

## Métodos Experimentais no Estudo da Função Endotelial

Paulo Roberto B. Evora, Paul J. Pearson, John F. Secombe, Berent Discigil, Hartzell V. Schaff

Ribeirão Preto, SP - Rochester - MN

Em 1980, Furchgott e Zawadzki<sup>1</sup> demonstraram que a acetilcolina só age como vasodilatador na presença do endotélio, desencadeando uma era de intensos trabalhos na década de 80, a qual estabeleceu o endotélio como a sede do desencadeamento da maioria das doenças cardiovasculares. Postulou-se, então, a existência de um fator relaxante derivado do endotélio, que em 1982 foi denominado de *endothelium-derived relaxing factor* - EDRF. Nesses trabalhos pioneiros determinou-se que o EDRF não era um prostanóide, pelo fato de que a indometacina, um bloqueador da via ciclooxigenase, não inibia o relaxamento dependente do endotélio produzido pela acetilcolina e por uma série de outros agonistas, tais como: ADP, serotonina, histamina e muitos outros. Determinou-se, ainda, que o EDRF era difusível e dependente de íons cálcio. Uma grande contribuição do ponto de vista científico ocorreu em 1985, quando Cocks e Angus<sup>2</sup> foram capazes de cultivar células endoteliais e instalá-las em um circuito de perfusão, permitindo a obtenção de grandes quantidades de EDRF para manipulação bioquímica e farmacológica. Descobriu-se, então, que o relaxamento dependente do endotélio associava-se a uma elevação de GMP cíclico na musculatura lisa vascular, podendo ser inibido pelo azul de metileno (GMP cíclico) e pela hemoglobina (seqüestrador ou *scavenger* do EDRF). Com o acúmulo de evidências de que o EDRF tinha muitas das características dos nitrovasodiladores, Furchgott<sup>3</sup> e Ignarro e col<sup>4</sup> propuseram, independentemente, que o EDRF era o óxido nítrico (*nitric oxide* - NO). As pesquisas direcionaram-se, então, no sentido de se determinar como o endotélio produz o radical e culminaram com a proposição de Palmer e Moncada<sup>5,6</sup> que postularam ser a L-arginina a fonte de óxido nítrico sob a ação de uma enzima, a óxido nítrico sintetase.

A importância da presença do endotélio bem como o papel de nitrovasodilatador endógeno e antitrombótico do EDRF/NO encontram-se representados nas figuras 1 e 2.

Nesta revisão será apresentada, de maneira sucinta, uma variedade de técnicas empregadas no estudo da função endotelial. Serão descritos modelos fisiológicos que estudam a influência das células endoteliais ou seus produtos em tecidos biológicos, como, suspensão de plaquetas, célu-

las musculares lisas, segmentos de vasos sanguíneos e preparações isoladas de órgãos perfundidos. Usando estas preparações fisiológicas e bloqueadores seletivos, investigadores podem inferir sobre ações específicas da célula endote-

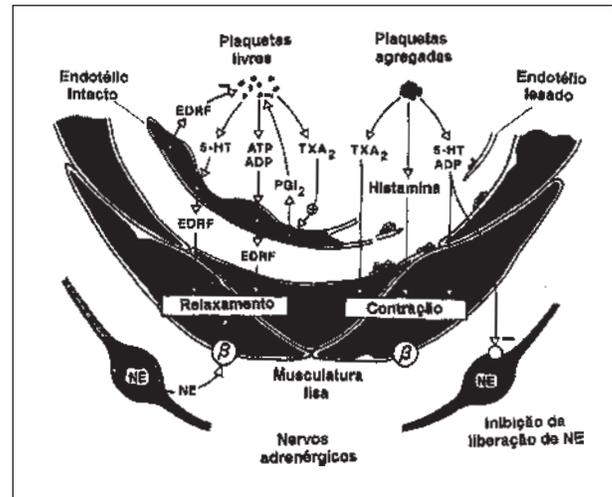


Fig. 1 - Ressalta-se o papel protetor vital do endotélio contra a trombose e o vasoespasmos por sua resposta a plaquetas agregadas. Com o endotélio intacto (esquerda), os produtos plaquetários liberam EDRF/NO e prostaciclina do endotélio, os quais induzem vasodilatação e agem, sinergicamente, na inibição da agregação e adesividade plaquetárias. Entretanto, se o endotélio é lesado ou disfuncionante (direita), ocorrem adesão e agregação plaquetárias e os fatores vasoativos plaquetários atuam diretamente na musculatura lisa vascular causando vasoconstrição. Os fatores plaquetários podem, ainda atingir as terminações nervosas adrenérgicas e inibir a vasodilatação mediada por receptores B<sub>2</sub>-adrenérgicos.

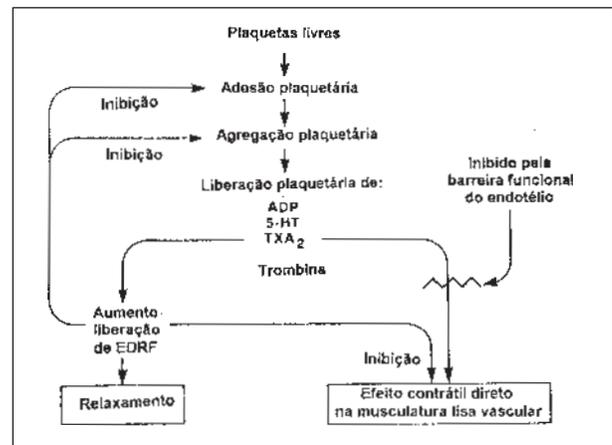


Fig. 2 - Interação entre plaquetas e o endotélio intacto. A agregação e a adesividade plaquetárias na artéria normal são inibidas pela liberação basal de EDRF/NO. Entretanto, se houver condições para a ocorrência da agregação e a adesividade plaquetárias, fatores liberados pelas plaquetas como o ADP e a serotonina (5-HT) atuam em receptores endoteliais para estimular a liberação de EDRF/NO. O EDRF/NO não só relaxa a musculatura lisa vascular (vasodilatação), mas, também inibe a adesividade e agregação plaquetárias. Relaxamento e vasodilatação podem aumentar o fluxo sanguíneo e colaborar para o bloqueio do processo trombótico.

Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Mayo Clinic and Foundation - Rochester, MN - Centro Especializado do Coração e Pulmão de Ribeirão Preto e Depto de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Correspondência: Paulo Roberto B. Evora - Rua Rui Barbosa, 455/140 - 14015-120 Ribeirão Preto, SP

Recebido para publicação em 23/10/95

Aceito em 7/2/96

lial. Ressalte-se um crescente avanço na tentativa de medir diretamente a produção de substâncias produzidas pelo endotélio. Recentes estudos têm desenvolvido *probes* de anticorpos monoclonais para enzimas que produzem estes fatores endoteliais e para RNAs mensageiros que codificam estas enzimas. Embora técnicas sofisticadas estejam sendo adaptadas para o estudo da função endotelial, Moncada tem, insistentemente, referido em seus artigos e palestras, que “em uma era de sofisticada tecnologia de pesquisa, o EDRF foi descrito utilizando-se a simples verificação de alterações de força isométrica”. Isto significa que as metodologias mais utilizadas para o estudo da função endotelial são simples, relativamente pouco custosas, e que podem ser “democraticamente” instaladas em qualquer centro de pesquisa que tenha interesse por estes estudos.

O objetivo deste texto é mostrar não só esta viabilidade a centros emergentes de pesquisa, mas também apresentar, a cardiologistas e outras especialistas médicos, as metodologias mais utilizadas no estudo da farmacologia do endotélio vascular. Muitas destas técnicas, vêm sendo adaptadas em laboratórios espalhados por todo o mundo, ficando muitas vezes difícil a determinação da sua autoria. Se a centenária preparação do coração isolado está associada ao nome de Oscar Langendorff, fica difícil, por exemplo, associar os banhos orgânicos (*organ chambers*) a um só pesquisador. Por outro lado, as pesquisas realizadas nas décadas de 80 e 90 têm demonstrado que, praticamente, todas as moléstias cardiovasculares estão associadas à disfunção do endotélio vascular. A doença coronariana obstrutiva é, sem dúvida alguma, um dos maiores desafios da ciência moderna, sendo associada à aterosclerose, vasoespasmo e trombose.

Os métodos de estudo da função endotelial foram e continuam sendo desenvolvidos para obtenção de respostas sobre questões referentes a seu papel fisiológico ou em doenças específicas, daí a importância do seu conhecimento.

### Determinação da funcionalidade endotelial

Em todos experimentos, a presença ou ausência de endotélio precisa ser confirmada pela determinação da resposta vascular a um agonista dependente do endotélio, como a acetilcolina ( $10^{-6}$  M). Os segmentos vasculares com endotélio pré-contráídos pelo cloreto de potássio apresentam rápido relaxamento, enquanto os vasos sem endotélio não o fazem. Esta simples estratégia constitui-se no padrão da determinação ou não da dependência endotelial dos fenômenos biológicos que regulam o tônus vascular. É essencial, portanto, que o endotélio de segmentos vasculares seja removido sem que haja comprometimento da função da musculatura lisa subjacente. Na rotina experimental antes de se iniciarem as curvas dose-respostas esta verificação é sempre realizada para a definição dos fenômenos biológicos dependentes e independentes do endotélio.

Em segmentos arteriais e venosos isolados esta remo-

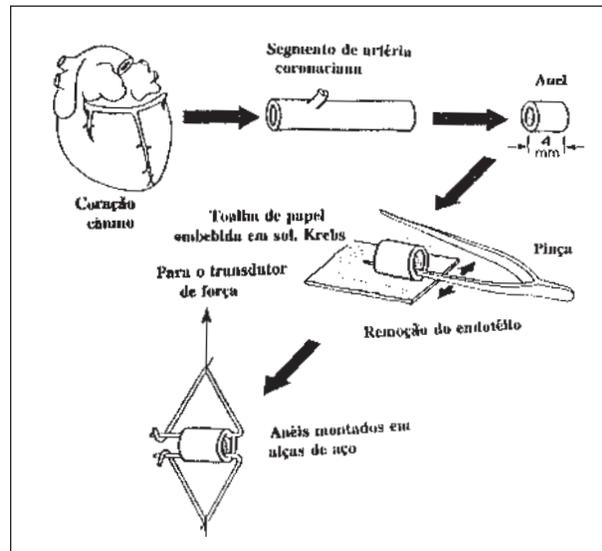


Fig. 3 - A remoção mecânica do endotélio de um segmento vascular pode ser obtida esfregando-se a sua luz com auxílio de uma pequena pinça. Este procedimento efetivamente remove o endotélio sem lesar a musculatura lisa.

ção pode ser feita escarificando a íntima vascular com auxílio de delicadas pinças (fig. 3). Estudos histológicos prévios demonstraram que este procedimento remove as células endoteliais, preservando a capacidade da musculatura lisa contrair ou relaxar<sup>7</sup>. Para o estudo de segmentos vasculares maiores, o endotélio pode ser removido com auxílio de um elemento de aço (por exemplo, uma corda de instrumento musical)<sup>8</sup>. Em animais vivos, esta remoção pode ser realizada com auxílio de cateteres-balões que, passados através de uma arteriotomia femoral, são avançados e puxados pelo menos três vezes<sup>9</sup>. A remoção do endotélio da microcirculação é melhor obtida por métodos químicos, perfundindo-se os vasos com colagenase, saponina<sup>10</sup>, solução CHAPS (3-((3-choladomipropyl) dimethyl amônio) 1-propanosulfonate)<sup>11</sup>, ou triton X (t-octylphenoxyethanol)<sup>12</sup>. Estes elementos removem o endotélio, efetivamente, sem afetar a reatividade vascular.

### Descrição geral do sistema envolvido na liberação do EDRF/NO, seus agonistas e bloqueadores

As alterações ao nível de receptores são estudadas por diversos agonistas, sendo muito utilizados a ACH como um neurotransmissor estimulador de receptores muscarínicos e o ADP como um produto plaquetário. Em relação à transdução do sinal entre receptores e os processos intracelulares, embora ainda não totalmente aceito como um marcador definitivo, inúmeros experimentos sugerem que o fluoreto de sódio produz relaxamento dependente do endotélio através de uma via sensível à toxina pertussis. A ferramenta para se estudar a via fosfatidilinositol é a fosfolipase C, ressaltando-se a sua especificidade, uma vez que as fosfolipases B e D não induzem vasodilatação dependente do endotélio. É possível que o sinergismo en-

tre o EDRF/NO e a prostaciclina ocorra através da via fosfatidil-inositol, merecendo destaque o ionóforo cálcico A23187 que, estimulando a liberação do cálcio do retículo endoplasmático celular, promove uma vasodilatação dependente do endotélio mostrando que a célula endotelial mantém a capacidade de produzir EDRF/NO (fig. 4). Para o estudo da função da musculatura lisa vascular utilizam-se os vasodilatadores independentes do endotélio: o isoproterenol (relaxamento via AMP cíclico) e o nitroprussiato de sódio (relaxamento via GMP cíclico).

Outros elementos importantes para o estudo farmacológico da função endotelial são os bloqueadores dos efeitos e da síntese do EDRF/NO. Entre eles, os mais importantes são: o azul de metileno (bloqueio ao nível do GMP cíclico); a hemoglobina (seqüestrador ou *scavenger* do EDRF/NO); e as formas nítrica (NG-nitro-L-arginina) e metilada (NG-monometil-L-arginina, o LNMMA) que são bloqueadores da óxido nítrico sintetase. Devem ser acrescentadas, ainda, a L-arginina e a D-arginina, utilizadas para se comprovar a especificidade da L-arginina. Como as formas metilada e nítrica da L-arginina bloqueiam a óxido

sintetase por competição, a adição de uma grande concentração de L-arginina reverte o bloqueio da enzima, o que não ocorre com a D-arginina<sup>13,14</sup>.

### Descrição do sistema de banhos orgânicos (*organ chambers*)

As *organ chambers* são construídas em vidro e constituem-se em uma dupla câmara por onde circula, constantemente, água a uma temperatura mantida a 37°C em circuito fechado, e um reservatório com um volume constante de 25ml, onde os anéis vasculares são suspensos e onde as drogas são adicionadas. Este reservatório é preenchido por uma solução de Krebs modificada e comunica-se a um sistema de aspiração a vácuo e a um sistema de aeração, que permite os estudos em situações de normóxia ou hipóxia. A solução de Krebs pode ser renovada sempre que o experimento exigir, combinando-se a aspiração com reintrodução de solução nova a qual fica contida em uma torre de vidro, que a semelhança das *organ chambers*, também é mantida a 37°C e com aeração contínua.

O segmento de anel vascular é suspenso entre alças de aço inoxidável, passando através de sua luz. Antes de se iniciar os experimentos farmacológicos, propriamente ditos, os vasos são submetidos ao seu ponto ótimo de estiramento-tensão, por meio de um sistema micrométrico, tendo como determinação, os vasos estirados progressivamente até que a sua contração ao potássio (20mM) seja máxima. Tensões ótimas típicas de vasos sanguíneos do cão são: veia safena, 2,5g; artéria coronária, 10-11g; artéria femoral, 12-15g; veia femoral, 1g. As tensões isométricas são registradas por um sistema de sensíveis transdutores de força (*Statham UC 2*) acoplados, individualmente, a cada anel vascular e ligados a um registrador de oito canais (*Gould*, Cleveland, Ohio) (fig. 5).

Os experimentos são realizados em um conjunto, em paralelo, de oito *organ chambers*. Para cada anel vascular com endotélio estuda-se um anel sem endotélio como controle. A ausência de endotélio é determinada pela ação da acetilcolina após contração do vaso, em geral, pelo potássio. Em seguida a um período de equilíbrio de 30 a 40min, os vasos podem ser contraídos e, após a obtenção da estabilidade desta contração, inicia-se a realização das curvas dose-respostas, adicionando-se ao banho orgânico os agonistas em concentrações molares crescentes, e os bloqueadores farmacológicos. Se o objetivo for estudar apenas as ações do EDRF/NO, excluindo-se a participação de elementos da via ciclo-oxigenase, após a obtenção do ponto de tensão-estiramento, os vasos são submetidos à ação da indometacina<sup>13-15</sup>. Quando a curva dose-resposta desloca-se para a direita, significa que há um comprometimento da liberação de EDRF/NO pelo endotélio. As conclusões destes estudos são, mais ou menos uniformes, no sentido de levarem à conclusão de que as alterações que desencadeiam a maioria das moléstias cardiovasculares.

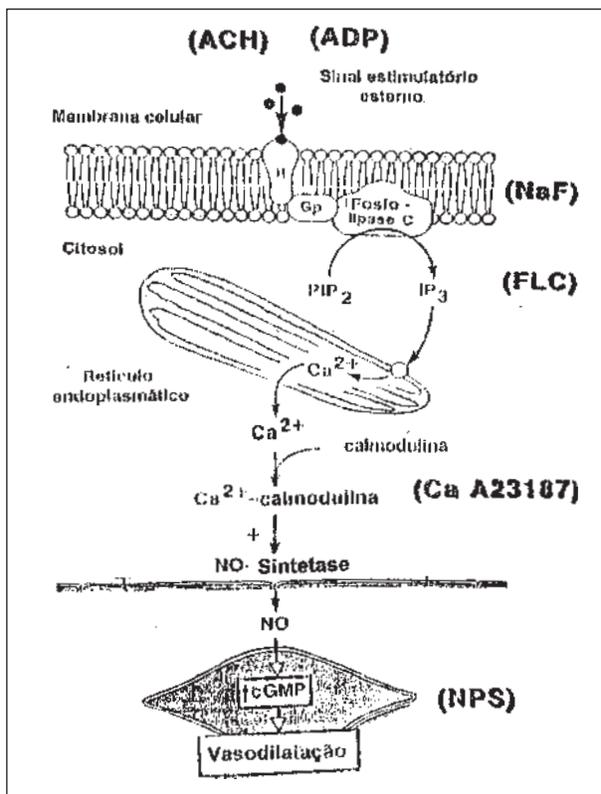
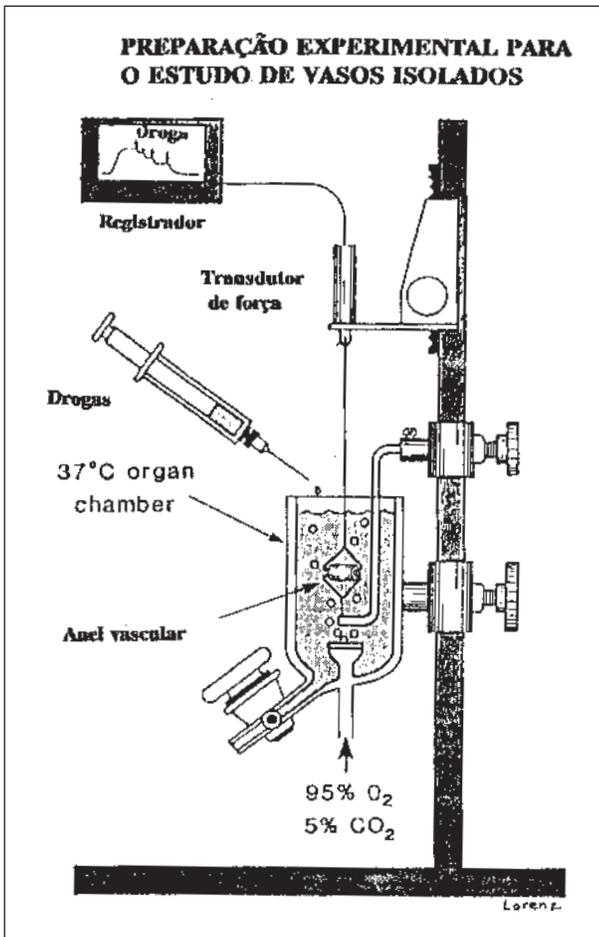


Fig. 4 - Via da liberação do NO pela ativação da óxido nítrico sintetase constitutiva (cNOS). Um neurotransmissor como a acetilcolina (ACH) ou um produto plaquetário como o difosfato de adenosina (ADP) ativam as vias de transdução do sinal para a produção do EDRF/NO ligando-se a receptor da superfície da célula endotelial. O fluoreto de sódio ativa seletivamente o sistema de transdução do sinal pela ativação de uma G-proteína que se acopla ao ciclo fosfatidil-inositol dependente da fosfolipase C (PLC). O ionóforo do cálcio (A23187) estimula a saída do cálcio do retículo endoplasmático. O aumento citosólico do cálcio permite a formação de complexos cálcio-calmodulina, levando à ativação da cNOS com produção de NO a partir da L-arginina. O NO se difunde para a musculatura lisa vascular subjacente que se relaxa com aumento do cGMP.

Fig. 5 - Representação do sistema de banhos orgânicos (*organ chamber*).

Estas disfunções ocorrem ao nível de receptores de membrana e ao nível da transdução do sinal pelas G-proteínas, sem comprometimento das funções bioquímicas intracelulares e ao nível da musculatura lisa vascular. Apesar desta ser a metodologia mais amplamente utilizada para o estudo da função endotelial, ela apresenta a limitação de não ser possível separar os fenômenos biológicos que ocorrem dentro e fora do vaso.

### Descrição do sistema para ensaios biológicos

Para os ensaios biológicos os segmentos vasculares (3 a 5cm), tendo todos os seus ramos ligados, são canulados com cânulas de aço inoxidável (diâmetro interno de 0,5 a 1,5mm), em um sistema de três vias: duas para perfusão de vasos (com ou sem endotélio) e uma direta para perfusão do anel vascular, sem endotélio, a ser submetida aos possíveis efeitos de substâncias liberadas, espontaneamente, ou por meio de estimulação farmacológica, pelos dois segmentos vasculares. Os vasos são mantidos em uma *organ chamber* de vidro (25ml), preenchida com solução de Krebs a 37°C e aerada (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>).

Os segmentos vasculares são perfundidos a um fluxo constante (5mL/min) com auxílio de uma bomba de rolete. A linha direta também é perfundida com o mesmo fluxo.

Um anel vascular, que tem seu endotélio removido (*bioassay ring*), é suspenso, diretamente abaixo da *organ chamber*, entre duas alças de aço inoxidável, e conectado a um transdutor de pressão. As alterações da força isométrica podem, assim, serem registradas. O conjunto de *bioassay ring*, alças de suspensão e transdutor de pressão pode ser, cuidadosamente, movido em direção ao gotejamento escolhido, de acordo com o protocolo experimental (linhas de perfusão vasculares ou linha direta). As possíveis alterações assim detectadas indicam, ou não, a liberação de fatores pelo endotélio do vaso perfundido. Podem-se adicionar drogas abluminal (na solução de Krebs da *organ chamber*) ou intraluminal. As infusões intraluminares de drogas podem ser feitas antes (sítio 1) ou, imediatamente, após a superfusão vascular (fig. 6 e 7)<sup>13-15</sup>.

A grande vantagem do ensaio biológico, também conhecido como ensaio em cascata é a de se estudar os fenômenos biológicos que ocorrem na luz vascular. Portanto, é possível estudar tanto a liberação basal do EDRF/NO, como a sua liberação estimulada pelos já mencionados agonistas farmacológicos que representam cada passo conhecido da sua via de liberação.

### Descrição do sistema de perfusão do coração isolado (método de Langendorff)

Em 1895, Oscar Langendorff idealizou um método para estudar a atividade mecânica do coração isolado. Canulando a aorta ascendente, ele foi capaz de perfundir as artérias coronárias e manter a atividade cardíaca. Em teoria, pode-se perfundir o coração de variadas espécies ani-

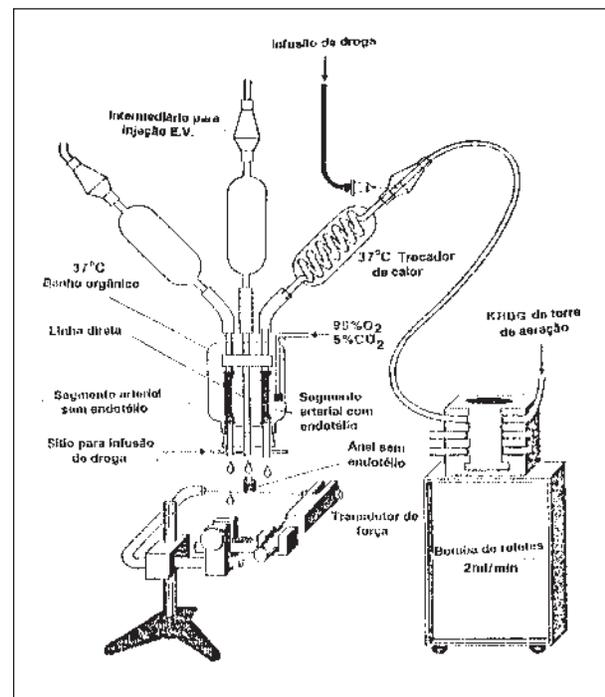


Fig. 6 - Representação esquemática do sistema para ensaio biológico de substâncias vasoativas.

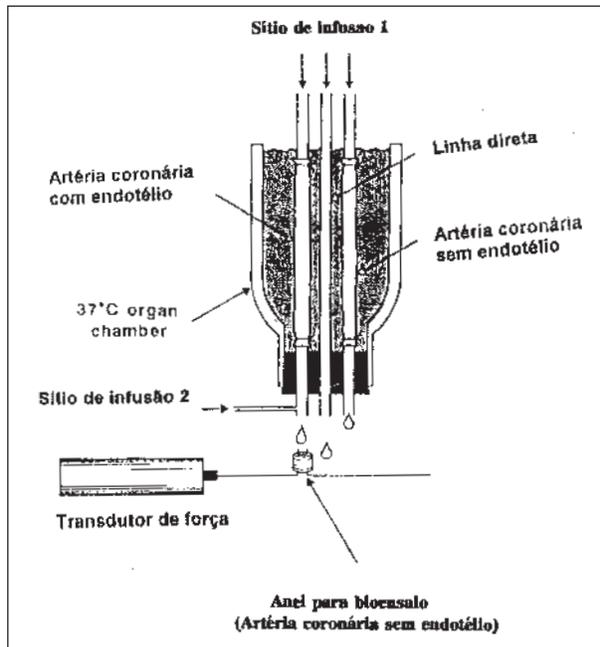


Fig. 7 - Detalhe esquemático do sistema de ensaio biológico para substâncias vasoativas. Fontes de células endoteliais (no exemplo artéria coronária com e sem endotélio) são montadas na câmara de bioensaio, sendo mantidas perfundidas com solução fisiológica de Krebs. O perfusato, passando através destes vasos, é usado para banhar um anel vascular sem endotélio, o qual é ligado a um registrador através de um sensível transdutor de força.

mais. O coração de coelhos adultos (pesando 3-4kg), presta-se, adequadamente, para estes estudos. Após adequado nível de anestesia do animal, realiza-se uma cardiectomia através de uma esternotomia mediana. Os corações ainda com batimentos são imediatamente colocados em solução de Krebs-Ringer bicarbonato, e, a seguir, os corações são suspensos a uma coluna de perfusão tipo Langendorff, estabelecendo-se uma perfusão retrógrada a uma temperatura

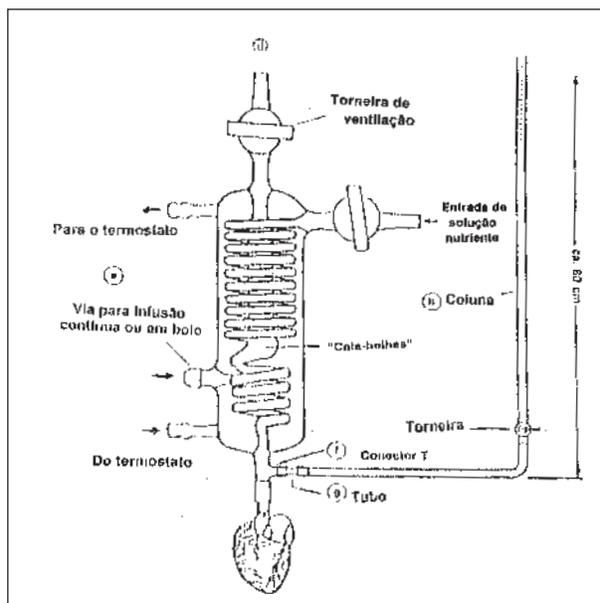


Fig. 8 - Representação da preparação experimental para perfusão a pressão constante do coração (sistema de Langendorff).

de 37°C com um sistema que mantém a perfusão a uma pressão constante de 50mmHg (Schaff e col, 1981). O tempo entre a retirada do coração e a sua perfusão isolada é em torno de um minuto. A solução fisiológica é mantida sob borbulhamento constante de uma mistura de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, mantendo-se a tensão de oxigênio entre 400 e 450mmHg, sendo a solução infundida através de um filtro de cardioplegia de 0,2µm.

Após estabelecida a perfusão retrógrada, são colocados eletrodos de marcapasso, mantendo-se a a frequência cardíaca (FC) em torno de 200-210bpm. Se houver necessidade para a fixação da FC por estimulação artificial pode-se esmagar o nó sinusal (Hashimoto e col, 1991). Um balão inflável pode ser inserido no ventrículo esquerdo, o qual pode ser insuflado para simular a pré-carga ventricular. Com transdutores de pressão apropriados, sensores de fluxo e registradores é possível o estudo de variáveis fisiológicas. A função cardíaca, fluxo coronariano, consumo de oxigênio miocárdico e permeabilidade vascular podem ser monitorizados em relação a manipulações da função da célula endotelial (fig. 8 e 9)<sup>14,15</sup>.

### Descrição para o ensaio biológico de fatores vasoativos liberados pelo coração em atividade mecânica

Discigil e col desta revisão descreveram, recentemente, uma montagem experimental que permite estudar a liberação de substâncias vasoativas liberadas pelo endocárdio do coração batendo<sup>16</sup>. Trata-se, em última instância, de uma combinação da perfusão do coração isolado com um ensaio biológico. O coração é suspenso em um sistema de Langendorff, já descrito.

Para a criação de um circuito para ensaio biológico de substâncias liberadas pelo endocárdio do coração direito, liga-se a veia cava inferior e excisa-se os folhetos da valva tricúspide. A cânula de perfusão é colocada na veia cava superior e uma outra cânula é posicionada na base do

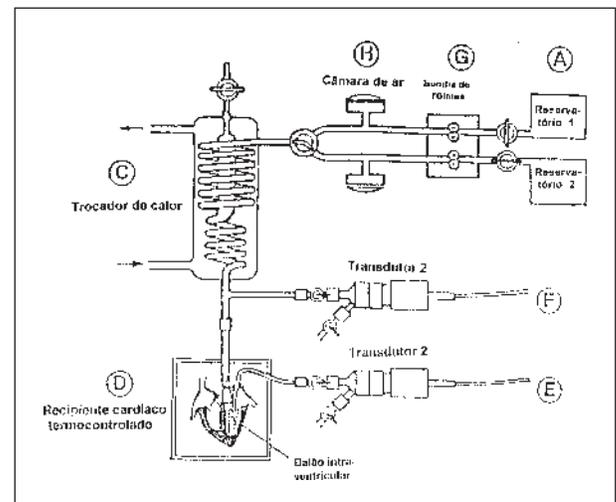


Fig. 9 - Representação da preparação experimental para perfusão a fluxo constante do coração (sistema de Langendorff).

ventrículo direito através da artéria pulmonar. Para prevenir a diluição pelo perfusato do seio coronariano, sutura-se o seu óstio, e abre-se o seio na superfície epicárdica para drenar o seu perfusato. Utiliza-se uma bomba de roletes para a manutenção de um fluxo constante (8mL/min) de solução fisiológica aerada através das cavidades cardíacas direitas. Antes de entrar no coração, a solução passa através de um trocador de calor que mantém a temperatura a 37°C. O perfusato que flui do coração, através da cânula via artéria pulmonar, pode ser submetido a ensaio biológico, como já descrito. Para se determinar a contribuição do endocárdio na produção de fatores vasoativos, os efeitos do superfusato de corações intactos podem ser comparados com os efeitos do superfusato de corações submetidos à remoção de seu endocárdio pela ação do triton X-100 (fig. 10)<sup>14,15</sup>. Este método permite o estudo da liberação de NO pelo endocárdio do coração em atividade mecânica. Pela indução de anóxia/hipóxia e pela utilização de drogas vasoconstritoras coronarianas, este método permite estudos que poderão levar a uma maior compreensão dos fenômenos que participam da isquemia subendocárdica e da formação de trombos cardíacos intracavitários.

### Estudos da microcirculação

A maioria dos estudos da função endotelial é realizada em vasos de grande capacitância, pelas dificuldades inerentes ao estudo da função endotelial da microcirculação. Uma das técnicas mais utilizadas para estudos da microcirculação é a análise de imagens computadorizadas de microvasos isolados com auxílio de dissecação microscópica. A perfusão do vaso é mantida constante com auxílio de uma seringa de infusão contínua ligada a um transdutor de pressão, a imagem em vídeo é obtida através de um microscópio acoplado a uma vídeo câmara, sendo a vídeo imagem analisada, continuamente, por um analisador dimensional.

Em 1985, Ritter e col descreveram uma técnica para visualização direta da microcirculação de um coração isolado perfundido com batimentos. McDonagh e Roberts descreveram uma variante deste sistema para estudar os efeitos da isquemia-reperfusão em corações perfundidos. Os corações eram perfundidos com uma solução contendo glóbulos vermelhos e albumina fluorescente, estudando-se o extravasamento da solução com auxílio do microscópio de fluorescência<sup>14</sup>.

### Determinações químicas

Os metabolitos do ácido aracdônico (tromboxane B<sub>2</sub>, prostaglandinas D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, 6-ceto-F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, leucotrienos B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>), podem ser medidos por radioensaio comercialmente disponíveis.

Os níveis de endotelina podem ser medidos por radioensaio convencional ou por anticorpos. Um *probe* monoclonal para o RNA mensageiro da endotelina-

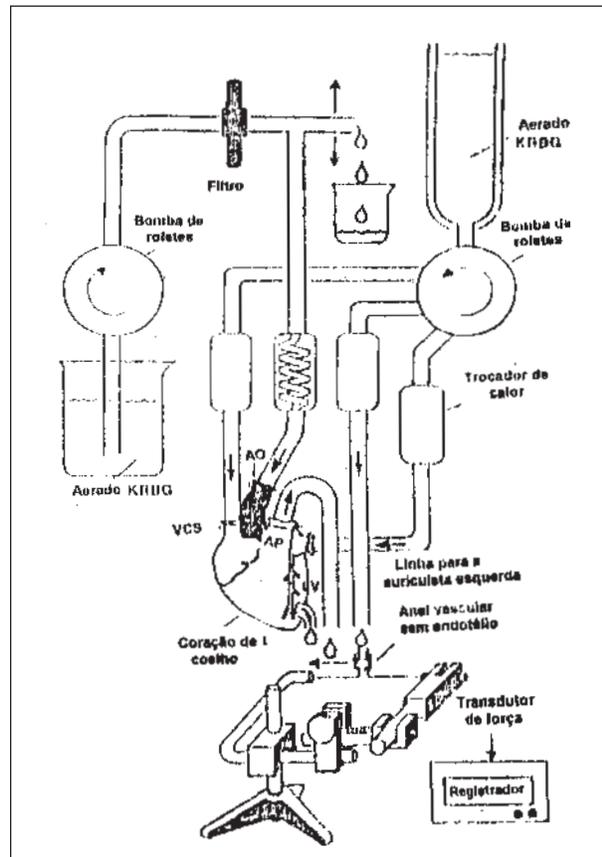


Fig. 10 - Representação esquemática da montagem experimental para ensaio biológico do coração em contração. As câmaras cardíacas direita e esquerda são perfundidas separadamente com um fluxo constante e o seu perfusato pode ser bioensaiado em um anel vascular sem endotélio, ligado a um registrador através de um transdutor de força sensível.

1 foi, recentemente, desenvolvido, sendo assim possível estudar-se a regulação da produção de endotelina-1<sup>14</sup>.

A obtenção de medidas específicas e sensíveis da produção de NO é um desafio. Em sistemas biológicos o NO é produzido em pequenas quantidades e é rapidamente inativado por ação do oxigênio e seus radicais. Numerosos e variados métodos para se medir o NO têm apresentado sucessos variáveis e nenhum método atual permite medidas confiáveis em todas as amostras. Estes métodos incluem medidas indiretas a medida dos níveis de GMP cíclico, NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> urinários e medidas diretas da citrulina, a qual é produzida pela conversão da L-arginina em NO.

As técnicas mais promissoras da medida direta do NO em sistemas biológicos empregam uma de três tecnologias disponíveis: quimioluminescência, eletro-ressonância paramagnética (EPR) e medidas espectrofotométricas. Malinski e Taha, reconhecendo que NO pode ser oxidado na presença de meteloporfirinas, idealizaram um microsensor consistindo de um filamento de carbono coberto por porfirina. A liberação de elétrons pelo processo de oxidação na superfície da porfirina cria uma corrente elétrica, que seria proporcional à produção de NO.

Finalmente, merece menção as técnicas de clonagem molecular que permitiram aos investigadores medir o RNA

mensageiro das isoformas constitutiva e induzível da NO sintetase. Pesquisas futuras usando esta técnica poderão avaliar os eventos relacionados com o controle da produção do óxido nítrico<sup>14</sup>.

### Limitações dos ensaios fisiológicos

A principal limitação dos ensaios fisiológicos é a precisa caracterização dos fatores vasoativos, uma vez que as suas ações são, em geral, estudadas por comparação das respostas vasculares na presença ou ausência de inibidores. Por exemplo, estudos realizados na presença ou ausência de indometacina, um potente inibidor da via ciclooxygenase, poderá estabelecer se uma determinada resposta vascular é devida totalmente ou em parte pela liberação de prostaglandinas. Esta tática de identificação de fatores vasoativos envolvidos em um particular processo não leva em conta um possível sinergismo ou interação de fatores. Assim, fica difícil afirmar com certeza se o aumento do tono vascular se deve pela perda da ação vasodilatadora do NO ou por sua ação supressora, recentemente demonstrada, sobre a endotelina. Acrescente-se que muitos inibidores da ação ou produção do NO podem não ser tão específicos como se pensa. O azul de metileno, por exemplo, tem um número de diversas ações independentes da inibição da

guanilato ciclase. De maneira semelhante, o L-NMMA, tido como um inibidor altamente específico da síntese de NO, pode promover alterações hemodinâmicas por mecanismos independentes desta inibição. Cada um destes exemplos indicam a necessidade da obtenção de técnicas específicas destinadas a medidas acuradas dos variados fatores vasoativos<sup>14</sup>.

### Análise dos dados

Os resultados experimentais são apresentados como médias  $\pm$  erro-padrão. Em todos os experimentos, n significa o número de animais dos quais os anéis vasculares foram obtidos. Em anéis contraídos com prostaglandina F<sub>2</sub>, ou outro vasoconstritor, as respostas são expressas como percentagem das alterações, a partir da contração máxima estável. Para os relaxamentos, calcula-se o logaritmo negativo da concentração 2 molar efetiva do agonista que causa inibição de 50% (IC<sub>50</sub>) da contração obtida pela prostaglandina F<sub>2</sub>. Estes valores são utilizados para a construção de curvas dose-resposta. Para a análise estatística utiliza-se, em geral, a análise de variância (ANOVA) e o teste T de Student para observações pareadas e não pareadas. Os valores são considerados significantes quando P for <0,05<sup>15</sup>.

### Referências

1. Furchgott RF, Zawadzki JV - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 228: 373-6.
2. Cocks T, Angus JA - Bioassay of the release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from isolated endothelial cells in vitro. In: Bevan JA, Godfraind T, Maxwell RA, Stoclet JS, Worcel M. eds - *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Amsterdam: Elsevier, 1985; 131-6.
3. Furchgott RF - Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acidactivated inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM. ed - *Mechanisms of Vasodilatation*, vol IV. New York: Raven Press, 1988; 401-14.
4. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS - Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM. ed - *Mechanisms of Vasodilatation*, vol IV. New York: Raven Press, 1988; 427-35.
5. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S - Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
6. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S - Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6.
7. DeMey JG, Vanhoutte PM - Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated femoral arteries. *J Physiol* 1981; 316: 347-55.
8. Pearson PJ, Evora PRB, Schaff HV - Bioassay of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from internal mammary arteries: Implications for early and late bypass graft patency. *Ann Thorac Surg* 1992; 54: 1078-84.
9. Cartier R, Pearson PJ, Lin PJ, Schaff HV - Time course and extent of recovery of endothelium-dependent contractions and relaxations after direct arterial injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102: 371-7.
10. De Mey JG, Gray SD - Endothelium-dependent reactivity in resistance vessels. *Prog Appl Microcirc* 1985; 8: 181-7.
11. Katusic ZS - Endothelial L-arginine pathway and regional cerebral arterial reactivity to vasopressin. *Am J Physiol* 1992; 262: H1557-62.
12. Discigil B, Pearson PJ, Chua YL, Evora PRB, Schaff HV - A novel technique to bioassay endocardium-derived nitric oxide from beating heart. *Circulation* 1992; 86(suppl I): 756.
13. Evora PRB - Alguns aspectos da função endotelial em cirurgia cardíaca. Tese de Livre-docência em Cirurgia Torácica e Cardiovascular. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, 1993.
14. Seccombe JF, Schaff HV - Experimental methods in the study of endothelial function. In: *Vasoactive Factors Produced By The Endothelium: Physiology and Surgical Implications*. Austin: RGLandes 1994; 27-41.
15. Evora PRB, Discigil B, Oeltjen M, Schaff HV - *Technical Manual*. Cardiovascular Surgical Research. Rochester: Mayo Clinic, 1992.
16. Discigil B, Pearson PJ, Chua YL, Evora PRB, Seccombe JF, Schaff HV - Novel technique to bioassay endocardium-derived nitric oxide from the beating heart. *Ann Thorac Surg* 1995; 59: 1182-6.