

Disfunção endotelial após isquemia global e reperusão em cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea: estudo do papel do magnésio em artérias coronarianas caninas

Marco A. VOLPE*, João J. CARNEIRO*, Luiz Alberto MAGNA**, Fernanda VIARO*, Eliana Aparecida Lopes ORIGUELA*, Paulo R. B. EVORA*

(* Laboratório de Função Endotelial – Divisão de Cirurgia Experimental e Divisão de Cirurgia Torácica e Cardiovascular do Departamento de Cirurgia e Anatomia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP; (** Departamento de Genética Médica – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade de Campinas – UNICAMP, SP.

RBCCV 44205-589

Resumo

Objetivo: Estudar a disfunção endotelial conseqüente à lesão provocada por isquemia global seguida de reperusão e a potencial influência protetora do magnésio sobre a integridade funcional do endotélio em coronárias isoladas de cães.

Método: Segmentos de artérias coronárias caninas foram suspensos em banhos orgânicos para medida de força isométrica. A disfunção endotelial foi avaliada pela capacidade destes segmentos produzirem óxido nítrico, alterando a força isométrica inicial. Foram selecionados quatro grupos com seis cães em cada um: SEM CEC (controle), CEC (110 minutos de perfusão sem isquemia), ISQ (45 minutos de isquemia), ISQ/REP (45 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperusão). A ação do magnésio foi avaliada em três fases: I (banho orgânico com magnésio), II (banho orgânico sem magnésio) e III (banho orgânico com magnésio restaurado). Foram utilizados três agonistas farmacológicos que representam os principais passos da via de produção do óxido nítrico: receptor de membrana da célula endotelial – acetilcolina (ACh); transdução do sinal entre o receptor e os processos intracelulares através da G-proteína - fluoreto de sódio (NaF); liberação dos estoques intracelulares de cálcio - cálcio ionóforo (A_{23187}). Ao estudo da função endotelial associou-se a avaliação da atividade da musculatura lisa dependente de GMPc - nitroprussiato de sódio (NPS).

Resultados: Os principais achados desta investigação foram: 1) a presença de magnésio no perfusato pareceu atenuar a disfunção endotelial causada por isquemia global seguida de reperusão; 2) a presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a maior relaxamento em resposta aos agonistas da produção de óxido nítrico; 3) a remoção de magnésio do banho orgânico (fase II) esteve associada à redução na intensidade do relaxamento em resposta aos agonistas da produção de óxido nítrico; 4) a restauração de magnésio ao banho orgânico (fase III) permitiu recuperação do relaxamento observado na fase I, apenas em resposta à estimulação direta das G-proteínas. Para os demais agonistas a restauração esteve associada à redução adicional na intensidade do relaxamento; 5) a musculatura lisa recebeu influência da concentração de magnésio no banho orgânico.

Conclusão: O magnésio influencia favoravelmente na produção de óxido nítrico pelo endotélio coronariano, atenuando a disfunção endotelial causada por isquemia global seguida de reperusão.

Descritores: Magnésio. Endotélio. Isquemia. Reperusão coronariana.

Abstract

Introduction: Hypomagnesemia and ischemia followed by reperfusion often occur in cardiac surgery. Both of them are associated with endothelial dysfunction which interferes

negatively with patient evolution. Physiopatology of these disturbances is similar and involves G-proteins dysfunction.

Objective: The present study focuses on the endothelial dysfunction consequent to the lesion resulting from global ischemia followed by reperfusion and the potential protective influence of magnesium on the endothelium functional integrity in isolated coronaries of dogs.

Method: Segments of canine coronary arteries were suspended in organ chambers to measure isometric force. Endothelial dysfunction was evaluated by the ability of these segments to produce nitric oxide changing the initial isometric force. Four groups with six dogs in each one were selected: SEM CEC (control), CEC (110 minutes of perfusion without ischemia), ISQ (45 minutes of ischemia), ISQ/REP (45 minutes of ischemia followed by 60 minutes of reperfusion). The magnesium action was evaluated in three different phases: I (organ chambers with magnesium), II (organ chambers without magnesium) and III (organ chambers with restored magnesium). Three pharmacological agonists were used which represented the main steps involved in the nitric oxide production: the membrane receptor of the endothelial cell – acetylcholine (ACh); transduction of the signal between the receptor and the intracellular processes through the G-protein – sodium fluoride (NaF); liberation of intracellular stocks of calcium – calcium ionophore (A23187). The study of endothelial function was combined with the

evaluation of smooth muscle activity dependent on GMPc – sodium nitroprusside (NPS).

Results: The major findings of this investigation were as follows: 1) presence of magnesium in priming seemed to attenuate the endothelial dysfunction caused by global ischemia followed by reperfusion; 2) presence of magnesium in the organ chamber (phase I) was associated with the greatest relaxation in response to agonists of the nitric oxide production; 3) removal of magnesium in the organ chamber (phase II) was linked to the reduction in the relaxation intensity in response to agonists of the nitric oxide production; 4) the magnesium restoration to the organ chamber (phase III) allowed restoration of the relaxation observed in the phase I, only in response to the direct stimulation of the G-proteins. For the rest of the remaining agonists, the restoration was associated with the additional reduction in the relaxation intensity; 5) the smooth muscle received the influence of the magnesium concentration in the organ chamber.

Conclusion: It was concluded that magnesium favorably influences the nitric oxide production by the coronary endothelium attenuating the endothelial dysfunction caused by global ischemia followed by reperfusion.

Descriptors: Magnesium. Endothelium. Ischemia. Coronary Reperfusion.

INTRODUÇÃO

Trabalhos experimentais realizados na Mayo Clinic, no início dos anos 90, associaram a lesão induzida por isquemia global seguida de reperusão, disfunção endotelial e agregação plaquetária. Utilizando cães e metodologias específicas para estudo da função endotelial evidenciaram prejuízo da liberação do óxido nítrico (NO), secundário a produtos plaquetários. Estes experimentos mostraram, também, que tal prejuízo afetava seletivamente a liberação de NO mediada por receptores, mas que a habilidade da célula endotelial em produzi-lo, bem como a função da musculatura lisa, permaneciam inalteradas. Esta disfunção seria uma consequência direta do comprometimento específico na transdução do sinal por G-proteínas^(1,2).

O conhecimento dos efeitos benéficos da infusão de magnésio no per-operatório de cirurgias cardíacas^(3,4,5,6) levantou a possibilidade de sua influência positiva atenuando a disfunção endotelial decorrente da lesão de isquemia/reperusão. Na tentativa de compreender os mecanismos responsáveis pelo efeito protetor observado com a infusão do magnésio em cirurgia cardíaca, estudos demonstraram que o magnésio tem um papel importante na via clássica da liberação de NO^(7,8). Ratificou-se o conhecimento que a deficiência de magnésio, isoladamente, associava-se à disfunção endotelial. Além disso, sugeriu-se que a disfunção decorrente da hipomagnesemia

previamente uma cânula através da veia pulmonar superior direita para descompressão do ventrículo esquerdo durante o período de isquemia e reperusão precoce.

Cumpridos os tempos de isquemia global e reperusão os animais foram sacrificados por exsanguinação. Posteriormente excisou-se o coração, ainda com batimentos espontâneos, transferindo-o para uma solução fisiológica gelada e oxigenada com a seguinte composição milimolar: NaCl, 118.3; KCl, 4.7; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.22; CaCl₂, 2.5; NaHCO₃, 25.0 e glicose, 11.1 (solução de Krebs ou controle). Os mesmos procedimentos foram realizados para os animais do grupo SEM CEC (controle) e grupo CEC A artéria coronária circunflexa dos corações dos cães pertencentes aos 4 grupos foram cuidadosamente dissecadas e colocadas em solução controle. Tomou-se o cuidado de remover-se ao máximo o tecido conjuntivo perivascular. Obteve-se, por secção da artéria isolada, oito segmentos vasculares com 4 a 5 mm (anéis coronarianos). Removeu-se o endotélio de quatro deles, permanecendo, portanto, um conjunto de quatro pares de anéis com e sem endotélio. A remoção do endotélio foi realizada por escarificação do interior do anel. Delicada pinça microvascular foi introduzida na luz dos anéis com posterior fricção dos mesmos em toalha de papel embebida com solução controle. Os anéis coronaria-nos com e sem endotélio, de todos os grupos, foram suspensos em banhos

apresentava perfil semelhante àquele observado na vigência de isquemia seguida de reperusão. O comprometimento da liberação do NO seria dependente da transdução do sinal entre receptores de membrana e processos bioquímicos intracelulares, estabelecendo-se, portanto, uma relação direta entre hipomagnesemia e disfunção de G-proteínas⁽⁸⁾.

Estes estudos motivaram a presente investigação a estudar a disfunção endotelial conseqüente à lesão de G-proteínas por isquemia global seguida de reperusão e a potencial influência protetora do magnésio.

MÉTODO

Cães mestiços livres de verminose 12 a 31,5 Kg de ambos os sexos foram anestesiados com Tiopental Sódico (Abbott) - 25mg/kg em bolo endovenoso, entubados com uma sonda traqueal com balão e ventilados com oxigênio a 100%. A manutenção anestésica foi garantida pela inalação de Halotano (Zeneca) vaporizado na sonda orotraqueal. Em todos os animais registrou-se o eletrocardiograma e cateterizou-se a artéria femoral comum direita para monitorização da pressão arterial média. Realizou-se toracotomia ântero-lateral direita no quarto espaço intercostal para a exposição cardíaca. Foram planejados quatro grupos experimentais com seis animais cada (n=6): 1) Grupo SEM CEC - Não foi realizada circulação extracorpórea. Os animais foram submetidos apenas ao procedimento cirúrgico, não sendo realizadas perfusão nem isquemia global; 2) Grupo CEC - Cães submetidos a 110 minutos de perfusão normotérmica sem isquemia global; 3) Grupo ISQ - Cães submetidos a isquemia global por 45 minutos de pinçamento aórtico e 4) Grupo ISQ/REP - Cães submetidos a isquemia global por pinçamento aórtico durante 45 minutos seguidos de 60 minutos de reperusão. As coronárias dos animais de cada um dos grupos experimentais foram submetidas a três fases distintas e sucessivas para cada agonista farmacológico utilizado: 1) Fase I - As observações das alterações da força isométrica foram realizadas na presença de magnésio no banho orgânico;

2) Fase II - O ensaio experimental foi realizado removendo-se o magnésio do banho orgânico; Fase III - O ensaio experimental foi realizado restaurando-se o magnésio ao banho orgânico.

Nos animais submetidos à circulação extracorpórea (perfusão), após heparinização sistêmica (3mg/Kg) inseriu-se uma cânula venosa através do apêndice auricular direito e uma cânula na artéria femoral comum esquerda. Instituiu-se a perfusão com fluxo 2.3 - 2.4 l/min/m² (37°C). Após estabilização do fluxo e da pressão de perfusão, procedeu-se ao pinçamento da aorta ascendente, introduzindo-se

orgânicos (organ chambers) para medida de força isométrica na presença de indometacina.

Drogas. A disfunção endotelial foi avaliada pela capacidade de artérias coronárias caninas liberarem NO nas condições experimentais estabelecidas. Foram escolhidas três drogas que representam os principais passos da via de liberação do óxido nítrico: Receptor de membrana da célula endotelial - Acetilcolina (ACh); Transdução do sinal entre o receptor e os processos intracelulares através da G-proteína - Fluoreto de Sódio (NaF); Liberação dos estoques intracelulares de cálcio - Cálcio Ionóforo (A₂₃₁₈₇). Ao estudo da função endotelial associou-se o estudo da função de musculatura lisa dependente de GMPc - Nitroprussiato de Sódio (NPS). Adicionou-se indometacina (10-5M) aos banhos orgânicos 45 minutos antes dos experimentos, para prevenir a síntese de prostanoídes. Todas estas drogas foram fornecidas pela Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. O conjunto de anéis coronarianos foi deixado em repouso por um período de pelo menos 60 minutos entre os protocolos experimentais para cada uma das fases.

Análise estatística. Os resultados serão apresentados como médias ± erros-padrão. Em todos os experimentos, n significa o número de animais dos quais os anéis vasculares foram obtidos. Em anéis contraídos com prostaglandina F_{2a}, as respostas foram expressas como percentagem das alterações a partir da contração máxima estável. Para os relaxamentos, calculou-se o logaritmo negativo da concentração molar efetiva do agonista que causa inibição de 50% (IC₅₀) da contração obtida pela prostaglandina F_{2a}. Esses valores foram utilizados para a construção de curvas dose-respostas. Para a análise estatística foram utilizadas as análise de variância (ANOVA). Além da análise de variância utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para observações não pareadas visando a comparação dos relaxamentos entre os diferentes grupos numa mesma fase. Quando observada significância estatística, esta análise foi complementada pelo teste de Mann-Whitney. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de (p) foi menor do que 0.05 (p<0.05)

RESULTADOS

1. Relaxamento dependente de receptor - Acetilcolina (ACh)

A adição do agonista em doses crescentes proporcionou relaxamentos progressivamente maiores aos segmentos coronarianos providos de endotélio. Nos segmentos desprovidos de endotélio, a adição do agonista não proporcionou relaxamentos chegando mesmo a induzir contrações.

Análise dos grupos por fases

Fase I (Krebs com magnésio) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e 10^{-4} M. As curvas dose-respostas mostraram expressivos relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e 10^{-4} M. As curvas dose-respostas exibiram discretos incrementos contráteis dos anéis (Figura 1).

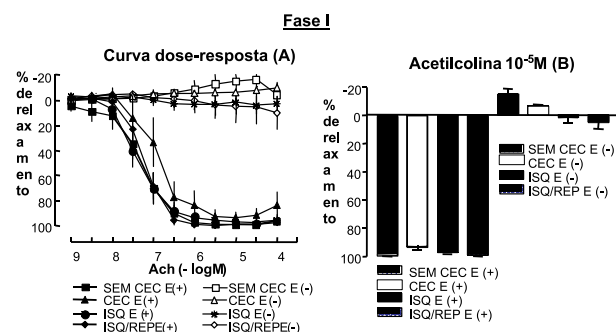


Fig. 1 - Fase I (Krebs com magnésio): A - Curvas dose-respostas à acetilcolina (ACh) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a (2×10^{-6} M), na presença de indometacina (10^{-5} M); B - Efeitos da dose 10^{-5} M de acetilcolina (ACh) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a (2×10^{-6} M), na presença de indometacina (10^{-5} M). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Fase II (Krebs sem magnésio) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e 10^{-4} M. As curvas dose-respostas mostraram relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram diferenças estatísticas entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e 10^{-4} M. As curvas dose-respostas praticamente não exibiram incrementos contráteis em nenhuma das doses do agonista para nenhum dos grupos em questão (Figura 2).

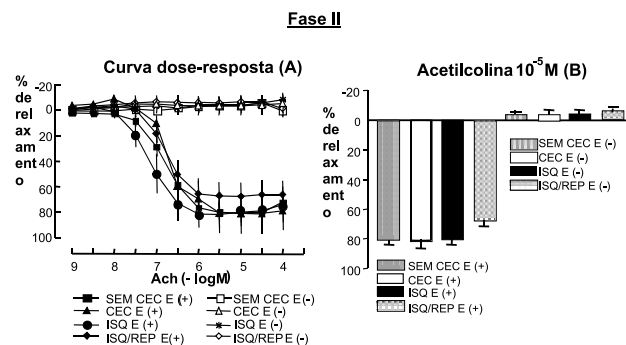


Fig. 2 - Fase II (Krebs sem magnésio): A - Curvas dose-respostas à acetilcolina (ACh) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a (2×10^{-6} M), na presença de indometacina (10^{-5} M); B - Efeitos da dose 10^{-5} M de acetilcolina (ACh) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a (2×10^{-6} M), na presença de indometacina (10^{-5} M). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Fase III (Krebs com magnésio - restauração) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e 10^{-4} M. As curvas dose-respostas mostraram relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e 10^{-4} M. As curvas dose-respostas mostraram incrementos contráteis dos anéis (Figura 3).

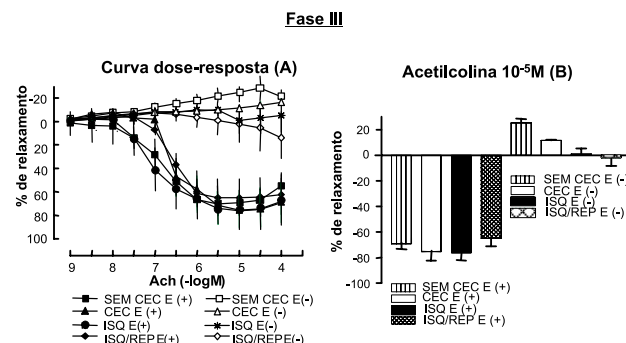


Fig. 3 - Fase III (Krebs com magnésio restaurado): A - Curvas dose-respostas à acetilcolina (ACh) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a (2×10^{-6} M), na presença de indometacina (10^{-5} M); B - Efeitos da dose 10^{-5} M de acetilcolina (ACh) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a (2×10^{-6} M), na presença de indometacina (10^{-5} M). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

acetilcolina (ACh) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com $PGF_2\alpha$ ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Relaxamento dependente da transdução do sinal por G-proteínas- Fluoreto de Sódio (NaF)

A adição do agonista em doses crescentes proporcionou relaxamentos aos segmentos coronarianos providos de endotélio. Nos segmentos desprovidos de endotélio a adição do agonista não proporcionou relaxamentos chegando mesmo a induzir contrações.

Análise dos grupos por fases

Fase I (Krebs com magnésio) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 0,5 e 7,5 mM. As curvas dose-respostas não exibiram relaxamentos nessas doses do agonista. Para a dose subsequente, 9,5 mM, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, embora as curvas dose-respostas tenham mostrado relaxamento dos anéis nos quatro grupos em questão. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 0,5 e 7,5 mM. As curvas dose-respostas exibiram discretos incrementos contráteis nessas doses do agonista. Para a dose subsequente, 9,5 mM, foi mantida a igualdade estatística entre os grupos e as curvas dose-respostas exibiram maior contração em todos eles (Figura 4).

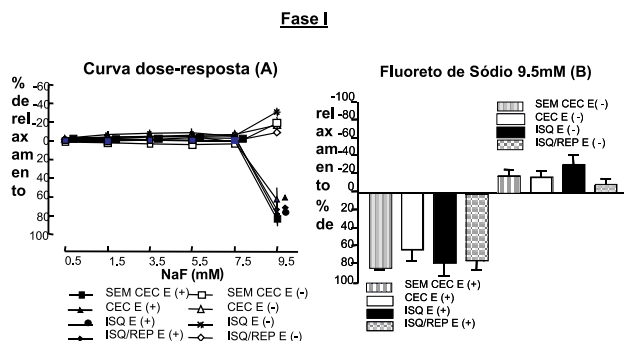


Fig. 4 - Fase I (Krebs com magnésio): A - Curvas dose-respostas ao fluoreto de sódio (NaF) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com $PGF_2\alpha$ ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$); B - Efeitos da dose 9,5 mM de fluoreto de sódio (NaF) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com $PGF_2\alpha$ ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais

submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Fase II (Krebs sem magnésio) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 0,5 e 7,5 mM. As curvas dose-respostas não exibiram relaxamentos nessas doses do agonista. Para a dose subsequente, 9,5 mM, o grupo ISQ mostrou-se estatisticamente diferente dos demais sendo que as curvas dose-respostas exibem um maior relaxamento neste grupo. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 0,5 e 7,5 mM. As curvas dose-respostas exibiram muito discretos incrementos contráteis nessas doses do agonista. Para a dose subsequente, 9,5 mM, foi mantida as igualdades estatísticas entre os grupos e as curvas dose-respostas exibiram maiores contrações em todos eles (Figura 5).

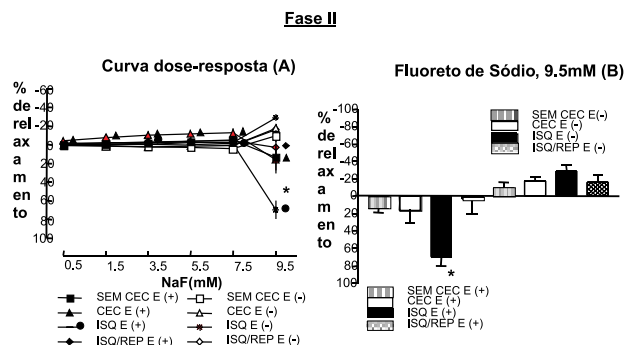


Fig. 5 - Fase II (Krebs sem magnésio): A - Curvas dose-respostas ao fluoreto de sódio (NaF) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com $PGF_2\alpha$ ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$); B - Efeitos da dose 9,5 mM de fluoreto de sódio (NaF) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com $PGF_2\alpha$ ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Fase III (Krebs com magnésio - restauração) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 0,5 e 7,5 mM. As curvas dose-respostas não exibiram relaxamento

nessas doses do agonista. Para a dose subsequente, 9,5 mM, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, embora as curvas dose-respostas tenham mostrado relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 0,5 e 7,5 mM. As curvas dose-respostas exibiram discretos incrementos contráteis nessas doses do agonista. Para a dose subsequente, 9,5 mM, foi mantida a igualdade estatística entre os grupos e as curvas dose-respostas exibiram expressivas contrações em todos eles (Figura 6).

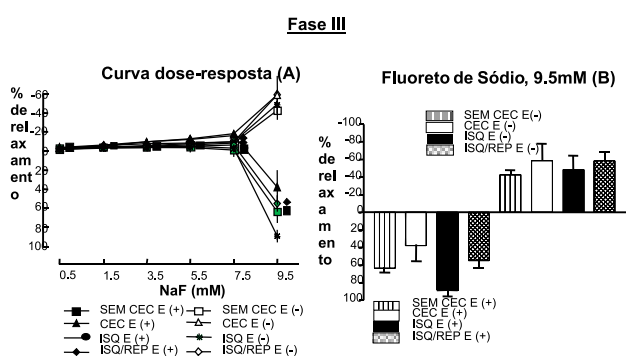


Fig. 6 - Fase III (Krebs com magnésio restaurado): A - Curvas dose-respostas ao fluoreto de sódio (NaF) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁻⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M); B - Efeitos da dose 9,5 mM de fluoreto de sódio (NaF) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁻⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias ± erros-padrão). (n = 6).

Relaxamentos independentes de receptor - Ionóforo do cálcio (A₂₃₁₈₇)

A adição do agonista em doses crescentes proporcionou relaxamentos progressivamente maiores aos segmentos coronarianos providos de endotélio. Nos segmentos desprovidos de endotélio a adição do agonista não proporcionou relaxamentos expressivos chegando em algumas situações a induzir contrações.

Análise dos grupos por fases

Fase I (Krebs com magnésio) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10⁻⁹ e 10⁻⁶ M. As curvas dose-respostas exibiram expressivos relaxamentos

dos anéis em todos os grupos. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10⁻⁹ e 10⁻⁶ M. As curvas dose-respostas mostraram inclusive discretas tendências ao relaxamento dos anéis (Figura 7).

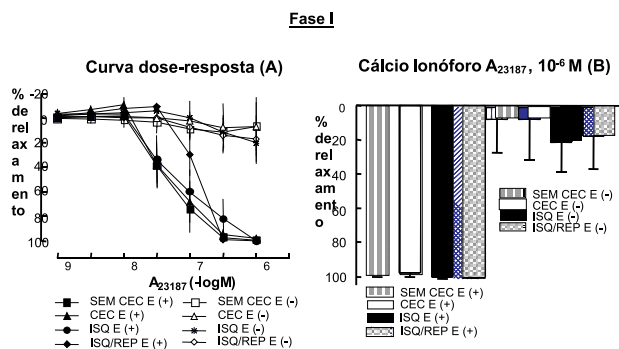


Fig. 7 - Fase I (Krebs com magnésio): A - Curvas dose-respostas cálcio ionóforo (A₂₃₁₈₇) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁻⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M); B - Efeitos da dose 10⁻⁶ M de cálcio ionóforo (A₂₃₁₈₇) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁻⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias ± erros-padrão). (n = 6).

Fase II (Krebs sem magnésio) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10⁻⁹ e 10⁻⁶ M. As curvas dose-respostas exibiram relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Os anéis dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10⁻⁹ e 10⁻⁶ M. As curvas dose-respostas praticamente não exibiram modificações em seu estado inicial nessas doses do agonista (Figura 8).

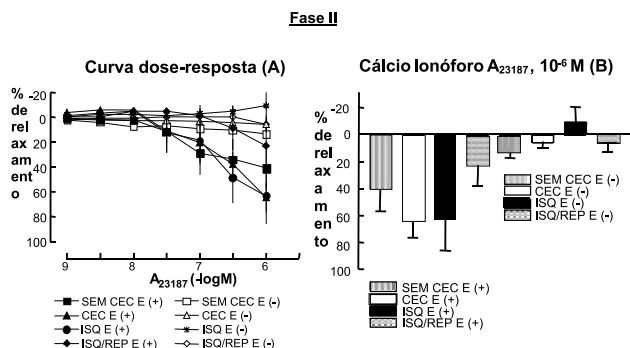


Fig. 8 - Fase II (Krebs sem magnésio): A - Curvas dose-respostas cálcio ionóforo (A_{23187}) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$); B - Efeitos da dose $10^{-6} M$ de cálcio ionóforo (A_{23187}) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Fase III (Krebs com magnésio - restauração) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e $10^{-6} M$. As curvas dose-respostas exibiram discretos relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram contrações estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e $10^{-6} M$. As curvas dose-respostas exibiram discretas contrações dos anéis (Figura 9).

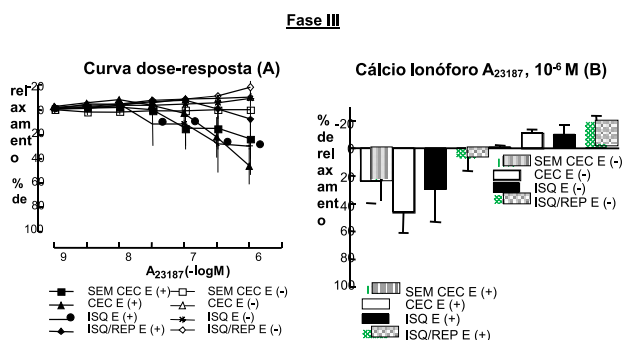


Fig. 9 - Fase III (Krebs com magnésio restaurado): A - Curvas dose-respostas ao cálcio ionóforo (A_{23187}) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$) - Fase I (Krebs com magnésio). B - Efeitos da dose $10^{-6} M$ de cálcio ionóforo (A_{23187}) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$) - Fase I (Krebs com magnésio). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Relaxamento independente do endotélio - Nitroprussiato de sódio (NPS)

A adição do agonista em doses crescentes proporcionou relaxamentos progressivamente maiores aos segmentos

coronarianos providos e desprovidos de endotélio.

Análise dos grupos por fases

Fase I (Krebs com magnésio) - Os anéis com e sem endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e $10^{-4} M$. As curvas dose-respostas exibiram relaxamentos dos anéis em todos os grupos (Figura 10).

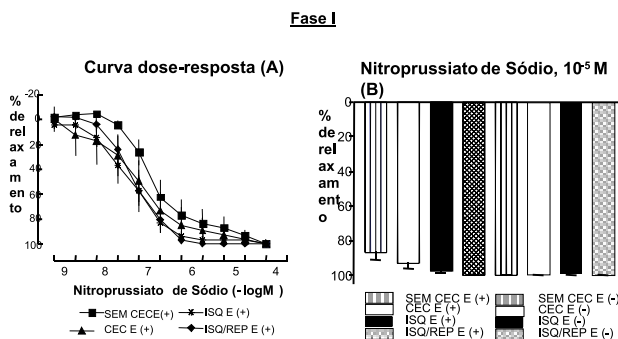


Fig. 10 - Fase I (Krebs com magnésio): A - Curvas dose-respostas ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$); B - Efeitos da dose $10^{-6} M$ de nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF_2a ($2 \times 10^{-6} M$), na presença de indometacina ($10^{-5} M$). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias \pm erros-padrão). (n = 6).

Fase II (Krebs sem magnésio) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10^{-9} e $3,7 M$. As curvas dose-respostas exibiram relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Para as doses subsequentes, 10^{-6} e $3,6 M$, o grupo ISQ/REP mostrou-se estatisticamente diferente dos demais, que não mostraram diferenças entre si. As curvas dose-respostas exibiram um maior relaxamento no grupo ISQ/REP. Para a dose $10^{-5} M$ o grupo SEM CEC mostrou-se estatisticamente diferente dos demais, que não mostraram diferenças entre si. As curvas dose-respostas exibiram menor relaxamento no grupo SEM CEC. Para a dose $3,5 M$ o grupo ISQ/REP novamente mostrou-se diferente dos demais, que não mostraram diferenças entre si. As curvas dose-respostas exibiram maior relaxamento no grupo ISQ/REP. Para última dose, $10^{-4} M$, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, embora as curvas dose-respostas tenham mostrado relaxamentos dos anéis nos quatro grupos em questão. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não

mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10-9 a 3,8 M. As curvas dose-respostas mostraram algum grau de relaxamento dos anéis. Para as doses subseqüentes, 10-7 a 10-5 M, o grupo CEC mostrou-se estatisticamente diferente dos demais, que não mostraram diferenças entre si. As curvas dose-respostas exibiram menor relaxamento no grupo CEC. Para as últimas doses, 3,5 e 10-4 M, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, embora as curvas dose-respostas tenham mostrado relaxamentos dos anéis em todos os grupos (Figura 11).

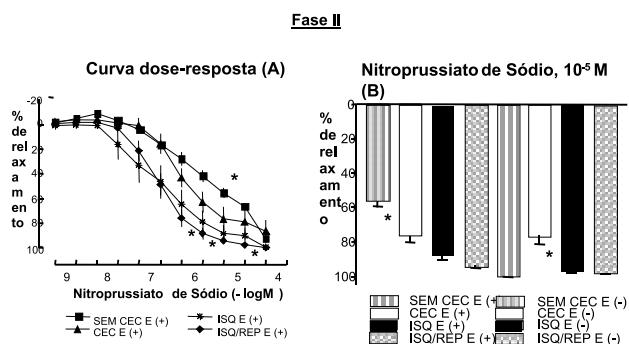


Fig. 11 - Fase II (Krebs sem magnésio): A - Curvas dose-respostas ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M); B - Efeitos da dose 10⁻⁶ M de nitroprussiato de sódio (NPS) de em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M). (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias ± erros-padrão). (n = 6).

Fase III (Krebs com magnésio - restauração) - Os anéis com endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes compreendidas entre 10-9 e 10-4 M. As curvas dose-respostas exibiram relaxamentos dos anéis em todos os grupos. Os anéis sem endotélio dos quatro grupos não mostraram relaxamentos estatisticamente diferentes entre si quando consideradas doses crescentes 10-9 e 3,8 M. As curvas dose-respostas exibiram relaxamentos dos anéis, exceto no grupo CEC onde os anéis não relaxaram. Para as doses, 10-7 a 10-5 M, o grupo CEC mostrou-se estatisticamente diferente dos demais, que não mostraram diferenças entre si. As curvas dose-respostas exibiram menor relaxamento no grupo CEC. Para a dose 3,5 M os grupos CEC e ISQ mostraram-se estatisticamente diferentes dos grupos SEM CEC e ISQ/REP, que não mostraram diferenças entre si. As curvas dose-respostas exibiram menores relaxamentos nos grupos CEC e ISQ. Para a dose 10-4 M não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, embora as curvas

dose-respostas tenham mostrado relaxamentos dos anéis em todos os grupos (Figura 12).

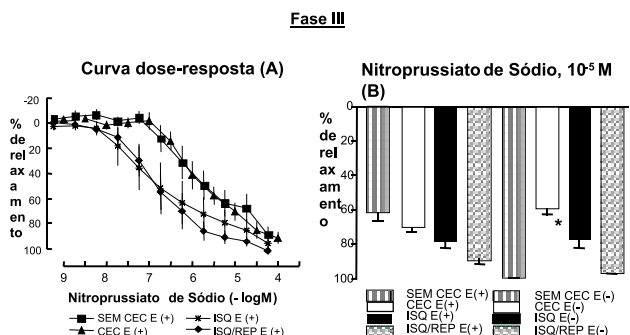


Fig. 12 - Fase III (Krebs com magnésio restaurado): A - Curvas dose-respostas ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M); B - Efeitos da dose 10⁻⁶ M de nitroprussiato de sódio (NPS) de em anéis de artérias coronárias caninas, contraídas com PGF₂α (2 x 10⁶ M), na presença de indometacina (10⁻⁵ M).. (SEM CEC = grupo controle, CEC = grupo de animais submetidos a 110 min de circulação extracorpórea, ISQ = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia, ISQ/REP = grupo de animais submetidos a 45 min de isquemia e 60 min de reperusão, E (+) = anéis com endotélio, E (-) = anéis sem endotélio. Valores em porcentagem de relaxamento sob a forma de médias ± erros-padrão). (n = 6).

COMENTÁRIOS

Recentes descobertas no campo da biologia vascular tem levado à expansão do entendimento da patogênese de muitos fenômenos observados em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca ou procedimentos cardiológicos intervencionistas. Em particular, o endotélio dos vasos tem emergido como foco central de muitos eventos biológicos que afetam a evolução de praticamente todos os pacientes submetidos a intervenções cardíacas. No estudo da célula endotelial fica evidente sua susceptibilidade a agentes agressores capazes de produzir lesão celular e o papel crucial da agressão na gênese de distúrbios comuns às práticas cardiológicas e cirúrgicas modernas, tais como coagulopatia, resposta inflamatória sistêmica à circulação extracorpórea e lesão de isquemia/reperusão⁽⁹⁾.

Lesão de isquemia/reperusão é o termo usado para descrever alterações funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. Tal lesão produz dano de intensidade variável ao endotélio coronariano sendo a reperusão o principal agente agressor^(2,10-13). Este tipo de lesão acarreta disfunção endotelial e afeta drasticamente a liberação basal e estimulada de NO, resultando em mudanças que propiciam aderência leucocitária, migração celular transendotelial, coagulação e aumento do tono vascular. No campo da cirurgia cardíaca observam-se períodos de isquemia/

reperusão durante o curso de operações rotineiramente realizadas. O pinçamento eletivo da aorta, iniciando o tempo cirúrgico principal, e o posterior despinçamento ao término deste representam o binômio isquemia/reperusão carregando consigo o potencial de produzir lesão de intensidade variável ao endotélio coronariano.

Os achados básicos desta investigação foram: 1) A presença de magnésio no perfusato pareceu atenuar a disfunção endotelial causada por isquemia global seguida de reperusão; 2) A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) esteve associada ao maior relaxamento em resposta aos agonistas da produção de NO; 3) A remoção de magnésio do banho orgânico (fase II) esteve associada a redução na intensidade do relaxamento em resposta aos agonistas da produção de NO; 4) A restauração de magnésio ao banho orgânico (fase III) permitiu a recuperação do relaxamento observado na fase I apenas em resposta a estimulação direta das G-proteínas. Para os demais agonistas da produção de NO a restauração esteve associada à redução adicional na intensidade do relaxamento; 5) A função da musculatura lisa pareceu receber alguma influência da magnesemia do banho orgânico.

Estudo da fase dependente de receptor de membrana

A acetilcolina causa relaxamento dependente do endotélio por liberação de NO através de estimulação de receptores muscarínicos. Sua adição em doses crescentes de 10-9 a 10-4 M permitiu observar um comportamento uniforme quando analisados anéis com e sem endotélio. Independente da presença do íon magnésio no banho orgânico os anéis sem endotélio não mostraram relaxamento, chegando em algumas situações a apresentar contração. Todavia doses crescentes do agonista proporcionaram relaxamentos aos segmentos coronarianos providos de endotélio.

Anéis com endotélio exibiram expressivo relaxamento a partir das doses iniciais da acetilcolina. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a maior intensidade do relaxamento. A comparação entre os grupos nesta fase não evidenciou diferença entre eles. A igualdade entre os grupos controle, extracorpórea sem pinçamento aórtico e isquemia, ratificaram estudos que revelam discreto dano endotelial associado a isquemia como fenômeno isolado^(2,10-12). No grupo submetido à isquemia seguida de reperusão constatou-se padrão de curvas semelhante aos demais, exibindo expressivo relaxamento. Este achado está em desacordo com estudos prévios que mostraram um déficit de relaxamento associado a este grupo^(1,2). Todavia, a circulação extracorpórea, a isquemia e, principalmente, a isquemia seguida de reperusão, não atuou como variáveis de diferença entre grupos, de tal sorte que os anéis exibiram comportamento semelhante àquele do grupo controle. Tais fatos chamaram atenção sobre a possibilidade de concentrações fisiológicas de magnésio, como as contidas na solução de Krebs, que compunha o perfusato, dos animais,

atenuarem os efeitos deletérios da reperusão.

A ausência de magnésio no banho orgânico (fase II), associou-se a discreto retardo para início do relaxamento e importante diminuição na magnitude do fenômeno, confirmando a importância do magnésio na integridade funcional do endotélio em coronárias isoladas de cão^(7,8,14).

Assim, a deficiência de magnésio isoladamente determina déficit de produção de NO conforme observado nesta fase do experimento. Não se observou, novamente, diferença entre os grupos. A semelhança de comportamento do grupo isquemia/reperusão em relação aos demais evidenciou o benefício da presença de magnésio no momento da reperusão. Assim, ainda que a magnitude do fenômeno de relaxamento esteja comprometida pela ausência de magnésio no banho orgânico não existe prejuízo adicional relacionado ao grupo isquemia/reperusão uma vez que a reperusão ocorreu na presença de magnésio. Tais fatos foram observados clinicamente e justificam, pelo menos em parte, as diferenças entre os estudos LIMIT 2 e ISIS 4^(15,16), duas investigações que incluíram um grande número de pacientes. Estes dois estudos analisaram a influência da infusão de magnésio na morbi-mortalidade associada ao infarto agudo do miocárdio. As discordâncias nos achados de ambos os estudos parecem estar relacionadas ao momento da infusão do magnésio, que no LIMIT 2 ocorreu antes da reperusão, e parece explicar a superioridade do efeito do magnésio em relação ao observado no estudo ISIS 4, onde não houve esta preocupação^(3,15-18).

Na restauração do magnésio ao banho orgânico (fase III), não se observaram diferenças entre os grupos. De forma geral existe um discreto incremento no retardo para expressão do relaxamento além de atenuação adicional na intensidade do fenômeno.

Todavia tais achados não diferiram estatisticamente da fase II, quando o magnésio estava ausente. Tais achados atestaram a ineficiência da reposição do magnésio, estando discordantes daqueles observados por ALTURA & ALTURA (1987) (7) e PEARSON et al. (1998) (8). A explicação para estas discordâncias necessitaria de maiores investigações.

Anéis sem endotélio exibiram contração particularmente a partir de doses intermediárias da acetilcolina. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a discreta contração dos anéis. A comparação entre os grupos nesta fase não evidenciou diferenças entre eles. A ausência de magnésio no banho (fase II), não esteve associada à mudança na resposta dos anéis sendo novamente observada igualdade entre os grupos. A restauração de magnésio ao banho (fase III), associou-se a incremento contrátil, quando comparado à fase I, entretanto a igualdade entre os grupos foi mantida. Isto refletiu a resposta vascular à estimulação pela acetilcolina e a atuação do magnésio diretamente na musculatura lisa sem mediação endotelial,

ratificando os achados de que a isquemia e a isquemia seguida de reperusão não interferem na função muscular do vaso ^(1,2,19-21).

Estudo da transdução do sinal

O magnésio é um cofator na modificação conformacional de uma das subunidades da G-proteína, sendo essencial na sua ativação. Esta família de proteínas atua mediando a relação entre os receptores de membrana e o citoplasma da célula endotelial, para a síntese de NO ⁽²²⁻²⁴⁾.

O Fluoreto de Sódio (NaF) causa relaxamento dependente do endotélio por

estimulação direta de G-proteínas, responsáveis pela transdução do sinal dos receptores para os processos intracelulares ^(20,25-29). Sua adição em doses crescentes de 0,5 a 9,5 mM permitiu observar um comportamento uniforme quando analisados anéis com e sem endotélio. Independente da presença de magnésio no banho orgânico anéis sem endotélio não mostraram relaxamento, chegando em algumas situações a apresentar contração. Todavia, doses crescentes do agonista proporcionaram relaxamentos aos segmentos coronarianos providos de endotélio. Assim, a presença do endotélio foi determinante para o fenômeno do relaxamento.

Anéis com endotélio exibiram expressivo relaxamento particularmente associado a maior dose de fluoreto de sódio. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a maior intensidade deste fenômeno. A comparação entre os grupos nesta fase não evidenciou diferença entre eles. A igualdade entre os grupos exibindo comportamento semelhante ao controle ratificou uma vez mais discreto dano endotelial associado à isquemia como fenômeno isolado ^(2,10-13). Além disso, chamou a atenção, principalmente, sobre a possibilidade de concentrações fisiológicas de magnésio, como as contidas na solução de Krebs do perfusato, atenuarem os efeitos deletérios da reperusão.

A ausência de magnésio no banho orgânico (fase II), associou-se a importante diminuição na magnitude do relaxamento, poupando, entretanto, o grupo isquemia. A deficiência de magnésio "per si" determina déficit de produção de NO por disfunção das G-proteínas, justificando o comportamento da maioria dos grupos nesta fase ^(8,14). Novamente, explicou-se a semelhança de comportamento do grupo isquemia/reperusão em relação aos demais, particularmente ao controle, pela presença do magnésio no momento da reperusão. Desta forma apesar da magnitude do fenômeno de relaxamento estar comprometida pela ausência de magnésio no banho orgânico não existiu prejuízo adicional relacionado ao grupo isquemia/reperusão, uma vez que a reperusão ocorreu na presença de magnésio. Isto corrobora a importância de níveis adequados de magnésio no momento da reperusão ^(3,30-33).

Permanece ainda obscura a fisiopatologia associada à

diferença de comportamento do grupo isquemia em resposta a estimulação pelo fluoreto de sódio. Tal achado parece ser especificamente ligado ao comportamento das G-proteínas uma vez que tal resposta não foi observada no grupo isquemia em resposta a ação dos demais agonistas. A isquemia, de alguma forma, se contrapôs à disfunção endotelial causada pela ausência de magnésio no banho orgânico e propiciou aos anéis relaxamento semelhante àquele observado na presença de magnésio no banho. Sabe-se que ao nível da musculatura cardíaca existe aumento na concentração do magnésio livre intracelular durante a isquemia como consequência da redução de sua incorporação para formação de ATP⁽³⁴⁾ e que na reperusão ele é reincorporado produzindo um efeito cascata com redução importante do magnésio intracelular⁽⁵⁾. Semelhante comportamento poderia estar presente na célula endotelial justificando tais achados. Ainda assim, permaneceria o questionamento a respeito de tal fato não ser observado na atuação dos demais agonistas, particularmente, a acetilcolina que estuda um passo anterior ao do fluoreto na cascata de liberação do NO.

Na restauração do magnésio ao banho orgânico (fase III) não se observaram diferenças entre os grupos. A produção de NO e o conseqüente relaxamento secundário à estimulação direta das G-proteínas pelo fluoreto de sódio, pareceram ser positivamente afetados pela restauração do magnésio ao banho orgânico com reaquisição da magnitude observada originalmente na fase I, concordando com achados anteriores (PEARSON et al., 1998)⁽⁸⁾.

A análise da fase III em resposta à estimulação pela acetilcolina revelou que a intensidade do relaxamento secundário a estimulação de receptores de membrana permanecia comprometida a despeito da restauração do magnésio ao banho orgânico. Assim, a diferença observada em resposta à estimulação de receptores de membrana e à estimulação direta das G-proteínas chamou atenção para possibilidade de prejuízo da interação entre receptor e G-proteína na ausência de magnésio, não reparada por sua restauração ao banho orgânico. Resta saber se as adições de magnésio em doses superiores àquelas observadas na composição do banho poderiam reverter tal prejuízo.

Anéis sem endotélio exibiram contração particularmente relacionada à maior dose de fluoreto de sódio. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a discreta contração dos anéis. A comparação entre os grupos nesta fase não evidenciou diferença entre eles. A ausência de magnésio no banho, fase II, não esteve associada à mudança na resposta dos anéis sendo novamente observada igualdade entre os grupos. A restauração de magnésio ao banho, fase III, associou-se a incremento contrátil, quando comparado à fase I, todavia a igualdade entre os grupos foi mantida. Isto refletiu a resposta vascular a estimulação pelo fluoreto de sódio e a atuação do magnésio diretamente na musculatura lisa sem mediação endotelial,

ratificando os achados de que a isquemia e a isquemia seguida de reperusão não interferem na função muscular do vaso ^(1,2, 19-21).

Estudo da fase independente de receptor

O ionóforo do cálcio (A_{23187}) é um agonista farmacológico que produz relaxamento dependente do endotélio e independente dos processos de membrana - receptor e transdução do sinal ^(35,36). Sua adição em doses crescentes de 10-9 a 10-6 M permitiu observar que, independente da presença do magnésio no banho, anéis com endotélio exibiram relaxamento enquanto aqueles sem endotélio não exibiram tal resposta chegando, em algumas situações, a apresentar contração. Assim, a presença de endotélio foi determinante para o fenômeno do relaxamento.

Anéis com endotélio exibiram expressivo relaxamento a partir das doses iniciais do agonista. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a maior intensidade do relaxamento. O presente trabalho ratificou a semelhança entre os grupos na resposta ao ionóforo do cálcio (A_{23187}), uma vez que o binômio isquemia-reperusão não afeta o transporte e a liberação dos estoques intracelulares de cálcio, estando mantida a capacidade da célula endotelial produzir NO por estimulação independente dos fenômenos de membrana ^(1,2, 19-21).

Chama atenção certa tendência de comportamento diferente do grupo isquemia/reperusão. Neste grupo observou-se o início e a manutenção do relaxamento com discreto retardo, entretanto não existiu significância estatística.

A ausência de magnésio no banho orgânico (fase II), associou-se a discreto retardo para início do relaxamento e importante diminuição na magnitude do fenômeno. Tal fato não foi observado por PEARSON et al. (1998) ⁽⁸⁾ que referem independência dos níveis de magnésio para a magnitude do relaxamento secundário a estimulação pelo ionóforo do cálcio. De acordo com o autor, a deficiência de magnésio não determina déficit da produção de NO secundária a estimulação direta dos mecanismos intracelulares, uma vez que compromete apenas a produção dependente da transdução do sinal em nível de membrana. Tais achados ainda necessitam uma melhor explicação. Não foram observadas diferenças entre os grupos. A semelhança de comportamento do grupo isquemia/reperusão em relação aos demais era esperada uma vez que tal fenômeno, com fisiopatologia semelhante àquela da hipomagnesemia, não compromete a habilidade da célula em produzir NO ^(1,2, 19-21).

Na restauração do magnésio ao banho orgânico (fase III) não se observaram diferenças entre os grupos. De forma geral existiu discreto incremento no retardo para expressão do relaxamento, além de atenuação adicional na intensidade do fenômeno, porém tais achados em sua maior parte não diferiram estatisticamente da fase II, quando o magnésio estava ausente. Isto atestou a ineficiência da reposição e

também aguarda posterior averiguação.

Anéis sem endotélio exibiram comportamento semelhante, particularmente relacionado as maiores doses de ionóforo do cálcio. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a discreta atenuação da contração dos anéis. A comparação entre os grupos nesta fase não evidenciou diferença entre eles. A ausência de magnésio no banho, fase II, não esteve associada à mudança na resposta dos anéis sendo novamente observada igualdade entre os grupos. A restauração de magnésio ao banho, fase III, associou-se a incremento contrátil, quando comparado às fases I e II, mas a igualdade entre os grupos foi mantida. Isto refletiu a resposta vascular à estimulação pelo ionóforo do cálcio bem como a atuação do magnésio diretamente na musculatura lisa, sem mediação endotelial, ratificando os achados de que a isquemia e a isquemia seguida de reperusão não interferem na função muscular do vaso ^(1,2, 19-21).

Estudo da função da musculatura lisa

O Nitroprussiato de Sódio (NPS) causa relaxamento independente do endotélio por estímulo direto, via GMPc, da musculatura lisa vascular. Sua adição em doses crescentes de 10-9 a 10-4 M permitiu observar comportamento uniforme em todos os anéis. Independente da presença do endotélio ou do magnésio no banho orgânico a adição de doses crescentes do agonista proporcionou relaxamentos aos segmentos coronarianos. Tais achados ratificaram a independência de mediação endotelial para o efeito de relaxamento exercido pelo nitroprussiato de sódio.

Anéis com endotélio exibiram expressivo relaxamento a partir das doses iniciais do agonista. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a intenso relaxamento. O presente trabalho ratificou a semelhança entre os grupos na resposta ao nitroprussiato, uma vez que o binômio isquemia-reperusão não afeta o relaxamento vascular independente do endotélio ^(1,2, 19-21). O conhecimento que o nitroprussiato atua na musculatura lisa, sem mediação endotelial, e os presentes achados chamaram atenção para possibilidade do magnésio ter potencializado a atividade do agonista em nível muscular.

A ausência de magnésio no banho orgânico, fase II, associou-se a discreto retardo para início do relaxamento e diminuição na magnitude do fenômeno. As diferenças encontradas na intensidade do relaxamento entre as fases I (com magnésio no banho) e II (sem magnésio no banho) refletiram a importância da relação entre o magnésio e o cálcio diretamente na musculatura lisa vascular ^(37,38). Experimentos animais têm mostrado que a redução do magnésio extracelular induz contrações vasculares dependentes de cálcio incluindo constrição dos vasos sanguíneos coronarianos com conseqüente queda do fluxo sanguíneo coronário, débito cardíaco, volume sistólico ventricular esquerdo e aumento na produção de lactato ⁽³⁹⁾.

Permanece ainda a dúvida com respeito às diferenças encontradas entre os grupos em resposta à estimulação pelo nitroprussiato de sódio na ausência de magnésio no banho orgânico (fase II). Especula-se que estas diferenças possam estar associadas a diferentes níveis de antagonismo aos íons cálcio diretamente na musculatura lisa dos vasos^(40, 41), uma vez que se sabe não haver comprometimento da mesma pela isquemia seguida de reperusão em tempos compatíveis com a duração média de atos operatórios.

A restauração do magnésio ao banho orgânico (fase III) associou-se a incremento no retardo para início do relaxamento. Contudo parece ter propiciado a reatuação da igualdade entre os grupos a despeito da menor intensidade do relaxamento quando comparado àquele da fase I. A explicação para tais achados parece depender da interação entre magnésio e cálcio na musculatura lisa do vaso independente do endotélio.

Anéis sem endotélio exibiram comportamento semelhante àqueles com endotélio para as mesmas doses de nitroprussiato de sódio. A presença de magnésio no banho orgânico (fase I) associou-se a intenso relaxamento. A semelhança entre os grupos na resposta a este agonista, ratificou uma vez mais que o relaxamento vascular independente do endotélio não é afetado pelo binômio isquemia-reperusão^(1,2,19-21). A ausência de magnésio no banho (fase II) e a sua restauração (fase III) estiveram relacionadas a mudanças na resposta dos anéis quando da estimulação pelo nitroprussiato de sódio. Tais diferenças poderiam ser justificadas pelos diferentes níveis de interação entre magnésio e cálcio na musculatura lisa vascular^(40, 41), não estando associadas à fisiopatologia da isquemia/reperusão.

Implicações clínicas

A disfunção endotelial tem caráter evolutivo e insidioso levando a comprometimento relativamente tardio da função ventricular após cirurgias tecnicamente perfeitas onde no momento do despinçamento o coração retomou seus batimentos e, aparentemente, não houve comprometimento muscular^(42,43). MIZUNO et al.⁽⁴³⁾ chamam atenção para medidas eficientes em permitir a recuperação da função contrátil, mas ineficientes em prevenir a disfunção endotelial e advogam a adoção de medidas protetoras do endotélio na tentativa de prevenir os efeitos deletérios do binômio isquemia/reperusão. DICKENS et al.⁽¹⁹⁹²⁾⁽³¹⁾ mostraram que a deficiência de magnésio nas células endoteliais tornou-as mais vulneráveis aos danos provocados pelos radicais livres de oxigênio quando comparadas àquelas ricas em magnésio e que o citado dano inicia-se após curto período de exposição a estes radicais. KRAMER et al.⁽¹⁹⁹⁴⁾⁽³²⁾ trabalhando com corações isolados de ratos, demonstraram que após isquemia/reperusão a deficiência de magnésio esteve associada a maior nível de produção de radicais livres e menor recuperação da função cardíaca, evidenciando a influência pró-oxidante de baixas concentrações de magnésio.

HERZOG et al.⁽¹⁹⁹⁴⁾⁽³⁾ mostraram que a deficiência de magnésio e a conseqüente vulnerabilidade do miocárdio ao estresse oxidativo da reperusão estavam associados ao prolongamento do tempo de disfunção contrátil que ocorria após restauração do fluxo coronariano aos níveis normais (atordoamento miocárdico). Posteriormente, GARCIA et al.⁽¹⁹⁹⁸⁾⁽³³⁾ integraram tais conhecimentos e mostraram que o importante papel do magnésio na isquemia/reperusão se deve predominantemente a inibição direta na produção de radicais livres durante a reperusão, atenuando o estresse oxidativo total, e que tal efeito parecia ser mais expressivo que sua atividade como removedor dos radicais já formados. Estes últimos autores sugerem uma avaliação dose-resposta a diferentes concentrações de magnésio, uma vez que analisaram apenas a dose preconizada pelo estudo LIMIT 2⁽¹⁵⁾.

A presente investigação, concordante com estes estudos ratificou a eficiência do magnésio, mesmo em doses fisiológicas, como agente antioxidante e inibidor da produção de radicais livres de oxigênio, responsáveis pela lesão de G-proteínas. Isto explica, pelo menos em parte, os efeitos benéficos de sua presença no momento da reperusão, fato que permanecia ainda obscuro quando considerados seus efeitos apenas por ação direta nas musculaturas cardíaca e lisa vascular. Assim, justifica-se sua indicação precoce na vigência do binômio isquemia/reperusão comum na prática cardiológica moderna incluindo recanalização de artérias após trombólise, angioplastias e particularmente despinçamento aórtico^(4-6,18,44).

Os conhecimentos adquiridos com o presente trabalho alertam para necessidade de prevenção da hipomagnesemia na presença de isquemia seguida de reperusão. Ressalte-se, o uso de diuréticos, o estresse, as restrições dietéticas e a administração pré-operatória de catecolaminas contribuem significativamente para queda dos níveis circulantes de magnésio nos pacientes cirúrgicos^(6,44,45). Adicionalmente a composição do perfusato por soluções que não possuem magnésio, como a solução de Ringer, propicia queda adicional na concentração sérica de magnésio induzida pela hemodiluição^(4,6,44,47). Os fatores acima descritos são relativamente freqüentes e exacerbam a disfunção endotelial causada pela isquemia/reperusão. Torna-se ainda mais preocupante a constatação de que algum grau de disfunção endotelial já está presente antes mesmo do início da cirurgia, uma vez que existe comprometimento funcional das G-proteínas associado à fisiopatologia da hipertensão arterial⁽⁴⁸⁾, da aterosclerose^(49,50-52) e do diabetes⁽⁵³⁻⁵⁵⁾, doenças de alta prevalência nos candidatos a operações cardíacas⁽²⁴⁾.

Finalizando, o presente estudo chama atenção para influência benéfica do magnésio atenuando os efeitos danosos da disfunção endotelial coronariana causada por isquemia global seguida de reperusão e sugere fortemente que a administração do magnésio antes da reperusão possa ser uma manobra terapêutica útil. Os exatos mecanismos

pelos quais o magnésio tem efeito benéfico permanecem ainda especulativos, mas parecem estar associados à inibição na produção de radicais livres e suas conseqüências sobre as G-proteínas e, em última análise, sobre a produção de NO. Tais achados oferecem um subsídio adicional em defesa da administração do magnésio no per-operatório de cirurgias cardíacas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pearson PJ, Lin PJ, Schaff HV - Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery: a possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103: 1147-54.
2. Evora PRB, Pearson PJ, Schaff HV - Impaired endothelium-dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. *Ann Thorac Surg* 1994; 57: 1550-6.
3. Herzog WR, Atar D, Mak IT, Alyono D, MacCord C, Weglicki WB - Magnesium deficiency prolongs myocardial stunning in an open-chest swine model. *Int J Cardiol* 1994; 47: 105-15.
4. Satur CMR, Anderson J R, Jennings A et al. - Magnesium flux caused by coronary artery bypass operation: three patterns of deficiency. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 1674-8.
5. Caspi J, Rudis E, Bar I, Safadi T, Saute M - Effects of magnesium on myocardial function after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1995; 59: 942-7.
6. Aziz S, Haigh WG, Van Norman GA, Kenny RJ, Kenny MA - Blood ionized magnesium concentrations during cardiopulmonary bypass and their correlation with other circulating cations. *J Card Surg* 1996; 11: 341-7.
7. Altura BT & Altura BM - Endothelium-dependent relaxation in coronary arteries requires magnesium ions. *Br J Pharmacol* 1987; 91: 449-51.
8. Pearson PJ, Evora PR, Seccombe JF, Schaff HV - Hypomagnesemia inhibits nitric oxide release from coronary endothelium: protective role of magnesium infusion after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: 967-72.
9. Verrier ED, Boyle Jr EM - Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 915-22.
10. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL - Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J* 1991; 5: 2029-34.
11. Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ et al. - Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992; 263: H1650-8.
12. Nakanishi K, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J, Lewis JC, McGee DS, Hammon Jr. JW - Coronary artery endothelial dysfunction after global ischemia, blood cardioplegia, and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 191-9.
13. Vinten-Johansen J, Sato H, Zhao ZQ - The role of nitric oxide and NO-donor agents in myocardial protection from surgical ischemic-reperfusion injury. *Int J Cardiol* 1995; 50: 73-81.
14. Gilman AG - G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 615-49.
15. Woods KL & Fletcher S - Long term outcome after intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: the second Leicester Intravenous Magnesium Intervention Trial (LIMIT-2). *Lancet* 1994; 343: 816-9.
16. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. ISIS-4: a randomized factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1995; 345: 669-85.
17. Christensen CW, Rieder MA, Silverstein EL, Gencheff NE - Magnesium sulfate reduces myocardial infarct size when administered before but not after coronary reperfusion in a canine model. *Circulation* 1995; 92: 2617-21.
18. Redwood SR, Bashir Y, Huang J, Leatham EW, Kaski JC, Camm AJ - Effect of magnesium sulphate in patients with unstable angina: a double blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur Heart J* 1997; 18: 1269-77.
19. Evora PRB et al. - Impaired endothelium-dependent relaxation to sodium fluoride following coronary reperfusion: "evidence for G-protein dysfunction". *Circulation* 1991; 84 (Suppl. 2): II 275.
20. Evora PRB, Pearson PJ, Schaff HV - Crystalloid cardioplegia and hypothermia do not impair endothelium-dependent relaxation or damage vascular smooth muscle of epicardial coronary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104: 1365-74.
21. Chang CH, Lin PJ, Chu Y, Lee YS - Impaired endothelium-dependent relaxation after cardiac global ischemia and reperfusion: role of warm blood cardioplegia. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 681-7.
22. Insel PA & Ransnäs LA - G-proteins and cardiovascular disease. *Circulation* 1988; 78: 1511-3.
23. Meiji JTA - Regulation of G-protein function: Implications for heart disease. *Mol Cell Biochem* 1996; 157: 31-8.
24. Evora PRB & Nobre F - O papel das G-proteínas na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. *Arq Bras Cardiol* 1999; 72: 209-29.
25. Sternweiss PC & Gilman AG - Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 4888-91.
26. Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M - Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma-phosphate of GTP. *EMBO J* 1987; 6: 2907-13.
27. Flavahan NA & Vanhoutte PM - G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels* 1990; 27: 218-29.

28. Flavahan NA & Vanhoutte PM - Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations evoked by fluoride. *Eur J Pharmacol* 1990; 178: 121-4.
29. Cushing DJ, Sabouni MH, Brown GL, Mustafa SJ - Fluoride produces endothelium-dependent relaxation and endothelium-independent contraction in coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 28-32.
30. Woods KL, Fletcher S, Roffe C, Haider Y - Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: results of the second Leicester Intravenous Magnesium Intervention Trial (LIMIT-2). *Lancet* 1992; 339: 1553-8.
31. Dickens BF, Weglicki WB, Li YS, Mak IT - Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Lett* 1992; 311: 187-91.
32. Kramer JH, Misik V, Weglicki WB - Magnesium-deficiency potentiates free radical production associated with postischemic injury to rat hearts: vitamin E affords protection. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 713-23.
33. Garcia LA, Dejong SC, Martin SM, Smith RS, Buettner GR, Kerber RE - Magnesium reduces free radicals in an in vivo coronary occlusion-reperfusion model. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 536-9.
34. Sommers KE, Ohkado A, Simplaceanu E, Koretsky AP, Ho C, del Nido PJ - The role of magnesium in postischemic cardiac dysfunction. *Surgery* 1992; 112: 159-65.
35. Zawadzki JV et al. - Comparison of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by A23187 and by acetylcholine. *Pharmacologist* 1980; 22: 271. (Abstract).
36. Singer HA & Peach MJ - Calcium-and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 1982; 4(suppl 2): 19-25.
37. Gold ME, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G, Ignarro LJ - Antagonistic modulatory roles of magnesium and calcium on release of endothelium-derived relaxing factor and smooth muscle tone. *Circ Res* 1990; 66: 355-66.
38. Gelband CH, Ishikawa T, Post JM, Keef KD, Hume JR - Intracellular divalent cations block smooth muscle K⁺ channels. *Circ Res* 1993; 73: 24-34.
39. Weglicki WB, Bloom S, Cassidy MM, Freedman AM, Atrakchi AH, Dickens BF - Antioxidants and the cardiomyopathy of Mg-deficiency. *Am J Cardiovasc Pathol* 1992; 4: 210-5.
40. Iseri LT & French JH - Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J* 1984; 108: 188-93.
41. Karaki H - Magnesium as a modifier of smooth muscle contractility. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1989; 5: 77-97.
42. Tsao PS & Lefer AM - Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic -and hypoxic-perfused rat hearts. *Am J Physiol* 1990; 259: H1660-6.
43. Mizuno A, Baretti R, Buckberg GD et al. - Endothelial stunning and myocyte recovery after reperfusion of jeopardized muscle: a role of L-arginine blood cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113: 379-89.
44. Harris MN, Crowther A, Jupp RA, Aps C - Magnesium and coronary revascularization. *Br J Anaesth* 1988; 60: 779-83.
45. Holden MP, Ionescu MI, Wooler GH - Magnesium in patients undergoing open heart surgery. *Thorax* 1972; 27: 212-8.
46. Whang R & Ryder KW - Frequency of hypomagnesemia and hypermagnesemia: requested versus routine. *JAMA* 1990; 263: 3063-4.
47. Westhorpe RN, Varghese Z, Petrie A, Wills MR, Lumley J - Changes in ionized calcium and other plasma constituents associated with cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth* 1978; 50: 951-7.
48. Kanagy NL, Charpie JR, Webb RC - Nitric oxide regulation of ADP-ribosylation of G proteins in hypertension. *Med Hypotheses* 1995; 44: 159-64.
49. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM - Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83: 652-60.
50. Quyyumi AA - Nitric oxide activity in human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1994; 90(4 Pt 2): I 121. (Abstract).
51. Harrison DG - Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 1994; 89 (suppl 1): 87-102.
52. Shimokawa H, Nakaike R, Takeshita A - Significance of defective endothelial signal transduction in impaired endothelium-dependent relaxation in atherosclerosis. *Gerontology* 1995; 41 (suppl 1): 28-33.
53. Kowluru A, Kowluru RA, Yamazaki A - Functional alterations of G-proteins in diabetic rat retina: a possible explanation for the early visual abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35: 624-31.
54. Williams SB - Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in non-insulin-dependent diabetes. *Circulation* 1994; 90(4 Pt 2): I 513. (Abstract).
55. Sjöholm A - Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C - dependent mechanisms. *Diabetes* 1997; 46: 1141-79.