

Bruna Cláudia Marques Costa

Potencial terapêutico dos antagonistas da endotelina

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018



Bruna Cláudia Marques Costa

Potencial terapêutico dos antagonistas da endotelina

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

## Potencial terapêutico dos antagonistas da Endotelina

---

Bruna Costa

(assinatura)

Trabalho apresentado á Universidade  
Fernando Pessoa como parte dos requisi-  
tos para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas

## RESUMO

A Endotelina é um péptido produzido essencialmente pelas células endoteliais em resposta a vários estímulos, sendo considerado o péptido vasoconstritor mais potente. A endotelina liga-se a dois recetores acoplados à proteína G, o recetor ET<sub>A</sub> e o recetor ET<sub>B</sub>. O recetor ET<sub>A</sub> predomina a nível do músculo liso vascular e a sua ativação provoca essencialmente vasoconstrição, por sua vez o recetor ET<sub>B</sub> tem maior expressão a nível do endotélio e a sua ativação provoca vasodilatação, podendo também em menor grau relativamente ao ET<sub>A</sub>, causar vasoconstrição. Em condições patológicas ocorre a desregulação dos níveis de endotelina sendo que os recetores da endotelina contribuem para os efeitos prejudiciais deste péptido. A desregulação dos níveis plasmáticos de endotelina contribui para o desenvolvimento de diversas patologias como a hipertensão arterial pulmonar, a insuficiência cardíaca ou a doença renal crónica. O estudo dos recetores da endotelina levou à descoberta de compostos capazes de antagonizar estes recetores com potencial terapêutico. Alguns fármacos já se encontram disponíveis para uso clínico, em particular destacam-se o bosentano o ambrisentano e o macitentano, no entanto muitos outros ainda se encontram em fase de ensaios clínicos. Neste trabalho pretende-se fazer uma revisão bibliográfica de todos os mecanismos fisiopatológicos do sistema da endotelina, o seu envolvimento nas várias patologias bem como as várias opções terapêuticas disponíveis. Pretende-se, ainda, fazer uma pesquisa relativamente aos vários compostos destinados a modular o sistema da endotelina em fase de ensaios clínicos, avaliando o seu potencial clínico.

**Palavras-chave:** endotelina, hipertensão arterial pulmonar, antagonistas, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>, bosentano, ambrisentano, macitentano

## **ABSTRACT**

Endothelin is a peptide produced essentially by endothelial cells in response to various stimuli, being considered the most potent vasoconstrictor peptide. Endothelin binds to two G protein coupled receptors, the ET<sub>A</sub> receptor and the ET<sub>B</sub> receptor. The ET<sub>A</sub> receptor predominates at vascular smooth muscle level and its activation essentially causes vasoconstriction. In turn, the ET<sub>B</sub> receptor has a greater expression at the endothelium level and its activation causes vasodilation, and may also cause vasoconstriction to a lesser degree with respect to ET<sub>A</sub>. Under pathological conditions deregulation of endothelin levels occurs and endothelin receptors contribute to the detrimental effects of this peptide. Deregulation of plasma levels of endothelin contributes to the development of several pathologies such as pulmonary arterial hypertension, heart failure or chronic kidney disease. The study of endothelin receptors led to the discovery of compounds capable of antagonizing these receptors with therapeutic potential. Some drugs are already available for clinical use, in particular bosentan, ambrisentan and macitentan, but many others are still in clinical trials. In this work we intend to make a bibliographical review of all pathophysiological mechanisms of the endothelin system, its involvement in the various pathologies as well as the various therapeutic options available. It is also intended to perform a research on the various compounds intended to modulate the endothelin system in the clinical trials phase, assessing its clinical potential.

**Key words:** endothelin, pulmonary arterial hypertension, antagonists, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>, bosentan, ambrisentan, macitentan

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, queria agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor João Capela, pela atenção e disponibilidade demonstrada, bem como a competência científica e incentivo. Não poderia deixar de referir também e dessa forma deixar mais uma vez o meu agradecimento, por me ter motivado o interesse pela área da Farmacologia durante o meu percurso académico.

Agradecer também aos meus pais, são eles os principais responsáveis por este percurso. Obrigado por me terem encorajado a seguir sempre os meus sonhos, obrigado por terem tornado tudo isto possível, sem vocês este sonho não se teria concretizado.

À minha irmã, um agradecimento muito especial. Obrigada pelos bons exemplos que me transmites-te, serás sempre um motivo de orgulho pra mim. Obrigada também por todo o apoio não só ao longo desta caminhada, mas em todos os momentos da minha vida. Obrigada também por me dares o maior amor do mundo.

Ao meu namorado, obrigado por todos estes anos ao meu lado. Obrigado por me apoiares em todos os momentos da nossa vida, mesmo que tudo pareça muito complicado. Obrigado por teres sempre forma de ver o lado positivo das coisas e me acalmar mesmo quando penso que não vou conseguir atingir os meus objetivos.

Obrigada à minha amiga e companheira de todos os momentos nesta caminhada, Helena Magalhães. Obrigada pela amizade e companheirismo que demonstraste para comigo desde o primeiro dia deste curso.

Obrigado a todos os restantes amigos e familiares pelo apoio, companheirismo, admiração, pelas palavras de incentivo sempre demonstradas.

Obrigado ao meu avô, porque mesmo não estando comigo fisicamente esteve sempre presente no pensamento e no coração, dando-me força nos momentos menos fáceis.

## Índice

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
Agradecimentos .....	vii
Índice .....	viii
Índice de figuras .....	xi
Lista abreviaturas:.....	xii
Introdução.....	1
I. Materiais e métodos.....	2
II. Endotelina: Síntese e recetores .....	3
III. Papel Fisiológico da Endotelina .....	5
1. Efeitos da Endotelina nos vasos sanguíneos .....	5
2. Efeitos da Endotelina no coração .....	5
3. Efeitos da Endotelina a nível pulmonar.....	6
4. Efeitos da Endotelina a nível renal .....	7
IV. Fármacos modificadores do Sistema da Endotelina .....	9
1. Recetores da Endotelina .....	9
i. Recetor ET <sub>A</sub> .....	9
ii. Recetor ET <sub>B</sub> .....	10
2. Agonistas do recetor ET <sub>A</sub> .....	12
3. Agonistas do recetor ET <sub>B</sub> .....	12

4.	Antagonistas do recetor ET <sub>B</sub> .....	13
5.	Antagonistas do recetor ET <sub>A</sub> .....	14
6.	Sitaxsentano.....	15
7.	Antagonistas dos recetores ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> .....	16
V.	Fármacos antagonistas da Endotelina como agentes terapêuticos.....	16
1.	Bosentano .....	16
2.	Ambrisentano .....	20
3.	Macicentano.....	23
4.	Terapêutica de combinação .....	25
i.	Antagonistas da endotelina combinados com análogos da prostaciclina.....	25
ii.	Antagonistas da endotelina combinados com inibidores da fosfodiesterase tipo-5	26
VI.	Novos fármacos antagonistas em fase de desenvolvimento.....	27
1.	Atrasentano.....	27
2.	Avosentano .....	28
3.	Clazosentano.....	29
4.	Darusentano .....	30
5.	Sparsentano.....	30
6.	Tezosentano .....	31
7.	Zibotentano.....	33
VII.	Perspetivas futuras para a terapêutica baseada no sistema da endotelina.....	35

VIII. Conclusão.....	38
Bibliografia.....	40

## **Índice de figuras**

Figura 1- Síntese da endotelina.. .....	4
Figura 2- Estrutura do bosentano na ligação ao sítio ativo de recetor.....	17
Figura 3-Estrutura do ambrisentano na ligação ao sítio ativo do recetor.. .....	21
Figura 4-Estrutura do macitentano na ligação ao sítio ativo do recetor. ....	23

**Lista abreviaturas:**

AMP<sub>c</sub> – Adenosina monofosfato cíclico

ET – Endotelina

GMP<sub>c</sub>- Guanosina monofosfato cíclico

HAP- Hipertensão arterial pulmonar

IP<sub>3</sub>- 1,4,5- trifosfato de inositol

PKA – Proteína cínase A

PKC - Proteína cínase C

## **Introdução**

A Endotelina (ET) é um péptido, produzido a nível das células endoteliais, que promove essencialmente a vasoconstrição. A endotelina é libertada pelas células endoteliais como um péptido biologicamente inativo (“Grande ET”) e por ação de enzimas conversoras da endotelina é convertida numa endotelina completamente ativa, desenvolvendo então os seus efeitos, aquando da interação com os recetores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>.

A endotelina é essencial para controlar a atividade dos vasos sanguíneos e os seus níveis são baixos, em condições normais. Contudo, havendo uma desregulação no normal mecanismo, origina um aumento dos níveis da endotelina, o que culmina no aparecimento de patologias tais como a hipertensão arterial pulmonar (HAP), as doenças do tecido conjuntivo como a esclerodermia, e fibrose pulmonar.

Como consequência da influência da endotelina no desenvolvimento de uma série de patologias e de os seus recetores estarem localizados numa grande variedade de células do organismo, os seus efeitos, quando em excesso, têm grande alcance e podem agravar ainda mais o quadro clínico da patologia. Áreas de estudo incluem os vasos sanguíneos, o coração, os pulmões, a pele, os rins, e o cérebro.

Como forma de controlar estas patologias surgem as tentativas de modular o sistema endotelina, havendo já diversos estudos em modelos animais com fármacos já aprovados para uso exclusivo hospitalar e outros ainda em estudo.

## **I. Materiais e métodos**

Foi efetuada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados científicas PubMed, B-on e Science Direct, utilizando as palavras-chave: “ endothelin”, “endothelin antagonists”, “endothelin receptors”, “bosentan”, “ambrisentan”, “macitentan” e “ET<sub>B</sub> receptor agonists”. Os critérios de escolha basearam-se nas palavras-chave, assim como artigos científicos em inglês e português. A pesquisa foi contínua ao longo do desenvolvimento deste trabalho, tendo-se realizado deste outubro de 2017 a agosto de 2018. Como resultado desta pesquisa usaram-se cento e treze artigos.

## II. Endotelina: Síntese e recetores

A ET tipo 1 (ET-1), um péptido constituído por 21 aminoácidos (Yanagisawa *et al.*, 1988) é um potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais. Este efeito vasoconstritor é imensamente mais potente e duradouro do que qualquer outro vasoconstritor (Hickey *et al.*, 1985). A ET-1 é sintetizada a partir de uma molécula constituída por 212 aminoácidos, a pré-pro-ET1, posteriormente processada a “ET-1 grande”, com 38 aminoácidos, e, por fim, clivada por uma enzima conversora da endotelina originando então a ET-1, com vinte e um aminoácidos (Dupuis e Hoepfer, 2008).

Dois outros genes humanos codificam para duas outras isoformas de endotelina, a Endotelina-2 (ET-2) e a Endotelina-3 (ET-3). Estas duas isoformas são formadas similarmente à ET-1, através dos precursores intermediários “ET-2 grande” e “ET-3 grande”, respetivamente. A Endotelina-1 é a única endotelina presente no endotélio, estando também presente no cérebro, rim, suprarrenal, intestinos e músculo liso. A Endotelina-2 está presente no rim e em menor concentração nos intestinos. Por sua vez, Endotelina-3 é expressa em maior concentração nos intestinos e na suprarrenal, e em menor concentração no rim e cérebro (Galié *et al.*, 2004).

A síntese de endotelina é estimulada por vários mediadores vasoconstritores nocivos libertados em situações de trauma ou inflamação, como endoxina, trombina, citocinas e fatores de crescimento, angiotensina II, adrenalina, vasopressina, cortisol, insulina, glucose, hipoxia ou ciclosporina. Por sua vez, o óxido nítrico, fatores natriuréticos, prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaciclina, heparina são fatores inibidores da síntese de endotelina (Mazzuca e Khalil, 2012).

Inicialmente pensou-se que a endotelina fosse libertada aquando do surgimento de um estímulo, contudo há evidências de que a ET-1 pré-formada possa ser armazenada nas células endoteliais, sendo que os mecanismos de libertação são ainda pouco conhecidos.

As endotelinas interagem com dois recetores distintos, acoplados à proteína G, o recetor ET<sub>A</sub> e o recetor ET<sub>B</sub>.

A Endotelina-1 ativa preferencialmente o recetor ET<sub>A</sub>, sendo este expresso em vários tecidos humanos, como sejam o músculo liso vascular, cérebro, rim, intestinos e suprarenal. A ET-1 e a ET-2 têm igual afinidade para o recetor ET<sub>A</sub>, sendo a ET-3 a endotelina com menor afinidade para o mesmo.

A resposta farmacológica mediada pelo recetor ET<sub>A</sub> inclui vasoconstrição, constrição brônquica e secreção de aldosterona. Os recetores ET<sub>B</sub> são ativados com um grau semelhante de afinidade pelas três isoformas da endotelina. O recetor ET<sub>B</sub> é expresso principalmente no cérebro, tendo também uma expressão moderada na aorta, coração, pulmão, rim e suprarenal. A sua ativação é antiproliferativa, antifibrótica, e promove a vasodilatação. Ao contrário do recetor ET<sub>A</sub>, expressa-se no endotélio, podendo assim causar vasodilatação por indução da produção de óxido nítrico e prostaglandinas I<sub>2</sub>, mas também está presente no músculo liso vascular, onde inicia vasoconstrição, tal como o recetor ET<sub>A</sub> (Kohan *et al.*, 2011).

Estimulação: endoxina, trombina, citocinas e fatores de crescimento, angiotensina II, adrenalina, vasopressina, cortisol, insulina, trombina, glucose, hipoxia ou ciclosporina

Inibição: óxido nítrico, fatores natriuréticos, prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaciclina, heparina

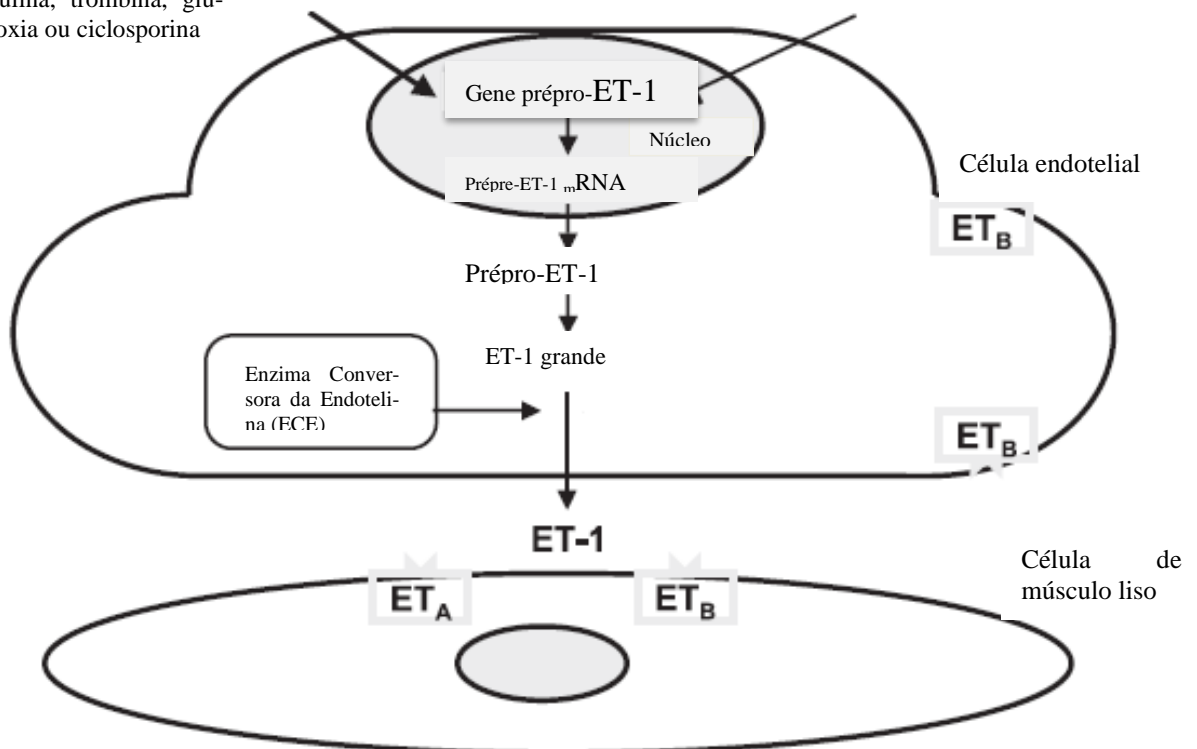


Figura 1- Síntese da endotelina. Adaptado de Galié *et al.*, 2004.

### **III. Papel Fisiológico da Endotelina**

#### **1. Efeitos da Endotelina nos vasos sanguíneos**

A Endotelina atua de forma parácrina nas células musculares lisas vasculares produzindo assim um poderosíssimo efeito vasoconstritor mediado pelo recetor ET<sub>A</sub>. Atua, também, de forma autócrina, nas células endoteliais atuando no recetor ET<sub>B</sub>, que induz a libertação de óxido nítrico e prostaciclina, levando por sua vez a vasodilatação (Ches-ter *et al.*, 2017).

Segundo um estudo levado a cabo por Kiely e seus colegas, em que se administraram diversas doses de ET-1 exógena a um grupo de indivíduos saudáveis, sendo a dose mais baixa correspondente à dose encontrada em estados patológicos, conclui-se que a ET-1 possui também, além de um potente efeito vasoconstritor que é mantido após cessar o estímulo da infusão, capacidade de aumentar significativamente a pressão arterial sistémica, assim como a resistência vascular periférica (Kiely *et al.*, 1997).

Aquando de um aumento da ET-1 desenrola-se uma resposta que se traduz num aumento de pressão significativa, com a pressão arterial bastante aumentada, resposta esta associada a uma diminuição de monóxido de carbono. Isto reflete os efeitos de pós-carga cardíaca, uma vez que a resistência vascular sistémica aumenta muito em associação com vasoconstrição coronária.

Em ratos com hipoxia intermitente crónica, os níveis de ET-1 em circulação e a sensibilidade da resposta vasoconstritora à ET-1 aumentaram. Neste mesmo estudo, verificou-se que as artérias coronárias exibiram mudanças histopatológicas significativas na camada endotelial (Kanagy *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2006).

#### **2. Efeitos da Endotelina no coração**

Apesar de inicialmente ter sido caracterizada como um péptido vasoconstritor, ficou claro mais tarde que, além dos efeitos de aumento de pressão, a ET-1 possui também efeitos diretos a nível do miocárdio. Verificou-se que, após a infusão de doses baixas (0,75 pmol/kg/min durante trinta minutos, aumentando depois para 1,5 pmol/kg/min durante trinta minutos e por fim 3,0 pmol/kg/min durante 30 minutos), sendo que a dose

mais baixa alcança os níveis encontrados em estados patológicos, de ET-1 em indivíduos saudáveis, que esta produziu efeitos adversos inotrópicos e lusitrópicos, pelo que esta descoberta deve ser considerada no papel fisiopatológico da ET-1 nas doenças cardiovasculares e cardiopulmonares (Kiely *et al.*, 1997).

A ET-1 está aumentada em indivíduos com insuficiência cardíaca congestiva comparativamente com indivíduos sãos, sendo os valores cerca de três vezes superiores (Cody *et al.*, 1992). Além disso, estudos em cães sugerem ainda o aumento da pressão arterial média com a infusão de endotelina e uma diminuição da pressão quando da infusão continuada de endotelina e com aumento da resistência vascular sistêmica, isto associado a uma diminuição significativa de monóxido de carbono (Miller *et al.*, 1989).

### **3. Efeitos da Endotelina a nível pulmonar**

Os pulmões representam um alvo primário para a ação da ET-1, sendo também uma via importante tanto para a depuração como para a produção de ET-1 circulante. Os recetores ET<sub>A</sub> predominam nas grandes artérias pulmonares humanas, enquanto os recetores ET<sub>B</sub> prevalecem no músculo liso das vias aéreas, no tecido da parede alveolar e nos capilares (Galié *et al.*, 2004).

Quando administrada por via intravenosa, a ET-1 causa uma resposta bifásica na circulação, com uma vasodilatação moderada inicial, devida à libertação de óxido nítrico e pela ativação dos canais de potássio seguida de uma vasoconstrição (Eddahibi *et al.*, 1993). Esta constrição dos vasos pulmonares é mediada pelos recetores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, pois é necessário o duplo antagonismo dos recetores para maximizar a inibição da constrição induzida pela ET-1 (McCulloch e MacLean, 1995).

Foram detetados níveis plasmáticos aumentados de ET-1 em pacientes com algumas formas de HAP num estudo cujo objetivo era estudar precisamente o papel deste péptido vasoconstritor nesta patologia, medindo por isso a sua concentração plasmática arterial e venosa (Stewart *et al.*, 1991). Deste modo, os níveis de ET-1 arteriais aumentados em pacientes com HAP quando comparados com os níveis plasmáticos sugerem uma produção pulmonar de ET-1, o que pode contribuir para uma resistência vascular pulmonar elevada. Isto pode refletir alterações na libertação de ET-1 pelo pulmão.

Em pacientes com HAP primária, o aumento dos níveis plasmáticos de ET-1 está relacionado com a pressão atrial direita, saturação de oxigénio na artéria pulmonar e a resistência pulmonar (Cacoub *et al.*, 1993, 1997; Nootens *et al.*, 1995). Pese embora não seja ainda claro se o aumento dos níveis plasmáticos de ET-1 são uma causa ou consequência da HAP, estudos sobre a expressão do sistema tecidual ET sustentam um papel proeminente na patogénese da HAP (Stewart *et al.*, 1991). Efetivamente, foi detetado um aumento de coloração para ET-1 comparativamente com os controlos em secções de pulmão de doentes com HAP. A HAP também pode ter como complicação a associação a doenças do tecido conjuntivo.

O sistema ET é ativado não só na HAP mas também noutras formas de HAP, como sejam a HAP venosa, HAP associada a distúrbios do sistema respiratórios e/ou hipoxemia, HAP por doença trombótica crónica. Uma ativação desadequada do sistema ET foi demonstrada de forma clara em pacientes com quase todas as formas de HAP. (Galié *et al.*, 2004).

#### **4. Efeitos da Endotelina a nível renal**

Embora inicialmente a ET-1 tenha sido descrita como um péptido vasoconstritor derivado do endotélio, sabe-se agora é produzido e tem atuação a nível de vários outros órgãos no corpo humano.

A ET-1 assume também um importante papel na regulação da excreção renal de sódio e água (Kohan *et al.*, 2011). A ET renal modula também outros aspetos da fisiologia renal como o fluxo sanguíneo, a contração mesangial, a função podocitária e o equilíbrio ácido/base, através do qual se pensa que a ET possa ter importante relevância na doença renal crónica, também pela sua atuação no desenvolvimento de proteínuria e fibrose (Barton e Yanagisawa, 2008), bem como pela promoção de hipertrofia e inflamação (Barton, 2008), proliferação celular e acumulação de matriz.

A produção de ET-1 encontra-se aumentada em situações de patologia renal como seja diabetes, resistência à insulina e obesidade. A ET-1 também aumenta a formação de outras substâncias vasoconstritoras e fatores de crescimento, como sejam a angiotensina

II. A angiotensina II, por sua vez ativa a formação de ET-1 renal, gerando assim um ciclo de feedback positivo (Barton *et al.*, 1997).

A ET-1 é sintetizada a nível renal pelos podócitos e células vizinhas, que expressam os recetores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. A lesão do podócito é uma característica das doenças renais proteinúricas e antecede o desenvolvimento da glomeruloesclerose (Barton e Tharaux, 2012).

Um estudo feito em cães mostrou que a função excretora renal foi significativamente afetada pela ação da ET-1, sendo que o volume de urina e a excreção de sódio foram substancialmente diminuídos após infusão do péptido e assim permaneceram após a cessação da infusão da ET-1. A taxa de filtração glomerular também foi significativamente alterada com a infusão de ET-1, contudo recuperou parte do seu valor aquando da cessação da infusão de ET-1. Isto pode refletir um efeito da diminuição da ET-1 preferencialmente na resistência arteriolar aferente e/ ou o efeito de um aumento sustentado do péptido atrial natriurético que tenha propriedade vasodilatadoras aferentes da arteríola. Os dados endócrinos sustentam a hipótese da estimulação da atividade da renina in vivo pela ET-1 (Miller *et al.*, 1989).

Por outro lado, os fatores de relaxamento derivados do endotélio inibem a produção de renina, o que sugere que a endotelina pode funcionar fisiologicamente antagonizando os efeitos dos fatores de relaxamento derivados do endotélio (Vidal *et al.*, 1988).

Pensa-se, então, que a ET-1 ativa a renina diminuindo a libertação de sódio para a mácula densa, o que é consistente com a sua ação na taxa de filtração glomerular. A arginina vasopressina permaneceu inalterada nos períodos iniciais da infusão mas posteriormente aumentou. Isto ocorreu apesar do aumento do péptido atrial natriurético assim como do aumento da pressão atrial esquerda, ambos inibidores da libertação de vasopressina (Miller *et al.*, 1989). Em suma, este estudo demonstra que a ET-1 é um potente péptido vasoconstritor in vivo com um efeito preponderante na circulação renal, em associação com um efeito significativo na circulação periférica para aumentar a resistência sistémica geral.

O potencial efeito da ET-1 contribuir para estados fisiopatológicos como hipertensão, vasoespasma, insuficiência cardíaca congestiva, entre outros continua a ser investigado, tal como a interação deste péptido com outros agentes vasoativos derivados do endotélio, como os fatores de relaxamento derivados do endotélio.

#### **IV. Fármacos modificadores do Sistema da Endotelina**

##### **1. Recetores da Endotelina**

Os recetores da endotelina, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, pertencem à classe dos recetores acoplados à proteína G.

##### **i. Recetor ET<sub>A</sub>**

Os recetores ET<sub>A</sub> estão localizados essencialmente nas células musculares lisas vasculares onde são responsáveis pela vasoconstrição potente, proliferação celular e efeito pró inflamatório. O recetor ET<sub>A</sub> humano tem 63 % de similaridade com o recetor ET<sub>B</sub>, ao longo de um comprimento que corresponde a quatrocentos e vinte aminoácidos. O gene ET<sub>A</sub> contém oito exões e sete intrões, está localizado no cromossoma quatro e codifica para uma proteína de quatrocentos e vinte e sete aminoácidos. A sequência do recetor exhibe um elevado grau de conservação entre espécies humanas e animais, sendo que as principais diferenças residem no terminal N e não nos domínios transmembranares que contribuem para a ligação ao recetor (Davenport *et al.*, 2016).

O recetor ET<sub>A</sub> está ligado à via da fosfolípase C pela ligação à proteína Gq, e aumenta os níveis de cálcio intracelular em resposta à interação com o ligando agonista. Por outro lado medeia efeitos estimulatórios na formação de AMP<sub>c</sub>, que resulta da ligação da adenil ciclase via uma proteína G estimuladora, a proteína Gs (Aramori e Nakanishi, 1992).

Modificações pós-traducionais, como fosforilações, glicosilações ou palmitoilações, podem modular a função deste tipo de recetor. A mutação de cinco resíduos de cisteína presentes na cauda citoplasmática não alterou a ligação, contudo impediu a palmitoilação do recetor resultando numa falha aquando da ligação de ET-1 para promover o aumento de cálcio citoplasmático. A modificação pós traducional por palmitoilação parece

ser essencial para a atividade funcional do recetor  $ET_A$  (Horstmeyer *et al.*, 1996). O truncamento do terminal N, que inclui um possível local de glicosilação, eliminou a possibilidade de ligação, contudo isto pode dever-se a uma alteração estrutural (Hashido *et al.*, 1992).

Ratinhos “*knockout*” para recetores  $ET_A$  apresentam anormalidades morfológicas quase idênticas aos ratinhos “*knockout*” para ET-1 e enzima conversora da endotelina-1. Os recetores  $ET_A$  são, portanto, essenciais para o desenvolvimento, sendo as mutações letais ou prejudiciais para os humanos/animais (Davenport *et al.*, 2016).

## ii. Recetor $ET_B$

Os recetores  $ET_B$  são expressos nas células endoteliais provocando vasodilatação, mediada pelo óxido nítrico. O recetor  $ET_B$  possui um terminal N invulgarmente longo, que pode ser clivado por uma metaloprotease para remover os primeiros sessenta e quatro aminoácidos, conservando a capacidade de ligação de ET-1. O gene  $ET_B$  humano compreende sete exões e seis intrões, está localizado no cromossoma treze e codifica para uma proteína de quatrocentos e quarenta e dois aminoácidos. Pensa-se que os aminoácidos associados ao primeiro, segundo, terceiro e sétimos domínios estão envolvidos na ligação ao ligando. O terminal carboxilo, tal como noutros recetores acoplados à proteína G, é importante para sinalização intracelular (Davenport *et al.*, 2016).

O recetor  $ET_B$  está ligado à via da fosfolípase C, pelo acoplamento à proteína Gq, havendo também elevação dos níveis de cálcio intracelular em resposta à interação com o ligando agonista. Por outro lado, o recetor  $ET_B$  medeia um efeito inibitório na formação de  $AMP_c$  através de uma proteína inibitória da adenil ciclase, a proteína  $G_i$ , o que culmina numa diminuição dos níveis de  $AMP_c$  causando a inibição das cascatas dependentes deste segundo mensageiro. Tal como os recetores  $ET_A$ , os recetores  $ET_B$  têm um elevado número de potenciais modificações pós-traducionais. Existem locais de fosforilação no terminal C, um sítio de glicosilação no terminal N e quatro locais para palmitoilação. Por exemplo, a atividade mitogénica dos recetores ET que estimula proteínas cínases reguladas por sinalização extracelular depende criticamente da palmitoilação, mas não da fosforilação (Horstmeyer *et al.*, 1996).

A descoberta da estrutura cristalina do recetor ET<sub>B</sub> revela-se importante devido ao seu potencial em identificar péptidos de ligação alostérica como novos ligandos. A estrutura cristalina do recetor ET<sub>B</sub> apoia a hipótese de que associações entre ETs e os recetores ET<sub>B</sub> são mediadas essencialmente pelas regiões  $\alpha$  helicoidais e C terminais, enquanto a região N terminal é responsável por modular a seletividade, estabilizando a arquitetura do péptido e facilitando a interação com o recetor. Foram identificados mais de vinte aminoácidos neste recetor ET<sub>B</sub> responsáveis pela interação com resíduos específicos de ET-1, sendo que a ocorrência de mutações pode originar a alteração da ligação das ETs ao recetor. Foi proposto um modelo de ligação no qual as hélices transmembranares um, dois, seis e sete se movem e envolvem todo o péptido da ET, formando assim uma arquitetura em forma de pálpebra que cobre a bolsa ortostérica, originando um complexo muito estável. Isto dá uma explicação estrutural para a ET-1 causar respostas duradouras e com uma lenta taxa de dissociação do recetor (Shihoya *et al.*, 2016).

O agonismo tendencioso, ou sinalização tendenciosa, é um modelo farmacológico com o potencial de aumentar o direcionamento dos ligandos para os recetores ET alvo da terapêutica. Estes ligandos estabilizam o recetor numa conformação que vai culminar na ativação preferencial de cascatas dependentes e/ou independentes da proteína G que são normalmente envolvidas por um ligando sem esta propriedade de ser tendencioso. Os recetores ET são internalizados, após cessação da sinalização da proteína G, por mecanismos dependentes da  $\beta$  arrestina e dinamina/clatrina, embora por mecanismos diferentes. Enquanto o recetor ET<sub>A</sub> é reciclado na membrana plasmática, ficando assim disponível para nova sinalização, o recetor ET<sub>B</sub> é direcionado para os lisossomas, onde é degradado (Bremnes *et al.*, 2000). As  $\beta$  arrestinas também podem contribuir para a fisiologia e respostas fisiopatológicas como migração e proliferação celular (Shukla *et al.*, 2011).

Em suma, os ligandos tendenciosos são, assim, de grande utilidade e o desenvolvimento de fármacos que assentem nesta perspectiva tem o potencial de direcionar os fármacos para os locais alvo da terapêutica, bem como limitar os efeitos adversos destes.

## 2. Agonistas do recetor ET<sub>A</sub>

Não foram ainda descritos agonistas do recetor ET<sub>A</sub>, para possível uso terapêutico, uma vez que provavelmente não teriam grande interesse na clínica dado que iriam exacerbar os efeitos vasoconstritores da ET-1.

## 3. Agonistas do recetor ET<sub>B</sub>

As sarafotoxinas são uma família de péptidos compostas por quatro isoformas (S6a,S6b,S6c,S6d;) com elevado grau de semelhança a nível de estrutura com a ET-1, identificadas no veneno da cobra *Atractaspis engaddensis* (Kloog *et al.*, 1988; Takasaki *et al.*, 1988). Aquando do ataque à presa, um dos sintomas do veneno observados é o rápido aumento da pressão arterial consistente com vasoconstricção sistémica, observada também com ET-1. Outro sintoma reside nas alterações no eletrocardiograma compatíveis com vasoconstricção coronária ou ações inotrópicas diretas no coração acompanhadas por alterações no eletrocardiograma incluindo também paragem cardíaca (Kurnik *et al.*, 1999).

A sarafotoxina 6c apresenta uma elevada seletividade para os recetores ET<sub>B</sub>, pese embora a afinidade seja maior para os recetores ET<sub>B</sub> dos ratos (Russell e Davenport, 1996). A sarafotoxina 6C induz contrações imediatas nos vasos sanguíneos pré incubados, sendo que passado algum tempo essas contrações estão diminuídas (Seo *et al.*, 1994).

Um estudo realizado por Fernandes e seus colaboradores com o objetivo de avaliar este agonista seletivo do recetor ET<sub>B</sub> na contração mediada pelo nervo colinérgico no músculo liso brônquico em humanos despoletou uma descoberta importante. Descobriu-se que a sarafotoxina 6c causou uma potenciação da contração colinérgica induzida pela estimulação de campo elétrico e mediada pelo recetor ET<sub>B</sub>, potenciação essa sensível à presença do péptido BQ 788, um antagonista do recetor ET<sub>B</sub>. A evidência atual de recetores ET<sub>B</sub> no nervo colinérgico que medeiam a potenciação da contração induzida pela estimulação de campo elétrico no brônquio humano, fornece um mecanismo adicional pelo qual os níveis elevados de ET-1 na asma podem promover obstrução brônquica (Fernandes *et al.*, 1996).

O péptido [Ala<sup>1,3,11,15</sup>] - ET-1 é um análogo linear da ET-1 truncado no terminal N em que a substituição de quatro resíduos cisteína pela alanina faz deste um agonista do recetor ET<sub>B</sub>. Estudos demonstram que este péptido é tão potente quanto ET-1 e ET-3 na ligação ao recetor ET<sub>B</sub>, produzindo vasodilatação mediada pelos recetores ET<sub>B</sub> das células vasculares endoteliais, que libertam os fatores de relaxamento derivados do endotélio (Saeki *et al.*, 1991).

Entre os análogos sintéticos da ET-1, o IRL 1620, é descrito como o mais potente e específico agonista do recetor ET<sub>B</sub> entre uma série de análogos sintetizados por Takai e seus colegas, sendo também o mais específico ligando para este recetor. Observou-se que este péptido induz contrações do músculo liso de traqueia, com uma curva concentração-resposta quase paralela à observada com ET-1 e ET-3 (Takai *et al.*, 1992). O IRL 1620 produz um relaxamento endotelial em aorta de rato pré tratada com noradrenalina, promove o aumento de Ca<sup>2+</sup> e ativa a óxido nítrico sintase, libertando assim óxido nítrico que culmina no relaxamento do músculo liso vascular. Fica também atribuída a seletividade deste péptido pelo recetor ET<sub>B</sub> (Karakı *et al.*, 1993).

O BQ3020 é um análogo linear da ET-1 truncado no terminal-N tal como o péptido [Ala<sup>1,3,11,15</sup>]-ET-1, sendo que estes compostos são altamente seletivos para os recetores ET<sub>B</sub>. Estudos demonstram que BQ3020 é capaz de contrair a artéria pulmonar de coelho com uma potência semelhante a ET-1 e ET-3, assim como induzir vasodilatação a nível do endotélio. Isto indica claramente que o BQ3020 é um agonista seletivo do recetor ET<sub>B</sub> (Ihara *et al.*, 1992).

#### **4. Antagonistas do recetor ET<sub>B</sub>**

O bloqueio do recetor ET<sub>B</sub> pelo péptido BQ788 provoca um aumento muito significativo dos níveis de ET-1 na circulação em modelos animais (Plumpton *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 2006). O aumento dos níveis em circulação de ET-1 pode melhorar a hipotensão e aumentar a contratilidade cardíaca pelo aumento do influxo do cálcio (Pollock *et al.*, 1995; Zahradni *et al.*, 2008). Por outro lado, a estimulação do recetor ET<sub>B</sub> causa vasodilatação e secreção de óxido nítrico pelas células endoteliais, pelo que o seu bloqueio originará um bloqueio da secreção de óxido nítrico melhorando também, as-

sim, o estado de hipotensão. Num estudo feito com este péptido ele foi capaz de melhorar a bradicardia induzida pela amitriplina (Arici *et al.*, 2013).

O ligando não peptídico A192621 é um antagonista seletivo para o recetor ET<sub>B</sub>, com efeito no aumento da pressão arterial. Um estudo perpetrado por Wessale e colaboradores mostrou que o A192621 inibiu a resposta vasodilatadora e de aumento da pressão arterial induzida pela Sarafotoxina 6c, mediada pelo recetor ET<sub>B</sub>. Isto sugere que o A192621 é seletivo em relação ao recetor ET<sub>B</sub>. No mesmo estudo, sozinho este ligando causou aumento da pressão arterial assim como aumento dos níveis plasmáticos de ET-1 (Wessale *et al.*, 2002).

O péptido IRL2500 antagonizou, de forma dependente da concentração, a resposta induzida por ET-3 e mediada por ET<sub>B</sub>. É, portanto, um antagonista seletivo dos recetores ET<sub>B</sub> (Früh *et al.*, 1996). Segundo observaram Leung e seus colegas o IRL2500 inibiu os efeitos constritores do agonista ET<sub>B</sub> IRL1620, mas aumentou a constrição induzida pela ET-1 assim como a pressão arterial média. O bloqueio dos recetores ET<sub>B</sub> por este péptido resultou também em vasoconstrição sistémica, renal e mesentérica (Leung *et al.*, 2002).

O ligando K-8794 é um antagonista dos recetores ET<sub>B</sub> (Shihoya *et al.*, 2017). Estudos demonstram que a administração de um inibidor seletivo ET<sub>B</sub> diminui significativamente as células musculares lisas apoptóticas e impede a formação completa de aneurismas em ratos (Rafat, 2018).

## **5. Antagonistas do recetor ET<sub>A</sub>**

O pentapeptido cíclico BQ123 foi originalmente isolado de produtos de fermentação do microrganismo *Streptomyces Misakensis*. Sendo um antagonista seletivo para o recetor ET<sub>A</sub>, possui elevada afinidade para este ligando-se, assim, em altas concentrações ao recetor. A sequência de aminoácidos de BQ123 pode mimetizar o terminal carboxilo das endotelina, pelo que isto será um fator preponderante na ligação deste péptido ao recetor (Sakamoto *et al.*, 1993). A infusão de BQ123 na artéria braquial em humanos causou aumento do fluxo sanguíneo no antebraço, sendo que em porquinhos-da-Índia anestesiados ou conscientes provocou diminuição da pressão arterial (Goto, 2001).

O tripéptido linear FR139317 liga-se seletivamente aos recetores ET<sub>A</sub>, inibindo a ligação de ET-1 e antagonizando as contrações induzidas e atenuando também os efeitos vasoconstritores coronários desencadeados pela ET-1 (McMurdo *et al.*, 1994). *In vivo*, este péptido inibe também a resposta de aumento de pressão arterial ligada à ET-1 em ratos normotensos, inibindo também fortemente a vasoconstrição induzida por ET-1 e ET-2, em preparações de músculo liso (Cardell *et al.*, 1993). A ligação de ET-1 ao ET<sub>A</sub> na artéria coronária aterosclerótica humana é inibida pelo FR139317, sendo que este péptido tem uma baixa afinidade de ligação para os recetores ET<sub>B</sub> (Dashwood *et al.*, 1994).

## 6. Sitaxsentano

O sitaxsentano é um antagonista altamente seletivo para o recetor ET<sub>A</sub>, desenvolvido pela farmacêutica Pfizer cujo uso clínico foi aprovado na Europa no ano de 2006. Com uma biodisponibilidade oral superior a noventa por cento e uma longa duração de ação e um tempo de semivida de cerca de dez horas permite uma única toma diária, o que é uma vantagem relativamente a outros fármacos com tempos de semivida mais curtos que obrigam a várias tomas diárias.

Um estudo realizado em pacientes com HAP, de nome STRIDE-1, que pretendia avaliar os efeitos do sitaxsentano nestes pacientes, demonstrou através do teste de caminhada de seis minutos uma melhora na capacidade de exercício, no índice cardíaco bem como na resistência vascular pulmonar em ambas as doses estudadas (100mg e 300 mg). A dose mais elevada, de 300mg revelou um perfil de segurança inaceitável, com maior incidência de transaminases elevadas e eventos adversos (Frost *et al.*, 2005). Desta forma a perceção foi que a dose de 100 mg seria a dose ideal, e daí surgiu o estudo STRIDE-2, para avaliar a diferença de eficácia entre a dose de 100 mg de sitaxsentano e placebo. Os resultados deste estudo sugeriram que 100 mg é, de facto, a dose terapêutica ideal para o tratamento da HAP sintomática. Os efeitos adversos relacionados com o tratamento com sitaxsentano relatados foram edema, congestão nasal e insónia. O sitaxsentano interage com o metabolismo da varfarina, uma vez que é um inibidor da CYP2C9, responsável pela metabolização deste fármaco anticoagulante, pelo que a sua dose terá que ser ajustada quando o uso de ambos for concomitante (Langleben e Ca-

coub, 2009). O sitaxsentano foi aprovado para uso clínico em 2006 para o tratamento da HAP classe III, contudo foi retirado em 2010 devido a casos de lesão hepática grave, um deles veio a revelar-se fatal.

## **7. Antagonistas dos recetores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>**

O hexapéptido cíclico TAK 044 é um potente e competitivo antagonista dos recetores ET<sub>A</sub>, que exhibe simultaneamente atividade antagonista dos recetores ET<sub>B</sub> (Masuda *et al.*, 1996). Um estudo apontou que a vasoconstrição induzida por ET-3 mostrou duas fases distintas, indicando o envolvimento de dois fatores (recetores) diferentes na resposta. Uma vez que ET-3 tem mais afinidade para ET<sub>B</sub>, a primeira fase de vasoconstrição é provavelmente induzida pela estimulação deste, sendo as respostas da segunda fase devidas à estimulação do recetor ET<sub>A</sub>. O TAK 044 é capaz de reverter essa vasoconstrição. Por outro lado, também a hipotensão transiente, promovida pela estimulação dos recetores ET<sub>B</sub>, e a hipertensão sustentada, promovida pelos recetores ET<sub>A</sub>, de ratos foram inibidas por tratamento prévio com o péptido TAK 044 (Watanabe *et al.*, 1995).

O péptido SB 209670 é um antagonista altamente potente e seletivo para os recetores da endotelina (Elliott *et al.*, 1994). A infusão de SB 209670 em ratos hipertensos, nos quais se supõe que a hipertensão fulminante seja decorrente da produção de angiotensina II, causou uma diminuição da pressão arterial sistémica semelhante àquela causada pelo losartan (antagonista do recetor da angiotensina II). Está também associado a uma melhora na taxa de sobrevivência de ratos e os animais sobreviventes apresentaram um aumento significativo na taxa de filtração glomerular, diminuição na creatinina plasmática bem como melhoria na função tubular (Goto, 2001).

## **V. Fármacos antagonistas da Endotelina como agentes terapêuticos**

### **1. Bosentano**

O bosentano foi o primeiro fármaco antagonista dos recetores da endotelina a ser aprovado para uso clínico e comercializado. O bosentano é uma sulfonamida e é um antagonista duplo dos recetores da endotelina, antagonizando tanto o recetor ET<sub>A</sub> como o rece-

tor ET<sub>B</sub>. O bosentano está disponível em Portugal nos medicamentos Tracleer<sup>®</sup> nas dosagens de 32 mg, 62.5 mg e 125 mg ou Stayveer<sup>®</sup>, nas dosagens de 62.5mg e 125 mg.

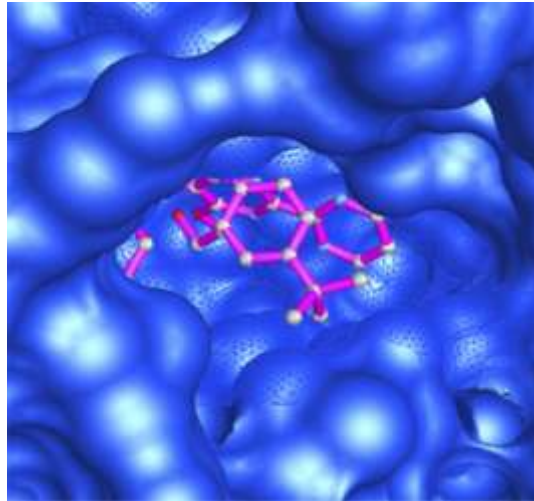


Figura 2- Estrutura do bosentano na ligação ao sítio ativo de recetor. Retirado de Clozel, 2016.

Em relação à farmacocinética, os níveis plasmáticos são atingidos em média dentro de duas a três horas após a toma, sendo que a sua biodisponibilidade oral é de aproximadamente cinquenta por cento. O bosentano é metabolizado pelo sistema citocromo P450 (CYP), mais concretamente pelas isoenzimas CYP2C9 e CYP 3A4. A depuração hepática e a excreção biliar são as vias de eliminação consideradas para o bosentano (Weber *et al.*, 1996).

Este fármaco está indicado no tratamento da HAP primária (idiopática e hereditária-sem causa identificada ou familiar), na HAP secundária à esclerodermia sem doença pulmonar significativa, bem como na HAP associada a “*shunts*” sistémico-pulmonares congénitos e síndrome de Eisenmenger. O bosentano está também indicado no tratamento de úlceras digitais em doentes adultos com esclerodermia.

Foi revelado, após experiências em animais, que o bloqueio duplo dos recetores da endotelina com o bosentano melhora a função cardiopulmonar, reduz a HAP e a lesão pulmonar, atenuando também a disfunção microcirculatória intestinal e hepática (Kowalczyk *et al.*, 2015).

Num estudo feito em indivíduos do sexo masculino com o objetivo de avaliar a farmacocinética e a farmacodinâmica do bosentano foram usadas as doses de 3mg, 10 mg, 30 mg, 100 mg, 300 mg, 600 mg, 1200 mg, 2400 mg por via oral. Outro conjunto de indivíduos do sexo masculino recebeu as doses de 10 mg, 50 mg, 250 mg, 500 mg e 750 mg por via intravenosa, sendo que uma outra parte dos indivíduos recebeu também por via intravenosa a dose de 600 mg. Verificou-se que bosentano aumentou os níveis plasmáticos de ET-1 após administração oral e intravenosa e reverteu o efeito vasoconstritor da ET-1 (Weber *et al.*, 1996). Além disso, um estudo operado por Yokoyama e seus companheiros com o objetivo de caracterizar os recetores da ET-1 em vários locais do organismo, como pulmão, coração, rim, bexiga e córtex cerebral usando um radioligando seletivo determinou que, aquando da administração oral de bosentano ocorreu uma diminuição significativa deste ligando nos recetores (Yokoyama *et al.*, 2014).

Um estudo randomizado controlado por placebo de fase II conduzido em trinta e dois pacientes com HAP a receber terapia oral com bosentano nas doses de 62,5 e 125 mg mostrou uma melhora hemodinâmica significativa associada a uma diminuição na resistência vascular pulmonar após doze semanas de tratamento no grupo administrado com bosentano, quando comparado com o grupo placebo. No estudo subsequente de fase III, de nome BREATHE-1, o bosentano melhorou a distância de seis minutos de caminhada em quarenta e quatro metros após dezasseis semanas de tratamento quando comparado com o grupo placebo, havendo ainda melhoras consideráveis no índice de dispneia de Borg. O estudo BREATHE-1 explorou as dosagens de 125 mg e 250 mg de bosentano, sendo que ambas se mostraram igualmente eficazes em termos de melhorias clínicas, todavia a elevação das aminotransferases foi superior na dosagem de 250 mg (Dupuis e Hoeper, 2008).

Um estudo controlado por placebo foi projetado para avaliar os efeitos do bosentano em pacientes com HAP classe II (EARLY), encontrando-se estes a receber terapia oral na dose de 65 mg duas vezes por dia durante um período de quatro semanas e posteriormente a dose de 125 mg duas vezes por dia até ao fim do estudo. Os resultados mostram uma queda significativa na resistência vascular periférica, uma melhora no teste da distância de seis minutos de caminhada e uma diminuição considerável no número de eventos pré-definidos de piora clínica em setenta e sete por cento quando comprado com

o grupo placebo. É, assim, de esperar que o uso de bosentano seja também estendido à HAP de classe II, visto ter-se revelado bastante proveitosa a sua utilização nesta situação clínica (Galie *et al.*, 2008).

Um ensaio randomizado controlado por placebo realizado em pacientes com síndrome de Eisenmenger (BREATHE-5) a receber tratamento com bosentano nas doses de 62,5 mg ou 125 mg oral mostrou também melhorias significativas na hemodinâmica. Estudos realizados em crianças com HAP (BREATHE-3), em que estas recebiam como terapia oral a dose de 2 a 4 mg/kg/dia de bosentano, e em doentes com HAP associada ao vírus da imunodeficiência adquirida (BREATHE-4), tratados com 62,5 mg de bosentano oral duas vezes por dia por um período de quatro semanas e posteriormente a dose aumentaria para 125 mg duas vezes por dia durante doze semanas, revelam perfis de segurança/eficácia semelhantes (Chester e Yacoub, 2014).

A HAP no recém-nascido é uma condição potencialmente fatal caracterizada por uma falha na resistência vascular periférica. O bosentano mostrou reduzir a pressão arterial pulmonar na HAP em recém-nascidos, induzindo uma melhora na oxigenação seis horas após o início do tratamento e nos resultados a longo prazo em lactentes com HAP. Houve, ainda, uma melhora nos parâmetros de oxigenação (Maneenil *et al.*, 2018).

Quanto aos efeitos adversos, será de salientar, que o uso do bosentano encontra-se inerente um efeito hepatotóxico, que é independente da ativação dos recetores ET-1. Através da inibição da bomba de exportação do sal biliar, há acumulação de sais biliares citotóxicos, resultando em dano hepatocelular. Acontece também aumento das transaminases hepáticas, essencialmente a aspartato e alanina transaminase, pelo que é recomendável a realização de análises antes de iniciar o tratamento e depois disso, mensalmente.

Devido à teratogenicidade e embriotoxicidade, o bosentano está totalmente contraindicado na gravidez e em mulheres com potencial para engravidar. Deste modo, deve ser apurado que a mulher não está grávida antes do início da terapia com bosentano e deve evitar-se uma gravidez durante o período de tratamento.

O tratamento com bosentano foi também associado a anemias, pelo que é prudente medir a concentração de hemoglobina antes do início de tratamento com bosentano, uma

vez por mês nos primeiros quatro meses e a partir daí a medição é feita a cada três meses (EMA, 2012).

As interações farmacológicas devem ser tidas em conta, já que o bosentano é um indutor das enzimas CYP 2C9 e CYP 3A4, havendo uma diminuição na concentração plasmática de substâncias metabolizadas por estas mesmas isoenzimas, quando coadministradas com bosentano. A administração concomitante de bosentano e ciclosporina A, um inibidor da calcineurina, está totalmente contraindicada, bem como a glibenclamida pelo aumento da ocorrência transaminases elevadas. A administração de bosentano em conjunto com fluconazol também não é indicada, uma vez que este último é um inibidor em certa extensão tanto da CYP 2C9 como da CYP 3A4, originando uma elevação dos níveis plasmáticos de bosentano. Por outro lado, o uso concomitante de bosentano pode reduzir as concentrações plasmáticas de tacrolímus e sirolímus, pelo que não deve ser coadministrado (INFARMED,2017).

A rifampicina é um potente indutor das isoenzimas CYP 2C9 e CYP 3A4, pelo que origina uma diminuição das concentrações plasmáticas de bosentano, e conseqüentemente uma perda do efeito terapêutico. Recomenda-se também precaução na coadministração de bosentano e sildenafil. O bosentano pode originar interações farmacocinéticas com os anticoncepcionais hormonais, pelo que estes não são considerados métodos fiáveis. (EMA,2012).

Quando administrado conjuntamente com lopinavir+ ritonavir (ou outros inibidores da protéase potenciados pelo ritonavir) a tolerabilidade do doente ao bosentano tem de ser monitorizada. A associação com nevirapina também não é recomendada devido à elevada toxicidade hepática revelada pela nevirapina que se pode acrescentar à hepatotoxicidade do bosentano. (INFARMED,2017).

## **2. Ambrisentano**

O ambrisentano é um antagonista seletivo dos recetores  $ET_A$ . É um ácido propanoico, não sulfonamídico, com uma afinidade muito grande para o recetor  $ET_A$ . O ambrisentano é comercializado em Portugal sob o nome de Volibris®, nas dosagens de 5 mg e 10 mg.

Após administração oral o ambrisentano é rapidamente absorvido, sendo que a concentração máxima é atingida após duas horas e a administração concomitante com alimentos não tem influência na biodisponibilidade, sendo o seu tempo de semivida de quinze horas o que permite uma única toma diária. O ambrisentano apresenta uma percentagem de ligação às proteínas plasmáticas de noventa e nove por cento, sendo que a sua metabolização fica a cargo do sistema citocromo P450, nomeadamente as CYP 3A4 e CYP 2C1, bem como pelas glucuronosiltransferases 1A9S, 2B7S e 1A3S. A eliminação faz-se essencialmente por mecanismos de extrusão intestinal, sendo cerca de cinco por cento eliminado inalterado na urina (Elshaboury e Anderson, 2013).

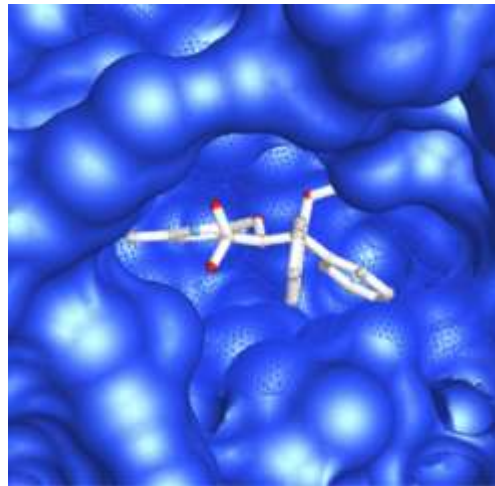


Figura 3-Estrutura do ambrisentano na ligação ao sítio ativo do recetor. Retirado de Clozel, 2016.

Há benefícios teóricos no uso de antagonistas seletivos do recetor  $ET_A$ , que inclui o bloqueio dos efeitos vasoconstritores e proliferativos da ET-1 mediados pelo recetor  $ET_A$ , quer a vasodilatação e o aumento da depuração da ET-1, efeitos mediados pela atuação da ET-1 no recetor  $ET_B$ . A administração de ambrisentano em pacientes com HAP visa o relaxamento do músculo liso vascular e a vasodilatação. O ambrisentano revela-se eficiente no aumento da tolerância ao exercício, diminuindo o risco de deterioração da classe funcional da HAP, prolongando o tempo de piora clínica e aumentando a taxa de sobrevivência. Um estudo controlado por placebo foi feito para avaliar a eficácia e segurança do ambrisentano (ARIES). O estudo foi subdividido em dois sendo que num deles os pacientes recebiam tratamento com ambrisentano na dose de 5 mg ou 10 mg e no outro a dose diminuía para 2,5 mg ou 5 mg de ambrisentano pela via oral. Neste estudo o am-

brisentano foi em geral bem tolerado em todos os grupos de pacientes, sendo os efeitos adversos edema periférico, cefaleias, sinusite, rubor e congestão nasal na natureza leve a moderada. A nível de melhorias clínicas a distância no teste de seis minutos de caminhada, os parâmetros hemodinâmicos assim como o tempo de piora clínica sofreram aumentos significativos (Galiè *et al.*, 2008).

O ambrisentano está indicado no tratamento da HAP classe II e III, bem como na HAP idiopática e HAP associada a doenças do tecido conjuntivo. Um estudo realizado em pacientes chineses, na procura de eventuais discrepâncias no metabolismo, eficácia e perfil de segurança do fármaco, inclui essencialmente mulheres jovens com HAP. O tratamento com ambrisentano resultou em melhoras significativas em vários parâmetros clínicos, nomeadamente a capacidade de exercício e função cardíaca (Huo *et al.*, 2016).

Um estudo feito em pacientes com HAP de exercício, que se crê ser uma fase leve e precoce da HAP, a dose de ambrisentano administrada oralmente foi de 5 mg passando depois de quatro semanas a 10 mg diariamente. Este estudo revelou melhorias clínicas a “nível” do índice de dispneia de Borg, na qualidade de vida dos pacientes, bem como na hemodinâmica cardiopulmonar. A nível das aminotransferases as anomalias foram de baixa incidência (Segrera *et al.*, 2017).

Uma vez que acarreta um elevado risco de teratogenicidade, sempre que uma mulher inicie tratamento com ambrisentano é imperativo a realização de um teste de gravidez, que deve ser repetido mensalmente depois do início do tratamento (Elshaboury e Anderson, 2013).

A nível de interações farmacológicas, é aconselhada precaução no uso concomitante de ambrisentano e ciclosporina. A uma vez que este último fármaco inibe o transportador e enzimas metabólicas envolvidas na farmacocinética do ambrisentano. Deste modo, os níveis de ambrisentano estão aumentados aquando da toma conjunta, pelo que se recomenda um ajuste (diminuição) da posologia de ambrisentano nesta situação. A rifampicina, inibidor do polipéptido transportador dos aniões inorgânicos, forte indutor das CYP3A4 e CYP2C9 e das glucuronosiltransferases foi associada a um aumento dos níveis plasmáticos de ambrisentano, quando tomados em conjunto. Os inibidores das fosfodiesterases, tanto o tadalafil como o sildenafil, (substrato para a CYP3A4), os con-

tracetivos hormonais, a varfarina e o cetoconazol não causaram interações farmacológicas significativas (EMA,2013).

### 3. Macitentano

O macitentano é um antagonista duplo dos recetores  $ET_A$  e  $ET_B$ , desenvolvido através da modificação da estrutura do bosentano, numa tentativa de melhorar e aumentar a segurança e eficácia da molécula. É uma sulfamida com maior afinidade para o recetor e maior grau de lipofilicidade, sendo a interação hidrofóbica responsável pela ligação do macitentano ao recetor  $ET_A$ . Além disso a sua penetração tecidual também foi otimizada (Clozel, 2016). O macitentano é comercializado em Portugal como Opsumit® na dosagem de 10 mg, e está indicado no tratamento HAP em doentes adultos em classe funcional II e III bem como HAP idiopática e hereditária, HAP associada a doenças do tecido conjuntivo, e HAP associada a cardiopatia congénita simples corrigida.

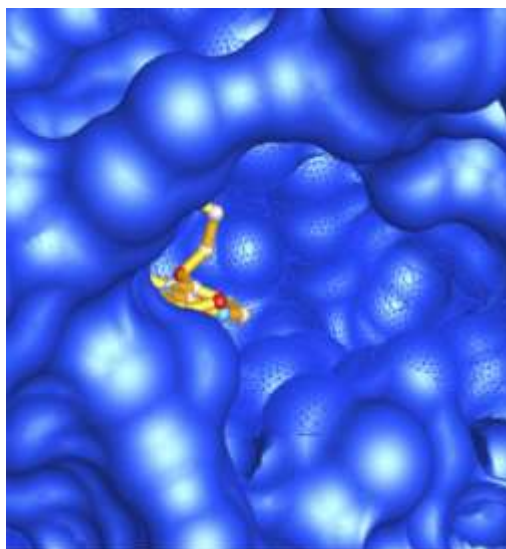


Figura 4-Estrutura do macitentano na ligação ao sítio ativo do recetor. Retirado de Clozel, 2016.

Contrariamente aos antagonistas atualmente usados o macitentano possui um metabolito farmacologicamente ativo, o ACT-132577, que embora tenha uma potência mais baixa que o composto que lhe dá origem atinge concentrações plasmáticas bastante mais elevadas, com um tempo de semivida de cerca de quarenta e oito horas, pelo que estes são fatores que melhoram a atividade deste fármaco relativamente ao bosentano (Maguire e

Davenport, 2014). Além disso, o macitentano provoca uma ocupação dos recetores muito mais longa, o que pode ser consequência da interação de diferentes aminoácidos com os recetores.

Um estudo de fase 3 controlado por placebo (SHERAPIN), no qual os pacientes receberam tratamento com 3 mg diárias ou 10 mg diárias em toma única mostrou que o macitentano reduziu significativamente a mortalidade e a morbidade em doentes com HAP, estando também associado a menores taxas de hospitalização quando comparado com o grupo placebo. Além disso, houve uma melhoria na distância de caminhada de seis minutos (Pulido *et al.*, 2013).

O macitentano mostrou impulsionar melhorias no estado não só físico mas também mental dos pacientes. O efeito sobre o domínio mental é de extrema importância nesta situação uma vez que pacientes com hipertensão arterial pulmonar sofrem muitas vezes de ansiedade, depressão e stresse (Mehta *et al.*, 2017).

A biodisponibilidade do macitentano é de setenta e quatro por cento, e é independente da ingestão com alimentos. A concentração máxima é atingida cerca de oito horas e meia após a administração oral do fármaco, sendo que o seu tempo de semivida é de cerca de dezasseis horas (Kholdani *et al.*, 2014).

O macitentano liga-se mais de noventa e nove por cento às proteínas plasmáticas, sendo posteriormente eliminado cerca de cinquenta por cento numa combinação entre vias hepática e renal enquanto cerca de vinte e cinco por cento é sujeito a eliminação fecal. A metabolização do macitentano fica a cargo do sistema citocromo P450, nomeadamente a CYP3A4 (Monaco e Davila, 2016). Devido ao seu elevado potencial teratogénico, o macitentano é totalmente contraindicado na gravidez.

Relativamente às interações farmacológicas, a farmacocinética do macitentano e do seu metabolito ativo não é afetada pela varfarina ou ciclosporina, sendo que o uso combinado com sildenafil não afeta de forma significativa clinicamente a farmacocinética do macitentano.

A administração coincidente de cetoconazol, assim como de outros potentes inibidores da CYP3A4, aumenta o dobro a exposição ao macitentano, sendo a exposição do seu

metabolito ativo reduzida cerca de vinte e seis por cento. Desta forma, a administração concomitante de macitentano e fortes inibidores da CYP3A4 deve ser realizada com bastante precaução.

No entanto, também fortes indutores da CYP3A4, causam alterações na farmacocinética do macitentano. A rifampicina diminuiu a exposição ao macitentano em cerca de oitenta por cento, sendo que não afetou a exposição ao metabolito ativo. Em suma, há uma redução da eficácia de macitentano na presença de fortes indutores da CYP3A4, sendo que o uso concomitante destes dois tipos de fármacos deve ser evitado (Sidharta *et al.*, 2015).

#### **4. Terapêutica de combinação**

A terapêutica de combinação supõe o uso simultâneo de mais do que uma classe terapêutica de fármacos para uso clínico. Recorre-se à terapêutica de combinação no sentido de melhorar a terapêutica.

##### **i. Antagonistas da endotelina combinados com análogos da prostaciclina**

A prostaciclina é um potente vasodilatador produzido essencialmente nas células endoteliais, com ação antiproliferativa, sendo que as suas vias metabólicas se encontram desreguladas em doentes com HAP. Têm sido utilizados na terapêutica vários análogos da prostaciclina, de síntese, que podem ser usados sozinhos ou em associação para um maior efeito terapêutico, sendo eles o epoprostenol, o iloprost, o trepreostinil e o beraprost (Laufs *et al.*, 2011).

O estudo BREATHE-2, realizado em pacientes com HAP classe III ou IV, com o objetivo de detetar efeitos aditivos da combinação do bosentano com o epoprostenol mostrou uma melhoria na hemodinâmica e capacidade de exercício da combinação bosentano-epoprostenol quando comparado com o epoprostenol sozinho (Humbert *et al.*, 2004).

A segurança e eficácia da adição do iloprost inalatório a pacientes com HAP tratados com bosentano oral foi objetivo do estudo STEP-1, que demonstrou vantagens na terapêutica de combinação, nomeadamente ao nível da hemodinâmica cardiopulmonar, incluindo a pressão arterial média e a resistência vascular pulmonar. Foram também ob-

servadas melhorias no tempo de piora clínica, com nenhum paciente no grupo iloprost e cinco pacientes no grupo placebo, o que sugere que a adição do iloprost ao bosentano pode ser benéfica na modulação da progressão da doença (McLaughlin *et al.*, 2006).

No estudo TRIUMPH os pacientes com sintomas funcionais de HAP de classe III ou IV tratados com bosentano ou sildenafil receberam tratamento com treprostnil inalatório, tendo-se verificado uma melhoria no tempo de seis minutos de caminhada (McLaughlin *et al.*, 2010).

## **ii. Antagonistas da endotelina combinados com inibidores da fosfodiesterase tipo-5**

A inibição da fosfodiesterase tipo-5, que degrada o GMP<sub>c</sub>, culmina numa vasodilatação nos locais que expressam essa enzima. Sendo que a árvore vascular pulmonar contém grande quantidade de fosfodiesterase tipo-5, e que esta enzima possui efeitos antiproliferativos, é relevante o uso desta classe de fármacos na HAP. Os inibidores da fosfodiesterase tipo-5 usados no tratamento da HAP são o sildenafil e o tadalafil, e causam vasodilatação pulmonar considerável.

Um estudo levado a cabo por Liang e seus colaboradores demonstrou que o ambrisentano atua sinergicamente com o tadalafil para relaxar as preparações de artéria pulmonar de rato constrictas com ET-1, sendo que o bloqueio do recetor ou a desnudação dos anéis dos vasos do endotélio aboliu esta resposta (Liang *et al.*, 2012).

Num estudo com o objetivo de avaliar a eficácia da combinação entre o bosentano e o sildenafil em pacientes com síndrome de Eisenmenger, o tratamento com bosentano melhorou significativamente a distância percorrida no teste de seis minutos de caminhada, tendo também aumentado o fluxo sanguíneo pulmonar e reduzido a resistência vascular periférica. A adição do sildenafil ao bosentano aumentou a saturação em repouso, não tendo alterado mais nenhum parâmetro. Não foram descritas alterações significativas nas concentrações plasmáticas de ambos os fármacos, pelo que o uso concomitante é seguro (Iversen *et al.*, 2010).

Clozel e seus companheiros levaram a cabo um estudo com o objetivo de comparar os efeitos do bosentano e do sildenafil, bem como avaliar se a combinação entre ambos

confere um efeito benéfico adicional no tratamento da hipertensão pulmonar. Os resultados sugerem que, de facto, a terapia de combinação pode ser mais eficaz, nomeadamente na diminuição da pressão arterial pulmonar média, relativamente a qualquer um dos fármacos quando administrados isoladamente. Além disso, os resultados também sugerem que a terapia combinada estava associada a uma taxa de sobrevida máxima (Clozel *et al.*, 2006).

Por sua vez, o estudo AMBITION teve como objetivo avaliar a segurança e eficácia da terapia de combinação entre o ambrisentano e o tadalafil em comparação com ambos em monoterapia, realizado em pacientes com HAP classe II e III. Os resultados sugerem que a terapia combinada resulta numa redução do risco de falha clínica e uma melhoria na capacidade de exercício, nomeadamente assistiu-se a um aumento na distância percorrida no teste de caminhada de seis minutos (Coghlan *et al.*, 2017).

## **VI. Novos fármacos antagonistas em fase de desenvolvimento**

### **1. Atrasentano**

O atrasentano é um antagonista potente e altamente seletivo para o recetor ET<sub>A</sub> desenvolvido pela empresa Abbvie no ano de 2014. Um estudo levado a cabo por Zeeuw e seus colegas revelou que o atrasentano diminuiu a albuminúria em cerca de trinta e seis por cento para baixas doses na ordem dos 0,75 miligramas sem efeitos adversos relevantes (de Zeeuw *et al.*, 2014).

Um estudo foi projetado para testar a hipótese de que um antagonista do recetor ET<sub>A</sub> melhora a função endotelial coronária em pacientes com aterosclerose coronária. Os resultados sugerem que o tratamento com atrasentano melhora a função endotelial microvascular. Além disso o estudo propõe também um papel eventual para antagonistas do recetor ET<sub>A</sub> como opção medicamentosa para pacientes com disfunção endotelial coronária e doença arterial coronária não obstrutiva (Reriani *et al.*, 2011).

Num estudo com o objetivo de avaliar o efeito do atrasentano na albuminúria em indivíduos com nefropatia diabética que já recebiam doses estáveis de inibidores do sistema renina-angiotensina, os resultados mostraram que o atrasentano é eficaz no tratamento

da albuminúria residual e na diminuição da razão albumina-creatinina urinária (Kohan *et al.*, 2011).

O estudo SONAR pretendia determinar se a adição de atrasentano às terapias preconizadas reduz o risco de progressão da doença renal crónica e atrasa o início da doença renal terminal em pacientes com diabetes tipo dois e nefropatia diabética, em pacientes com doença renal crónica nos estados dois e três e macroalbuminúria aos quais está a ser administrada a dose máxima tolerada de um inibidor do sistema renina-angiotensina. Verificou-se, durante o curso do estudo que a taxa de problemas renais nos pacientes que estavam a ser tratados com atrasentano era menor à esperada inicialmente (de Zeeuw *et al.*, 2014).

O atrasentano falhou um ensaio clínico de fase 3 para o tratamento do cancro da próstata refratário a terapia hormonal (Carducci *et al.*, 2007).

Novos ensaios clínicos de fase 3 estão a ser desenvolvidos com o intuito de reunir mais informações sobre a segurança e eficácia deste fármaco em patologias que incluem essencialmente a nefropatia diabética, mas também doença renal crónica e diversas formas de cancro.

## **2. Avosentano**

O avosentano é um antagonista predominante do recetor ET<sub>A</sub> estudado pela Speedel pharma desde 2005. Um estudo feito em ratinhos “knouckout” apolipoproteína E, modelo animal que combina desta forma hiperglicemia e hiperlipidemia, revelou que o aumento da albuminúria e a diminuição da creatinina sérica foram atenuados pelo avosentano, havendo também uma moderação na lesão estrutural e funcional renal neste modelo de nefropatia diabética (Watson *et al.*, 2010).

O ensaio clínico de fase 3 ASCEND, com o objetivo de avaliar o efeito deste antagonista no tempo de duplicação da creatinina sérica, doença renal em estado terminal ou morte em pacientes com diabetes mellitus tipo dois e nefropatia diabética mostrou uma redução da albuminúria em cerca de quarenta a cinquenta por cento dos doentes. Além disso também exibiu um controlo razoável da pressão arterial. Contudo este estudo foi interrompido devido aos efeitos adversos significativos (Mann *et al.*, 2010).

Nenhum outro ensaio clínico está neste momento a ser levado a cabo para este fármaco.

### **3. Clazosentano**

O Clazosentano é um antagonista dos recetores da endotelina, seletivo para o recetor ET<sub>A</sub> que tem sido estudado pela Idorsia pharmaceuticals desde o ano 2016 para prevenção do vasoespasmó em pacientes com hemorragia subaracnoídea aneurismática.

Um estudo mostrou que o clazosentano não só previne o vasoespasmó de grandes artérias bem como melhora o fluxo sanguíneo cerebral e reduz a mortalidade após uma hemorragia subaracnoídea aneurismática em ratinhos. Além disso, este fármaco mostrou também ser capaz de prevenir a lesão neuronal, assim como o microtromboembolismo (Sabri *et al.*, 2011).

Um ensaio clínico de fase 3 foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a segurança e eficácia do clazosentano na redução da morbidade relacionada com o vasoespasmó e da mortalidade em pacientes adultos com hemorragia subaracnoídea aneurismática. Os pacientes receberam o tratamento com clazosentano nas doses de 5 mg/h ou 15 mg/h, pela via intravenosa. Os resultados obtidos neste ensaio mostram que o clazosentano reduziu significativamente a morbidade relacionada com o vasoespasmó cerebral e a mortalidade. Quando comparado com o grupo placebo, complicações pulmonares, anemia e hipotensão foram mais comuns nos pacientes a receber terapia com clazosentano (MacDonald *et al.*, 2012).

Um ensaio clínico de fase 3 com o intuito de avaliar se o clazosentano pode reduzir o risco de desenvolver complicações relacionadas com o vaso espasmó cerebral e danos cerebrais permanentes em comparação com os cuidados médicos de rotina habituais vai iniciar em Novembro de 2018, bem como um outro ensaio clínico também de fase com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do clazosentano na prevenção e deterioração clínica devido à isquemia cerebral tardia em indivíduos adultos com hemorragia aneurismática subaracnoídea.

#### **4. Darusentano**

O darusentano é um antagonista dos recetores da endotelina que atua antagonizando seletivamente os recetores ET<sub>A</sub>. Este fármaco tem sido estudado pela Gilead Science desde 2006 para o tratamento da hipertensão arterial resistente.

Um estudo inicial mostrou que o darusentano leva a uma redução na hipertensão arterial em pacientes com hipertensão moderada, diminuição essa que se verificou ser dose-dependente. Um resultado importante é que essa redução na pressão arterial não foi acompanhada por um aumento na frequência cardíaca em repouso, pelo que vasodilatação periférica devido ao bloqueio dos efeitos vasoconstritores da endotelina é a explicação mais provável e não a redução da contratilidade cardíaca (Nakov *et al.*, 2002).

Um ensaio clínico de fase 3, DORADO, pretendia determinar se o darusentano é eficaz na diminuição da pressão arterial sistólica em indivíduos com hipertensão sistólica resistente, apesar do tratamento com três classes de fármacos, incluindo um diurético. Foi administrado o tratamento oral aos pacientes nas doses de 50 mg, 100 mg ou 300 mg. Os resultados demonstram que o darusentano é eficaz na redução da pressão arterial. Contudo, houve o aparecimento de edema e retenção de líquidos no grupo a receber tratamento com darusentano, que se verificou ser relacionado com a dose e exigiu, por isso, intensificação do diurético. Por outro lado, houve também agravamento da função renal, com diminuição na taxa de filtração glomerular (Weber *et al.*, 2009).

Neste momento não existe nenhum ensaio clínico que vá começar num futuro próximo.

#### **5. Sparsentano**

O sparsentano é um antagonista do recetor ET<sub>A</sub> mas também do recetor da angiotensina tipo 1. Os seus efeitos têm sido estudados pela Retrophin desde 2012. Em estudos pré-clínicos em ratos, o sparsentano retardou o aumento da pressão arterial causada pela infusão intravenosa de angiotensina II ou de ET-1 em maior extensão e com maior duração que os antagonistas dos recetores da angiotensina tipo 1 e ET<sub>A</sub> isolados, sendo que o sparsentano foi mais eficaz que o irbesartan (Davenport *et al.*, 2018).

O DUET é um ensaio clínico de fase 2 a decorrer, no qual está a ser avaliada a eficácia antiproteinúrica e segurança a longo prazo do sparsentano em comparação com o irbesartan em pacientes com glomeruloesclerose segmentar focal. Neste ensaio clínico os pacientes são tratados com sparsentano 200 mg, 400 mg ou 800 mg, por via oral. Este composto pode ser o primeiro agente a atuar como antagonista dos recetores da endotelina que é adequado como agente nefroprotetor. Isto é particularmente relevante em pacientes com doença glomerular, sendo que ainda não está esclarecido se o sparsentano tem os mesmos efeitos adversos que os antagonistas do recetor ET<sub>A</sub> (Komers *et al.*, 2017).

Um ensaio clínico, de fase 3, está neste momento em fase de recrutamento de pacientes e tem como objetivo determinar o potencial nefroprotetor a longo prazo do tratamento com sparsentano em comparação com bloqueadores dos recetores da angiotensina em pacientes com glomeruloesclerose segmentar focal primária.

## **6. Tezosentano**

O tezosentano é um antagonista não seletivo dos recetores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. Foi concebido para o tratamento de doentes com insuficiência cardíaca crónica, devido à sua ação vasodilatadora. Está a ser desenvolvido pela Idorsia pharmaceuticals, e os seus efeitos vêm sendo estudados desde 2007.

Um estudo realizado por Chin e colaboradores tinha como o objetivo de avaliar os efeitos do tezosentano nos sistemas renal e cardiovascular de leitões durante endotoxemia. O grupo a receber terapia com tezosentano estava a receber 1 mg/kg/h pela via intravenosa. Os resultados deste estudo revelaram que, no grupo que estava a receber terapia com tezosentano ocorreu uma queda significativa da pressão arterial média e da resistência vascular renal desde o início do tratamento, o que não se verificou no grupo que estava a receber terapia com uma solução salina. Houve, também, um aumento significativo do índice cardíaco e do fluxo sanguíneo renal.

Embora a pressão arterial média tenha sofrido uma queda devido à vasodilatação sistémica isso pode ser particularmente preocupante nos casos em que esta se combina com a vasodilatação que geralmente acompanha o choque endotóxico. Contudo, isto sugere

que o tezosentano foi capaz de melhorar as funções cardíaca e renal, aumentando o índice cardíaco, o fluxo sanguíneo renal e até a taxa de filtração glomerular e diminuindo a resistência vascular renal (Chin *et al.*, 2002).

Um estudo realizado tinha como objetivo avaliar os efeitos hemodinâmicos das doses de 50mg e 100 mg de tezosentano, ambas administradas por via intravenosa, em pacientes hospitalizados com insuficiência cardíaca e necessidade de tratamento imediato. Os resultados obtidos revelaram que a hemodinâmica foi rápida e significativamente melhorada, o índice cardíaco foi aumentado e a pressão capilar pulmonar teve uma redução acentuada, em comparação com o grupo placebo. Estes efeitos hemodinâmicos benéficos foram rapidamente reduzidos no início, mantidos durante a infusão de tezosentano bem como cerca de seis horas após o seu término.

Os resultados revelam que o tezosentano é eficaz no tratamento da insuficiência cardíaca, contudo revela alguns efeitos secundários como cefaleias, hipotensão, piora precoce da função renal essencialmente em doentes com história de insuficiência renal crónica (Torre-Amione *et al.*, 2003).

Um outro estudo revelou que a administração de baixas doses de tezosentano a pacientes com insuficiência aguda está associada a efeitos hemodinâmicos favoráveis, embora modestos, como a redução da resistência vascular sistémica e o aumento do índice cardíaco. As doses administradas foram de 0,2 mg/h, 1 mg/h, 5 mg/h ou 25 mg/h, pela via intravenosa. Verificou-se que o tratamento com tezosentano resultou na redução das concentrações de péptido natriurético cerebral (BNP), ao contrário do que acontece no grupo placebo. O BNP é sintetizado como resposta a uma patologia como enfarte agudo do miocárdio ou mesmo na insuficiência cardíaca.

Neste estudo uma das doses de tezosentano testada foi significativamente baixa (1mg/h), sendo que no grupo de doentes a receber esta dose de fármaco as melhorias foram maiores que para doses muito altas e, embora aparecessem um pouco mais tarde, contudo persistiram até à descontinuidade do estudo. Isto pode estar relacionado com o aumento dos níveis de ET-1 plasmáticos e diminuição do débito cardíaco nas doses mais altas do estudo (Cotter *et al.*, 2004).

## 7. Zibotentano

O zibotentano é um antagonista altamente seletivo do recetor ET<sub>A</sub>, desenvolvido pela AstraZeneca desde 2006 como um fármaco potencial anticancerígeno, visto que tem dado resultados essencialmente a nível do tratamento do cancro da próstata.

Um ensaio clínico de fase 2 foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do zibotentano em combinação com o quimioterápico padrão pemetrexede para o tratamento do cancro do pulmão comparativamente com o pemetrexede sozinho. A dose de zibotentano utilizada foi de 10 mg, por via oral, sendo que a administração intravenosa de pemetrexede foi de 500 mg/m<sup>2</sup>. Este ensaio revelou que os doentes aos quais estavam a ser administrados os dois fármacos morreram mais precocemente, contudo tiveram uma progressão mais lenta da doença (ClinicalTrials, 2018).

Um estudo que investigou a segurança e eficácia do zibotentano, administrado nas doses de 10 mg ou 15 mg por via oral, em pacientes com cancro da próstata metastático resistente à castração mostrou que este fármaco foi bem tolerado pelos pacientes, sendo que não mostrou diferença significativa entre zibotentano e o placebo para o tempo de progressão da doença. Contudo, o zibotentano continuou a sugerir uma vantagem na sobrevivência comparativamente com o grupo placebo, sendo que o número de metástases ósseas no primeiro grupo teve uma diminuição em comparação com o grupo placebo (James *et al.*, 2010).

Um ensaio clínico de fase 3 foi realizado com o objetivo de testar a eficácia de zibotentano em comparação com placebo em pacientes com cancro da próstata resistente a terapia hormonal e metástases ósseas que são sensíveis à dor e levemente sintomáticas. Metade dos pacientes foram tratados com 10 mg de zibotentano como terapia oral e a outra metade recebeu placebo, sendo que todos os participantes receberam tratamentos padrão para o tratamento do cancro da próstata. Verificou-se que o tempo de sobrevivência, o tempo até utilização de opiáceos para diminuição dos sintomas relacionados com a doença, bem como o tempo até ao aparecimento de novas lesões ósseas foi maior no grupo zibotentano comparativamente com o grupo placebo. Também o tempo para administração da primeira quimioterapia foi superior no grupo a receber tratamento com zibotentano. (ClinicalTrials, 2018).

## Potencial terapêutico dos antagonistas da endotelina

Desta forma, este fármaco revela-se uma potencial estratégia de tratamento promissora no tratamento essencialmente do cancro da próstata.

## VII. Perspetivas futuras para a terapêutica baseada no sistema da endotelina

A modulação do sistema da endotelina tem vindo a revelar-se uma estratégia favorável tanto na prevenção como no tratamento de diversas patologias.

Os antagonistas dos recetores da endotelina são uma recente e promissora classe de medicamentos que bloqueiam os recetores da endotelina,  $ET_A$  e  $ET_B$  com diferentes graus de seletividade. Estes fármacos atuam em vários mecanismos fisiopatológicos, sendo que existem já três compostos aprovados para o tratamento da HAP, o bosentano, o ambrisentano e o macitentano. Muitos outros compostos encontram-se neste momento em ensaios clínicos de fase 2 e 3 para o tratamento de diversas patologias como a doença renal crónica, insuficiência renal, cancros da próstata, ovário e coloretal e na insuficiência cardíaca aguda, estando a revelar-se promissores nessa matéria.

Uma outra estratégia alternativa para bloquear a ação da ET-1 poderá passar pelo desenvolvimento de anticorpos monoclonais, direcionados para antagonizar os recetores  $ET_A$  e  $ET_B$ .

O primeiro anticorpo monoclonal descoberto com propriedades a nível dos recetores da ET-1 foi o Rendomab-B1. Este composto possui uma elevada afinidade para o recetor  $ET_B$  e foi mencionado como sendo mais eficaz que o péptido BQ788 na competição pela ligação ao recetor. O mecanismo do Rendomab-B1 é de atuação como antagonista deste recetor, baseado na inibição completa de sinalização  $IP_3$  cálcio-induzida pela ET-1. Este composto reconhece um epítoto conformacional extracelular distinto do local de ligação de ET-1, interagindo depois com a porção N-terminal para ligação ao recetor.

O Rendomab-B1 não só bloqueia a via de sinalização do cálcio induzida pela ET-1 desencadeando uma rápida internalização do recetor nas células recombinantes do recetor  $ET_B$  como exerce atividade farmacológica nas células endoteliais vasculares humanas, causando uma diminuição da viabilidade celular (Allard *et al.*, 2013).

A potencial utilização deste anticorpo monoclonal na terapêutica seria uma mais valia na clínica, onde o bloqueio do recetor  $ET_B$  se revelaria benéfico no tratamento de patologias como o cancro ou distúrbios cardiovasculares.

O Rendomab-B1 possui uma afinidade muito baixa para células tumorais, algo que não acontece com o seu análogo Rendomab-B4. Este composto liga-se com alta afinidade aos recetores ET<sub>B</sub> das células cancerígenas, é internalizado por elas e bloqueia a sua migração. A sua ligação ao recetor é feita através do reconhecimento de duas sequências não contínuas presentes no domínio N-terminal do recetor. As modificações pós-traducionais, particularmente a glicosilação, que ocorre ao nível da região N-terminal podem afetar a ligação de anticorpo. Um dos locais de glicosilação do recetor ET<sub>B</sub> está localizado entre as duas sequências que constituem o epítotope de ligação do anticorpo ao recetor. Desta forma, modificações na glicosilação podem influenciar as propriedades de ligação do Rendomab-B4. Este composto não compete com as endotelinas pela ligação ao recetor mas modula diferentemente as vias de sinalização deste, inibindo os processos dependentes da proteína G mas não os dependentes da  $\beta$  arrestina (Borrull *et al.*, 2016).

As propriedades do Rendomab-B4 tornam este composto muito interessante na terapêutica tendo em conta a sua capacidade em bloquear a migração de células cancerígenas.

Um outro anticorpo monoclonal direcionado para o recetor ET<sub>B</sub> é o Rendomab-B49, que tem o mesmo perfil de reconhecimento que o Rendomab-B4 e tem também uma alta afinidade para os recetores ET<sub>B</sub> das células cancerígenas humanas (Herbet *et al.*, 2018).

Relativamente ao recetor ET<sub>A</sub> também existe um anticorpo monoclonal descrito para antagonizar este recetor. O Rendomab-A63 foi dirigido para ser capaz de se ligar a linhas de células tumorais humanas, sendo que ainda estão a ser feitos estudos sobre o seu funcionamento (Herbet *et al.*, 2018).

Outra estratégia de modular o sistema da endotelina passa pela utilização de péptidos permeáveis às células (CPP). Os CPP são uma família de péptidos ligados a lípidos que permanecem ligados à membrana celular, podendo ainda assim interagir com um segmento intracelular de um recetor acoplado a uma proteína G resultando numa ativação ou bloqueio da sinalização. Foi relatado um CPP para o recetor ET<sub>B</sub>, que se verificou reduzir a pressão sistólica, a hipertrofia ventricular direita bem como a muscularização da artéria pulmonar em ratos. Uma vantagem do uso destes compostos é a possibilidade de bloqueio fisiológico específico, ou seja, o bloqueio dos efeitos pretendidos mantendo

os efeitos desejáveis associados ao recetor, que neste caso do recetor  $ET_B$  se trata da depuração de ET-1 (Green *et al.*, 2013).

Em suma, esta abordagem parece interessante no sentido em que a terapêutica pode ser mais especificamente direcionada, evitando assim a toxicidade associada.

Desta forma, a pesquisa por novos compostos que module o sistema da endotelina tem sido incessante, na busca por terapias cada vez mais precisas, procurando compostos capazes de modular o sistema da endotelina de forma a que se obtenham os efeitos terapêuticos desejados com o mínimo de efeitos adversos possíveis.

## VIII. Conclusão

Desde a descoberta do péptido com maior poder vasoconstrictor ET-1, a procura pelo conhecimento do funcionamento de todo o sistema da endotelina tem sido ininterrupta. Com a constatação de que a ET-1 estaria envolvida numa série de mecanismos fisiopatológicos a nível cardíaco, pulmonar e renal surgiram as tentativas para compreender a fisiopatologia deste péptido, os mediadores envolvidos na sua libertação e os recetores em que atua.

Depois de descobertos os recetores em que a ET-1 atua, e de se perceber que a ativação do recetor ET<sub>A</sub> origina a vasoconstrição e a proliferação celular essencialmente e a ativação do recetor ET<sub>B</sub> origina vasodilatação e tem uma ação antiproliferativa, a pesquisa de fármacos que fossem capazes de modular o sistema da endotelina tornou-se uma prioridade.

Desde então muitos fármacos têm sido descritos, sendo que nem todos estão em uso clínico. Uma grande questão que se levanta é a da seletividade, ou falta dela. Ou seja, se os antagonistas dos recetores ET<sub>A</sub> apresentam vantagens relativamente aos antagonistas ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>. A inibição seletiva pode trazer vantagens à terapêutica preservando a vasodilatação e mantendo a função depurativa específica do recetor ET<sub>B</sub>, prevenindo a vasoconstrição e proliferação celular mediada pelo recetor ET<sub>A</sub>. Contudo esta questão não está ainda totalmente esclarecida uma vez que os dados clínicos não permitem tirar conclusões sobre se a seletividade é importante em termos terapêuticos.

Apenas três fármacos estão aprovados para uso clínico neste momento em Portugal, sendo eles o Tracleer<sup>®</sup> ou Stayveer<sup>®</sup> (bosentano), o Volibris<sup>®</sup> (ambrisentano) e o Opsumit<sup>®</sup> (macitentano). As diferenças mais significativas entre os três antagonistas dos recetores da endotelina assentam essencialmente na segurança e efeitos secundários, o aumento das aminotransferases hepáticas é mais acentuado no bosentano que nos outros, pelo que o risco de toxicidade hepática é superior. Os antagonistas dos recetores da endotelina apresentam elevado risco de teratogenicidade, pelo que a contração e realização de testes de gravidez deve sempre ser tida em conta. É importante salientar também as interações farmacológicas, uma vez que estes fármacos interferem com isoenzimas do citocromo P450 e podem alterar as concentrações plasmáticas de outros fármacos,

quando administrados em simultâneo. Vários fármacos antagonistas dos recetores da endotelina estão em fase de ensaios clínicos em patologias que incluem doença renal crónica, insuficiência renal, insuficiência cardíaca aguda, cancro da próstata, do ovário e do pulmão, esperando-se que possam ser aprovados para uso clínico.

As terapêuticas de combinação são uma estratégia que consiste no uso de mais do que uma classe de fármacos para o tratamento das patologias. Neste caso específico, aos antagonistas da endotelina podem adicionar-se os análogos da prostaciclina, a fim de promover a vasodilatação e uma ação antiproliferativa ou com os inibidores da fosfodiesterase tipo-5, que originam uma vasodilatação a nível pulmonar.

Por fim, novas estratégias terapêuticas estão a ser exploradas como o uso de anticorpos monoclonais capazes de antagonizar os recetores da endotelina seletivamente, sendo eles o Rendomab-A63, o Rendomab-B1, o Rendomab-B4 e o Rendomab-B49. Estes compostos, excluindo o Rendomab-B1, oferecem a possibilidade de ligação a células cancerígenas, impedindo a sua migração, sendo deste modo um alvo terapêutico de interesse a explorar.

Em suma, pese embora todo o desenvolvimento já conquistado e o conhecimento adquirido sobre o sistema da endotelina há ainda um longo caminho a percorrer no sentido de ver todos os processos totalmente esclarecidos e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## Bibliografia

- Allard, B. *et al.* (2013) «Generation and characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody displaying potent and specific antagonism of the human endothelin B receptor», *mAbs*, 5(1), pp. 56–69.
- Arici, M. A. A. *et al.* (2013) ‘Effects of BQ-788 on amitriptyline-induced cardiovascular toxicity’, *Human and Experimental Toxicology*, 32(3), pp. 316–322.
- Barton, M. *et al.* (1997) ‘Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation.’ *Biochemical and biophysical research communications*. United States, 238(3), pp. 861–865.
- Barton, M. (2008) ‘Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin’, *Nature Clinical Practice Nephrology*, 4(9), pp. 490–501.
- Barton, M. e Tharaux, P. L. (2012) ‘Endothelin and the podocyte’, *Clinical Kidney Journal*, 5(1), pp. 17–27.
- Barton, M. e Yanagisawa, M. (2008) ‘Endothelin: 20 years from discovery to therapy.’, *Canadian journal of physiology and pharmacology*. Canada, 86(8), pp. 485–498.
- Borrull, A. *et al.* (2016) «Rendomab B4, a monoclonal antibody that discriminates the human endothelin B receptor of melanoma cells and inhibits their migration», *mAbs*. Taylor & Francis, 8(7), pp. 1371–1385.
- Brunner, F. *et al.* (2006) ‘Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis’, *Pharmacology and Therapeutics*, 111(2), pp. 508–531.
- Cacoub, P. *et al.* (1993) ‘Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome.’ *The American journal of cardiology*. United States, 71(5), pp. 448–450.
- Cacoub, P. *et al.* (1997) ‘Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension.’, *Cardiovascular research*. England, 33(1), pp. 196–200.

Cardell, L. O., Uddman, R. e Edvinsson, L. (1993) 'A novel ETA receptor antagonist, FR 139317, inhibits endothelin induced contractions of guinea pig pulmonary arteries, but not trachea', *British Journal of Pharmacology*, 108(2), pp. 448–452.

Carducci, M. A. *et al.* (2007) «A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer», *Cancer*, 110(9), pp. 1959–1966.

Chester, A. H. e Yacoub, M. H. (2014) «The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension.», *Global cardiology science & practice*. Qatar, 2014(2), pp. 62–78.

Chester, A. H., Yacoub, M. H. e Moncada, S. (2017) 'Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension', *Global Cardiology Science and Practice*, 2017(2), pp. 1–16.

Chin, A. *et al.* (2002) «Effects of tezosentan, a dual endothelin receptor antagonist, on the cardiovascular and renal systems of neonatal piglets during endotoxic shock», *Journal of Pediatric Surgery*, 37(3), pp. 482–487.

Cody, R. J. *et al.* (1992) 'Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure.', *Circulation*, 85(2), pp. 504–509.

Cotter, G. *et al.* (2004) «The hemodynamic and neurohormonal effects of low doses of tezosentan (an endothelin A/B receptor antagonist) in patients with acute heart failure», *European Journal of Heart Failure*, 6(5), pp. 601–609.

ClinicalTrials.gov. [Em linha]. Disponível em <  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00745875?term=zibotentan&rank=13> >.  
[Consultado em 12-08-2018].

ClinicalTrials.gov [Em linha]. Disponível em  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00554229?term=zibotentan&phase=2&rank=1&sect=X870156> >. [Consultado em 12-08-2018].

Clozel, M. (2016) 'Endothelin research and the discovery of macitentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension', *American Journal of Physiology - Regulatory*

ry, *Integrative and Comparative Physiology*, 311(4), pp. R721–R726.

Clozel, M. *et al.* (2006) «Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats.», *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 231(6), pp. 967–73.

Coghlan, J. G. *et al.* (2017) «Initial combination therapy with ambrisentan and tadalafil in connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension (CTD-PAH): Subgroup analysis from the AMBITION trial», *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(7), pp. 1219–1227.

Dashwood, M. R. *et al.* (1994) ‘The effect of the ETA receptor antagonist, FR 139317, on [125I]-ET-1 binding to the atherosclerotic human coronary artery’, *British Journal of Pharmacology*, 112(2), pp. 386–389.

Davenport, A. P. *et al.* (2016) «Endothelin.», *Pharmacological reviews*, 68(2), pp. 357–418

Davenport, A. P. *et al.* (2018) «New drugs and emerging therapeutic targets in the endothelin signaling pathway and prospects for personalized precision medicine», *Physiological Research*, 67, pp. S537-S54.

de Zeeuw, D. *et al.* (2014) «The Endothelin Antagonist Atrasentan Lowers Residual Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy», *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), pp. 1083–1093.

Dupuis, J. e Hoeper, M. M. (2008) ‘Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension’, *European Respiratory Journal*, 31(2), pp. 407–415.

Eddahibi, S. *et al.* (1993) ‘Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia.’, *The American journal of physiology*, 265, pp. L571–L580.

EMA (2012). Resumo das características do medicamento. [Em linha]. Disponível em <[http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000401/WC500041597.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000401/WC500041597.pdf)> [Consultado em 10-08-

2018].

EMA (2013). Resumo das características do medicamento. [Em linha]. Disponível em <[http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180419140829/anx\\_140829\\_pt.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180419140829/anx_140829_pt.pdf)> [Consultado em 17-08-2018].

Elliott, J. D. *et al.* (1994) '1,3-Diarylindan-2-carboxylic Acids, Potent and Selective Non-Peptide Endothelin Receptor Antagonists', *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(11), pp. 1553–1557.

Elshaboury, S. M. e Anderson, J. R. (2013) 'Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: Improving outcomes', *Patient Preference and Adherence*, 7, pp. 401–409.

Fernandes, L. B. *et al.* (1996) 'Endothelin (B) (ET(B)) receptor-activated potentiation of cholinergic nerve-mediated contraction in human bronchus', *British Journal of Pharmacology*, 118(8), pp. 1873–1874.

Frost, A. E. *et al.* (2005) «The 6-min walk test (6MW) as an efficacy endpoint in pulmonary arterial hypertension clinical trials: Demonstration of a ceiling effect», *Vascular Pharmacology*, 43(1), pp. 36–39.

Früh, T. *et al.* (1996) 'IRL 2500: A potent ET(B) selective endothelin antagonist', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 6(19), pp. 2323–2328.

Galie, N. *et al.* (2008) «Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial.», *Lancet (London, England)*. England, 371(9630), pp. 2093–2100.

Galiè, N. *et al.* (2008) «Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: Results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-Blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2», *Circulation*, 117(23), pp. 3010–3019.

Galié, N., Manes, A. e Branzi, A. (2004) «The endothelin system in pulmonary arterial hypertension», *Cardiovascular Research*, 61(2), pp. 227–237.

Goto, K. (2001) 'Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(11), pp. 1219–1230.

Green, D. S. *et al.* (2013) «A cell permeable peptide targeting the intracellular loop 2 of endothelin B receptor reduces pulmonary hypertension in a hypoxic rat model», *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–10.

Herbet, A. *et al.* (2018) «Antibodies targeting human endothelin-1 receptors reveal different conformational states in cancer cells», *Physiological Research*, 67, pp. S257-S264.

Hickey, K. *et al.* (1985) 'Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells.', *The American journal of physiology*, 248, pp. C550–C556.

Humbert, M. *et al.* (2004) «Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2», *European Respiratory Journal*, 24(3), pp. 353–359.

Huo, Y. *et al.* (2016) 'Evaluation of efficacy, safety and tolerability of Ambrisentan in Chinese adults with pulmonary arterial hypertension: A prospective open label cohort study', *BMC Cardiovascular Disorders*, 16(1), pp. 1–8.

INFARMED (2017). Guia de informações para o prescritor- Bosentano. [Em linha]. Disponível em <  
[http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwiB1faM5q\\_dAhUGxoUKHdxDAgEQFjABegQIBxAC&url=http%3A%2F%2Fapp7.infarmed.pt%2Finfomed%2FdownloadMatEduc.php%3Ffilename%3DBosentano\\_6TAIM%2FBosentano\\_Prescritor\\_versao\\_1\\_14-08-2017.pdf&usg=AOvVaw0tu90g0M5SOUU\\_VB1MabNb](http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwiB1faM5q_dAhUGxoUKHdxDAgEQFjABegQIBxAC&url=http%3A%2F%2Fapp7.infarmed.pt%2Finfomed%2FdownloadMatEduc.php%3Ffilename%3DBosentano_6TAIM%2FBosentano_Prescritor_versao_1_14-08-2017.pdf&usg=AOvVaw0tu90g0M5SOUU_VB1MabNb)> [Consultado em 06-08-2018].

Iversen, K. *et al.* (2010) «Combination therapy with bosentan and sildenafil in Eisenmenger syndrome: A randomized, placebo-controlled, double-blinded trial», *European Heart Journal*, 31(9), pp. 1124–1131.

- Ihara, M. *et al.* (1992) 'A novel radioligand [<sup>125</sup>I] BQ3020 selective for endothelin (ET<sub>B</sub>) receptor', pp. 47–52.
- Iversen, K. *et al.* (2010) «Combination therapy with bosentan and sildenafil in Eisenmenger syndrome: A randomized, placebo-controlled, double-blinded trial», *European Heart Journal*, 31(9), pp. 1124–1131.
- James, N. D. *et al.* (2010) «Final safety and efficacy analysis of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain-free or mildly symptomatic for pain: a double-blind», *BJU International*, 106(7), pp. 966–973.
- Kanagy, N. L., Walker, B. R. e Nelin, L. D. (2001) 'Role of Endothelin in Intermittent Hypoxia-Induced Hypertension', *Hypertension*, 37(2), pp. 511–515.
- Karaki, H. *et al.* (1993) 'Induction of endothelium-dependent relaxation in the rat aorta by IRL 1620, a novel and selective agonist at the endothelin ET B receptor', *British Journal of Pharmacology*, 109, pp. 486–490.
- Kholdani, C. A., Fares, W. H. e Trow, T. K. (2014) 'Macitentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension', *Vascular Health and Risk Management*, 10, pp. 665–673.
- Kiely, D. G. *et al.* (1997) 'Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man.', *Cardiovascular research*, 33(2), pp. 378–386.
- Kohan, D. E. *et al.* (2011) «Addition of Atrasentan to Renin-Angiotensin System Blockade Reduces Albuminuria in Diabetic Nephropathy», *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(4), pp. 763–772.
- Kohan, D. E. *et al.* (2011) 'Physiology of endothelin and the kidney', *Comprehensive Physiology*, 1(2), pp. 883–919.
- Komers, R. *et al.* (2017) «Efficacy and Safety of Sparsentan Compared With Irbesartan in Patients With Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: Randomized, Controlled Trial Design (DUET)», *Anuario de Psicologia*. 47(1), pp. 654–664.

Kowalczyk, A. *et al.* (2015) «The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis», *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(1), pp. 41–52.

Kloog, Y. *et al.* (1988) ‘Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain.’, *Science (New York, N.Y.)*. United States, 242(4876), pp. 268–270.

Kurnik, D., Haviv, Y. e Kochva, E. (1999) ‘A snake bite by the Burrowing Asp, *Atractaspis engaddensis*.’, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxicology*. England, 37(1), pp. 223–227. Chester, A. H. e Yacoub, M. H. (2014) «The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension.», *Global cardiology science & practice*. Qatar, 2014(2), pp. 62–78.

Davenport, A. P. *et al.* (2016) «Endothelin.», *Pharmacological reviews*, 68(2), pp. 357–418.

Dupuis, J. e Hoeper, M. M. (2008) «Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension», *European Respiratory Journal*, 31(2), pp. 407–415.

Elshaboury, S. M. e Anderson, J. R. (2013) «Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: Improving outcomes», *Patient Preference and Adherence*, 7, pp. 401–409.

Galiè, N. *et al.* (2008) «Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial.», *Lancet (London, England)*. England, 371(9630), pp. 2093–2100.

Galiè, N. *et al.* (2008) «Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: Results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-Blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2», *Circulation*, 117(23), pp. 3010–3019.

Galiè, N., Manes, A. e Branzi, A. (2004) «The endothelin system in pulmonary arterial hypertension», *Cardiovascular Research*, 61(2), pp. 227–237.

Kowalczyk, A. *et al.* (2015) «The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis», *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(1), pp. 41–52.

Laufs, U., Rettig-Ewen, V. e Böhm, M. (2011) «Strategies to improve drug adherence», *European Heart Journal*, 32(3), pp. 264–268.

Maneenil, G. *et al.* (2018) «Effect of bosentan therapy in persistent pulmonary hypertension of the newborn», *Pediatrics and Neonatology*. Elsevier Taiwan LLC, 59(1), pp. 58–64.

Mazzuca, M. Q. e Khalil, R. A. (2012) «Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease», *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 84(2), pp. 147–162.

Weber, C. *et al.* (1996) «Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects», *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 60(2), pp. 124–137.

Weber, M. A. *et al.* (2009) «A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.», *Lancet (London, England)*. England, 374(9699), pp. 1423–1431.

Yokoyama, Y. *et al.* (2014) «Endothelin-1 Receptors in Rat Tissues: Characterization by Bosentan, Ambrisentan and CI-1020», *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(3), pp. 461–465.

Langleben, D. e Cacoub, P. (2009) «A review of STRIDE-2 and STRIDE-2X: the case for selective endothelin receptor blockade.», *European journal of clinical investigation*, 39 Suppl 2(June 2008), pp. 27–31.

Leung, S. W. S. *et al.* (2002) ‘Use of A-192621 and IRL-2500 to unmask the mesenteric and renal vasodilator role of endothelin ETB receptors’, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 39(4), pp. 533–543.

- Liang, F. *et al.* (2012) «Ambrisentan and tadalafil synergistically relax endothelin-induced contraction of rat pulmonary arteries», *Hypertension*, 59(3), pp. 705–711.
- MacDonald, R. L. *et al.* (2012) «Randomized trial of clazosentan in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing endovascular coiling», *Stroke*, 43(6), pp. 1463–1469.
- Maguire, J. J. e Davenport, A. P. (2014) ‘Endothelin - new agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR Review 12.’, *British journal of pharmacology*. England, 171(24), pp. 5555–5572.
- Maneenil, G. *et al.* (2018) «Effect of bosentan therapy in persistent pulmonary hypertension of the newborn», *Pediatrics and Neonatology*. Elsevier Taiwan LLC, 59(1), pp. 58–64.
- Mann, J. F. E. *et al.* (2010) «Avosentan for Overt Diabetic Nephropathy», pp. 527–535.
- Marinissen, M. J. e Gutkind, J. S. (2001) «G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms», *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(7), pp. 368–376.
- Masuda, Y. *et al.* (1996) ‘Receptor binding and antagonist properties of a novel endothelin receptor antagonist, TAK-044 [cyclo[D-alpha-aspartyl-3-[(4-phenylpiperazin-1-yl) carbonyl]-L-alanyl-L-alpha-aspartyl-D-2-(2-thienyl) glyceryl-L-leucyl-D-tryptophyl]disodium salt], in human endothelin A and endothelin B receptors.’, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. United States, 279(2), pp. 675–685.
- Mathai, S. C. *et al.* (2007) «Addition of sildenafil to bosentan monotherapy in pulmonary arterial hypertension», *European Respiratory Journal*, 29(3), pp. 469–475.
- Mazzuca, M. Q. e Khalil, R. A. (2012) «Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease», *Biochemical Pharmacology*. 84(2), pp. 147–162.
- Mehta, S. *et al.* (2017) ‘Macitentan Improves Health-Related Quality of Life for Pa-

tients With Pulmonary Arterial Hypertension: Results From the Randomized Controlled SERAPHIN Trial', *Chest*. 151(1), pp. 106–118.

McCulloch, K. M. e MacLean, M. R. (1995) 'Endothelin B receptor-mediated contraction of human and rat pulmonary resistance arteries and the effect of pulmonary hypertension on endothelin responses in the rat.', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 26 Suppl 3, pp. S169-76.

McMurdo, L., Thiemermann, C. e Vane, J. R. (1994) 'The effects of the endothelin ETA receptor antagonist, FR 139317, on infarct size in a rabbit model of acute myocardial ischaemia and reperfusion', *British Journal of Pharmacology*, 112(1), pp. 75–80.

McLaughlin, V. V. *et al.* (2006) «Randomized study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension», *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(11), pp. 1257–1263.

McLaughlin, V. V. *et al.* (2010) «Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: A randomized controlled clinical trial», *Journal of the American College of Cardiology*. 55(18), pp. 1915–1922.

Miller, W. L., Redfield, M. M. e Burnett, J. C. (1989) 'Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin', *Journal of Clinical Investigation*, 83(1), pp. 317–320.

Monaco, T. J. e Davila, C. D. (2016) 'Safety, efficacy, and clinical utility of macitentan in the treatment of pulmonary arterial hypertension', *Drug Design, Development and Therapy*, 10, pp. 1675–1682.

Nakov, R., Pfarr, E. e Eberle, S. (2002) «Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension.», *American journal of hypertension*, pp. 583–9.

Nootens, M. *et al.* (1995) 'Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: relation to hemodynamic variables and endothelin levels.', *Journal of the American College of Cardiology*. 26(7), pp. 1581–1585.

Plumpton, C. *et al.* (1996) 'The increase in human plasma immunoreactive endothelin

but not big endothelin-1 or its C-terminal fragment induced by systemic administration of the endothelin antagonist TAK-044', *British Journal of Pharmacology*, 119(2), pp. 311–314.

Pollock, D. M., Keith, T. L. e Highsmith, R. F. (1995) 'Endothelin receptors and calcium signaling.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(12), pp. 1196–204.

Pulido, T. *et al.* (2013) 'Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension', *New England Journal of Medicine*, 369(9), pp. 809–818.

Rafat, M. 2012 (2018) 'Dual Antibody Functionalized Polyvinyl Alcohol and Alginate Hydrogels for Synergistic Endothelial Cell Adhesion.'

Reriani, M. *et al.* (2011) «Long term administration of endothelin receptor antagonist improves coronary endothelial function in patients with early atherosclerosis», *Circulation*, 122(10), pp. 958–966.

Russell, F. D. e Davenport, A. P. (1996) 'Characterization of the binding of endothelin ET(B) selective ligands in human and rat heart', *British Journal of Pharmacology*, 119(4), pp. 631–636.

Sabri, M., Ai, J. e MacDonald, R. L. (2011) «Dissociation of vasospasm and secondary effects of experimental subarachnoid hemorrhage by clazosentan», *Stroke*, 42(5), pp. 1454–1460.

Saeki, T. *et al.* (1991) '[Ala1,3,11,15]endothelin-1 analogs with ETB agonistic activity.', *Biochemical and biophysical research communications*. 179(1), pp. 286–292.

Sakamoto, A. *et al.* (1993) 'Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin(A)-selective antagonist and endothelin(B)-selective agonists', *Journal of Biological Chemistry*, 268(12), pp. 8547–8553.

Segrera, S. A. *et al.* (2017) 'Open label study of ambrisentan in patients with exercise pulmonary hypertension', *Pulmonary Circulation*, 7(2), pp. 531–538.

Seo, B. *et al.* (1994) 'Both ET(A) and ET(B) receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels', *Circulation*, 89(3), pp. 1203–1208.

Shukla, A. K., Xiao, K. e Lefkowitz, R. J. (2011) «Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling.», *Trends in biochemical sciences*. England, 36(9), pp. 457–469.

Stewart, D. J. *et al.* (1991) 'Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?', *Annals of internal medicine*. United States, 114(6), pp. 464–469.

Takai, M. *et al.* (1992) 'A potent and specific agonist, Suc-[Glu<sup>9</sup>,Ala<sup>11,15</sup>]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET<sub>B</sub> receptor', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(2), pp. 953–959.

Takasaki, C. *et al.* (1988) 'Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart.', *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. England, 26(6), pp. 543–548.

Torre-Amione, G. *et al.* (2003) «Hemodynamic and clinical effects of tezosentan, an intravenous dual endothelin receptor antagonist, in patients hospitalized for acute decompensated heart failure», *Journal of the American College of Cardiology*. 42(1), pp. 140–147.

Yanagisawa, M. *et al.* (1988) 'A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells', *Nature*, pp. 411–415.

Yokoyama, Y. *et al.* (2014) «Endothelin-1 Receptors in Rat Tissues: Characterization by Bosentan, Ambrisentan and CI-1020», *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(3), pp. 461–465.

Zahradni, I., Minarovic, I. e Zahradni, A. (2008) 'Inhibition of the Cardiac L-Type Calcium Channel Current by Antidepressant Drugs', *Pharmacology and experimental therapeutics*, 324(3), pp. 977–984.

Watanabe, T. *et al.* (1995) 'Pharmacology of a non-selective ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor an-

tagonist, TAK-044 and the inhibition of myocardial infarct size in rats', *British Journal of Pharmacology*, 114(5), pp. 949–954.

Watson, A. M. D., Li, J. e Schumacher, C. (2010) «The endothelin receptor antagonist avosentan ameliorates nephropathy and atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E knockout mice», pp. 192–203.

Weber, C. *et al.* (1996) «Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects», *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 60(2), pp. 124–137.

Weber, M. A. *et al.* (2009) «A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.», *Lancet (London, England)*. England, 374(9699), pp. 1423–1431.

Wessale, J. L. *et al.* (2002) 'Pharmacology of endothelin receptor A-192621 : ex vivo and in vivo studies', 103, pp. 112–117.