

Inibidores da enzima de conversão da endotelina e sua aplicação na patologia cardiovascular [29]

ANA SOFIA CERDEIRA, CARMEN BRÁS-SILVA, ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2008; 27 (3): 385-408

RESUMO

A endotelina, um potente vasoconstrictor descrito em 1988 por Yanagisawa, contribuiu para normal regulação da função cardiovascular. No entanto, quando em desequilíbrio, concorre para o processo patológico de várias doenças cardiovasculares como sejam o enfarte do miocárdio, a reestenose, a hipertensão pulmonar, a hipertensão arterial e até mesmo a doença de Chagas. Têm sido desenvolvidos vários esforços na tentativa de bloquear esta via. Os resultados obtidos com inibidores dos receptores foram desanimadores, no entanto, tem-se verificado um interesse crescente no bloqueio da sua formação. Estão descritos inibidores selectivos e não selectivos da enzima de conversão da endotelina (ECE), estes últimos com a possibilidade da inibição associada da enzima de conversão da angiotensina e da endopeptidase neutral permitindo o bloqueio simultâneo de várias vias envolvidas na fisiopatologia destas doenças.

Nesta revisão são apresentados os diferentes tipos de inibidores da ECE com referência às características farmacológicas, dando particular ênfase à potencialidade da sua aplicação clínica nas diversas patologias cardiovasculares.

Palavras-Chave

Endotelina; Enzima de conversão da endotelina; Inibidores da enzima de conversão da endotelina; Coração; Doenças Cardiovasculares; Terapêutica

ABSTRACT

Endothelin-converting Enzyme Inhibitors: their Application in Cardiovascular Diseases

Endothelin, a potent vasoconstrictor first described in 1988 by Yanagisawa, is an important regulator of cardiovascular function. Hyperactivation of the endothelin system has been implicated in the pathogenesis of various cardiovascular disorders including myocardial infarction, restenosis, hypertension, heart failure and Chagas cardiopathy. Various attempts have been made to suppress this axis. Although promising, the results of clinical trials on endothelin receptor antagonists have been disappointing.

There is growing interest in blockade of endothelin formation. Several selective and non-selective endothelin-converting enzyme (ECE) inhibitors have been developed, the latter with the possibility of simultaneously blocking angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase, combining inhibition of more than one axis.

This article reviews the different ECE inhibitors, with particular emphasis on their potential clinical application in cardiovascular diseases.

Key words

Endothelin; Endothelin-converting enzyme; Endothelin-converting enzyme inhibitors; Heart; Cardiovascular diseases; Therapeutics

INTRODUÇÃO

Em 1988, Masashi Yanagisawa descreveu um peptídeo com potente acção vasoconstritora que denominou de endotelina⁽¹⁾. Desde então houve grande desenvolvimento no conhecimento desta substância revelando-se a sua actividade sobre diversos órgãos e sistemas, sendo hoje sobejamente conhecidas muitas das suas acções na função cardíaca.

A endotelina é um importante regulador da função cardiovascular, contribuindo para a regulação da homeostasia como um factor parácrino^{(para revisão ver (2))}. Paralelamente ao que acontece com outros mediadores neurohumorais, quando em desequilíbrio (hiperactivação do sistema da endotelina), pode concorrer para o processo fisiopatológico de várias doenças cardiovasculares como sejam a hipertensão pulmonar, a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, o enfarte do miocárdio, a reestenose e até mesmo a doença de Chagas^{(3) (para revisão ver (4; 5))}.

Estão caracterizados e descritos dois tipos de receptores para a endotelina, o receptor ETA e o receptor ETB. Estes receptores fazem parte da família dos receptores acoplados às proteínas G, estando distribuídos por uma variedade de células e tecidos em diferentes proporções⁽⁶⁾. Leite-Moreira e Brás-Silva sugeriram ainda a existência de dois subtipos de receptores ETB no coração: ETB1 (localizado no endotélio endocárdico) e ETB2, (localizado nos cardiomiócitos)⁽⁷⁾, à semelhança do que já havia sido descrito para a vasculatura⁽⁸⁾.

Da família da endotelina fazem parte quatro isoformas codificadas por diferentes genes: ET-1, a isoforma predominante, ET-2, ET-3⁽⁹⁾ e ET-4⁽¹⁰⁾. A partir do produto inicial do gene de cada endotelina, uma cascata de eventos permite formar o peptídeo na sua forma activa.

A enzima de conversão da endotelina (ECE) é uma protease transmembranar sensível ao Fosforamidon⁽¹¹⁾ que cataliza a fase final do processamento pós-translacional da endotelina⁽¹²⁾ clivando a big ET₍₁₋₃₈₎ na ligação Trp²¹-Val/Ile²² para formar a ET₍₁₋₂₁₎ (Figura 1). A ECE também pode hidrolizar outros peptídeos biologicamente activos como a bradicinina, a substância P, a angiotensina I e a insulina, embora com menor eficácia^{(Para revisão ver (13))}. Esta enzima integra a família M13 das metaloendopeptidases de zinco juntamente com a endopeptidase neutral 24.11

INTRODUCTION

In 1988, Masashi Yanagisawa described a potent vasoconstrictor peptide, and called it endothelin⁽¹⁾. Since then there have been considerable advances in knowledge of this substance and its action in various organs and systems, particularly its effect on cardiac function.

Endothelin is an important regulator of cardiovascular function, contributing to homeostasis as a paracrine mediator^{(for review see (2))}. As with other neurohumoral modulators, hyperactivation of the endothelin system may be implicated in the pathogenesis of several cardiovascular disorders such as pulmonary and arterial hypertension, heart failure (HF), myocardial infarction, restenosis and Chagas cardiopathy^{(3) (for review see (4, 5))}.

Two types of endothelin receptor have been characterized, ETA and ETB. These belong to the family of G-protein-coupled receptors and are found in a range of cells and tissues in varying proportions⁽⁶⁾. Leite-Moreira and Brás-Silva have further suggested that there are two subtypes of ETB receptors in the heart: ETB1 (in endocardial endothelium) and ETB2 (in cardiomyocytes)⁽⁷⁾, as had already been described for the vasculature⁽⁸⁾.

There are four isopeptides in the endothelin family encoded by different genes: ET-1, the predominant isoform, ET-2, ET-3⁽⁹⁾ and ET-4⁽¹⁰⁾. From the initial gene product of each endothelin, a cascade of events leads to formation of the active peptide.

Endothelin-converting enzyme (ECE) is a membrane-bound phosphoramidon-sensitive protease⁽¹¹⁾ that catalyzes the final stage of post-translational modification of endothelin⁽¹²⁾, cleaving big ET₍₁₋₃₈₎ at the Trp²¹-Val/Ile²² bond to form ET₍₁₋₂₁₎ (Figure 1). ECE can also hydrolyze other biologically active peptides such as bradykinin, substance P, angiotensin I and insulin, although less efficaciously^{(for review see (13))}. This enzyme belongs to the M13 family of zinc metalloendopeptidases, together with neutral endopeptidase 24.11 (NEP), Kell blood group protein, the PHEX gene product^{(for review see (14))}, soluble secreted endopeptidase (SSE)⁽¹⁵⁾ and ECE-like 1 (ECEL-1)⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. The members of this family characteristically contain a highly conserved pentameric consensus sequence of a C-terminal zinc-binding motif (HEXXH)⁽¹⁵⁾.

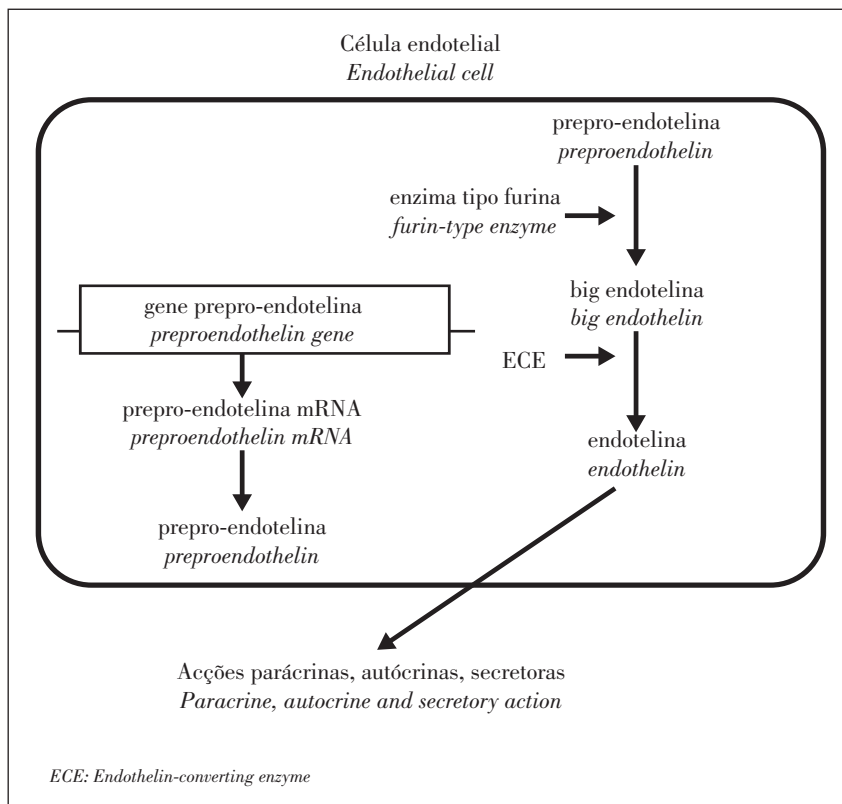


Figura 1. Síntese de endotelina. ECE- Enzima de Conversão da Endotelina (adaptado de Brunner F. e col. 2006)

Figure 1. Endothelin synthesis. ECE - Endothelin converting enzyme. (adapted from Brunner F. et al. 2006)

(EPN), a proteína do grupo sanguíneo Kell, o produto do gene PHEX (para revisão ver (14), a endopeptidase solúvel secretada (ESS) (15) e a enzima tipo ECE (ECEL-1) (16-18). Caracteristicamente, os membros desta família contêm no domínio C-terminal uma sequência de consenso pentamérica de ligação ao zinco (HEXXH) fortemente conservada (15).

Estão descritas diferentes formas de ECE: ECE-1 (19), ECE-2 (20), e ECE-3 (21) com diferentes especificidades para as isoformas de big ET.

Além disso, foram identificadas quatro isoformas para a ECE-1: ECE1a/β, ECE-1b (22), ECE-1c/α (23) e ECE-1d (24), derivadas de um único gene por *splicing* alternativo (22; 24), localizado na banda 1p23 do genoma humano (25). Estas enzimas diferem no domínio N-terminal e apresentam diferentes localizações subcelulares (22). À semelhança do que aconteceu para a ECE-1 identificaram-se as seguintes isoformas de ECE-2: ECE-2a-1, ECE-2a-b, ECE-2b-1 e ECE-2b-2 (26), também com diferentes localizações subcelulares e gene localizado no cromossoma 3 do genoma humano: 3q28-q29 (27).

A ECE-3 é uma enzima com especificidade para a big ET-3 (21).

Estudos com disrupção do gene da ECE-1 (28),

Three forms of ECE have been described: ECE-1 (19), ECE-2 (20), and ECE-3 (21), with different specificities for the isoforms of big ET.

Four isoforms of ECE-1 have also been identified: ECE-1a/β, ECE-1b (22), ECE-1c/α (23) and ECE-1d (24), derived by alternative splicing from a single gene (22, 24), located at 1p23 of chromosome 1 of the human genome (25). These enzymes differ in the N-terminal portion and have different subcellular localizations (22). As with ECE-1, four different isoforms of ECE-2 have been identified: ECE-2a-1, ECE-2a-b, ECE-2b-1 and ECE-2b-2 (26), also with different subcellular localizations, the gene being located on chromosome 3 at 3q28-q29 (27).

ECE-3 is specific for big ET-3 (21).

Studies on disruption of the ECE-1 gene (28), together with the fact that ECE-1 is found in a wider range of tissues and expressed in greater quantities than ECE-2, indicate that ECE-1 is the main enzyme responsible for the transformation of big ET into ET (27).

As was the case with the angiotensin pathway, ECE inhibitors have been developed extending the possibilities of therapeutic intervention in the endothelin pathway beyond receptor antagonism.

We review the different ECE inhibitors, with

assim como a distribuição por um maior número de tecidos e expressão em níveis mais elevados desta enzima relativamente à ECE-2, indicam que a ECE-1 é a principal enzima responsável pela transformação da big ET em ET⁽²⁷⁾.

À semelhança do que aconteceu com a via da angiotensina, foram desenvolvidos inibidores da ECE, o que permite alargar as potencialidades terapêuticas da intervenção na via da endotelina já iniciada com o antagonismo dos receptores.

Nesta revisão serão abordados diferentes inibidores da enzima de conversão da endotelina dando particular ênfase à sua aplicação clínica nas diversas patologias cardiovasculares com referência a estudos animais e humanos quando descritos.

TIPOS DE INIBIDORES DA ECE

Há três tipos de inibidores conhecidos: inibidores selectivos ECE-1, inibidores ECE-1/EPN e inibidores ECE-1/EPN/ECA (*Quadro I*). O termo “selectivo ECE-1” refere-se apenas à selectividade entre diferentes tipos de enzimas como a EPN, e não entre diferentes formas ou isoformas de ECE, uma vez que, além do Fosforamidom e do FR901533⁽²⁰⁾, ainda não foi descrita actividade destes compostos para a ECE-2 ou para a ECE-3.

A ECE-1 humana partilha 37% da sequência de aminoácidos com a EPN⁽²⁹⁾ enzima responsável pela degradação proteolítica do peptídeo natriurético auricular⁽³⁰⁾, e da bradicinina⁽³¹⁾, entre outros (para revisão ver⁽¹⁴⁾). Assim, não é surpreendente que a maioria dos inibidores da ECE possua também actividade inibitória para a EPN.

A ECE, a EPN e a ECA são metaloproteases de zinco, pelo que podem ser inibidas simultaneamente por moléculas que possuam um grupo quelante de metal apropriado,⁽³²⁾ o que permite que um único composto tenha capacidade inibitória tripla.

Inibidores selectivos ECE-1

Estes inibidores podem ser de origem natural ou sintética. São exemplos dos primeiros, o WS79089A, B e C, isolados da fermentação de *Streptosporangium roseum* No.79089, o FR901533, sal sódico de WS79089B^(33: 34), o WS75624A e B isolados da fermentação de

particular emphasis on their clinical application in various cardiovascular diseases, and referring to animal and human studies when available.

TYPES OF ECE INHIBITORS

There are three known types of inhibitors: selective ECE-1, ECE-1/NEP and ECE-1/NEP/ACE inhibitors (*Table I*). The term “selective ECE-1” serves merely to differentiate it from other enzymes such as NEP, and not between different ECE forms or isoforms, since, besides phosphoramidon and FR901533⁽²⁰⁾, it is not yet known whether these compounds are active against ECE-2 or ECE-3.

Human ECE-1 shares 37% of its amino acid sequence with NEP⁽²⁹⁾, the enzyme responsible for the proteolysis of atrial natriuretic peptide (ANP)⁽³⁰⁾ and bradykinin⁽³¹⁾, among others (for review see⁽¹⁴⁾). It is thus not surprising that most ECE inhibitors also inhibit NEP.

ECE, NEP and ACE are zinc metalloproteases, and can therefore be inhibited simultaneously by molecules that possess an appropriate metal-chelating group⁽³²⁾, enabling a single compound to provide triple inhibition.

Selective ECE-1 inhibitors

These inhibitors can be natural or synthetic. Examples of the former are WS79089A, B and C, isolated from fermentation of *Streptosporangium roseum* No. 79089; FR901533, the sodium salt of WS79089B^(33:34); WS75624A and B, isolated from fermentation of *Saccharothrix* sp. No. 75624⁽³⁴⁾; and B90063, isolated from fermentation of *Blastobacter* sp. SANK 71894⁽³⁵⁾. These compounds have IC₅₀ values for ECE of 0.73 µM, 0.14 µM and 3.42 µM (WS79089A, B and C), 0.03 g/ml (WS75624A and B), and 1 µM (B90063), and for NEP of >100 µM (WS79089A B and C), 1 µg/ml (WS75624A and B), and 66 µM (B90063)⁽³³⁻³⁵⁾.

Synthetic inhibitors include RO 67-7447 (IC₅₀ 1.2 nM for ECE, >100 µM for NEP, and >10 µM for ACE)⁽³⁶⁾, CGS 35066 (IC₅₀ 22 nM for ECE, 2.3 µM for NEP)⁽³⁷⁾, and PD 069185 and SM-19712, with different IC₅₀ values in different experimental models; the latter has practically no inhibiting effect on ACE and NEP^(38:39). RO 68-7629 and CGS 35339 are prodrugs of RO 67-7447⁽³⁶⁾ and CGS 35066⁽³⁷⁾ respectively.

Saccharothrix sp No 75624⁽³⁴⁾ e o B90063 isolado da fermentação de *Blastobacter sp* SANK 71894⁽³⁵⁾. Estes compostos apresentam IC₅₀ para a ECE de 0,73µM, 0,14µM, 3,42µM (WS79089A, B e C), 0,03µg/ml (WS75624A e B) e 1µM (B90063) e IC₅₀ para a EPN de >100µM (WS79089A B e C), 1µg/ml (WS75624A e B) e 66µM (B90063)⁽³³⁻³⁵⁾.

São inibidores de origem sintética, o RO 67-7447 (IC₅₀ 1,2 nM-ECE, >100µM-EPN e >10µM-ECA)⁽³⁶⁾, o CGS 35066 (IC₅₀ 22nM-ECE/ IC₅₀ 2,3µM-EPN)⁽³⁷⁾, o PD 069185 e o SM-19712, com IC₅₀ diferentes em modelos experimentais diferentes, este último praticamente sem efeito inibitório ECA e EPN^(38; 39). O RO 68-7629 e o CGS 35339 são pró-fármacos de RO 67-7447⁽³⁶⁾ e CGS 35066⁽³⁷⁾, respectivamente.

Inibidores ECE-1/EPN

O Fosforamidon, um dos primeiros inibidores descritos⁽¹¹⁾, é um composto com IC₅₀ de 3,5µM para a ECE, 0,034 µM para a EPN e 78 µM para a ECA⁽⁴⁰⁾, com pouca eficácia por via oral e curta duração de acção. De forma a contornar estas características farmacodinâmicas foram desenvolvidos a partir dele, o CGS 26303 (IC₅₀ 1,1µM-ECE/ IC₅₀ 0,9nM-EPN)⁽⁴¹⁾, o CGS 34043 (IC₅₀ 5,8 nM-ECE/ IC₅₀ 110nM-EPN)⁽⁴²⁾, o CGS 34226 (IC₅₀ 11nM-ECE/ IC₅₀ 4,6nM-EPN)⁽⁴³⁾ e o SLV-306 (potência semelhante ao Fosforamidon)⁽⁴⁴⁾.

A partir dos compostos CGS 26303, CGS 34043 e CGS 34226, desenvolveram-se pró-fármacos com maior biodisponibilidade oral: CGS 26393⁽⁴⁵⁾, CGS 34753⁽⁴²⁾ e CGS 34225⁽⁴⁶⁾, respectivamente. O SLV-306 (daglutril) é disponível por via oral sendo metabolizado em KC-12615, a molécula activa^(47; 44).

Impulsionado pelos resultados promissores obtidos em estudos pré-clínicos, nomeadamente efeito diurético, anti-hipertensor e anti-hipertrofico do músculo cardíaco^(47; 48), este último fármaco tornou-se o primeiro inibidor da ECE a integrar ensaios clínicos⁽⁴⁹⁾, estando a decorrer neste momento a fase II de um ensaio em doentes com insuficiência cardíaca e em doentes com hipertensão arterial⁽⁴⁴⁾.

Inibidores ECE-1/EPN/ECA

São inibidores triplos ECE/EPN/ECA, o Sch 54470, um ácido fosfínico (com IC₅₀ de 80nM para a ECE, 90nM para a EPN e 2,5nM para a

ECE-1/NEP inhibitors

Phosphoramidon, one of the first inhibitors described⁽¹¹⁾, has an IC₅₀ of 3.5 µM for ECE, 0.034 µM for NEP and 78 µM for ACE⁽⁴⁰⁾, with little efficacy when taken orally, as well as being short acting. In order to overcome these pharmacodynamic characteristics, the following have been developed from it: CGS 26303 (IC₅₀ 1.1 µM for ECE and 0.9 nM for NEP)⁽⁴¹⁾, CGS 34043 (IC₅₀ 5.8 nM for ECE and 110 nM for NEP)⁽⁴²⁾, CGS 34226 (IC₅₀ 11 nM for ECE and 4.6 nM for NEP)⁽⁴³⁾, and SLV-306 (with similar potency to phosphoramidon)⁽⁴⁴⁾.

Based on the compounds CGS 26303, CGS 34043 and CGS 34226, prodrugs have been developed with greater oral bioavailability: CGS 26393⁽⁴⁵⁾, CGS 34753⁽⁴²⁾ and CGS 34225⁽⁴⁶⁾ respectively. SLV-306 (daglutril) is orally active, being metabolized to KC-12615, the active molecule^(47, 44).

Following the promising results obtained in preclinical studies, particularly its diuretic, antihypertensive and antihypertrophic effects on cardiac myocytes^(47, 48), SLV 306 became the first ECE inhibitor to be included in clinical trials⁽⁴⁹⁾, and a phase II trial is currently in progress in patients with heart failure and in others with arterial hypertension⁽⁴⁴⁾.

ECE-1/NEP/ACE inhibitors

Triple inhibitors of ECE/NEP/ACE include SCH 54470, a phosphinic acid (with an IC₅₀ of 80 nM for ECE, 90 nM for NEP, and 2.5 nM for ACE)⁽⁵⁰⁾, SA-6817 (IC₅₀ 910 nM for ECE and Ki 4.4 nM for NEP and 15 nM for ACE)⁽⁵¹⁾, CGS 26582 (IC₅₀ 620 nM for ECE, 4 nM for NEP, and 175 nM for ACE)⁽⁵²⁾, CGS 35601 (IC₅₀ 55 nM for ECE, 2 nM for NEP, and 22 nM for ACE) and CGS 37808, its orally active prodrug⁽³²⁾.

Theoretically, non-selective inhibitors would be expected to produce greater benefits by acting simultaneously on various pathways involved in the pathophysiology of cardiovascular diseases. They would thus inhibit the harmful effects mediated by endothelin and angiotensin by blocking their formation, while strengthening the known beneficial effects of atrial natriuretic peptide and bradykinin by preventing their degradation. This question will be discussed below, making reference to relevant published studies.

Tabela 1
Classificação e características dos inibidores da enzima de conversão da endotelina

	Profármaco	Grupo químico	IC50	Modelo	Outras características	Referência
Inibidor selectivo ECE-1	WS79089A	Produto natural	ECE - 0,73 µM NEP - > 100 µM	ECE - homogeneizado de células endoteliais de carótida de boi		(33)
	WS79089B	Produto natural	ECE - 0,14 µM NEP - > 100 µM	NEP - homogeneizado de rim de rato	FR901533 - sal sódico	
	WS79089C	Produto natural	ECE - 3,42 µM NEP - > 100 µM			
	WS75624A	Produto natural	ECE - 0,03 µg/ml (A e B)	ECE - homogeneizado de células endoteliais de carótida de boi	A 100 µ/ml têm actividade antimicrobiana fraca sobre <i>Cryptococcus neoformans</i> YC203, <i>Aspergillus fumigatus</i> IFO 5840 e a 50 µ/ml sobre <i>Cândida albicans</i>	(34)
	WS75624A	Produto natural	EPN - 1 µg/ml (A e B)	NEP - homogeneizado de rim de rato		
	B90063	Produto natural	ECE humana - 1,0 µM ECE rato - 3,2 µM EPN - 66,0 µM	ECE humana- homogeneizado de células endoteliais de veia umbilical EPN:homogeneizado de baço de rato	Inibição fraca da ligação ET-1 aos receptores ETA de rato e ETB bovino	(35)
	RO 67-7447	RO 68-7629	ECE - 1,2 nM EPN >100µM ACE >10µM	Extractos de rim e ventrículo esquerdo de rato		(36)
	CGS 35066	CGS 35339	ECE - 22nM EPN - 2,3µM	Membrana de células COS-1 com sobreexpressão de ECE-1 humana e córtex de rim de rato	Reduziu a acção da big ET-1 em ratos de forma dependente da dose	(37)
	PD 069185	-	Derivado quinazolínico ECE-1- 900nM 25% inibição EPN a 300 µM ECE - 3,8 µM ⁺	Enzima isolada: fracção de membrana solubilizada de células CHO transfectedas com cDNA ECE-1 Células intactas: cocultura de células CHO/ECE-1 e CHO/preproET-1	Sem acção sobre ECE-2 a concentrações de 200µM Citoxicidade (TC ₅₀ = 56 µM) Redução da potencia em 4 vezes, quando comparada com a acção sobre a enzima isolada Potência varia com pH do meio	(38)
	SM-19712	-	Derivado pirazolónico ECE - 42nM ECE - 3 1µM	<i>In vitro</i> - cultura de células endoteliais de aorta de porco ECE solubilizada de microsomas de rato	A potência <i>in vitro</i> foi inferior à esperada de acordo com os resultados obtidos <i>in vitro</i>	(39)

	Profármaco	Grupo químico	IC50	Modelo	Outras características	Referência
Inibidores ECE-1/EPN	Fosforamidon	-	ECE - 3,5 µM, EPN - 0,034 µM ACE - 78 µM	ECE, EPN e ACE: purificadas a partir de células endoteliais de aorta de porco, rim de rato e pulmão de coelho respectivamente	Potência varia com pH do meio	(40)
	CGS 26303	Ácido aminofosfónico	ECE - 1,1 µM EPN - 0,9 nM	ECE- purificada a partir de células endoteliais de aorta de porco EPN- obtida a partir de membrana de córtex de rim	Longa duração de acção <i>in vivo</i> A optimização deste composto permitiu obter IC50 de 17nM para a ECE-1 recombinante humana expressa em células CHO.	(41, 45)
	CGS 34043	CGS 34753	ECE - 5,8 nM EPN - 110nM	Membrana de células COS-1 com sobre-expressão de ECE-1 humana e córtex de rim de rato	Reduziu a acção da big ET-1 em ratos de forma dependente da dose e sustentada durante 2 horas	(46)
	CGS 34226	CGS34225	ECE - 11nM EPN - 4,6nM	Membrana de células COS-1 com sobre-expressão de ECE-1 humana e córtex de rim de rato	Reduziu a acção da big ET-1 em ratos de forma dependente da dose	(51)
	SLV-306 (KC-12792)	-	Carboxilato	ECE - grandeza do µM EPN - grandeza do nM	Metabolizado via oral em KC-12615 Ensaio clínico em fase II para tratamento de hipertensão arterial e insuficiência cardíaca Demonstrou-se a sua acção inibitória ECE e EPN em humanos saudáveis; bem tolerado	(44; 47; 49)
Inibidores ECE/EPN /ACE	Seh 54470	-	Ácido fosfínico ECE - 80nM EPN - 90nM ACE - 2,5nM	ECE - isolada de membrana de pulmão de cobaiá		(50)
	SA-6817	-	Ácido carboxílico ECE - 910nM EPN - 4,4nMb ACE - 15nMb			(51)
	CGS 26582	-	Inibidor sulfídrico ECE - 620nM EPN - 4nM ACE - 175nM	ECE purificada a partir de células endoteliais de aorta de porco Músculo liso de coronária de porco	Maior eficácia nos primeiros 10 minutos com diminuição gradual do efeito inibitório sobre a acção da big ET-1 em ratos, sugerindo curta duração de acção	(52)
	CGS 35601	CGS 37808	ECE - 55nM EPN - 2,4nM ACE - 22nM	Células CHO, com sobre-expressão de ECE-1a humana recombinante, córtex de rim de rato e preparações de membrana de pulmão de coelho	Inibição da resposta pressora da big ET-1 ao longo de duas horas (72% de inibição às 2h). Aumento dos níveis PNA em 170% ao longo de 4h. Inibição da resposta pressora induzida pela angiotensina ao longo de 6 horas (74-90% inibição às 2h).	(32)

a EC50; b KI; CHO - chinese hamster ovary ; COS-1- linha celular

ECA)⁽⁵⁰⁾, o SA-6817 (IC50 910nM e KI 4,4 para a EPN e 15nM para a ECA)⁽⁵¹⁾, o CGS 26582 (IC50 620nM para a ECE, 4nM para a EPN e 175nM para a ECA)⁽⁵²⁾ o CGS 35601 (IC50 55nM-ECE, 2nM-EPN e 22nM-ECA) e CGS 37808, o seu pró-fármaco com biodisponibilidade oral⁽³²⁾.

Conceptualmente, será de esperar que os inibidores não selectivos tenham efeitos benéficos superiores pela acção simultânea em várias vias envolvidas na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Assim, inibiriam as acções deletérias mediadas pela endotelina e angiotensina bloqueando a sua formação e potenciariam os efeitos favoráveis já conhecidos do peptídeo natriurético auricular e da bradicinina evitando a sua degradação. Esta questão será abordada ao longo do texto, com referência aos estudos desenvolvidos nesse sentido.

ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM INIBIDORES DA ENZIMA DE CONVERSÃO DA ENDOTELINA

Enfarte do miocárdio

Apesar de ainda haver poucos estudos, os inibidores da ECE revelaram uma acção benéfica no enfarte do miocárdio, com resultados consistentes em várias espécies animais, diminuindo a área de enfarte e melhorando parâmetros de remodelagem ventricular.

A administração de SM-19712 diminuiu a área de enfarte do miocárdio em coelhos sujeitos a oclusão (30 min) e reperfusão (5h) coronária, (25,9mg/Kg i.v. 10 min antes da oclusão da artéria marginal seguido por infusão contínua de 1,7mg/Kg/min i.v. até ao fim da experiência)⁽³⁹⁾. Verificou-se um efeito semelhante para o Fosforamidon, em cães submetidos a isquemia (2h) e reperfusão (3h) do miocárdio, (0,08mg/Kg/min i.v., com início 5 minutos antes e continuação durante toda a experiência), associando-se à diminuição da área de enfarte (40%), uma diminuição de 88% do número de extrassístoles ventriculares⁽⁵³⁾.

Martin e colaboradores verificaram não haver diminuição da espessura telediastólica da parede anterior, nem diminuição da espessura relativa da

EXPERIMENTAL STUDIES ON ENDOTHELIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS

Myocardial infarction

Although there have been few studies to date, ECE inhibitors have shown beneficial effects in myocardial infarction by reducing infarct size and improving ventricular remodeling parameters, with consistent results in various animal species.

Administration of SM-19712 reduced infarct size in rabbits subjected to coronary occlusion (30 min) and reperfusion (5 h) (25.9 mg/kg iv 10 min before occlusion of the marginal artery, followed by continuous infusion of 1.7 mg/kg/min iv until the end of the experiment)⁽³⁹⁾. A similar effect was observed with phosphoramidon in dogs subjected to myocardial ischemia (2 h) and reperfusion (3 h) (0.08 mg/kg/min iv, beginning 5 min before and maintained throughout the experiment), with a 40% reduction in infarct size and an 88% decrease in ventricular ectopic beats⁽⁵³⁾.

Martin et al. found no reduction in anterior wall end-diastolic thickness, nor in relative ventricular wall thickness, after administration of FR901533 (100 mg/kg/day beginning 24 h following infarction and maintained continuously for seven days) in Sprague-Dawley rats, in contrast to what occurred in the control group. There was a tendency for improvement in hemodynamic parameters (mean blood pressure, systolic pressure and left ventricular end-diastolic pressure), although this was not statistically significant⁽⁵⁴⁾.

At the molecular level, ECE inhibitors decreased levels of α -actin (a marker of myofibroblast activation) in smooth muscle in the infarct zone⁽⁵⁴⁾ and of plasma creatine phosphokinase⁽³⁹⁾.

The few studies available do however open up possibilities for the use of ECE inhibitors in myocardial infarction and will encourage further studies to evaluate the short- and long-term action of these compounds.

Restenosis

Restenosis (re-occlusion of the vessel lumen due to neointimal proliferation) occurs in 30-50% of cases in the first six months following angioplasty, which is an important limitation on the procedure's efficacy⁽⁵⁵⁾.

Following balloon angioplasty of the rat

parede ventricular, após administração de FR 901533 (início 24h após enfarte durante 7 dias, 100mg/Kg/dia de forma contínua) em ratos Sprague-Dawley, contrariamente ao sucedido no grupo controlo. É de assinalar uma tendência para a melhoria dos parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial média, pressão arterial sistólica e pressão telediastólica do ventrículo esquerdo), que, no entanto, não foi estatisticamente significativa⁽⁵⁴⁾.

A nível molecular, os inibidores da ECE diminuíram os níveis de α -actina de músculo liso na zona de enfarte (marcador de activação do miofibroblastos)⁽⁵⁴⁾ e a actividade da creatina fosfocínase no plasma⁽³⁹⁾.

Há ainda poucos trabalhos descritos, abrindo, não obstante, as perspectivas da aplicação dos inibidores da ECE no enfarte do miocárdio e impulsionando o desenvolvimento de novos estudos que avaliem a acção destes compostos a curto e a longo prazo.

Reestenose

A reestenose, proliferação da neointima reocludindo o lúmen do vaso, ocorre em 30-50% das angioplastias nos primeiros 6 meses após o procedimento, constituindo um importante fenómeno limitativo da sua eficácia⁽⁵⁵⁾.

Após angioplastia de balão da artéria carótida de rato, a administração de CGS 26303 (10mg.Kg⁻¹.dia⁻¹ i.v. via mini bomba osmótica com libertação de 5 μ l/h durante 14 dias na veia jugular), reduziu a proliferação da neointima em 35%. Outras formas de administração deste fármaco, por via s.c., intraperitoneal, ou por via oral através do pró-fármaco CGS 26393 reduziram também a proliferação da neointima, em 19, 21 e 23% respectivamente, não se observando qualquer melhoria com o inibidor selectivo EPN-CGS 24592⁽⁵⁵⁾. Este efeito também se tinha verificado com o Fosforamidon que, administrado por mini-bomba osmótica de 10 mg.Kg⁻¹.min⁻¹ s.c. durante 21 dias em ratos submetidos a lesão da artéria carótida comum esquerda, reduziu a formação da neointima em 50%, sem alterar o tamanho da média⁽⁵⁶⁾.

Em ambos os estudos não houve alteração da morfometria da artéria contralateral, não sujeita a angioplastia^(56; 55).

A ausência de efeito com a administração de um inibidor selectivo EPN⁽⁵⁵⁾ sugere que a inibição selectiva ECE pode ser eficaz. É

carotid artery, administration of CGS 26303 (10 mg/kg/day iv by osmotic minipump, releasing 5 μ l/h into the jugular vein for 14 days) reduced neointimal proliferation by 35%. Other methods of administering the drug - subcutaneous, intraperitoneal, or orally with the prodrug CGS 26393 - also reduced neointimal proliferation (by 19, 21 and 23% respectively), although no improvement was seen with the selective NEP inhibitor CGS 24592⁽⁵⁵⁾. A similar effect was found following administration by osmotic minipump of 10 mg/kg/min sc of phosphoramidon for 21 days in rats subjected to left common carotid artery injury, which reduced neointimal formation by 50%, without altering medial thickness⁽⁵⁶⁾.

In both these studies, there was no change in the morphology of the contralateral artery that did not undergo angioplasty^(56, 55).

The absence of an effect with a selective NEP inhibitor⁽⁵⁵⁾ suggests that selective ECE inhibition may be efficacious. It is important to determine whether the more selective and potent of these ECE inhibitors lead to better results.

The development of stents, together with adjuvant pharmacological and radiation therapies, has led to considerable improvements in angioplasty, with significant reductions in the restenosis rate⁽⁵⁷⁾. Despite advances in therapy and the good results obtained with new drugs, ways to prevent the process underlying restenosis continue to be vigorously investigated, and future studies will determine whether ECE inhibitors have a therapeutic role to play in the stent era.

Pulmonary hypertension

Although pulmonary hypertension is the only pathology for which there is general agreement concerning the efficacy of inhibiting the endothelin pathway⁽²⁾, with one receptor inhibitor already approved for clinical use, there have been few studies on ECE inhibition in this context.

Takahashi et al. found that in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension, 100 mg/kg/day of FR901533, administered 24 h after injection of monocrotaline, protected against medial thickening of pulmonary arteries and development of right ventricular overload. No differences in left ventricular systolic pressure were observed between the control group and the pulmonary hypertension group⁽⁵⁸⁾.

Table I
Classification and characteristics of endothelin-converting enzyme inhibitors

	Prodrug	Chemical group	IC ₅₀	Model	Other characteristics	Reference
Selective ECE-1 inhibitors	WS79089A	natural	ECE: 0.73 µM NEP: >100 µM	ECE homogenized from bovine carotid endothelial cells		(33)
	WS79089B	natural	ECE: 0.14 µM NEP: >100 µM	NEP homogenized from rat kidney	Sodium salt: FR901533 -	
	WS79089C	natural	ECE: 3.42 µM NEP: >100 µM			
	WS75624A	natural	ECE: 0.03 µg/ml (A and B)	ECE homogenized from bovine carotid endothelial cells	100 l/ml has a weak antimicrobial action on <i>Cryptococcus neoformans</i> YC203 and <i>Aspergillus fumigatus</i> IFO 5840, and 50 µ/ml on <i>Candida albicans</i>	(34)
	WS75624A	natural	NEP: 1 µg/ml (A and B)	NEP homogenized from rat kidney		
	B90063	natural	Human ECE: 1.0 µM Murine ECE: 3.2 µM NEP: 66.0 µM	Human ECE homogenized from umbilical vein endothelial cells NEP homogenized from rat spleen	Weak inhibition of ET-1 binding to rat ETA and bovine ETB receptors	(35)
	RO 67-7447	Synthetic	ECE: 1.2 nM NEP: >100 µM ACE: >10 µM	Extracts of rat kidney and left ventricle		(36)
	CGS 35066	CGS 35339	ECE: 22 nM NEP: 2.3 µM	COS-1 cell membrane with overexpression of human ECE-1 and rat kidney cortex	Dose-dependent reduction of big ET-1 activity in rats	(37)
	PD 069185	Quinazoline derivative	ECE-1: 900 nM 25% NEP inhibition at 300 µM	Isolated enzyme: solubilized membrane fraction of CHO cells transfected with ECE-1 cDNA Intact cells: coculture of CHO/ECE-1 and CHO/preproET-1 cells	No effect on ECE-2 at a concentration of 200 µM Cytotoxic (TC ₅₀ =56 µM) 400% reduction in potency compared to effect on the isolated enzyme Potency varies with pH of medium	(38)
SM-19712	Sulfonylureid-pyrazole derivative	ECE: 42 nM ECE: 31 µM	<i>In vitro</i> culture of porcine aortic endothelial cells ECE solubilized from rat microsomes	<i>In vivo</i> potency was lower than expected compared to <i>in vitro</i> results	(39)	

	Prodrug	Chemical group	IC ₅₀	Model	Other characteristics	Reference	
ECE-1/NEP inhibitors	Phosphoramidon	-	ECE: 3.5 µM NEP: 0.034 µM ACE: 78 µM	ECE, NEP and ACE: purified from porcine aortic endothelial cells, rat kidney and rabbit lung respectively	Potency varies with pH of medium	(40)	
	CGS 26303	CGS 26393	Phosphonic acid	ECE: 1.1 µM EPN: 0.9 nM	ECE purified from porcine aortic endothelial cells NEP obtained from kidney cortex	Long-acting <i>in vivo</i> Optimization of this compound led to an IC ₅₀ of 17 nM for human recombinant ECE-1 expressed in CHO cells.	(41, 45)
	CGS 34043	CGS 34753		ECE: 5.8 nM EPN: 110 nM	COS-1 cell membrane with overexpression of human ECE-1 and rat kidney cortex	Dose-dependent reduction of big ET-1 activity in rats, sustained for two hours	(46)
	CGS 34226	CGS34225		ECE: 11 nM EPN: 4.6 nM	COS-1 cell membrane with overexpression of human ECE-1 and rat kidney cortex	Dose-dependent reduction of big ET-1 activity in rats	(51)
	SLV-306 (KC-12792)	-	Carboxylate	ECE: order of magnitude µM NEP: order of magnitude nM		When orally administered, metabolized to KC-12615 Phase II clinical trial for treatment of arterial hypertension and heart failure ECE and NEP inhibition demonstrated in healthy human subjects; well tolerated	(44; 47; 49)
ECE/NEP/ACE inhibitors	SCH 54470	-	Phosphonic acid	ECE: 80 nM EPN: 90 nM ACE: 2.5 nM	ECE isolated from guinea-pig lung membrane	(50)	
	SA-6817	-	Carboxylic acid	ECE: 910 nM EPN: 4.4 nM ACE: 15 nM		(51)	
	CGS 26582	-	Sulphydryl inhibitor	ECE: 620 nM EPN: 4 nM ACE: 175 nM	ECE purified from porcine aortic endothelial cells Porcine coronary artery smooth muscle	Greatest efficacy in the first ten minutes, with gradual reduction in inhibition of big ET-1 activity in rats, suggesting it is short-acting	(52)
CGS 35601	CGS 37808		ECE: 55 nM EPN: 2.4 nM ACE: 22 nM	CHO cells, with overexpression of human recombinant ECE-1a, rat kidney cortex, and rabbit lung membrane preparation	Inhibition of pressor response of big ET-1 for two hours (72% inhibition at 2 h), 170% increase in ANP levels for four hours. Inhibition of angiotensin-induced pressor response for six hours (74 - 90% inhibition at 2 h).	(32)	

^a EC₅₀; ^b KI; ECE: endothelin-converting enzyme; NEP: neutral endopeptidase; ET: endothelin; ACE: angiotensin-converting enzyme; CHO: Chinese hamster ovary; COS-1: cell line; ANP: atrial natriuretic peptide

necessário esclarecer se dentro dos inibidores ECE, os mais selectivos e potentes podem conduzir a melhores resultados.

O desenvolvimento de *stents*, terapêutica farmacológica e radiação adjuvantes, teve grande impacto na melhoria da técnica diminuindo significativamente a taxa de reestenose⁽⁵⁷⁾. Apesar da evolução terapêutica, e dos bons resultados obtidos com os novos agentes, a estratégia para evitar o processo subjacente à reestenose continua em profícuo desenvolvimento. Novos estudos dirão se os inibidores da ECE terão um lugar terapêutico na era dos *stents*.

Hipertensão pulmonar

Apesar desta patologia ser a única em que não há grande controvérsia acerca da eficácia da inibição da via da endotelina⁽²⁾, havendo inclusivamente um inibidor dos receptores aprovado para uso clínico, foram desenvolvidos poucos estudos sobre a inibição da ECE.

Takahashi e colaboradores verificaram que, em ratos com hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina, o FR901533 (100mg/Kg/dia) administrado a partir das primeiras 24h após injeção de monocrotalina, protegia do espessamento da camada média das artérias pulmonares e do desenvolvimento de sobrecarga do ventrículo direito. Não foram observadas diferenças na pressão sistólica do ventrículo esquerdo entre o grupo controlo e o de hipertensão pulmonar⁽⁵⁸⁾.

O Fosforamidon reduziu o aumento da pressão pulmonar após o *bypass* cardiopulmonar e paragem cardiocirculatória da hipotermia profunda no porco. Este inibidor foi administrado 15 minutos antes do *bypass* cardiopulmonar numa dose de 30mg/kg através de um catéter introduzido na artéria pulmonar, registando-se um valor final de pressão arterial pulmonar de 22,5±1,3mmHg *versus* 32,1±1,1mmHg no grupo controlo⁽⁵⁹⁾.

Foi descrito um aumento dos níveis de ET-1 associado à hipertensão pulmonar^(60; 61), assim como uma diminuição da expressão dos receptores ETB na hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina⁽⁶²⁾, e aumento da expressão dos receptores ETB noutras formas de hipertensão pulmonar⁽⁶³⁾; para revisão ver⁽⁶⁴⁾.

Os receptores ETB têm acções benéficas no contexto desta doença. Estão envolvidos na depuração da endotelina, diminuindo assim os

Phosphoramidon reduced pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass and circulatory arrest with deep hypothermia in a porcine model. The inhibitor was administered 15 minutes before cardiopulmonary bypass, at a dose of 30 mg/kg via a catheter inserted into the pulmonary artery, the final value for pulmonary arterial pressure being 22.5±1.3 mmHg versus 32.1±1.1 mmHg in the control group⁽⁵⁹⁾.

Increased ET-1 levels have been associated with pulmonary hypertension^(60, 61), as well as reduced ETB-receptor expression in monocrotaline-induced pulmonary hypertension⁽⁶²⁾ and increased ETB-receptor expression in other forms of pulmonary hypertension⁽⁶³⁾ (for review see⁽⁶⁴⁾).

ETB receptors have beneficial effects in this disease since they are involved in endothelin clearance, thus decreasing circulating levels, and reduce pulmonary artery pressure⁽⁶⁵⁾. However, harmful effects have also been described, with the receptors modulating the proliferation⁽⁶⁶⁾ and contraction^(67, 68) of pulmonary artery smooth muscle cells.

The beneficial effects appear to be modulated by receptors located in the endothelium, with harmful ones being modulated by receptors in smooth muscle⁽⁶⁴⁾, suggesting that it may be possible to develop a specific antagonist of therapeutic value.

In the study cited above, Takahashi et al. observed an increase in the immunoreactivity of ETB receptors in the pulmonary artery and a fall in ET-1 levels in the group treated with FR901533. The latter effect was produced by ECE inhibition and possibly by the increased number of ETB receptors⁽⁵⁸⁾.

Thus, while intuition suggests that a selective ETA antagonist would have advantages over a combined ETA/ETB antagonist, leaving ETB receptors free for ET clearance and pulmonary vasodilation, on the other hand, blocking the proliferative and vasoconstricting action modulated by the latter receptors may also be beneficial.

Bosentan, an ETA/ETB antagonist, was shown to be efficacious in the treatment of various forms of pulmonary hypertension⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾, and was approved by the US Food and Drug Administration in 2001 for treatment of patients with this disease in functional class III and IV.

Sitaxsentan⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾ and ambrisentan⁽⁷⁸⁾ are

seus níveis circulantes, e diminuem a pressão da artéria pulmonar⁽⁶⁵⁾. No entanto, também foram descritas acções nocivas mediadas por estes receptores como sejam a proliferação⁽⁶⁶⁾ e a contracção^(67: 68) das células musculares lisas da artéria pulmonar.

As acções benéficas parecem ser mediadas pelos receptores localizados no endotélio e as nefastas pelos receptores localizados no músculo liso⁽⁶⁴⁾, sugerindo que será possível desenvolver um bloqueio específico com tradução terapêutica.

No estudo supracitado, Takahashi e colaboradores, observaram um aumento da imunoreactividade dos receptores ETB na artéria pulmonar e diminuição dos níveis de ET-1 no grupo tratado com FR901533. Este último efeito foi promovido pela acção inibitória sobre a ECE e possivelmente pelo aumento do número de receptores ETB⁽⁵⁸⁾.

Assim, se por um lado é intuitivo pensar que um antagonista selectivo ETA teria vantagem sobre um antagonista misto ETA/ETB, deixando os receptores ETB livres para o *clearance* da ET e vasodilação pulmonar, por outro, o bloqueio das acções proliferativas e vasoconstritoras mediadas por este receptor também poderá ter efeito benéfico.

O Bosentan, antagonista ETA/ETB, mostrou-se eficaz no tratamento de várias formas de hipertensão pulmonar⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* em 2001 para o tratamento desta doença em classe funcional III e IV.

O Sitaxsentan⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾ e o Ambrisentan⁽⁷⁸⁾ são inibidores selectivos ETB, com bons resultados no tratamento da hipertensão pulmonar, aguardando a aprovação para uso clínico.

Até à data, apenas um estudo fez a comparação directa entre estes dois tipos de inibidores. Neste estudo, o LU135252 50mg/Kg/dia (antagonista ETA selectivo) e o BSF420627 50mg/Kg/dia (antagonista ETA/ETB) foram administrados durante três semanas a ratos com hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina. Apesar de haver uma tendência favorável ao inibidor misto, os resultados obtidos foram semelhantes nos dois grupos. É importante referir que a biodisponibilidade e a semi-vida do BSF420627 são inferiores às do LU135252⁽⁷⁹⁾.

Qual será então o papel dos inibidores da ECE neste contexto? Se por um lado diminuem os níveis de ET, bloqueando o seu papel na

selective ETA receptor antagonists that have shown good results in the treatment of pulmonary hypertension, and approval for clinical use is awaited.

To date, only one study has directly compared the two types of antagonists. In this study, 50 mg/kg/day of LU135252 (a selective ETA antagonist) or 50 mg/kg/day of BSF420627 (an ETA/ETB antagonist) were administered to rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension for three weeks. Although the combined antagonist was slightly more effective, the results were similar in both groups. It should be noted that the bioavailability and half-life of BSF420627 are lower than LU135252⁽⁷⁹⁾.

What then is the role of ECE inhibitors in this context? While on the one hand they decrease ET levels, blocking its effect in the pathophysiology of the disease, they also decrease the likelihood of ET binding to endothelial ETB receptors. Are they better than receptor antagonists? In the study by Takahashi et al., the effect of FR901533 was similar to that of the ETA receptor antagonist FR139317⁽⁵⁸⁾. Would it be advantageous to associate ECE inhibition with receptor antagonism, and if so, which receptor? The benefits of each of these blocking agents remain the subject of debate and the results of further studies are awaited.

Arterial hypertension

With regard to the effects of ECE inhibitors on arterial blood pressure (BP), different results have been obtained depending on the experimental model used.

In anesthetized normotensive rats, phosphoramidon had no effect on baseline BP, but it did inhibit the pressor action induced by administration of big ET-1⁽⁸⁰⁾.

In conscious, spontaneously hypertensive rats, a fall in mean BP (mBP) was seen after administration of 10, 20 or 40 mg/kg/h of phosphoramidon for five hours⁽⁸¹⁾, but not after 0.3 or 1 mg/kg/min for two hours⁽⁸⁰⁾. The antihypertensive effect of the drug was again observed in reduced BP levels in a model of hypertension induced by occlusion of the renal artery and in rats with hypertension induced by administration of deoxycorticosterone acetate (DOCA) and salt. In these studies, phosphoramidon was administered to conscious rats in doses of 10, 20 or 40 mg/kg/h for five hours

fisiopatologia desta doença, por outro diminuem a probabilidade da ET se ligar aos receptores ETB endoteliais. Serão superiores aos inibidores dos receptores? No estudo de Takahashi e colaboradores, o efeito do FR901533 foi semelhante ao obtido com um antagonista dos receptores ETA, FR139317⁽⁵⁸⁾. Haverá vantagem na associação da inibição ECE à inibição dos receptores? Se sim, a qual deles? Permanece a controvérsia acerca do benefício de cada um destes bloqueios aguardando-se o resultado de novos estudos.

Hipertensão arterial

Relativamente à acção dos inibidores da ECE sobre a pressão arterial, observaram-se diferentes resultados consoante o modelo experimental de doença estudado.

Em ratos normotensos anestesiados, o Fosforamidon não teve efeito sobre a pressão arterial basal, no entanto, inibiu a acção pressora induzida pela administração de big ET-1⁽⁶⁰⁾.

Em ratos espontaneamente hipertensos conscientes, verificou-se a diminuição da pressão arterial média (PAM) após administração de 10, 20 e 40 mg/Kg/h de Fosforamidon durante 5 horas⁽⁶¹⁾, mas não após administração de 0,3 e 1 mg/Kg/min durante 2 horas⁽⁶⁰⁾. Este fármaco reiterou o seu efeito anti-hipertensor ao diminuir a pressão arterial, nos modelos de hipertensão por oclusão da artéria renal e em ratos hipertensos pela administração de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e sal. Nestes estudos, o Fosforamidon foi administrado em doses de 10, 20 e 40 mg/kg/h durante 5 horas e de 0,01, 0,1 e 1mg/kg/h durante 2 horas, respectivamente, em ratos conscientes^(61; 60).

Após estes estudos iniciais, a investigação foi retomada dando particular atenção à inibição simultânea da enzima de conversão da angiotensina. O CGS 35066 (30mg/Kg/dia em administração intra-arterial contínua durante 3 dias) diminuiu a pressão arterial média 11mmHg em ratos normotensos e 22mmHg em ratos espontaneamente hipertensos. A adição de benazepril, inibidor da enzima de conversão da angiotensina, (30mg/kg/dia em administração intra-arterial contínua durante 3 dias simultaneamente com o CGS 35066), condicionou uma maior diminuição da PAM em ratos normotensos e tratou a hipertensão nos ratos hipertensos. Removendo posteriormente o CGS 35066

and 0.01, 0.1 or 1 mg/kg/min for two hours respectively^(61, 60).

Following these initial studies, research then focused on simultaneous inhibition of ECE and angiotensin-converting enzyme. CGS 35066 (continuous intra-arterial administration of 30 mg/kg/day for three days) reduced mBP by 11 mmHg in normotensive rats and by 22 mmHg in spontaneously hypertensive rats. The addition of the ACE inhibitor benazepril (continuous intra-arterial administration of 30 mg/kg/day for three days simultaneously with CGS 35066) led to a larger fall in mBP in normotensive rats and controlled hypertension in the hypertensive rats. Subsequently discontinuing CGS 35066 while maintaining benazepril led to a smaller decrease in BP in normotensive rats, with no significant change in BP levels in spontaneously hypertensive animals⁽⁶²⁾.

Thus, at the above doses, ACE inhibition without ECE inhibition was sufficient to control hypertension, and a combination of the two inhibitors had an additional effect only in normotensive rats.

Following this line of research came the work of Daull et al., who compared the effect of selective ECE-1 (CGS 35066), ACE (benazepril) and NEP (CGS 24592) inhibitors with the triple inhibitor CGS 35061 in spontaneously hypertensive 36-week-old rats. CGS 35601 reduced mBP (156±4 mmHg) by between 0% and 40% for the lowest (0.01 mg/kg/day) and highest (5 mg/kg/day) doses respectively. ACE inhibition with benazepril was four times less effective than CGS 35601 at doses of 1 mg/kg/day for both drugs, and half as effective at doses of 5 mg/kg/day. Combined ACE and NEP inhibition, and the combination of three inhibitors (benazepril, CGS 35066 and CGS 24592), had no additional effect⁽⁶³⁾.

A subsequent study by the same group set out to determine the effects of this triple inhibitor in a different model of hypertension (low-renin, high-salt hypertension). Dahl salt-sensitive rats with unrestricted salt intake were fed a normal diet (group 1) or a salt-rich diet (groups 2 and 3) for six weeks, and then instrumented with a carotid artery catheter and placed in metabolic cages for 30 days. Hemodynamic, hematologic and biochemical parameters were assessed daily. The treatment began seven days after stabilization, with groups 1 and 2 receiving

(mantendo o benazepril), observou-se uma menor diminuição da pressão arterial nos ratos normotensos e não se verificou alteração significativa da pressão arterial nos ratos espontaneamente hipertensos⁽⁸²⁾.

Em suma, para as doses acima referidas, a inibição da ECA, não associada à inibição da ECE, revelou-se suficiente para controlar a hipertensão arterial, sendo que a combinação dos dois inibidores teve um efeito aditivo apenas para os ratos normotensos.

No seguimento desta linha de investigação surgem os trabalhos de Daull e colaboradores comparando o efeito dos inibidores selectivos ECE-1 (CGS 35066), ECA (benazepril) e EPN (CGS 24592) com o inibidor triplo CGS 35061 em ratos espontaneamente hipertensos (com idade de 36 semanas). Com o CGS 35601 a PAM (156 ± 4 mm Hg) diminuiu entre 0% e 40% para as doses mais baixa (0,01mg/Kg/d) e mais alta (5mg/Kg/d), respectivamente. Com a inibição da ECA (benazepril) obteve-se um resultado quatro vezes menor do que o observado com o CGS 35601 (comparando doses de 1mg/Kg/d para os dois fármacos) e duas vezes menor comparando doses de 5mg/Kg/d. A inibição combinada ECA e EPN, bem como a combinação dos três inibidores (benazepril, CGS 35066 e CGS 24592) não teve efeito adicional⁽⁸³⁾.

Num estudo subsequente, os mesmos autores, pretenderam determinar os efeitos deste inibidor triplo noutra modelo de hipertensão (hipertensão de renina baixa induzida por dieta rica em sódio). Ratos Dahl sensíveis ao sódio, não sujeitos a restrição salina (DSS) foram alimentados com dieta normal (grupo 1) ou com dieta rica em sal (grupos 2 e 3) durante 6 semanas e posteriormente instrumentados com um catéter carotídeo e colocados em gaiolas metabólicas durante 30 dias. Os perfis hemodinâmico, hematológico e bioquímico foram avaliados diariamente. O tratamento começou 7 dias após o período de estabilização com os grupos 1 e 2 a fazerem placebo e o grupo 3 a fazer CGS 35601 em doses de 0,1, 1 e 5mg/Kg/dia durante 6 dias para cada dose por infusão intra-arterial contínua, seguido por um período de 5 dias de *washout*. Nos ratos que receberam CGS 35601, a PAM diminuiu para os valores basais dos ratos DSS alimentados com dieta normal. A frequência cardíaca não foi afectada e o perfil hemodinâmico voltou ao normal durante o período de *washout*. O

placebo and group 3 receiving CGS 35601 in doses of 0.1, 1 and 5 mg/kg/day for six days at each dosage by continuous intra-arterial infusion, followed by a five-day washout period. In the rats receiving CGS 35601, mBP fell to the baseline values of the rats fed a normal diet. Heart rate was not affected and the hemodynamic profile returned to normal during the washout period. The effect was dose-dependent and the drug was well tolerated⁽⁸⁴⁾.

The only drug included in clinical trials, SLV 306, has also shown good preclinical results in arterial hypertension, decreasing systolic and diastolic pressure by 18 mmHg and 4.7 mmHg respectively, and increasing diuresis in DOCA-salt sensitive rats⁽⁴⁷⁾.

Although there would appear to be advantages to administering ECE inhibitors in arterial hypertension, different degrees of efficacy are found in various animal models of the disease. Several factors may be responsible for the inconsistencies in the results, including drug dosage, method of administration, age of the animals, and the model itself.

Simultaneous inhibition of endothelin-converting enzyme, angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase constitutes a new approach to the treatment of hypertension that has the theoretical advantage of reducing levels of two vasoconstrictors, endothelin and angiotensin, while increasing levels of bradykinin and atrial natriuretic peptide, two important vasodilators. Further studies will be required to explore this advantage, as well as to compare the association of selective ECE-1 and ACE inhibitors with triple inhibition.

Human studies

Solvay Pharmaceuticals Inc. have published the preliminary results of a phase II clinical trial of SLV 306 in hypertensive patients, reporting significant reductions in systolic and diastolic blood pressure and good tolerance to the drug⁽⁸⁵⁾.

Heart failure

In a canine model of heart failure induced by rapid stimulation of the right ventricle, FR901533 was administered acutely and chronically.

Acute administration (1 and 3 mg/kg 30 min apart) led to an increase in cardiac output, and decreases in mBP, vascular resistance

efeito foi dependente da dose e o fármaco bem tolerado⁽⁸⁴⁾.

O único fármaco a integrar ensaios clínicos, o SLV 306, também obteve bons resultados pré-clínicos na hipertensão arterial, diminuindo a pressão arterial sistólica e diastólica 18mmHg e 4,7mmHg, respectivamente, e aumentando a diurese em ratos sensíveis à administração de DOCA e sal⁽⁴⁷⁾.

Apesar de parecer haver vantagem na administração dos inibidores da ECE no tratamento da hipertensão arterial, observam-se diferentes graus de eficácia em vários modelos animais de doença. Diversos factores podem ser responsáveis pela falta de equidade dos resultados como sejam a dose do fármaco, o tipo de administração, a idade dos ratos, e o modelo em si.

A inibição simultânea da enzima de conversão da endotelina, enzima de conversão da angiotensina e endopeptidase neutral constitui uma nova abordagem para o tratamento da hipertensão que encerra a vantagem teórica da redução dos níveis de dois vasoconstritores, endotelina e angiotensina associada ao aumento dos níveis de bradicinina e peptídeo natriurético auricular, dois importantes vasodilatadores. Uma vantagem, a explorar em futuros estudos assim como a comparação da associação iECE-1 selectivo e iECA com os inibidores triplos.

Estudos humanos

A farmacêutica Solvay apresentou os resultados preliminares do ensaio clínico de fase II com SLV 306 em doentes hipertensos, referindo uma redução significativa da pressão arterial sistólica e diastólica, e boa tolerância ao fármaco⁽⁸⁵⁾.

Insuficiência cardíaca

Num modelo de insuficiência cardíaca (IC) induzida por estimulação ventricular rápida do ventrículo direito de cão, administrou-se FR901533 de forma aguda e crónica.

Após administração aguda (1 e 3mg/Kg separadas por 30 min) verificou-se aumento do débito cardíaco, diminuição da PAM, das resistências vasculares (pulmonar e sistémica), da actividade da renina plasmática, dos níveis de angiotensina II, aldosterona e PNA, e manutenção dos níveis de noradrenalina.⁽⁸⁶⁾

(pulmonary and systemic), plasma renin activity, and angiotensin II, aldosterone and ANP levels, with no change in noradrenaline levels⁽⁸⁶⁾.

Chronic administration (0.3 mg/kg/h for two weeks) also led to increased cardiac output, together with reduced pulmonary capillary wedge pressure, but had no effect on blood pressure^(87, 88). There was a fall in levels of ANP, aldosterone⁽⁸⁸⁾, angiotensin II and noradrenaline⁽⁸⁷⁾ and prevention of vascular remodeling (as assessed by collagen deposition, medial thickness and lumen diameter)⁽⁸⁷⁾.

Similar results were obtained with chronic administration of CGS 26303 (10 mg/kg/day for 30 days) in rats with HF due to complete occlusion of the left coronary artery, with reduced cardiac remodeling, preload and afterload and increased cardiac output⁽⁸⁹⁾.

Interestingly, Fontaine et al. reported depression of myocardial function with ECE inhibition. Phosphoramidon (10 µM infusion) reduced cardiac contractility in isolated Syrian hamster heart (with and without cardiomyopathy), with no change in coronary vascular tone⁽⁹⁰⁾.

Emoto et al. compared chronic inhibition of ECE/NEP (CGS 26303), NEP (CGS 24592) and ACE (temocapril) in a model of transition from left ventricular hypertrophy to HF in hypertensive rats. All of the drugs improved left ventricular diameter and ejection fraction. Both temocapril and CGS 26303 reduced perivascular fibrosis and overall cardiac hypertrophy. However, only CGS 26303 completely prevented right ventricular hypertrophy and led to regression, and was more effective than ACE inhibition in reducing perivascular fibrosis⁽⁹¹⁾.

Following the same line of investigation, Mellin et al. set out to determine whether the association of an ECE/NEP inhibitor (CGS 26303, 10 mg/kg/day) with an ACE inhibitor (benazepril, 2 mg/kg/day) was superior to their use in isolation. Benazepril and CGS 26303 were administered alone or in combination to rats with HF (subcutaneously for 28 days beginning on the 7th day following coronary occlusion). The results of the association of the two inhibitors proved superior in reducing blood pressure, left ventricular diameter and end-diastolic pressure, as well as collagen deposition and the weight of viable left ventricular myocardium. Cardiac output increased to a similar extent in the different study groups⁽⁹²⁾.

Após administração crónica (0,3 mg/Kg/h durante duas semanas) verificou-se de igual modo um aumento do débito cardíaco e uma redução da pressão capilar pulmonar, mas, no entanto, ausência de efeito na pressão arterial^(87, 88). Os níveis de PNA, aldosterona⁽⁸⁸⁾, angiotensina II e noradrenalina diminuíram⁽⁸⁷⁾ e preveniu-se o desenvolvimento de remodelagem vascular (avaliada pelo depósito de colagénio, espessura da média e diâmetro do lúmen)⁽⁸⁷⁾.

Resultados semelhantes foram obtidos com o CGS 26303 (10 mg/Kg/dia por 30 dias) administrado cronicamente a ratos com IC por oclusão completa da artéria coronária esquerda. Nestes animais verificou-se diminuição da remodelagem cardíaca, da pré e da pós-carga e aumento do débito cardíaco⁽⁸⁹⁾.

Curiosamente, Fontaine e colaboradores descreveram depressão da função miocárdica com um inibidor da enzima de conversão da endotelina. O Fosforamidon (10µM em infusão) diminuiu a contractilidade cardíaca em coração isolado de hamster Sírio (com cardiomiopatia e normal), sem alterar o tónus vascular coronário⁽⁹⁰⁾.

Emoto e colaboradores compararam a inibição crónica de ECE/EPN (CGS 26303), EPN (CGS 24592) e ECA (termocapril) num modelo de transição de hipertrofia do ventrículo esquerdo para IC em ratos hipertensos. Todos os fármacos melhoraram o aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo e a diminuição da fracção de ejeção. Tanto o termocapril como o CGS 26303 diminuíram a fibrose perivascular e reduziram a hipertrofia cardíaca globalmente. No entanto, só o CGS 26303 preveniu completamente e conseguiu regredir a hipertrofia do ventrículo direito sendo mais eficaz que o iECA na diminuição da fibrose perivascular⁽⁹¹⁾.

No seguimento da mesma linha, Mellin e colaboradores pretenderam verificar se a associação de um inibidor ECE/EPN (CGS26303, 10 mg/Kg/d) e um inibidor ECA (benazepril, 2 mg/Kg/d), era superior ao seu uso isolado. Benazepril e CGS 26303 foram administrados sozinhos ou em combinação a ratos com insuficiência cardíaca (subcutaneamente durante 28 dias iniciados ao 7º dia pós-occlusão da coronária). Os resultados da associação dos dois inibidores mostraram a sua superioridade na diminuição da pressão arterial, do diâmetro e pressão telediastólica do ventrículo esquerdo e também na diminuição da acumulação de

The good results obtained with SLV 306 prompted its inclusion in a clinical trial. Administration of SLV 306 (30 mg/kg/day) in genetically hypertensive rats with HF (SHHF/Mcc-facp) reduced left ventricular end-diastolic pressure, peripheral vascular resistance, cardiac hypertrophy, and renin and aldosterone secretion, and increased urinary output⁽⁴⁴⁾. The same dose administered to HF rats with aortic stenosis reduced cardiac hypertrophy and pulmonary congestion⁽⁴⁸⁾. In dogs with HF, it increased cardiac output, contractility, diuresis and natriuresis, and reduced left ventricular end-diastolic pressure⁽⁴⁴⁾.

An interesting finding on the impact of ECE inhibition on survival was reported by Muller et al. in a model of transgenic rats carrying the human gene for angiotensin and renin. The animals developed arterial hypertension, as well as severe renal and cardiac damage independently of increased BP, with death at around seven weeks. In this model, RO0687629 reduced cardiac damage and mortality by 20%⁽³⁶⁾.

Human studies

Various neurohumoral modulators are implicated in the pathophysiology of HF, including angiotensin, endothelin, noradrenaline, and aldosterone. Inhibitors of some of these are routinely used in clinical practice, but this is not yet the case for endothelin.

The harmful effects of elevated ET levels are seen as an important potential therapeutic goal in HF treatment, not only because of the hemodynamic effects of endothelin itself, but also due to changes in levels of other humoral modulators. Following the promising results obtained in animal models with both endothelin receptor antagonists and endothelin-converting enzyme inhibitors, various clinical trials were performed, particularly of the former. However, the results for these antagonists have been disappointing, in some cases showing a worsening of cardiac dysfunction⁽⁹³⁻⁹⁵⁾.

These findings are in agreement with what has been suggested by various authors^{(for review see (2))}, and as reported in Fontaine's study on phosphoramidon in a model of HF in the Syrian hamster⁽⁹⁰⁾, that endothelin helps maintain cardiac function even in the failing heart. This suggests a possible contraindication to use of these drugs, at least in patients with poor left

colagénio e do peso do ventrículo esquerdo no miocárdio viável. O débito cardíaco aumentou de forma semelhante nos diferentes grupos de estudo⁽⁹²⁾.

Os bons resultados obtidos com o SLV 306 instigaram o seu envolvimento num ensaio clínico. A administração de SLV 306 (30 mg/kg/dia) a ratos geneticamente hipertensos com IC (SHHF/Mcc-facp), diminuiu a pressão telediastólica do ventrículo esquerdo, a resistência vascular periférica, a hipertrofia cardíaca, a secreção de renina e aldosterona e aumentou o débito urinário⁽⁴⁴⁾. A mesma dose administrada a ratos com IC por estenose aórtica, reduziu a hipertrofia cardíaca e a congestão pulmonar⁽⁴⁸⁾. Em cães com IC, aumentou o débito cardíaco, a contractilidade, a diurese e a natriurese, e reduziu a pressão telediastólica do ventrículo esquerdo⁽⁴⁴⁾.

Um ponto interessante refere-se ao impacto sobre a sobrevivência observado por Muller e colaboradores num modelo de ratos transgênicos portadores do gene humano da angiotensina e renina. Estes animais desenvolvem hipertensão arterial bem como lesão renal e cardíaca graves independentes do aumento da pressão arterial, com morte ocorrendo cerca das 7 semanas de idade. Neste modelo, o RO0687629 diminuiu a lesão cardíaca e reduziu a mortalidade em 20%⁽³⁶⁾.

Estudos humanos

Vários mediadores neurohumorais estão implicados na fisiopatologia da IC, como a angiotensina, a endotelina, a noradrenalina, a aldosterona, entre outros. Inibidores de alguns destes mediadores neurohumorais são de uso corrente na clínica, mas não ainda os inibidores da via da endotelina.

Os efeitos deletérios do aumento dos níveis da ET são encarados como um potencial e importante alvo terapêutico no tratamento da IC, não só pelos efeitos hemodinâmicos próprios da endotelina, mas também pela alteração dos níveis de outros mediadores humorais. Após os resultados promissores obtidos em modelos animais, quer com antagonistas dos receptores, quer com antagonistas da enzima de conversão da endotelina, desenvolveram-se vários ensaios clínicos, especialmente para os primeiros. No entanto, no primeiro caso, os resultados foram desanimadores tendo-se inclusivamente verifi-

ventricular function.

In patients with chronic HF undergoing conventional therapy including ACE inhibitors, phosphoramidon (30 nM/min for 60 min infused into a brachial artery) caused increased blood flow to the forearm⁽⁹⁶⁾.

SLV 306 (three single doses of 200 mg, 400 mg and 800 mg) administered to patients with congestive HF undergoing right catheterization was well tolerated, reducing pulmonary artery and right atrial pressures, with no significant effect on systemic arterial pressure, heart rate or cardiac output, and no clear evidence of a dose-dependent effect^(97, 98). A clinical trial of this compound is in progress and final results are awaited.

There are as yet no large-scale clinical trials on ECE inhibitors; the SLV 306 study mentioned above is currently under way⁽⁹⁸⁾. Comparisons between ECE and ACE inhibitors, as well as their association, also merit further investigation in the light of the results obtained by Emoto and Mellin^(91, 92).

Chagas disease

Endothelin-converting enzyme inhibitors have also proved useful in the treatment of other diseases with cardiac involvement, such as infection by *Trypanosoma cruzi*, also known as Chagas disease. The disease is expressed in the heart as acute myocarditis and chronic cardiomyopathy. Phosphoramidon administered to infected rats at a dose of 10 mg/kg during the first 15 days postinfection reduced cardiac damage and mortality, and improved prognosis⁽⁹⁹⁾.

FINAL COMMENTS

Significantly increased levels of ET-1 have been detected in studies of ECE knockout mice, suggesting that pathways other than ECE may be involved in processing big-ET-1^(28, 100). Fernandez-Patron et al. have suggested that other enzymes such as chymase and non-ECE metalloproteinases are involved in ET-1 formation⁽¹⁰¹⁾. Although ECE is the main pathway for ET formation, further studies are required to determine the function of these alternative pathways when ECE is blocked. Furthermore, various isoforms for the different ECEs have been described, with different subcellular

cado agravamento da disfunção cardíaca⁽⁹³⁻⁹⁵⁾.

Estes dados vêm ao encontro do que já tem sido sugerido por vários autores^{(para revisão ver (2))} e com o observado por Fontaine com o Fosforamidon, no modelo de insuficiência cardíaca de rato hamster Sírio⁽⁹⁰⁾, de que a endotelina contribui para a manutenção da função cardíaca mesmo em doentes. Estes dados indiciam uma possível contra-indicação do uso destes fármacos pelo menos em doentes com má função ventricular esquerda.

Em doentes com IC crónica em tratamento convencional, incluindo um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, o Fosforamidon (30 nmol/min durante 60 min infundido na artéria braquial) provocou aumento do fluxo sanguíneo do antebraço⁽⁹⁶⁾.

O SLV 306 (três doses únicas 200 mg, 400 mg e 800 mg) administrado a doentes com insuficiência cardíaca congestiva submetidos a cateterismo direito foi bem tolerado, diminuindo a pressão arterial pulmonar e a pressão da aurícula direita, não tendo efeito significativo na pressão arterial sistémica, frequência ou débito cardíacos e sem apresentar clara evidência de dose-efeito^(97; 98). O ensaio clínico com este composto está a decorrer aguardando-se a publicação dos resultados finais.

Para os iECE ainda não há ensaios clínicos em larga escala, estando a decorrer o estudo com o SLV 306⁽⁹⁸⁾. Além disso, a comparação entre iECE e iECA e mesmo a sua associação merece ser mais explorada atendendo aos resultados obtidos por Emoto e Mellin^(91; 92).

Doença de Chagas

Os inibidores da enzima de conversão da endotelina também se revelaram úteis no tratamento de outras doenças com expressão cardíaca, como a infecção por *Trypanosoma cruzi*, também conhecida como doença de Chagas. No coração, esta doença expressa-se sob a forma de miocardite aguda e cardiomiopatia crónica. O Fosforamidon, administrado a ratos infectados, numa dose de 10mg/Kg nos primeiros 15 dias pós-infecção diminuiu a lesão cardíaca e a mortalidade, condicionando um melhor prognóstico⁽⁹⁹⁾.

localizations. The specific role of each of these has yet to be determined in the pathophysiology of diseases in which endothelin plays a part, and particular targeted therapies may be developed in the future based on inhibition of each isoform. In addition, ECE-1 can also hydrolyze other peptides such as bradykinin^(102, 103), substance P, angiotensin I and insulin⁽¹⁰³⁾, and the implications of this effect and the therapeutic applications arising from it remain to be discovered.

Barker et al. created an antisense oligodeoxynucleotide to ECE-1c with the aim of studying the role of this enzyme in ET formation⁽¹⁰⁴⁾. Although this study was not performed for pharmacological purposes, it has opened the way for pharmacogenomics to intervene in the endothelin pathway.

To date, there has been less progress in developing ECE inhibitors than endothelin receptor antagonists. Research into ECE inhibitors received little attention in the beginning, perhaps due to the initially promising results obtained with receptor antagonists. However, there is now growing interest, particularly in the context of heart failure and arterial hypertension, with excellent hemodynamic results, good drug tolerance and reduced mortality. At the same time, advances in understanding of the cellular dynamics of ECE and characterization of its isoforms have stimulated interest in these inhibitors, with the possibility of developing more specific, targeted blockade. The results of the clinical trial in progress are eagerly awaited, and will certainly be an important step in the research and development of new therapeutic strategies using endothelin-converting enzyme inhibitors.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em estudos com ratinhos *knockout* para as ECE, foram identificados níveis significativamente elevados de ET-1, sugerindo que outras vias que não a da ECE podem existir para o processamento de big-ET-1^(28; 100). Fernandez-Patron e colaboradores aventaram outras enzimas como a quimase e metaloproteinases não-ECE, como também participando na formação de ET-1⁽¹⁰¹⁾. Apesar da ECE ser a principal via para a formação de ET, é necessário promover estudos no sentido de determinar qual a função destas vias alternativas quando a ECE é bloqueada. Além disso, foram descritas várias isoformas para as diferentes ECE, com diferentes localizações subcelulares não estando ainda exploradas funções específicas para cada uma delas na fisiopatologia de doenças em que a endotelina tem um papel contributivo, podendo, no futuro, desenvolver-se terapêuticas mais direcionadas, com inibidores específicos para cada isoforma. Por outro lado, a ECE-1 pode também hidrolisar outros peptídeos como a bradicinina^(102; 103), a substância P, a angiotensina I e a insulina⁽¹⁰³⁾ estando ainda a descoberto as reais implicações deste efeito e as particularidades terapêuticas que daí podem advir.

Barker e colaboradores criaram um oligodesoxinucleótido anti-sense para a ECE-1c com o intuito de estudar o papel desta enzima na formação de ET⁽¹⁰⁴⁾. Apesar de não ter sido desenvolvido com sentido farmacológico, fica aberta a página da farmacogenómica na intervenção da via da endotelina.

Até à data, tem havido menos progresso no desenvolvimento de fármacos inibidores da ECE do que antagonistas dos receptores da endotelina. A investigação dos inibidores da ECE foi pouco explorada inicialmente, talvez fruto dos resultados inicialmente auspiciosos obtidos com os antagonistas dos receptores. No entanto, tem vindo a ser retomada cada vez com mais interesse, particularmente na área da insuficiência cardíaca e da hipertensão arterial, com excelentes resultados hemodinâmicos, boa tolerância ao fármaco e diminuição da mortalidade. Por outro lado, a evolução do conhecimento da dinâmica celular da ECE e a caracterização das suas isoformas, vem estimular o interesse por estes inibidores com a possibilidade de uma inibição mais específica e direcionada. Aguardam-se com expectativa os resultados do ensaio clínico em curso que, certamente, serão um passo importante para a investigação e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com fármacos inibidores da enzima de conversão da endotelina.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Professor Hernâni Monteiro

4200-319 Porto, PORTUGAL

amoreira@med.up.pt

Telefone: 225513644

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T, 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.
2. Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF, 2006. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 111, 508-531.
3. Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loredó ML, Weiss LM, Factor SM, Shtutin V, Mukherjee S, Kitsis RN, Christ GJ, Wittner M, Shirani J, Kisanuki YY, Yanagisawa M, 2005. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun* 73, 2496-2503.
4. Luscher TF, Barton M, 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102, 2434-2440.
5. Attina T, Camidge R, Newby DE, Webb DJ, 2005. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart* 91, 825-831.
6. Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM, 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol Rev* 46, 137-142.
7. Leite-Moreira AF, Bras-Silva C, 2004. Inotropic effects of ETB receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H1194-H1199.
8. Masaki T, Ninomiya H, Sakamoto A, Okamoto Y, 1999. Structural basis of the function of endothelin receptor. *Mol Cell Biochem* 190, 153-156.
9. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T, 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2863-2867.

10. Saida K, Mitsui Y, Ishida N, 1989. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 264, 14613-14616.
11. McMahon EG, Palomo MA, Moore WM, McDonald JF, Stern MK, 1991. Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1-(1-39) in vivo and conversion of big endothelin-1-(1-39) to endothelin-1-(1-21) in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 703-707.
12. Okada K, Miyazaki Y, Takada J, Matsuyama K, Yamaki T, Yano M, 1990. Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 1192-1198.
13. D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J, 2003. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 503-510.
14. Turner AJ, Isaac RE, Coates D, 2001. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23, 261-269.
15. Ikeda K, Emoto N, Raharjo SB, Nurhantari Y, Saiki K, Yokoyama M, Matsuo M, 1999. Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem* 274, 32469-32477.
16. Valdenaire O, Richards JG, Faull RL, Schweizer A, 1999. XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 64, 211-221.
17. Valdenaire O, Rohrbacher E, Langeveld A, Schweizer A, Meijers C, 2000. Organization and chromosomal localization of the human ECE1 (XCE) gene encoding a zinc metalloprotease involved in the nervous control of respiration. *Biochem J* 346 Pt 3, 611-616.
18. Benoit A, Vargas MA, Desgroseillers L, Boileau G, 2004. Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECE1) is present both in the plasma membrane and in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 380, 881-888.
19. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, de Wit D, Yanagisawa M, 1994. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78, 473-485.
20. Emoto N, Yanagisawa M, 1995. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270, 15262-15268.
21. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T, 1998. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-1. *FEBS Lett* 428, 304-308.
22. Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Loffler BM, 1997. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 328 (Pt 3), 871-877.
23. Brown CD, Barnes K, Turner AJ, 2000. Functional significance of the isoforms of endothelin-converting enzyme-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, S26-27.
24. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB, 1999. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter: molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 264, 341-349.
25. Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG, 1995. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* 270, 29794-29798.
26. Ikeda S, Emoto N, Alimsardjono H, Yokoyama M, Matsuo M, 2002. Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 421-426.
27. Lorenzo MN, Khan RY, Wang Y, Tai SC, Chan GC, Cheung AH, Marsden PA, 2001. Human endothelin converting enzyme-2 (ECE2): characterization of mRNA species and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* 1522, 46-52.
28. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE, 1998. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 125, 825-836.
29. Schmidt M, Kroger B, Jacob E, Seulberger H, Subkowski T, Otter R, Meyer T, Schmalzing G, Hillen H, 1994. Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* 356, 238-243.
30. Sonnenberg JL, Sakane Y, Jeng AY, Koehn JA, Ansell JA, Wennogle LP, Ghai RD, 1988. Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides* 9, 173-180.
31. Dumoulin MJ, Adam A, Blais C, Jr., Lamontagne D, 1998. Metabolism of bradykinin by the rat coronary vascular bed. *Cardiovasc Res* 38, 229-236.
32. Trapani AJ, Beil ME, Bruseo CW, Savage P, Firooznia F, Jeng AY, 2004. CGS 35601 and its Orally Active Prodrug CGS 37808 as Triple Inhibitors of Endothelin-converting Enzyme-1, Neutral Endopeptidase 24.11, and Angiotensin-converting Enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1, S211-215.
33. Tsurumi Y, Ohhata N, Iwamoto T, Shigematsu N, Sakamoto K, Nishikawa M, Kiyoto S, Okuhara M, 1994. WS79089A, B and C, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Streptosporangium roseum*. No. 79089. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 47, 619-630.
34. Tsurumi Y, Ueda H, Hayashi K, Takase S, Nishikawa M, Kiyoto S, Okuhara M, 1995. WS75624 A and B, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Saccharothrix* sp. No. 75624. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 48, 1066-1072.
35. Takaishi S, Tuchiya N, Sato A, Negishi T, Takamatsu Y, Matsushita Y, Watanabe T, Iijima Y, Haruyama H, Kinoshita T, Tanaka M, Kodama K, 1998. B-90063, a novel endothelin converting enzyme inhibitor isolated from a new marine bacterium, *Blastobacter* sp. SANK 71894. *J Antibiot (Tokyo)* 51, 805-815.
36. Muller DN, Mullally A, Dechend R, Park JK, Fiebeler A, Pilz B, Loffler BM, Blum-Kaelin D, Masur S, Dehmlow H, Aebi JD, Haller H, Luft FC, 2002. Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension* 40, 840-846.
37. Jeng AY, De Lombaert S, Beil ME, Bruseo CW, Savage P, Chou M, Trapani AJ, 2000. Design and synthesis of a potent and selective endothelin-converting enzyme inhibitor, CGS 35066. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, S36-39.
38. Ahn K, Sisneros AM, Herman SB, Pan SM, Hupe D, Lee C, Nikam S, Cheng XM, Doherty AM, Schroeder RL, Haleen SJ, Kaw S, Emoto N, Yanagisawa M, 1998. Novel selective

- quinazoline inhibitors of endothelin converting enzyme-1. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 184-190.
39. Umekawa K, Hasegawa H, Tsutsumi Y, Sato K, Matsumura Y, Ohashi N, 2000. Pharmacological characterization of a novel sulfonyleid-pyrazole derivative, SM-19712, a potent nonpeptidic inhibitor of endothelin converting enzyme. *Jpn J Pharmacol* 84, 7-15.
40. Kukkola PJ, Savage P, Sakane Y, Berry JC, Bilei NA, Ghai RD, Jeng AY, 1995. Differential structure-activity relationships of phosphoramidon analogues for inhibition of three metalloproteases: endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase, and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3, S65-68.
41. De Lombaert S, Ghai RD, Jeng AY, Trapani AJ, Webb RL, 1994. Pharmacological profile of a non-peptidic dual inhibitor of neutral endopeptidase 24.11 and endothelin-converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 407-412.
42. Trapani AJ, De Lombaert S, Beil ME, Bruseo CW, Savage P, Chou M, Jeng AY, 2000. CGS 34043: a non-peptidic, potent and long-acting dual inhibitor of endothelin converting enzyme-1 and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci* 67, 1025-1033.
43. Jeng AY, Savage P, Beil ME, Bruseo CW, Hoyer D, Fink CA, Trapani AJ, 2002. CGS 34226, a thiol-based dual inhibitor of endothelin converting enzyme-1 and neutral endopeptidase 24.11. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48, 98S-101S.
44. Tabrizchi R, 2003. SLV-306. *Solvay. Curr Opin Investig Drugs* 4, 329-332.
45. De Lombaert S, Blanchard L, Berry C, Ghai RD, Trapani AJ, 1995. Non-peptidic inhibitors of neutral endopeptidase 24.11 - 2. Design and pharmacology of orally active phosphonate prodrugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 5, 151-154(154).
46. Trapani AJ, Beil ME, Bruseo CW, Fink CA, Hoyer D, Savage P, Jeng AY, 2002. Effects of the ECE/NEP inhibitor CGS 34225 on the big ET-1-induced pressor response and plasma atrial natriuretic peptide concentration in conscious rats. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48, 102S-106S.
47. Meil J, Wurl M, Thormählen D, Rose H. Pharmacology of the active metabolite of SLV 306: A mixed inhibitor of NEP and ECE. *Nau Schi Arch Pharmacol*. 1998;358(Suppl 1):R513.
48. Meil J, Rupp H, Thormählen D, Rose H. In-vivo results with SLV 306, an orally active inhibitor of NEP and ECE. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1998, 358(1, Suppl. 2): R 514
49. Seed A, Kuc RE, Davenport A, Ashby M, Hiller C, De Voogd H, Essers H, McMurray J, 2003. First demonstration in humans of systemic neutral endopeptidase and endothelin converting enzyme inhibition using a new, orally active dual metalloprotease inhibitor SLV 306. *Journal of the American College of Cardiology* 265A
50. Vemulapalli S, Chintala M, Stamford A, Watkins R, Chiu P, Sybertz E, Fawzi A, 1997. Renal effects of SCH 54470: a triple inhibitor of ECE, ACE, and NEP. *Cardiovascular Drug Reviews* 15, 260-272.
51. Jeng AY, Mulder P, Kwan AL, Battistini B, 2002. Nonpeptidic endothelin-converting enzyme inhibitors and their potential therapeutic applications. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 440-449.
52. Ksander GM, Savage P, Trapani AJ, Balwierczak JL, Jeng AY, 1998. Benzofused macrocyclic lactams as triple inhibitors of endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase 24.11, and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1, S71-73.
53. Alberola Aguilar AM, Revert F, Moya A, Beltran J, Garcia J, San Martin E, Sancho S, Such L, 2000. Intravenous BQ-123 and phosphoramidon reduce ventricular ectopic beats and myocardial infarct size in dogs submitted to coronary occlusion and reperfusion. *Gen Pharmacol* 35, 143-147.
54. Martin P, Tzanidis A, Stein-Oakley A, Krum H, 2000. Effect of a highly selective endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiac remodeling in rats after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, S367-370.
55. Pham D, Jeng AY, Plante S, Escher E, Battistini B, 2002. Inhibition of endothelin-converting enzyme for protection against neointimal proliferation following balloon angioplasty of the rat carotid artery. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 450-457.
56. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, Shimada K, Maemura K, Oda H, Ishikawa T, Uchiyama T, Tanzawa K, Yazaki Y, 1997. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 95, 221-230.
57. Smith SC, Jr., Feldman TE, Hirshfeld JW, Jr., Jacobs AK, Kern MJ, King SB, 3rd, Morrison DA, O'Neil WW, Schaff HV, Whitlow PL, Williams DO, Antman EM, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, 2006. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation* 113, e166-286.
58. Takahashi T, Kanda T, Inoue M, Sumino H, Kobayashi I, Iwamoto A, Nagai R, 1998. Endothelin converting enzyme inhibitor protects development of right ventricular overload and medial thickening of pulmonary arteries in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Life Sci* 63, PL137-143.
59. Kirshbom PM, Tsui SS, DiBernardo LR, Meliones JN, Schwinn DA, Ungerleider RM, Gaynor JW, 1995. Blockade of endothelin-converting enzyme reduces pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Surgery* 118, 440-444; discussion 444-445.
60. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ, 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328, 1732-1739.
61. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K, 1993. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 73, 887-897.
62. Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K, 1993. Altered expression of ETB-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8, S336-338.
63. Kirshbom PM, Page SO, Jacobs MT, Tsui SS, Bello E, Ungerleider RM, Schwinn DA, Gaynor JW, 1997. Cardiopulmonary bypass and circulatory arrest increase endothelin-1 production and receptor expression in the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113, 777-783.
64. Galie N, Manes A, Branzi A, 2004. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 61, 227-237.
65. Okada M, Yamashita C, Okada M, Okada K, 1995. Role of endothelin-1 in beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 92, 114-119.

66. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J, 2002. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 398-405.
67. MacLean MR, McCulloch KM, Baird M, 1995. Effects of pulmonary hypertension on vasoconstrictor responses to endothelin-1 and sarafotoxin S6C and on inherent tone in rat pulmonary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 26, 822-830.
68. McCulloch KM, Docherty CC, Morecroft I, MacLean MR, 1996. EndothelinB receptor-mediated contraction in human pulmonary resistance arteries. *Br J Pharmacol* 119, 1125-1130.
69. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G, 2002. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346, 896-903.
70. Barst RJ, Ivy D, Dingemans J, Widlitz A, Schmitt K, Doran A, Bingaman D, Nguyen N, Gaitonde M, van Giersbergen PL, 2003. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of bosentan in pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 73, 372-382.
71. Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galie N, Boonstra A, Rubin LJ, Horn EM, Manes A, Simonneau G, 2004. Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *Eur Respir J* 24, 353-359.
72. Sithon O, Gressin V, Speich R, Macdonald PS, Opravil M, Cooper DA, Fourme T, Humbert M, Delfraissy JF, Simonneau G, 2004. Bosentan for the treatment of human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1212-1217.
73. Hoeper MM, Kramm T, Wilkens H, Schulze C, Schafers HJ, Welte T, Mayer E, 2005. Bosentan therapy for inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest* 128, 2363-2367.
74. Galie N, Beghetti M, Gatzoulis MA, Granton J, Berger RM, Lauer A, Chiossi E, Landzberg M, 2006. Bosentan therapy in patients with Eisenmenger syndrome: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Circulation* 114, 48-54.
75. Langleben D, Brock T, Dixon R, Barst R, 2004. STRIDE 1: Effects of the Selective ETA Receptor Antagonist, Sitaxsentan Sodium, in a Patient Population with Pulmonary Arterial Hypertension that Meets Traditional Inclusion Criteria of Previous Pulmonary Arterial Hypertension Trials. *J Cardiovasc Pharmacol* 44, S80-S84.
76. Langleben D, Hirsch AM, Shalit E, Lesenko L, Barst RJ, 2004. Sustained symptomatic, functional, and hemodynamic benefit with the selective endothelin-A receptor antagonist, sitaxsentan, in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest* 126, 1377-1381.
77. Barst RJ, Langleben D, Badesch D, Frost A, Lawrence EC, Shapiro S, Naeije R, Galie N, 2006. Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. *J Am Coll Cardiol* 47, 2049-2056.
78. Galie N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon MD, Keogh AM, Frost AE, Zwicke D, Naeije R, Shapiro S, Olschewski H, Rubin LJ, 2005. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 46, 529-535.
79. Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J, 2001. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 103, 314-318.
80. Vemulapalli S, Watkins RW, Brown A, Cook J, Bernardino V, Chiu PJ, 1993. Disparate effects of phosphoramidon on blood pressure in SHR and DOCA-salt hypertensive rats. *Life Sci* 53, 783-793.
81. McMahon EG, Palomo MA, Brown MA, Bertenshaw SR, Carter JS, 1993. Effect of phosphoramidon (endothelin converting enzyme inhibitor) and BQ-123 (endothelin receptor subtype A antagonist) on blood pressure in hypertensive rats. *Am J Hypertens* 6, 667-673.
82. Battistini B, Ayach B, Molez S, Blouin A, Jeng AY, 2002. Effects of benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, combined with CGS 35066, a selective endothelin-converting enzyme inhibitor, on arterial blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48, 363S-366S.
83. Daull P, Benrezzak O, Arsenault D, Pheng LH, Blouin A, Cayer J, Beaudoin M, Belleville K, Sirois P, Nantel F, Jeng AY, Battistini B, 2005. Triple vasopeptidase inhibition normalizes blood pressure in conscious, unrestrained, and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 18, 1606-1613.
84. Daull P, Blouin A, Belleville K, Beaudoin M, Arsenault D, Leonard H, Sirois P, Nantel F, Jeng AY, Battistini B, 2006. Triple VPI CGS 35601 reduces high blood pressure in low-renin, high-salt Dahl salt-sensitive rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 830-833.
85. Solvay's novel therapeutic agent SLV306 shows its early promise for the treatment of hypertension and congestive heart failure. Solvay Pharmaceuticals Inc. Press release, September 14 2001.
86. Wada A, Tsutomoto T, Ohnishi M, Sawaki M, Fukai D, Maeda Y, Kinoshita M, 1999. Effects of a specific endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiac, renal, and neurohumoral functions in congestive heart failure: comparison of effects with those of endothelin A receptor antagonism. *Circulation* 99, 570-577.
87. Wang X, Ohnishi M, Wada A, Tsutomoto T, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Kurokawa K, Yamada H, Kinoshita M, 2001. Endothelin-1 promotes vascular structural remodeling during the progression of heart failure: prevention of vascular remodeling using a specific endothelin-converting enzyme inhibitor. *Life Sci* 69, 2477-2488.
88. Wada A, Ohnishi M, Tsutomoto T, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Wang X, Kinoshita M, 2002. Chronic effects of an endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiorenal and hormonal function in heart failure. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48, 254S-257S.
89. Mulder P, Barbier S, Monteil C, Jeng AY, Henry JP, Renet S, Thuillez C, 2004. Sustained improvement of cardiac function and prevention of cardiac remodeling after long-term dual ECE-NEP inhibition in rats with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 489-494.
90. Fontaine ER, Viau S, Jasmin G, Dumont L, 1998. Effects of phosphoramidon, BQ 788, and BQ 123 on coronary and cardiac dysfunctions of the failing hamster heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 32, 12-20.
91. Emoto N, Raharjo SB, Isaka D, Masuda S, Adiarso S, Jeng AY, Yokoyama M, 2005. Dual ECE/NEP inhibition on cardiac and neurohumoral function during the transition from hypertrophy to heart failure in rats. *Hypertension* 45, 1145-1152.
92. Mellin V, Jeng AY, Monteil C, Renet S, Henry JP, Thuillez C, Mulder P, 2005. Triple ACE-ECE-NEP inhibition in heart failure: a comparison with ACE and dual ECE-NEP inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 46, 390-397.
93. Mylona P, Cleland JG, 1999. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. *Cardio.net Editorial*

Team. Eur J Heart Fail 1, 197-200.

94. Kalra PR, Moon JC, Coats AJ, 2002. Do results of the ENABLE (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure) study spell the end for non-selective endothelin antagonism in heart failure? Int J Cardiol 85, 195-197.

95. Packer M, McMurray J, Massie BM, Caspi A, Charlon V, Cohen-Solal A, Kiowski W, Kostuk W, Krum H, Levine B, Rizzon P, Soler J, Swedberg K, Anderson S, Demets DL, 2005. Clinical effects of endothelin receptor antagonism with bosentan in patients with severe chronic heart failure: results of a pilot study. J Card Fail 11, 12-20.

96. Love MP, Haynes WG, Gray GA, Webb DJ, McMurray JJ, 1996. Vasodilator effects of endothelin-converting enzyme inhibition and endothelin ETA receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors. Circulation 94, 2131-2137.

97. Bayes M, Rabasseda X, Prous JR, 2003. Gateways to clinical trials. Methods Find Exp Clin Pharmacol 25, 831-855.

98. Dickstein K, De Voogd HJ, Miric MP, Willenbrock R, Mitrovic V, Pacher R, Koopman PA, 2004. Effect of single doses of SLV306, an inhibitor of both neutral endopeptidase and endothelin-converting enzyme, on pulmonary pressures in congestive heart failure. Am J Cardiol 94, 237-239.

99. Jelicks LA, Chandra M, Shtutin V, Petkova SB, Tang B, Christ GJ, Factor SM, Wittner M, Huang H, Douglas SA, Weiss

LM, Orleans-Juste PD, Shirani J, Tanowitz HB, 2002. Phosphoramidon treatment improves the consequences of chagasic heart disease in mice. Clin Sci (Lond) 103 Suppl 48, 267S-271S.

100. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S, Clouthier DE, Yanagisawa M, 2000. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. J Clin Invest 105, 1373-1382.

101. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST, 1999. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. Circ Res 85, 906-911.

102. Hoang MV, Turner AJ, 1997. Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. Biochem J 327 (Pt 1), 23-26.

103. Johnson GD, Stevenson T, Ahn K, 1999. Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. J Biol Chem 274, 4053-4058.

104. Barker S, Khan NQ, Wood EG, Corder R, 2001. Effect of an antisense oligodeoxynucleotide to endothelin-converting enzyme-1c (ECE-1c) on ECE-1c mRNA, ECE-1 protein and endothelin-1 synthesis in bovine pulmonary artery smooth muscle cells. Mol Pharmacol 59, 163-169.

Ciclo de Formação Avançada em Cardiologia

Auditório da Casa do Coração, SPC

Fibrilhação auricular e síncope: duas ameaças para a vida. (Já realizada)

Doença cardíaca avançada: o dilema da reabilitação *versus* palição. (Já realizada)

Tratamento da **Síndrome Coronária Aguda:** é impossível melhorar? (A realizar em 4 e 5 de Abril)

Avanços recentes na **Imagiologia Cardiovascular:** que exames pedir e o que esperar deles.

Genética em cardiologia: que deve o clínico saber?

Cardiologia Clínica: os novos fármacos que realmente interessam.

Hipertensão: o que se sabe. E o que se ignora?

Hiperglicémia: sinal vermelho de complicações cardiovasculares.

Miocardiópatias: vamos clarificar conceitos.

Pericardite aguda e crónica: doença velha, tratamento novo.

Doença cardíaca na gravidez: o capítulo esquecido.

Hipertensão arterial pulmonar: avanços no tratamento.

Lapsos, derrotas, sucessos e novas esperanças no diagnóstico e tratamento das **Doenças Valvulares.**

Insuficiência Cardíaca: uma epidemia do século XXI - o que se sabe. E o que há de novo?