

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**Elevação dos níveis séricos de endotelina-1  
após implante de stent coronariano em humanos:  
um marcador de disfunção endotelial  
não associado à reestenose**

**Sandro Cadaval Gonçalves**

Orientador: Prof. Dr. Marco V. Wainstein  
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

*Dissertação de  
Mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde: Cardiologia e Ciências  
Cardiovasculares para obtenção do  
título de Mestre em Cardiologia*

**Porto Alegre**

**2003**

*A minha esposa, Andrea.*

## **Agradecimentos**

*Ao professor e amigo, Paulo Picon, pelo incentivo constante e pelo exemplo de caráter e ética profissional;*

*ao brilhante professor Flávio Fuchs por ter-me conduzido nos primeiros passos da iniciação científica;*

*aos amigos Andry Fiterman Costa e Guilherme Sander pelo companheirismo e auxílio técnico;*

*ao professor Jarbas de Oliveira, pelos ensinamentos na técnica de ELISA e pelo inestimável trabalho de análise bioquímica;*

*ao professor Mário Wagner pelo auxílio na análise estatística*

*a Sra. Indara Saccilotto pela competência, boa-vontade e constante disposição em ajudar;*

*à professora Nadine pelo incessante estímulo;*

*ao Doutor Nilton Brandão da Silva pelo exemplo de competência;*

*a todos os funcionários do Setor de Hemodinâmica do HCPA pela colaboração no trabalho;*

*a todos os pacientes que gentilmente concordaram em participar deste estudo;*

*ao professor Jorge Pinto Ribeiro, por sua competente ajuda estratégica em várias situações;*

*ao professor Marco Wainstein pelo dedicado e incansável trabalho de orientação neste projeto.*

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| Lista de Tabelas .....                          | 5  |
| Lista de Figuras .....                          | 6  |
| Resumo .....                                    | 7  |
| Abstract .....                                  | 9  |
| Capítulo I: Introdução .....                    | 10 |
| Capítulo II: Objetivos .....                    | 12 |
| Capítulo III: Material e métodos .....          | 13 |
| Capítulo IV: Resultados .....                   | 17 |
| Capítulo V: Discussão .....                     | 22 |
| Capítulo VI: Conclusões .....                   | 25 |
| Referências Bibliográficas .....                | 26 |
| Anexo I: Termo de Consentimento Informado ..... | 30 |
| Anexo II: Artigo em inglês .....                | 34 |

## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Características demográficas e basais dos grupos em estudo ..... **11**

**Tabela 2:** Características angiográficas..... **13**

**Tabela 3:** Efeito da endotelina-1 (ET-1) na perda luminal tardia (PLT) obtido em modelo de regressão linear múltipla..... **18**

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Evolução dos valores de endotelina (ET-1) segundo grupos em estudo (com e sem reestenose)..... **14**

**Figura 2:** Gráficos de dispersão de pontos entre a endotelina-1 em diferentes momentos e a perda luminal tardia..... **15**

## Resumo

**Introdução:** A reestenose intra-stent ocorre basicamente por uma resposta proliferativa da parede vascular à lesão. Além de ser um marcador de disfunção endotelial, a endotelina-1 (ET-1) exerce atividade proliferativa sobre as células musculares lisas. Evidências experimentais sugerem que a ET-1 possa contribuir para fisiopatogenia da reestenose. Porém, a relação entre os níveis de ET-1 com o implante de stent coronariano e a reestenose intra-stent em humanos não está definida.

**Objetivo:** Avaliar o comportamento dos níveis plasmáticos da ET-1 em pacientes submetidos a implante de stent coronariano e determinar se há associação desses com a ocorrência de reestenose.

**Métodos:** Foram incluídos 41 pacientes (44 stents), encaminhados para revascularização coronariana eletiva com implante de stent, por indicação da equipe assistente. Os níveis séricos de ET-1 foram dosados pelo método de ELISA antes do procedimento, logo após e seis meses após o procedimento, quando se realizou nova angiografia quantitativa para avaliar a presença de reestenose. Os níveis de ET-1 foram comparados nos grupos com e sem reestenose e correlacionados com a perda luminal tardia.

**Resultados:** A incidência de reestenose angiográfica foi de 41%. Ocorreu um aumento significativo da ET-1 logo após o procedimento em ambos os grupos ( $P < 0,001$ ), retornando a valores semelhantes aos basais no sexto mês. Não houve diferença significativa entre os grupos com e sem reestenose quanto aos valores de ET-1 em nenhum dos momentos analisados. Não houve correlação entre os níveis de ET-1 e a perda luminal tardia.

**Conclusões:** Ocorre um aumento significativo dos níveis de ET-1 após o implante de stent, possivelmente por ser a ET-1 um marcador da disfunção endotelial provocada pela lesão.

Entretanto, não houve uma associação entre os níveis de ET-1 e a ocorrência de reestenose pós-stent em humanos.



**Abstract**

**Background:** Experimental evidence suggests that endothelin-1 (ET-1) levels may play a role in the occurrence of restenosis following percutaneous revascularization procedures. However, the relationship between serum ET-1 with coronary stent implantation and restenosis in humans is not well defined yet. The objective of this study was to evaluate the serum levels of ET-1 in patients submitted to coronary stenting and to determine if there is an association between ET-1 levels and the occurrence of in-stent restenosis.

**Methods:** 41 patients (44 stents) submitted to elective coronary stent implantation were included in the study. Serum ET-1 levels were measured right before and after the procedure and after 6 months. ET-1 levels were compared in patients with and without restenosis and correlated with late luminal loss.

**Results:** The incidence of restenosis was 41%. A significant increase in ET-1 levels right after the procedure was observed in both groups ( $P < 0.001$ ), with return to basal values after 6 months. No difference was observed between the groups, with and without restenosis, in ET-1 levels pre-procedure, post-procedure or at 6-months. No correlation was observed between late luminal loss and ET-1 levels.

**Conclusions:** There is a significant increase in ET-1 levels right after coronary stenting, probably as a marker of endothelial dysfunction associated arterial lesion. However, there was no association between ET-1 levels and in-stent restenosis in humans.

## Capítulo I

### Introdução

O implante de stent coronariano é um procedimento cada vez mais frequentemente utilizado em todo o mundo. Entretanto, a recorrência da lesão intra-stent (reestenose) é uma das principais limitações ao sucesso desta técnica (1). A reestenose intra-stent é uma resposta cicatricial à lesão provocada pela distensão da parede vascular. Neste local, a partir do estímulo de citocinas e de diversos fatores quimiotáticos e mitogênicos, ocorrem migração e proliferação de células musculares lisas, com importante produção de colágeno e matriz extracelular, dando origem à camada neoíntima que reduz o lúmen arterial (2-4). A necessidade de novos procedimentos de revascularização devidos à reestenose intra-stent acarreta custos e morbidade elevados. As tentativas de combate à reestenose são inúmeras, geralmente com resultados promissores nos modelos animais, mas sem uma adequada investigação em humanos ou com resultados menos impressionantes nestes (5).

A endotelina-1 (ET-1), liberada pelo endotélio vascular, células musculares lisas e macrófagos, possui potentes propriedades vasoconstritoras e proliferativas sobre a musculatura lisa vascular (6-7). Foi demonstrado que a ET-1 está fortemente relacionada ao controle do tônus coronariano, sendo responsável pela quase totalidade do tônus no local da placa aterosclerótica (7). Concentrações plasmáticas elevadas de ET-1 podem estar associadas à disfunção endotelial (8-11) e à progressão de lesões ateroscleróticas (12-14).

Em um modelo experimental de angioplastia com balão em porcos, Katwa et al. (15) demonstraram elevação dos níveis teciduais de ET-1 e aumento da densidade dos receptores ET(A) nos sítios do procedimento. A infusão de ET-1 intensificou a formação neointimal provocada pela angioplastia em carótidas de ratos (16,17), enquanto o bloqueio dos receptores ET(A) por diferentes agentes, em modelos experimentais, resultou em diminuição

na formação de camada neointima (18-21). Em pacientes submetidos à angioplastia por balão também foi demonstrada elevação dos níveis plasmáticos de ET-1, desde os dois primeiros minutos após a lesão, com retorno gradual aos valores iniciais nas próximas horas (22-26). O comportamento da ET-1 em pacientes submetidos a implante de stent coronariano é alvo de investigação. Em dois estudos (27-28) não houve aumento significativo após o procedimento, enquanto Hojo et al. (29), num subgrupo de 19 pacientes, encontraram elevação semelhante a que ocorreu durante a angioplastia por balão e aterectomia rotacional. Também não está definida a contribuição da ET-1 no processo de reestenose intra-stent em seres humanos.

## Capítulo II

### Objetivos

- 1) Avaliar o comportamento dos níveis plasmáticos da ET-1 em pacientes submetidos a implante de stent coronariano.
- 2) Determinar se há associação entre os níveis de ET-1 e a ocorrência de reestenose intra-stent em humanos em seis meses.

## Capítulo III

### Materiais e Métodos

**Seleção dos pacientes:** Foram convidados a participar do estudo pacientes encaminhados ao Laboratório de Hemodinâmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para serem submetidos à revascularização coronariana percutânea eletiva com implante de stent no período de janeiro a julho de 2002. A indicação do procedimento ficou exclusivamente a critério dos respectivos médicos assistentes. Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com angina estável ou isquemia detectável por teste funcional, com idade entre 18 e 75 anos, que concordaram em participar, assinando termo de consentimento informado. Os critérios de exclusão do estudo foram: gestação, síndromes coronarianas agudas nas últimas duas semanas, insuficiência cardíaca em classe funcional III ou IV no dia do exame, diagnóstico de neoplasias e doenças inflamatórias do colágeno. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado.

**Protocolo do estudo:** Este foi um estudo observacional, prospectivo, tipo coorte. Enquanto os pacientes aguardavam o procedimento, o protocolo do estudo era explicado e, caso concordassem em participar, era fornecido o termo de consentimento informado. Estudantes treinados aplicavam um questionário padronizado e coletavam dados do prontuário. As definições das patologias prévias dos pacientes foram feitas de acordo com as informações fornecidas pelo próprio paciente, pelos fármacos em uso (como hipoglicemiantes orais, hipolipemiantes ou anti-hipertensivos), pelos registros no prontuário e, eventualmente, através de contato direto com o médico assistente. O uso de fármacos como ácido acetilsalicílico, ticlopidina, clopidogrel, heparina e antagonistas dos receptores IIB/IIIA

foi feito de acordo com as rotinas e indicações do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. No início do procedimento, era coletada, em tubos com EDTA, amostra de sangue da bainha arterial (valor de ET-1 pré-procedimento) e repetida a coleta logo após o término da intervenção (ET-1 pós-procedimento). O sangue era centrifugado e o plasma congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Caso não ocorresse indicação clínica anterior, os pacientes eram submetidos à nova coronariografia em 6 meses. Nesse momento, outra amostra de sangue arterial era coletada, centrifugada e congelada (ET-1 6 meses).

**Análise angiográfica:** Todos os pacientes foram avaliados por angiografia quantitativa (GE System®, EUA), utilizando-se o mesmo aparelho e projeções, mantendo-se constantes a altura da mesa e do intensificador de imagem. A quantificação das imagens foi feita por um dos investigadores (M.V.W), que não conhecia os níveis de endotelina. A magnificação da imagem foi de sete polegadas em todos os casos. As variáveis angiográficas analisadas foram: diâmetro de referência do vaso tratado; grau de estenose (percentual) pré-revascularização; extensão da lesão; diâmetro luminal mínimo (DLM) nos três momentos (pré-procedimento, pós-procedimento e em 6 meses); perda luminal tardia (PLT) (considerada como a diferença entre o DLM pós-procedimento e o DLM em 6 meses); e grau de estenose intra-stent em 6 meses (reestenose). A definição de reestenose utilizada para classificar os pacientes em dois grupos, com e sem reestenose, foi considerada a presença de estenose no local da intervenção igual ou superior a 50% na angiografia de controle em seis meses após o procedimento.

**Análise bioquímica:** A dosagem de endotelina-1 foi feita pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), com amostras em duplicata, por profissionais experientes com o método. Após serem descongeladas, as amostras de plasma foram diluídas em solvente de extração (acetona, ácido hidrolórico e água) e centrifugadas. O material

sobrenadante foi liofilizado em centrífuga evaporadora durante aproximadamente 6 horas e o ensaio realizado imediatamente após este processo. Os reagentes foram adicionados conforme as rotinas especificadas pelo fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, EUA), seguido da leitura de densidade óptica (sensibilidade < 1.0 pg/ml, com coeficiente de variação médio intra e interensaios de 4,2 e 5,1%, respectivamente). As análises de endotelina-1 foram realizadas sem o conhecimento das análises angiográficas.

**Análise estatística:** Os dados quantitativos são apresentados como média e desvio padrão. As diferenças entre as médias das variáveis angiográficas contínuas foram analisadas pelo teste-T de Student. Os níveis séricos de ET-1 nos três momentos e as variáveis angiográficas contínuas (DLM, PLT) foram avaliadas por análise de variância de dupla entrada para medidas repetidas (ANOVA). Por apresentarem uma distribuição com leve assimetria positiva, os níveis de ET-1 foram também analisados após transformação logarítmica, não se observando diferenças substanciais em relação ao procedimento tradicional. Assim, segundo recomendação de Montgomery (30), optou-se pela apresentação dos resultados não transformados.

A proporção de reestenose binária, considerada como presença de estenose igual ou superior a 50% na angiografia de controle aos seis meses, foi tratada como variável categórica. A análise desta variável e de outras de mesmo nível de mensuração foi realizada pelo teste de qui-quadrado e, quando indicado, pelo teste exato de Fisher. A descrição das associações entre variáveis quantitativas foi inicialmente avaliada com a utilização do coeficiente de correlação de Pearson. Para avaliação do efeito conjunto dos diversos fatores em estudo sobre a endotelina utilizou-se a análise de regressão linear múltipla.

Para detectar uma diferença de duas unidades de ET-1, considerando-se alfa em 5% e poder de 80%, determinou-se a necessidade de pelo menos 11 pacientes com reestenose. Prevendo-se uma perda de até 12% por não realização da angiografia de controle e

estimando-se uma incidência de 25% de reestenose angiográfica, o tamanho da amostra foi calculado em 50 pacientes. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 10.0.



## Capítulo IV

### Resultados

Aceitaram participar do estudo 50 pacientes. Nove pacientes (18%) foram excluídos da análise devido aos seguintes motivos: cinco por terem desistido de submeterem-se à angiografia de controle; três por óbito antes do retorno (um paciente por isquemia mesentérica e dois por morte súbita cardíaca) e um paciente que foi submetido à revascularização miocárdica cirúrgica de urgência com análise angiográfica fora dos padrões do protocolo do estudo, totalizando 41 pacientes. Em três casos foi implantado mais de um stent, perfazendo um total de 44 stents analisados.

As características clínicas e demográficas basais dos 41 pacientes estão descritas na Tabela 1. De acordo com o critério angiográfico empregado, os pacientes foram divididos em dois grupos: com e sem reestenose. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das variáveis clínicas avaliadas. Foi observada alta prevalência de diabetes melito, tanto nos pacientes com reestenose (55,6%) como no grupo livre de reestenose (36,4%).

Tabela 1: Características demográficas e basais dos grupos em estudo

| Variável           | Total<br>n=41 | Reestenose<br>n=18 | S/reestenose<br>n=23 | P    |
|--------------------|---------------|--------------------|----------------------|------|
| idade. anos        | 61,5±8,9      | 62,9±8,5           | 60,2±9,3             | 0,34 |
| sexo masculino.(%) | 27 (67,5)     | 11 (64,7)          | 16 (69,6)            | 0,99 |
| diabete.(%)*       | 18 (45,0)     | 10 (55,6)          | 8 (36,4)             | 0,37 |
| hipertensão.(%)    | 31 (77,5)     | 14 (77,8)          | 17 (77,3)            | 0,99 |
| dislipidemia.(%)   | 22 (57,9)     | 10 (55,6)          | 12 (60,0)            | 0,99 |
| fumo.(%)           | 25 (62,5)     | 10 (55,6)          | 15 (68,2)            | 0,62 |

Os dados são descritos como média±desvio padrão ou frequência (percentual).

Conforme descrito na Tabela 2, em dezoito dos 44 stents analisados (41%) houve reestenose angiográfica. O tempo médio de retorno para controle angiográfico foi de 5,8 meses. As médias dos diâmetros de referência dos vasos submetidos a implante de stent demonstram que ambos os grupos apresentavam artérias de calibre relativamente pequeno. A revascularização do vaso-alvo tratado (reestenose clínica) ocorreu em 22% dos casos.

Excluído: ¶

Excluído: taxa de necessidade de

Excluído: foi de

Tabela 2: Características angiográficas

| Variável                    | Total       | Reestenose | S/reestenose | P     |
|-----------------------------|-------------|------------|--------------|-------|
|                             | n=44 stents | N=18       | n=26         |       |
| diâmetro de referência. mm  | 2,7±0.6     | 2,6±0.6    | 2,7±0.7      | 0,66  |
| extensão. mm                | 14,0±5.5    | 15,1±5.9   | 12,8±4,9     | 0,28  |
| diâmetro luminal mínimo. mm | 0,79±0.5    | 0,78±0,5   | 0,80±0,5     | 0,86  |
| % estenose pré-procedimento | 72±16       | 74±18      | 71,5±15,8    | 0,69  |
| ganho agudo. mm             | 1,75±0.5    | 1,65±0,5   | 1,8±0,5      | 0,30  |
| % estenose em 6 meses       | 42±24       | 65±13      | 27±17        | <0,01 |
| perda luminal tardia. mm    | 0,94±0.7    | 1,5±0,4    | 0,6±0,5      | <0,01 |

Os dados são descritos como média±desvio padrão.

Houve um aumento significativo dos níveis de ET-1 em ambos os grupos após o implante de stent, com retorno aos valores basais em seis meses, conforme demonstra a Figura 1 ( $P < 0,01$  para tempo). Porém, a variação entre os dois grupos mostrou-se similar, não havendo um pico maior de ET-1 após o procedimento no grupo que desenvolveu reestenose.

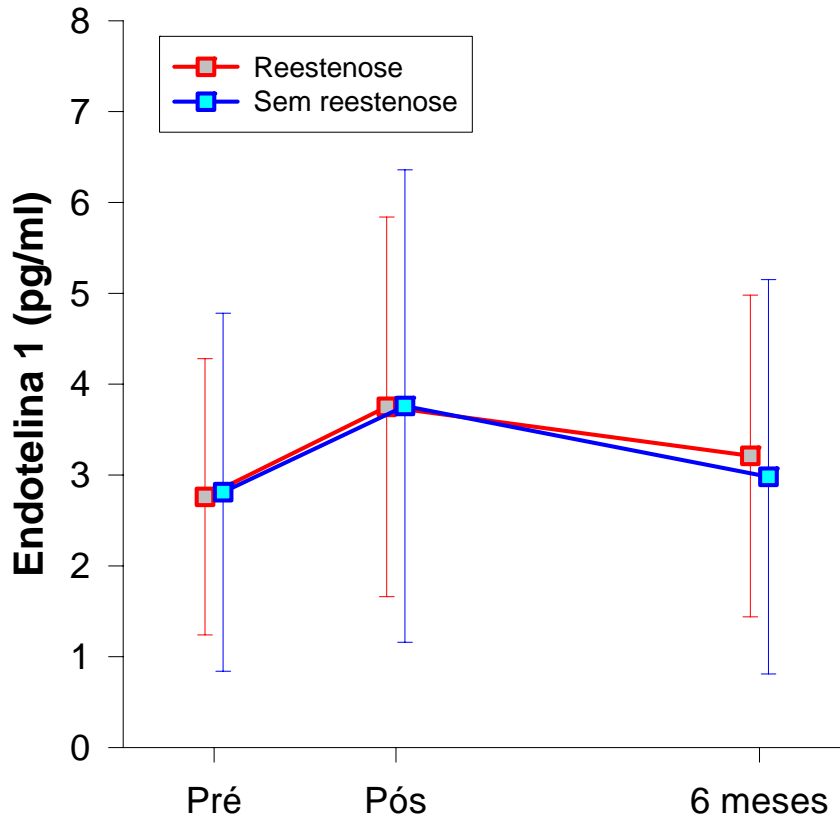


Figura 1. Evolução dos valores de endotelina-1 (ET-1) segundo grupos em estudo (reestenose vs sem reestenose),  $n=44$  stents. ANOVA de medidas repetidas:  $P_{tempo} < 0,01$ ;  $P_{interação} = 0,87$ ;  $P_{grupo} = 0,96$ .

Os valores de ET-1, determinados em qualquer dos momentos do estudo (pré-procedimento, pós-procedimento e em seis meses), não apresentaram associação significativa com a ocorrência de reestenose. Em um modelo de regressão linear múltipla, no qual a variável dependente era a perda luminal tardia e as variáveis independentes eram os valores de ET-1, a presença de diabetes melito e o diâmetro de referência do vaso, não se encontrou associação significativa (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito da endotelina-1 (ET-1) na perda luminal tardia (PLT) obtido em modelo de regressão linear múltipla, n=44 stents

| Variável                      | b     | P    |
|-------------------------------|-------|------|
| pré-stent                     | -0,02 | 0,78 |
| pós-stent                     | -0,03 | 0,58 |
| 6º mês                        | 0,02  | 0,79 |
| delta (pós-stent – pré-stent) | -0,07 | 0,61 |
| valor máximo                  | -0,02 | 0,82 |
| valor médio                   | -0,01 | 0,82 |

b: coeficiente linear representando o efeito na perda luminal tardia (PLT) para um aumento de uma unidade no valor da endotelina 1 (ET-1), ajustado para diabetes e diâmetro de referência.

A Figura 2 ilustra o teste de correlação de Pearson entre os valores de ET-1 nos três momentos estudados com a PLT, demonstrando não haver correlação significativa entre estes.

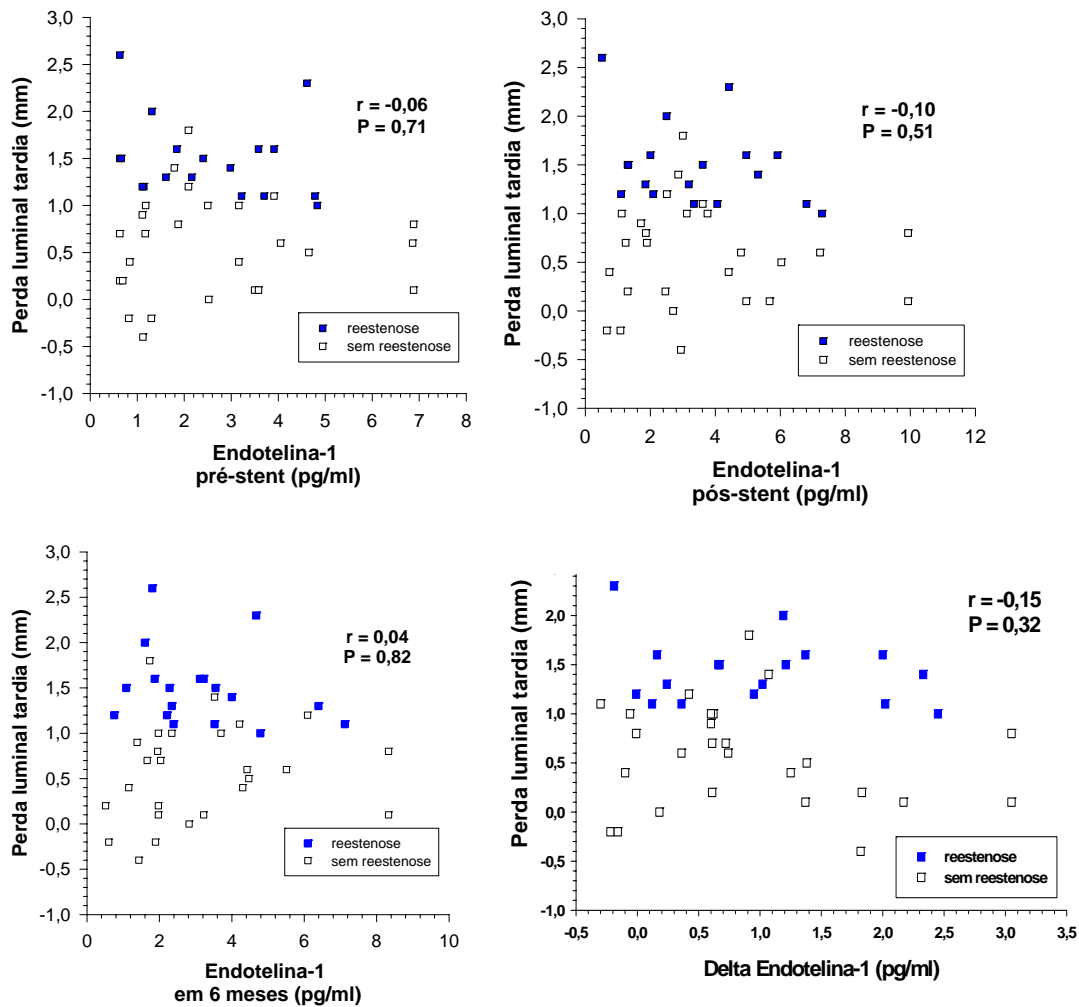


Figura 2: Gráficos de dispersão de pontos entre a endotelina-1 em diferentes momentos e a perda luminal tardia

## Capítulo V

### Discussão

Este estudo evidenciou uma elevação significativa dos níveis de ET-1 após o implante de stent em humanos. Conforme nossa revisão da literatura, esta foi a maior amostra de pacientes avaliados para se determinar a associação entre ET-1 e o implante de stent. Foi também o primeiro trabalho que avaliou prospectivamente a ET-1 como fator preditivo de reestenose intra-stent. Apesar da elevação sérica inicial, não houve associação entre a ET-1 e a ocorrência de reestenose em 6 meses.

As características clínicas e angiográficas da amostra estudada, bem como a alta prevalência de diabetes melito e o pequeno diâmetro de referência dos vasos analisados, justificam a incidência de 41% reestenose encontrada em nosso estudo (2). Apesar da proporção de pacientes com diabetes melito ter sido maior no grupo com reestenose (55,6% vs. 36,4%), não houve associação entre a presença de diabetes e reestenose, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes em cada grupo. Embora não tenha ocorrido associação entre os níveis de ET-1 e a reestenose intra-stent, a incidência de reestenose na amostra estudada, superior a nossa expectativa inicial, contribuiu para aumentar o poder desta análise.

O endotélio é um órgão dinâmico que regula o tônus vascular, a homeostasia local e o processo “fibro-inflamatório-proliferativo”. Dentre as substâncias liberadas pelo endotélio, em resposta a diferentes estímulos, destacam-se o óxido nítrico e a ET-1 (31,32). Apesar de outros estudos que avaliaram o comportamento da ET-1 após implante de stent terem apresentado resultados controversos (27-29), nossos achados confirmam a hipótese de que, assim como já havia sido demonstrado para a angioplastia por balão (24,25), também após o implante de stent ocorre um aumento na liberação de ET-1. A detecção da disfunção endotelial pode ser feita por testes de quantificação da capacidade vasomotora endotélio-

dependente (33,34) ou pela dosagem de marcadores biológicos, como a ET-1 (9). Assim, a elevação significativa dos níveis de ET-1 pode ser interpretada como um marcador de disfunção endotelial secundária à lesão provocada pelo stent.

Todas as formas de revascularização percutânea produzem lesão endotelial, sendo a resposta arterial à lesão um elemento-chave na patogênese da reestenose (35). Foi demonstrado que a função endotelial pode permanecer cronicamente afetada após a lesão provocada por procedimentos de revascularização percutâneos, sendo mais intensa em pacientes que receberam stents do que nos tratados por angioplastia por balão ou aterectomia direcional (36). O implante de stent produz disfunção endotelial microvascular, demonstrada pela análise do fluxo coronariano, com diminuição da resposta vasodilatadora à infusão intracoronariana de acetilcolina (37). O retorno para valores semelhantes aos basais em seis meses encontrado em nosso estudo sugere que a ET-1 seja um marcador da disfunção endotelial provocada pelo implante de stent de forma aguda, não mais detectável por este método na circulação sistêmica tardiamente, ou que possa haver uma recuperação ainda que parcial da função endotelial ao longo do tempo.

Estudos sugerem que a ET-1 é liberada pelo endotélio e placa aterosclerótica em resposta à lesão tecidual e não pelo músculo isquêmico (28,38) uma vez que as concentrações são maiores no sítio distal à lesão do que no seio coronariano. Uma das limitações do nosso estudo é o fato da ET-1 ter sido dosada em amostras de sangue arterial periférico, e não em seio coronariano ou em sítio intracoronariano distal à lesão. Nesses locais, devido à proximidade entre o sítio de liberação da ET-1 e o ponto de coleta, pode ser maior a capacidade de detecção de pequenas variações nas concentrações.

A partir de observações indiretas, originadas principalmente de modelos animais de angioplastia, parece ser consistente a contribuição da ET-1 no processo da reestenose (26,38,39). Embora necessários e amplamente empregados, os modelos animais de reestenose

apresentam limitações importantes, como diferenças no tipo de resposta cicatricial à lesão e nas características histológicas da camada neointima. Além disso, várias intervenções anti-reestenose testadas com sucesso nesse contexto não obtiveram resultados semelhantes quando avaliadas em humanos(5). A magnitude da liberação de ET-1 pode ser considerada um marcador de disfunção endotelial e, pelas propriedades proliferativas da ET-1, apresentar uma relação direta com a reestenose. Entretanto, em nosso estudo não foi encontrada qualquer associação entre os níveis de ET-1 com a ocorrência de reestenose. Devido à grande semelhança entre os valores de ET-1 encontrados nos grupos com e sem reestenose, um aumento no tamanho da amostra provavelmente não resultaria numa associação significativa entre ET-1 e reestenose (Figura 1).

As diversas conseqüências mecânicas e celulares provocadas pelo implante do stent em um substrato endotelial já alterado pela aterosclerose tornam a fisiopatogenia da reestenose extremamente complexa (40). Talvez, o equilíbrio entre as proporções de ET-1 e de óxido nítrico seja o fator mais importante na formação da camada neointima, tendo este último um papel preponderante. Poderia-se considerar que o efeito benéfico do bloqueio dos receptores ET(A) em reduzir a hiperplasia intimal, demonstrado em modelos experimentais, seja devido à facilitação da ação do óxido nítrico (19,41), muito mais do que pela inibição da atividade da ET-1. Desta forma, o implante de stent coronariano resulta em elevação significativa dos níveis de ET-1, que pode representar a disfunção endotelial provocada pelo stent, mas não parece ser um fator preditivo da ocorrência de reestenose em humanos.



## **Capítulo VI**

### **Conclusões**

- 1) Ocorre um aumento significativo dos níveis de ET-1 após o implante de stent, possivelmente por ser a ET-1 um marcador da disfunção endotelial provocada pela lesão.
- 2) Os níveis de ET-1 não parecem ser preditivos de reestenose intra-stent em humanos.

## Referências Bibliográficas

1. Lincoff AM. Stent scrutiny. *JAMA* 2000;284:1839-41.
2. Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: Current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:183-93.
3. Kearney M, Pieczeck A, Haley L, et al. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1997;95:1998-2002.
4. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, et al. Acute and chronic tissue-response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol* 1999;35:157-63.
5. Bennet MR, O`Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implication for design of rational therapy. *Pharmacol Ther* 2001;91:149-66.
6. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000;102:2434-2440.
7. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, et al. Role of endothelin-1 in the active constriction of human coronary arteries. *Circulation* 2001; 104:1114-1118
8. Seligman BS, Biolo A, Polanczyk CA, et al. Increased plasma levels of endothelin 1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2000;23:1395-400.
9. Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol* 2002;21(2):109-16
10. Bohm F, Ahlborg G, Pernow J. Endothelin-1 inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the human forearm: reversal by ETA receptor blockade in patients with atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)* 2002 Mar;102(3):321-7
11. Kolasinska-Kloch W, Lesniak W, Kiec-Wilk B, et al. Biochemical parameters of endothelial dysfunction in cardiological syndrome X. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62(1):7-13
12. Zouridakis EG, Schwartzman R, Garcia-Moll X, et al. Increased plasma endothelin levels in angina patients with rapid coronary artery disease progression. *Eur Heart J* 2001;22(17):1578-84

13. Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, et al. Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2001;104(8):864-9
14. Barton M, Haudenschild CC. Endothelium and atherogenesis: endothelial therapy revisited. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001 Nov;38 Suppl 2:S23-5
15. Katwa LC, Campbell SE, Tanner MA, Myers PR. The upregulation of endothelin and its receptors in porcine coronary arteries in a double balloon injury model of restenosis. *Basic Res Cardiol* 1999; 94:445-453
16. Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, et al. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty: protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 1994; 75:190-197.
17. Trachtenberg JD, Sun S, Choi ET, et al. Effect of endothelin-1 infusion on the development of intimal hyperplasia after balloon catheter injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 suppl 8:S355-9
18. Burke SE, Lubbers NL, Gagne GD, et al. Selective antagonism of the ET(A) receptor reduces neointimal hyperplasia after balloon-induced vascular injury in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30(1):33-41
19. McKeenna CJ, Burke SE, Opgenorth TJ, et al. Selective ETA receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation* 1998; 97:2551-2556.
20. Dashwood MR, Noertersheuser P, Kirchengast M, Munter K. Altered endothelin-1 binding following balloon angioplasty of pig coronary arteries: effect of the ETA receptor antagonist, LU 135252. *Cardiovasc Res* 1999; 43:445-456
21. Kirchengast M. Endothelin receptor blockade and in-stent restenosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38 suppl 2:S31-4
22. Ameli S, Kaul S, Castro L, et al. Effect of percutaneous transluminal coronary angioplasty on circulating endothelin levels. *Am J Cardiol* 1993;72(18):1352-6.
23. Franco-Cereceda A, Grip LG, Moor E, et al. Influence of percutaneous transluminal coronary angioplasty on cardiac release of endothelin, neuropeptide Y and noradrenaline. *Int J Cardiol* 1995;48(3):231-3.
24. Borries M, Heins M, Fisher Y, et al. Changes of hemostasis, endogenous fibrinolysis, platelet activation and endothelins after percutaneous transluminal

- coronary angioplasty in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(2):486-93.
25. Suzuki H, Takeyama Y, Matsubara H, et al. Plasma endothelin-1 and thrombomodulin levels in coronary sinus during right atrial pacing and percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int J Cardiol* 2000;74(1):15-23.
  26. Jain D, Schafer U, Dendorfer A, et al. Neurohumoral activation in percutaneous coronary interventions: apropos of ten vasoactive substances during and immediately following coronary rotastenting. *Indian Heart J* 2001;53(3):301-7.
  27. Mammana C, Russo G, Tamburino C, et al. Endothelin-1 variation in the coronary circulation during angioplasty with a stent implant. *Cardiologia* 1998;43(10):1083-8.
  28. Petronio AS, Amoroso G, Limbruno U, et al. Endothelin-1 release from atherosclerotic plaque after percutaneous transluminal coronary angioplasty in stable angina pectoris and single-vessel coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999;84(9):1085-8.
  29. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T. Release of endothelin 1 and angiotensin II induced by percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000;51(1):42-9.
  30. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, New York, 1984; 538p.
  31. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ J* 2002;66(6):529-33
  32. Schwarzacher SP, Tsao PS, Ward M, et al. Effects of stenting on adjacent vascular distensibility and neointima formation: role of nitric oxide. *Vasc Med* 2001;6(3):139-44.
  33. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Eng J Med* 1986;315:1046-51.
  34. Zeiher AM, Ihling C, Pistorius K, et al. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994;344:1405-6.
  35. Schwartz RS, Henry TD. Pathophysiology of coronary artery restenosis. *Rev Cardiovasc Med* 2002;3 Suppl 5:S4-9.

36. Caramori PR, Lima VC, Seidelin PH, et al. Long-term endothelial dysfunction after coronary artery stenting. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(6):1675-9.
37. Aymong ED, Curtis MJ, Youssef M, et al. Abciximab attenuates coronary microvascular endothelial dysfunction after coronary stenting. *Circulation* 2002;105(25):2981-5.
38. Kruger D, Giannitsis E, Sheikhzadeh A, et al. Cardiac release and kinetics of endothelin after uncomplicated percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1998;81(12):1421-6.
39. Kotamaki M, Laustiola K, Syvanne M, et al. Influence of continued smoking and some biological risk factors on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Intern Med* 1996;240(5):293-301.
40. Orford JL, Selwyn AP, Ganz P, et al. The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis. *Am J Cardiol* 2000;86(4B):6H-11H.
41. Spieker LE, Luscher TF, Noll G. Current strategies and perspectives for correcting endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38 Suppl 2:S35-41

## **Anexo I**

### **Termo de Consentimento Informado**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO**

**Protocolo:** “RELAÇÃO ENTRE ENDOTELINA-1 E IMPLANTE DE STENT CORONARIANO”

**Investigador Principal:** Dr. Sandro Cadaval Gonçalves

**Co-investigadores:** Dr. Marco V. Wainstein, Dr. Alcides J. Zago e Dr. Jorge P. Ribeiro

### **OBJETIVOS**

Solicitamos sua permissão para incluí-lo num protocolo de pesquisa. O objetivo deste estudo é dosar uma substância, chamada endotelina, para avaliar seu efeito na chance do estreitamento retornar dentro do stent (“molinha de metal”) que será colocado.

### **CONTATOS**

Se você tiver qualquer dúvida relacionada a este estudo, poderá entrar em contato com o Dr. Sandro Cadaval Gonçalves ou o Dr. Marco V. Wainstein pelo telefone 3316-8342.

### **PROCEDIMENTOS**

Sua angioplastia será realizada de maneira convencional. Você será avisado quando a pesquisa estiver a ponto de ser iniciada e poderá desistir de participar do estudo neste momento ou em qualquer outro momento sem que isso afete seus cuidados médicos regulares. Se você concordar em participar, duas amostras de sangue serão coletadas para análise. Não haverá nenhum custo extra para você ou para seu seguro de saúde por participar nesta pesquisa. Caso tenha concordado em prosseguir no estudo, você deverá retornar em 6 meses para repetir o cateterismo cardíaco para vermos como está seu stent e coletar nova amostra de sangue.

## RISCOS

Os riscos de complicações maiores causadas pela angioplastia coronariana incluindo morte, infarto, sangramento e derrame são de aproximadamente 1 em cada 200 exames realizados. Estes riscos não dependem da sua participação na pesquisa. Os riscos do novo cateterismo cardíaco em seis meses são ainda menores do que os da angioplastia ou da colocação do stent. A dose de radiação extra que você receberá é mínima.

## BENEFÍCIOS

O conhecimento de novos medicamentos para impedir a reestenose, ou seja, o retorno da obstrução no local tratado, pode ser útil para o maior sucesso deste tratamento.

## ALTERNATIVAS

Você não é obrigado a participar deste estudo. Se decidir não participar, sua decisão não vai afetar seu tratamento atual ou futuro. Se decidir participar, você poderá desistir a qualquer momento.

## CONFIDENCIAL

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar, exceto em casos especificados no termo de consentimento. As informações que não entrarão para o seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. As informações contidas no seu prontuário médico não podem ser fornecidas a nenhuma pessoa não afiliada ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os resultados deste estudo poderão ser publicados em uma revista médica ou livro texto médico com finalidade de ensinamento. Entretanto, seu nome não será usado em nenhuma publicação sem a sua permissão prévia. Além disso, se forem realizadas fotografias ou fitas de áudio ou vídeo durante o estudo que possam identificá-lo, você deverá dar permissão adicional para o seu uso após ver o material.

## PEDIDO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Você poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Os investigadores irão fornecer um número de telefone onde estão disponíveis para responder suas perguntas. Você será informado sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade de sua participação na pesquisa.

### RECUSA OU ABANDONO DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A participação neste estudo é totalmente voluntária. Você não precisa participar no estudo. Seus cuidados médicos atuais e futuros não serão afetados caso você não participe da pesquisa. Se você decidir participar, poderá mudar de idéia e retirar-se do estudo a qualquer momento sem afetar seus cuidados médicos neste Hospital. Além disso, o médico responsável pela pesquisa poderá decidir pelo término da sua participação na pesquisa a qualquer momento.

### DECLARAÇÃO DE LESÕES

Se você sofrer lesões como consequência direta do estudo, deverá entrar em contato com o investigador. Você receberá tratamento adequado. Estes cuidados médicos não implicam nenhuma culpa ou erro médico por parte do Hospital ou dos médicos envolvidos na pesquisa. O Hospital não oferecerá nenhuma compensação adicional.



**ASSINATURAS**

Eu confirmo que a proposta desta pesquisa, os procedimentos do estudo e os possíveis riscos e desconfortos, bem como potenciais benefícios foram explicados para mim. Todas as minhas dúvidas foram respondidas claramente.

Eu li este termo de consentimento. A minha assinatura abaixo indica minha concordância em participar do estudo.

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| _____                                | _____ |
| Paciente                             | Data  |
| _____                                | _____ |
| Testemunha                           | Data  |
| _____                                | _____ |
| Assinatura Adicional (se necessário) | Data  |

Eu expliquei o objetivo deste estudo, os procedimentos do estudo, identificando aqueles considerados como investigacionais, os possíveis riscos e desconfortos, bem como os potenciais benefícios, e respondi a todas as dúvidas relacionadas ao estudo da melhor forma possível. O paciente referiu ter compreendido e concordado em participar do estudo.

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| _____                          |      |
| _____                          |      |
| <b>Representante do Estudo</b> | Data |

## Anexo II

### Artigo em inglês

#### **Increased plasma endothelin-1 levels after coronary stenting in humans: a marker of endothelial dysfunction not associated with restenosis**

Marco V. Wainstein, MD, DSc\*, Sandro C. Gonçalves, MD\*, Alcides J. Zago, MD, DSc\*,  
Raquel Zenker\*\*, Renata Burtet\*\*, Guilherme de B. Couto\*\*, Fabiana Tomazi\*\*, Jorge P.  
Ribeiro, MD, DSc \*

\*Cardiology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\*\*School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Abbreviated title: Increased ET-1 levels after stenting in humans

#### Correspondence:

Marco V. Wainstein

Av. Itajaí, 140/401

90470-140 - Porto Alegre, RS - Brazil

E-mail: [mvwainstein@uol.com.br](mailto:mvwainstein@uol.com.br)

Fax: +55-51-3388-6489

## Abstract

**Background:** Experimental evidence suggests that endothelin-1 (ET-1) levels may play a role in the occurrence of restenosis following percutaneous revascularization procedures. However, the relationship between plasma ET-1 with coronary stent implantation and restenosis in humans is not well defined yet. The objective of this study was to evaluate the behavior of plasma levels of ET-1 in patients submitted to coronary stenting and to determine if there is an association between ET-1 levels and the occurrence of in-stent restenosis.

**Methods:** 41 patients (44 stents) submitted to elective coronary stent implantation were included in the study. Plasma ET-1 levels were measured by ELISA right before, after and 6 months post procedure, when quantitative angiography was performed to evaluate the presence of restenosis. ET-1 levels were compared in patients with and without restenosis and correlated with late luminal loss.

**Results:** The incidence of angiographic restenosis was 41%. A significant increase in ET-1 levels right after the procedure was observed in both groups ( $P < 0.001$ ), with return to baseline after 6 months. No difference was observed between the groups, with and without restenosis, in ET-1 levels pre-procedure, post-procedure or at 6-months. There was no correlation between late luminal loss and ET-1 levels.

**Conclusions:** There is a significant increase in ET-1 levels right after coronary stenting, probably as a marker of endothelial dysfunction associated arterial lesion. However, there was no association between ET-1 levels and in-stent restenosis in humans.

## Introduction

Coronary stent implantation has been increasing worldwide. However, the in-stent recurrence of the narrowing (restenosis) is one of the main limitations of this procedure (1). In-stent restenosis is an arterial healing response to injury produced by vessel wall distention. At this site, cytokines and other chemotactic and mitogenic factors promote migration and proliferation of smooth muscle cells, with production of collagen and extracellular matrix, resulting in neointimal formation and arterial lumen narrowing (2-4). The need to repeat revascularization procedures due to in-stent restenosis increases morbidity and costs. Several attempts have been made to reduce restenosis, with promising results in animal models and less impressive results in humans (5).

Endothelin-1 (ET-1) is a powerful vasoconstricting and proliferative substance released by vascular endothelium, smooth muscle cells and macrophages (6,7). ET-1 has been shown to be strongly related to the control of coronary vascular tone, being responsible for most of the enhanced vasoconstrictive tone at atherosclerotic plaque (7). Increased plasma levels of ET-1 may be associated with endothelial dysfunction (8-11) and progression of atherosclerotic lesions (12-14).

In an experimental balloon injury model of restenosis in pigs, Katwa et al. (15) have shown increased tissue ET-1 content and an up-regulation of ET(A) receptor density at the procedure sites. The infusion of ET-1 was found to potentiate carotid neointima formation following balloon angioplasty in rats (16, 17), whereas the blockade of ET(A) receptors by different agents in experimental models has resulted in decreased neointimal hyperplasia (18-21). Increased plasma levels of ET-1 have also been observed in patients submitted to balloon angioplasty, starting as early as two minutes after balloon deflation, followed by a gradual return to basal levels in the next hours (22-26). The response of plasma levels of ET-

1 after coronary stenting is still on dispute. While in two studies (27, 28) it was not observed any significant increase in ET-1 levels after the procedure, Hojo et al (29) reported similar increase in ET-1 levels in 19 patients after stenting than was it found after balloon angioplasty and rotational atherectomy. Moreover, the role of ET-1 in the process of in-stent restenosis in humans has not been established.

The aim of this study was to evaluate the behavior of plasma ET-1 levels in patients submitted to coronary stenting and to determine if there is an association between ET-1 levels and the occurrence of in-stent restenosis six months after the procedure.

## **Methods**

### *Patient selection*

Patients referred to the Hemodynamic Laboratory of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre for elective percutaneous coronary stenting, between January and July 2002, were invited to participate in the study. The indication for the procedure was left at discretion of each referring assistant physician. We included patients of both sexes, presenting with stable angina or ischemia detected on functional tests, with age ranging between 18 to 75 years who agreed to participate. Exclusion criteria were: pregnancy, acute coronary syndromes on the last two weeks, heart failure (New York Heart Association class III or IV) on the assessment day, diagnosis of neoplasia, and connective-tissue diseases. The study protocol was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and all patients signed an informed consent form.

### *Study protocol*

This was a prospective, observational cohort study. We approached patients awaiting the procedure. The study protocol was explained and those who agreed to participate signed an informed consent form. Trained medical students applied a standard questionnaire and collected data from the patient's chart. Previous pathologies were identified based on information given by the patient, on the use of drugs such as oral hypoglycemic, hypolipemic or anti-hypertensive agents, on diagnostic information found in the chart, and occasionally on information provided by the assistant physician.

The use of drugs such as acetylsalicylic acid, ticlopidine, clopidogrel, heparin and IIB/IIIA receptor antagonists followed the routine and indications of the Cardiology Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Blood samples were drawn to EDTA-containing tube from the arterial sheath at the beginning of the procedure (pre-procedure ET-1 levels) and again at the end of the procedure (post-procedure ET-1 levels). Samples were centrifuged and plasma was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Patients were submitted to control coronary angiography at 6 months, except in those who had recurrent symptoms requiring intervention sooner. Additional arterial blood samples were then collected, centrifuged and frozen (6-month ET-1 levels).

### *Angiographic analysis*

All patients were assessed by quantitative coronary angiography (GE System®, USA), using the same equipment and projections, with the table and image intensifier kept at constant height. Image analysis was carried out in all cases by the same investigator (M.V.W.), who was blinded to ET-1 levels. Seven inches of magnification was used for all images. The following angiographic variables were analyzed: reference diameter of the target

vessel; pre-procedural degree of stenosis (%); lesion extension; pre-procedure, post-procedure, and 6-month minimal luminal diameter (MLD); late luminal loss (LLL) (difference between post-procedure and 6-month MLD); and degree of in-stent stenosis after 6 months (restenosis). Patients were categorized into two groups: with and without restenosis, based on the presence of stenosis  $\geq 50\%$  at the intervention site (intra-stent plus 5 mm proximal and distal to the stented segment) on control angiography.

#### *Biochemical analysis*

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to perform ET-1 measurement, with duplicate samples. After thawing, plasma samples were diluted in extraction solvent (acetone, hydrochloric acid and water) and centrifuged. The supernatant material was lyophilized in a centrifugal evaporator for approximately 6 hours, reconstituted, and the assay was carried out immediately after this process. The reagents were added following strictly manufacturer specifications (R&D Systems®, Minneapolis, USA). After that, the optical density readings were performed (sensitivity  $< 1.0$  pg/ml, with mean intra and inter assay variation coefficients of 4.2 and 5.1%, respectively). The analyses of ET-1 were performed by experienced personnel without knowledge of angiographic results.

#### *Statistical analysis*

Quantitative data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. The difference between means of continuous angiographic variables were analyzed by Student's t-test. Pre and post-procedure and 6-month plasma ET-1 levels, and continuous angiographic variables (MLD, LLL) were evaluated by repeated-measures analysis of variance (ANOVA). In addition, since the distribution of ET-1 levels showed a slight positive asymmetry these variables were log-

transformed for analysis. The results of this analysis did not differ from those not transformed. Thus, following the recommendations of Montgomery (30), non transformed results were used.

The proportion of binary restenosis, defined as presence of stenosis equal to or higher than 50% on control angiography, was treated as a categorical variable. The chi-square test or Fisher's exact test, when indicated, were used for analysis of this and other categorical variables. The description of the associations between quantitative variables was initially assessed using Pearson's correlation coefficient. To evaluate the combined effect of the several factors under study on ET-1 levels, we performed a multivariate regression analysis.

In order to detect a difference of two units of ET-1, considering alfa 5% and power of 80%, a detection of a minimum of 11 restenosis cases was stipulated. Assuming a dropout rate of 12% and an incidence of 25% of restenosis, we adopted a sample-size of 50 patients. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 10.0.

## **Results**

Fifty patients agreed to participate in the study. Nine patients (18%) were excluded: five decided not to undergo control angiography; three died before the scheduled return (one patient due to mesenteric ischemia and two had sudden cardiac death); and one patient submitted to emergency myocardial revascularization the angiographic analysis did not follow the study protocol. Therefore, 41 patients were analyzed. In three patients more than one stent was implanted, therefore 44 stents were analyzed.

The demographic and clinical characteristics of the 41 patients are described in Table 1. According to the angiographic criteria employed, the patients were distributed into two



groups: with and without restenosis. There was no significant difference between the groups in any of the clinical variables analyzed. A high prevalence of diabetes mellitus was observed, in both patients with restenosis (55.6%) and free of restenosis (34.8%).

As presented in Table 2, restenosis was observed in 18 out of the 44 stents analyzed (41%). The mean time of return for angiographic control was 5.8 months. The mean reference diameter of the stented arteries shows that the vessel diameter was relatively small in both groups. Target-vessel revascularization (clinical restenosis) was performed in 22% of the cases.

There was a significant increase in ET-1 levels in both groups after stenting, with return to basal values after 6 months, as shown in Figure 1 ( $P < 0.01$  for time). However, the variation between the two groups was similar. The ET-1 values were not higher in the group that has developed restenosis.

Pre-procedure, post-procedure and 6-month ET-1 levels were not associated with the occurrence of restenosis. In a multivariate regression analysis with late loss as the dependent variable and ET-1 levels, presence of diabetes mellitus, and reference diameter as the independent variables, there was no significant association (Table 3). Figure 2 shows Pearson's correlation between the levels of ET-1 and late loss at the three moments analyzed. No significant correlation was observed.

## **Discussion**

Our findings showed a significant increase in ET-1 levels after coronary stenting in humans. As far as we know, this is the largest series of patients analyzed to investigate the association between ET-1 levels and stenting. Also, this is the first study to prospectively

assess ET-1 as a predictor of in-stent restenosis. Despite the initial increase in plasma ET-1 levels, no association was observed between ET-1 and restenosis after 6 months.

The clinical and angiographic characteristics of the patients studied, as well as the high prevalence of diabetes mellitus and the small reference diameter of the vessels analyzed probably account for the high incidence of restenosis (41%) observed in the present study (2). Although the proportion of patients with diabetes mellitus was higher in the group with restenosis (55.6% vs. 34.8%), there was no significant association between the presence of diabetes and restenosis, probably because of the small number of patients in each group. Even if no association was observed between ET-1 levels and in-stent restenosis, the incidence of restenosis in the studied sample, which was higher than we had expected, contributed to increase the power of this analysis.

The endothelium is a dynamic organ that regulates vascular tone, local homeostasis and the fibro-inflammatory-proliferative process. Among the substances released by the endothelium in response to different stimuli, nitric oxide and ET-1 deserve special attention (31, 32). Despite the controversial results of other studies assessing the behavior of ET-1 after stenting (27-29), our findings confirm the hypothesis that ET-1 levels increase after this procedure, as previously shown for balloon angioplasty (24, 25). Endothelial dysfunction can be detected by tests that quantify endothelium-dependent vasomotor function (33, 34) or by measurement of biological markers such as ET-1 (9). Thus, the significant increase in ET-1 levels may be interpreted as a marker of endothelial dysfunction secondary to stenting associated injury.

All forms of percutaneous coronary interventions produce endothelial lesion, and the arterial response to injury is a key-element in the pathogenesis of restenosis (35). As previously shown, endothelial function may be chronically affected by percutaneous revascularization procedures. More severe endothelial dysfunction was observed in patients

receiving stents than in those treated by balloon angioplasty or directional atherectomy (36). Stent implantation has been shown to result in microvascular endothelial dysfunction, as demonstrated by impairment of acetylcholine-mediated increase in coronary blood flow (37). The return to basal levels after 6 months, observed in the present study, suggests that ET-1 is a marker of acute endothelial dysfunction, locally provoked by stenting. Such dysfunction cannot be detected by this method in the systemic circulation in the long run, or that there may be recovery, even if partial, of the endothelial function with time.

ET-1 levels have been shown to be higher at coronary sites distal to the plaque than at the coronary sinus, suggesting that ET-1 is probably released by endothelium and atherosclerotic plaque in response to tissue injury, rather than by ischemic muscle (28, 38). One of the limitations of the present study is the fact that ET-1 levels were measured in the peripheral arterial blood, rather than in the coronary sinus or intracoronary distally to the lesion. At these sites, due to the proximity between the source of ET-1 release and the collection point, small variations in ET-1 levels would have been probably more easily detectable.

Based upon indirect observations, mainly from animal models, the contribution of ET-1 to the restenosis process seems to be consistent (26, 38, 39). However, despite their importance and extensive use, animal models of restenosis have major limitations, such as differences in the type of healing response to injury and in the histology of neointimal layer. In addition, they have failed to predict therapeutic success of anti-restenotic therapies in humans (5). The magnitude of ET-1 release after the stenting procedure can be considered as a marker of endothelial dysfunction produced and, because of the proliferative properties of ET-1, it may be directly related to restenosis. Nevertheless, we did not observe any association between ET-1 levels and restenosis. Due to the great similarity between ET-1

levels in the groups with and without restenosis, we believe that an increase in our sample size would not affect this result (Figure 1).

The superimposition of the mechanical and cellular consequences provoked by stenting on endothelial substrates that have already been altered by atherosclerosis make the pathophysiology of restenosis extremely complex (40). Maybe the balance between the levels of ET-1 and nitric oxide is an important factor regulating neointimal formation, with nitric oxide playing a major role in this process. Thus, the beneficial effect of blocking ET(A) receptors to reduce neointimal hyperplasia, observed in experimental models, could be attributable to the enhanced action of nitric oxide, rather than solely an inhibition of ET-1 action (19, 41). In summary, coronary stenting causes a significant increase in ET-1 levels right after the procedure. This may reflect endothelial dysfunction caused by stenting, but does not seem to be predictive of restenosis in humans.

## References

1. Lincoff AM. Stent scrutiny. *JAMA* 2000;284:1839-41.
2. Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: Current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:183-93.
3. Kearney M, Pieczeck A, Haley L, et al. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1997;95:1998-2002.
4. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, et al. Acute and chronic tissue-response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol* 1999;35:157-63.
5. Bennet MR, O'Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implication for design of rational therapy. *Pharmacol Ther* 2001;91:149-66.

6. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000;102:2434-40.
7. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, et al. Role of endothelin-1 in the active constriction of human coronary arteries. *Circulation* 2001; 104:1114-8.
8. Seligman BS, Biolo A, Polanczyk CA, et al. Increased plasma levels of endothelin 1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2000;23:1395-400.
9. Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol* 2002;21(2):109-16.
10. Bohm F, Ahlborg G, Pernow J. Endothelin-1 inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the human forearm: reversal by ETA receptor blockade in patients with atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:321-7.
11. Kolasinska-Kloch W, Lesniak W, Kiec-Wilk B, et al. Biochemical parameters of endothelial dysfunction in cardiological syndrome X. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:7-13.
12. Zouridakis EG, Schwartzman R, Garcia-Moll X, et al. Increased plasma endothelin levels in angina patients with rapid coronary artery disease progression. *Eur Heart J* 2001;22:1578-84.
13. Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, et al. Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2001;104:864-9.
14. Barton M, Haudenschild CC. Endothelium and atherogenesis: endothelial therapy revisited. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38 Suppl 2:S23-5.

15. Katwa LC, Campbell SE, Tanner MA, et al. The upregulation of endothelin and its receptors in porcine coronary arteries in a double balloon injury model of restenosis. *Basic Res Cardiol* 1999; 94:445-53.
16. Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, et al. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty: protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 1994;75:190-7.
17. Trachtenberg JD, Sun S, Choi ET, et al. Effect of endothelin-1 infusion on the development of intimal hyperplasia after balloon catheter injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 suppl 8:S355-9.
18. Burke SE, Lubbers NL, Gagne GD, et al. Selective antagonism of the ET(A) receptor reduces neointimal hyperplasia after balloon-induced vascular injury in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30:33-41.
19. McKeenna CJ, Burke SE, Opgenorth TJ, et al. Selective ETA receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation* 1998;97:2551-6.
20. Dashwood MR, Noertersheuser P, Kirchengast M, et al. Altered endothelin-1 binding following balloon angioplasty of pig coronary arteries: effect of the ETA receptor antagonist, LU 135252. *Cardiovasc Res* 1999; 43:445-56.
21. Kirchengast M. Endothelin receptor blockade and in-stent restenosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38 suppl 2:S31-4.
22. Ameli S, Kaul S, Castro L, et al. Effect of percutaneous transluminal coronary angioplasty on circulating endothelin levels. *Am J Cardiol* 1993;72:1352-6.

23. Franco-Cereceda A, Grip LG, Moor E, et al. Influence of percutaneous transluminal coronary angioplasty on cardiac release of endothelin, neuropeptide Y and noradrenaline. *Int J Cardiol* 1995;48:231-3.
24. Borries M, Heins M, Fisher Y, et al. Changes of hemostasis, endogenous fibrinolysis, platelet activation and endothelins after percutaneous transluminal coronary angioplasty in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:486-93.
25. Suzuki H, Takeyama Y, Matsubara H, et al. Plasma endothelin-1 and thrombomodulin levels in coronary sinus during right atrial pacing and percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int J Cardiol* 2000;74:15-23.
26. Jain D, Schafer U, Dendorfer A, et al. Neurohumoral activation in percutaneous coronary interventions: apropos of ten vasoactive substances during and immediately following coronary rotastenting. *Indian Heart J* 2001;53:301-7.
27. Mammana C, Russo G, Tamburino C, et al. Endothelin-1 variation in the coronary circulation during angioplasty with a stent implant. *Cardiologia* 1998;43:1083-8.
28. Petronio AS, Amoroso G, Limbruno U, et al. Endothelin-1 release from atherosclerotic plaque after percutaneous transluminal coronary angioplasty in stable angina pectoris and single-vessel coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999;84:1085-8.
29. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T. Release of endothelin 1 and angiotensin II induced by percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000;51:42-9.
30. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley and Sons; 1984.
31. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ J* 2002;66:529-33.

32. Schwarzacher SP, Tsao PS, Ward M, et al. Effects of stenting on adjacent vascular distensibility and neointima formation: role of nitric oxide. *Vasc Med* 2001;6:139-44.
33. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Eng J Med* 1986;315:1046-51.
34. Zeiher AM, Ihling C, Pistorius K, et al. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994;344:1405-6.
35. Schwartz RS, Henry TD. Pathophysiology of coronary artery restenosis. *Rev Cardiovasc Med* 2002;3 Suppl 5:S4-9.
36. Caramori PR, Lima VC, Seidelin PH, et al. Long-term endothelial dysfunction after coronary artery stenting. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1675-9.
37. Aymong ED, Curtis MJ, Youssef M, et al. Abciximab attenuates coronary microvascular endothelial dysfunction after coronary stenting. *Circulation* 2002;105:2981-5.
38. Kruger D, Giannitsis E, Sheikhzadeh A, et al. Cardiac release and kinetics of endothelin after uncomplicated percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1998;81:1421-6.
39. Kotamaki M, Laustiola K, Syvanne M, et al. Influence of continued smoking and some biological risk factors on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Intern Med* 1996;240:293-301.
40. Orford JL, Selwyn AP, Ganz P, et al. The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis. *Am J Cardiol* 2000;86:6H-11H.
41. Spieker LE, Luscher TF, Noll G. Current strategies and perspectives for correcting endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38 Suppl 2:S35-41.



**Table 1: Clinical and demographic characteristics of patients<sup>a</sup>**

| Variables    | All patients | Restenosis | Without restenosis | P    |
|--------------|--------------|------------|--------------------|------|
|              | n=41         | N=18       | n=23               |      |
| Age (years)  | 61.5±8.9     | 62.9±8.5   | 60.2±9.3           | 0.34 |
| Sex (male)   | 27 (65.8)    | 11 (61.1)  | 16 (69.6)          | 0.99 |
| Diabetes     | 18 (43.9)    | 10 (55.6)  | 8 (34.8)           | 0.37 |
| Hypertension | 31 (75.6)    | 14 (77.8)  | 17 (73.9)          | 0.99 |
| Dyslipidemia | 22 (53.7)    | 10 (55.6)  | 12 (52.2)          | 0.99 |
| Smokers      | 25 (61.0)    | 10 (55.6)  | 15 (65.2)          | 0.62 |

<sup>a</sup>Data are presented as means ± standard deviation or frequency (%).

**Table 2: Angiographic analysis**<sup>a</sup>

| Variable                      | All stents | Restenosis | Without restenosis | P     |
|-------------------------------|------------|------------|--------------------|-------|
|                               | n=44       | n=18       | n=26               |       |
| Reference diameter (mm)       | 2.7±0.6    | 2.6±0.6    | 2.7±0.7            | 0.66  |
| Lesion extension (mm)         | 14.0±5.5   | 15.1±5.9   | 12.8±4.9           | 0.28  |
| Minimal luminal diameter (mm) | 0.79±0.5   | 0.78±0.5   | 0.80±0.5           | 0.86  |
| Pre-procedure stenosis (%)    | 72±16      | 74±18      | 71.5±15.8          | 0.69  |
| Acute gain (mm)               | 1.75±0.5   | 1.65±0.5   | 1.8±0.5            | 0.30  |
| 6-month stenosis (%)          | 42±24      | 65±13      | 27±17              | <0.01 |
| Late luminal loss (mm)        | 0.94±0.7   | 1.5±0.4    | 0.6±0.5            | <0.01 |

<sup>a</sup>Data are described as means ± standard deviation.

**Table 3: Effect of endothelin-1 on late luminal loss according to multivariate regression analysis (n=44 stents)**

| Variable   | b     | P    |
|--|-------|------|
| Pre-procedure ET-1   | -0.02 | 0.78 |
| Post-procedure ET-1  | -0.03 | 0.58 |
| 6-month ET-1   | 0.02  | 0.79 |
| Delta ET-1 (post-procedure minus pre-procedure ET-1 levels ) | -0.07 | 0.61 |
| Peak ET-1 value  | -0.02 | 0.82 |
| Mean ET-1 value  | -0.01 | 0.82 |

b: linear coefficient representing the effect over the late luminal loss observed for each increase in one unit of endothelin-1 (ET-1), adjusted for diabetes and reference diameter.

Figure 1

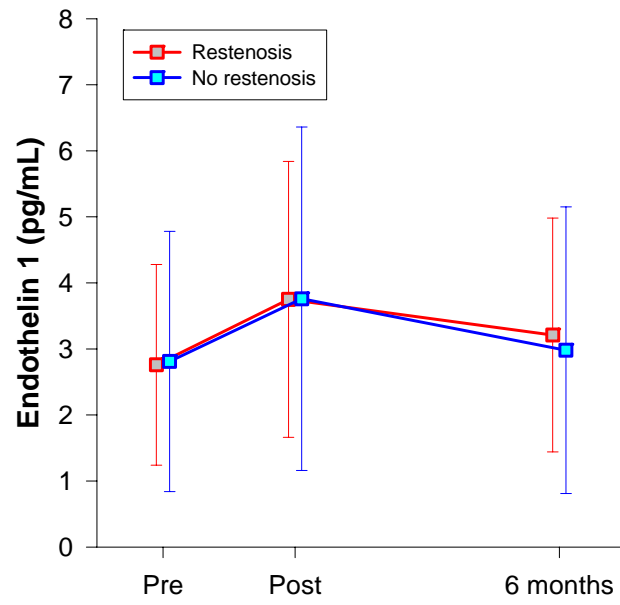
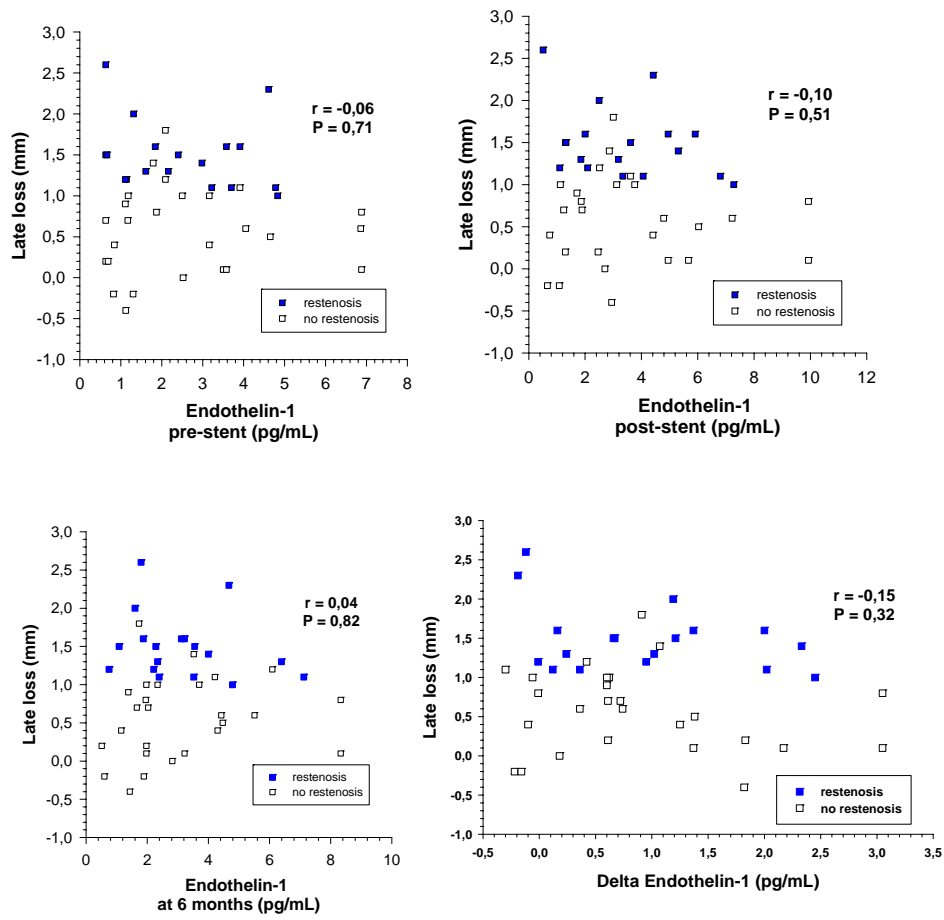


Figure 2



**Figure legends**

Figure 1: Endothelin-1 (ET-1) levels according to study group (restenosis vs. without restenosis); n=44 stents. Repeated measures ANOVA:  $P_{\text{time}} < 0.01$ ;  $P_{\text{interaction}} = 0.87$ ;  $P_{\text{group}} = 0.96$ .

Figure 2: Pearson's correlation between late luminal loss and endothelin-1 levels (pre-procedure, post-procedure, and at six months; delta means post-procedure minus pre-procedure values).