JYT, Waters D - Effects of nitroglycerin at therapeutic doses on platelet aggregation in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990; 66: 683-8.
67. Lam JYT, Chesebro JH, Fuster V - Platelets, vasoconstriction and nitroglycerin during arterial wall injury: a new antithrombotic role for an old drug. *Circulation* 1988; 78: 712-16.
68. Yao SK, Akhtar S, Scott-Burden T et al - Endogenous and exogenous nitric protect against intracoronary thrombosis and reocclusion after thrombolysis. *Circulation* 1995; 92: 1005-10.
69. Maalej N, Albrecht R, Folts JD - The potent inhibitor effect of a novel nitrosated albumin coating on platelet spreading attachment and thrombosis on a collagen coated surface. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-239.
70. Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney Jr JF, Welch GN, Loscalzo J - Inhibition of neointimal proliferation after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 96: 2630-8.
71. Kaul S, Naqvi TZ, Fishbein MC, et al - Profound inhibition of arterial thrombosis by a novel oxide donor. *J Am Coll Cardiol* 1995; Jan Special issue: 34A.
72. Kaul S, Naqvi TZ, Cercek B et al - Profound inhibition of arterial-injury induced thrombosis in normal and hypercholesterolemic humans by nitric oxide donors: an ex-vivo study. *Circulation* 1995; 92: I-422.
73. Adams MR, Robinson FJ, Jessup W, Celermajer DS - Oral L-arginine in humans: effect on platelet aggregation, hemodynamics and endothelium-dependent dilatation. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-138.
74. Adams MR, Forsyth CJ, Jessup W, Robinson J, Celermajer DS - Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in young men. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1054-61.
75. Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ et al - Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 1994; 344: 1458-60.
76. Langford EJ, Wainwright RJ, Martin JF - Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 51-5.
77. Komamura K, Node K, Kosaka H, Inoue M - Endogenous nitric oxide inhibits microthromboembolism in the ischemic heart. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-345.
78. Provost P, Lam JYT - N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine Methyl Ester increases mural platelet deposition and neutrophil-endothelial interactions under low and high shear conditions. *J Am Coll Cardiol* 1995; special issue: 84A.
79. Chen L, Mehta JL - High density lipoprotein antagonizes the stimulatory effect of low density lipoprotein on platelet function by affecting L-arginine-nitric oxide pathway. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-30.
80. Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Renhardt P, Kubes P - Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 1993; 265: H862-7.
81. Pagano PJ, Totenheim K, Cohen RA - Superoxide anion production by thoracic aorta: effect of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Physiol* 1993; 265: H707-12.
82. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall A - Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-4.
83. Hogg N, Darley-Usmar, Graham A, Moncada S, Kalyanaram B - The modification of low density lipoprotein (LDL) by peroxynitrite and systems generating nitric oxide (NO) and superoxide. *Free Rad Biol Med* 1993; 15: 495.

84. Hogg N, Parthasarathy S, Kalyanaraman B - Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 1993; 15: 495.
85. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S - Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide: potencial role in atherogenesis. *FEBS Lett* 1993; 334: 170-4.
86. Radi R, Robbo H, Freeman - The double-edged action of nitric oxide on free radical-mediated. *Ciência e Cultura. Journal of the Brazilian Association for the advancement of Science* 1995; 47: 288-96.
87. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB - Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992; 90: 1116-21.
88. Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A et al - Supplementation of hypercholesterolemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 1995; 117: 273-84.
89. Drenger B, Aleskowitz TD, Flavahan NA - Dysfunction of the endothelial Gi-protein causes increased production of superoxide anion from porcine endothelial cells. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-355.
90. Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison - Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol* 1991; 260: C219-C25.
91. Omar HA, Cherry PD, Mortelliti MP, Burke-Wolin T, Wolin MS - Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and independent nitrovasodilator relaxation. *Circ Res* 1991; 69: 601-8.
92. Meng YY, Trachtenburg J, Ryan U, Abendschein - Potentiation of endogenous nitric oxide with superoxide dismutase inhibits platelet-mediated thrombosis in injured and stenotic arteries. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 269-75.
93. Johnston TS, Harrison DG, Klein L et al - Xanthine-oxidase inhibition improves coronary endothelium-mediated relaxation in patients with early atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1995; special issue: 115A.
94. Ammar Jr RF, Gutterman DD, Delisperger KC - Topically applied superoxide dismutase and catalase normalize coronary arteriolar responses to acetylcholine in diabetes mellitus in vivo. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-574.
95. Garcia CE, Kilcoyne CM, Cardillo C, Cannon III RO, Quyyumi AA, Panza JA - Evidence that endothelial dysfunction in patients with hypercholesterolemia is not due to increased extracellular nitric oxide breakdown by superoxide anions. *Am J Cardiol* 1995; 76: 1157-61.
96. Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ - Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1591-601.
97. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O - Endothelial-leukocyte adhesion Molecules in Human disease. *Ann Rev Med* 1994; 45: 361-78.
98. Zand T, Nunnari JJ, Hoffman AH et al - Endothelial adaptations in aortic stenosis. Correlations with flow parameters. *Am J Pathol* 1988; 133: 407-18.
99. Moilanen E, Vuorinen P, Kankaanranta H, Metsä-Ketelä T, Vapaatalo H - Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 852-8.
100. De Caterina R, Shin WS, Liao JK, Libby P - Nitric oxide inhibits cytokine-induced expression of endothelial leukocyte adhesion molecules. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-29.
101. Tsao PS, Lewis NP, Wang B, Cooke JP - Flow-induced nitric oxide inhibits monocyte adhesion to endothelial cells. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-29.
102. Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP - Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89: 2176-82.
103. Neibauer J, Candipan RC, Wang B et al - Endothelium-derived nitric oxide attenuates monocyte-endothelial interaction in chronic hypercholesterolemia. *Circulation* 1995; 92: 1-422.
104. Tsao PS, Wang B, Chan JR, Cooke JP - Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits lipid and cytokine-induced monocyte-endothelial cell interactions. *Circulation* 1995; 92: 1-422.
105. Spiecker M, Darius H, Hübner F, Fisch A, Kaboth K, Meyer J - Nitric oxide donors inhibit cytokine induced adhesion molecule expression on human endothelial cells. *Circulation* 1995; 92: 1-506.
106. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM - Nitric oxide regulates VCAM-1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in vascular endothelial. *Circulation* 1995; 92: 1-506.
107. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo J, Lefler AM - Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1652-9.
108. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R - Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76: 981-6.
109. Lio JK, Peng HB, Rajavashisth TB, Libby P - Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in endothelial cells. *Circulation* 1995; 92: 1-506.
110. Garg UC, Hassid A - Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-7.
111. Rolland PH, Latrille V, Ghiringhelli O et al - Chronic treatment of atherosclerotic minipigs with isosorbide dinitrate inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces nitric oxide-synthase in endothelial cells. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-29.
112. Seki J, Nishio M, Kato Y, Motoyama Y, Yoshida K - FK 409, a new nitric oxide donor, suppresses smooth muscle proliferation in the rat model of balloon angioplasty. *Atherosclerosis* 1995; 117: 97-116.
113. Kaul S, Regnstrom J, Lake JP et al - Marked effects of locally derived nitric oxide donor. *Circulation* 1995; 92: 1-1232.
114. Lee JS, Adrie C, Jacob HJ, Roberts JD, Zapol WM, Bloch KD - Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointima formation after balloon arterial injury in rats. *Circulation* 1995; 92: 1-232.
115. Kolpakov V, Gordon D, Kulik TJ - Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 76: 305-9.
116. Rizvi MAD, Myers PR - Nitric oxide modulates endothelin-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen. *Circulation* 1995; 92: 1-232.
117. Cayatte AJ, Palcino JJ, Horten K, Cohen RA - Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 753-9.
118. Naruse K, Shimizu M, Muramatsu M, et al - Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 746-52.
119. Iturry YGR, Teixeira JE, Germiniani H, Boaretti AC, Marquetti PR, Barbosa JE - Análise da atividade anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida *in vitro*. *Arq Bras Cardiol* 1994; 63(suppl 1): 91.
120. Sims PJ, Wiedmer T - The reponse of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol Today* 1991; 12: 338-42.
121. Seifert PS, Kazatchkine MD - The complement system in atherosclerosis. *Atheroscler* 1988; 7: 91-104.
122. Irokawa M, Nishinaga M, Funayama H, Shimada K - The effect of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) on anticoagulant heparan sulfate on cultured vascular endothelial cell (EC). *Circulation* 1994; 90 (part 2): 1-396.
123. Constantini P - Plaque fissures in human coronary thrombosis. *J Atheroscl Res* 1966; 6: 1-17.
124. Davies MJ, Thomas AC - Plaque-fissuring the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53: 363-73.
125. Weindinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI et al - Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation* 1990; 81: 1667-79.
126. Myers PR, Weibel RR, Thondapu VR et al - Vascular nitric oxide synthase activity following coronary artery balloon injury in a porcine restenosis model. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-139.
127. Groves PH, Banning AP, Studer R, Lewis MJ, Cheadle HA, Drexler H - Constitutive Nitric oxide synthase gene expression is normalized with endothelial regeneration following balloon angioplasty. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-298.
128. Srivatsa SS, Pollock JS, Edwards WD, Simari RD, Schwartz RS - Nitric oxide synthase is prominently expressed in neointimal hyperplasia following experimental vascular injury. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-298.
129. Koide M, Kawahara Y, Tsuda T, Nakayama I, Yokoyama M - Expression of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1994; 23: 145-18.
130. Joly GA, Schini VB, Vanhoutte PM - Balloon injury and interleukin-1 beta induce nitric oxide synthase activity in rat carotid arteries. *Circ Res* 1992; 71: 331-8
131. Hansson GK, Geng Y, Holm J, Hårdhammar P, Wennmalm A, Jennische - Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J Exp Med* 1994; 180: 733-8.
132. Ohkawa F, Yamamoto K, Kambe T, Kawahara Y - Effect of various inflammatory cytokines on nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-34.
133. Durante W, Liao L, Schafer AI - Differential regulation of L-arginine transport and inducible nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995; 268: H1158-64.
134. Banning AP, Black P, Penny WJ, Newby AC, Lewis MJ - Endothelial nitric oxide production following balloon angioplasty. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-575.
135. Nowak J, Benthin G, Wennmalm A - Local formation of nitric oxide is transiently enhanced following vascular injury: evidence of a new mechanism for regulation of nitric oxide synthase activity. *Circulation* 1994; 90(part 2): 1-574.
136. McNamara DB, Bedi B, Aurora H et al - L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 193: 291-6.
137. Wang BY, Singer AH, Tsao PS, Drexler H, Kosek J, Cooke JP - Dietary arginine prevents atherogenesis in coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 452-8.

138. Candipan RC, Wang B, Buitrago R, Tsao P, Cooke JP - Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 44-50.
139. Preik-Steinhoff H, Zink S, Rosen P, Kelm M - Transport of L-arginine in endothelial cells. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-34.
140. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL - Arginine depletion induces oxygen free radical generation from nitric oxide synthase in intact cells. *Circulation* 1995; 92: I-562.
141. Jeremy RW, McCarron H, Sullivan D - Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilation in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation* 1996; 94: 498-506.
142. Ziche M, Morbidelli L, Mansini E, Granger H, Geppetti P, Ledda F - Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from postcapillary venules. *J Clin Invest* 1993; 192: 1198-203.
143. Ziche M, Morbidelli L, Masini E et al - Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994; 94: 2036-44.
144. Guo J, Lefer AM - Stimulatory effect of nitric oxide donor, CAS754, on vascular endothelial cell proliferation. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-141.
145. Guo J, Murohara T, Panday MM, Lefer AM - Nitric promotes endothelial cell proliferation: role in inhibiting restenosis. *Circulation* 1995; 92: I-750.
146. Flavahan NA - Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 1992; 85: 1927-38.
147. Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA - Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest* 1990; 86: 75-9.
148. Jacobs M, Plane F, Bruckdorfer KR - Native and oxidized low-density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium-derived relaxing factor in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 1990; 100: 21-6.
149. Tomita T, Ezaki M, Miwa M, Nakamura K, Inoue Y - Rapid and reversible inhibition by low density lipoprotein of the endothelium-dependent relaxation to hemostatic substances in porcine coronary arteries. Heat and acid labile factors in low density lipoprotein mediate the inhibition. *Circ Res* 1990; 66: 18-27.
150. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB - Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 1992; 89: 10-18.
151. Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Luscher TF - Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 1991; 83: 2012-20.
152. Pohl U, Heydari N, Dalle J - Effects of LDL on intracellular free calcium and nitric oxide-dependent cGMP formation in porcine endothelial cells. *Atherosclerosis* 1995; 117: 169-78.
153. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark S - Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270: 319-24.
154. Miki N, Hirata KI, Kuroda Y et al - Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine up regulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-407.
155. Hirata KI, Miki N, Kuroda Y, Sakoda T, Kawashima S, Yokoyama M - Low concentrations of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine up-regulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76: 958-62.
156. Keaney Jr JF, Xu A, Cunningham DG, Frei B, Vita JA - Limiting vascular oxidative stress-improved EDRF action in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1994; 90(part 2): I-626.
157. Mao S, Yates M, Lambert L et al - Nitric oxide protects the oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. *FASEB J* 1992; 6: A1030.