

GERMÁN RAMIRO ITURRY YAMAMOTO

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR  
DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA *IN VITRO*  
EFEITO INIBITÓRIO SOBRE A ATIVIDADE LÍTICA  
DO SISTEMA DE COMPLEMENTO.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cardiologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA

1992



P A R E C E R

PARECER CONJUNTO dos Professores Dr. JOSÉ ELPIDIO BARBOSA, Dr. JOÃO GUALBERTO DE SÁ SCHEFFER e Dr. CLAUDIO L. PEREIRA DA CUNHA sobre a Dissertação de Mestrado em Cardiologia da Universidade Federal do Paraná, elaborada pelo concluinte GERMAN R. ITURRY YAMAMOTO, intitulada "ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA "IN VITRO". EFEITO INIBITÓRIO SOBRE A ATIVIDADE LÍTICA DO SISTEMA DE COMPLEMENTO".

A Banca Examinadora considerou que o concluinte GERMAN R. ITURRY YAMAMOTO apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe o CONCEITO "A", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de MESTRE EM MEDICINA - área de concentração CARDIOLOGIA, e a publicação da Dissertação em veículo conveniente depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decorso das arguições.

Curitiba, 19 de dezembro de 1992.

Prof. JOSÉ ELPIDIO BARBOSA

Prof. JOÃO GUALBERTO DE SÁ SCHEFFER

Prof. CLAUDIO L. PEREIRA DA CUNHA

Orientador:

Prof. Dr. Hélio Germiniani

Co-Orientadores:

Prof. Dr. Antonio Carlos Boaretti

Prof. Dr. Paulo Roberto Cruz Marquetti

## FICHA BIBLIOGRÁFICA

ITURRY YAMAMOTO, GERMÁN RAMIRO.

Análise da atividade anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida *in vitro*. Efeito inibitório sobre a atividade lítica do Sistema de Complemento. / G.R.I.Y. Curitiba, 1992. 164 p.

Tese (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.  
Área de concentração: Cardiologia.

Palavras chaves: mononitrato-5 de isossorbida, nitratos orgânicos, Sistema de Complemento.

"A vida é curta e a arte é longa, a  
ocasião é fugaz, o experimento  
falaz e o juízo difícil."

Hipócrates

A mis padres, Victor Hugo y Lily, por su constante preocupación en mi formación, y por el abnegado apoyo, mis profundos agradecimientos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélio Germiniani, orientador, pelo apoio e estímulo para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Antonio Carlos Boaretti e Paulo Roberto Cruz Marquetti, co-orientadores, pela amizade e inestimável colaboração em todas as fases da elaboração deste trabalho, o nosso reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Gastão Pereira da Cunha, pela oportunidade concedida para a realização do Curso de Mestrado em Cardiologia na Universidade Federal do Paraná e pelo incentivo ao presente trabalho, nossos sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Franco de Oliveira, Coordenador do Curso de Mestrado em Cardiologia da Universidade Federal do Paraná, pelo constante apoio.

Ao Prof. Dr. José Elpídio Barbosa, Chefe do Laboratório de Imunologia Humoral do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, pela valiosa colaboração na realização deste trabalho e por ter propiciado as condições necessárias para a concretização do mesmo.

Ao Prof. Carlos Roberto Antunes dos Santos, Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação, e a todos os funcionários da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná, em especial à Sra. Elianne Guillaumon de Britto Pereira, pela cordialidade e atenção.

Ao Prof. Dr. Mário Fernando de Camargo Maranhão, Presidente da Sociedade Interamericana de Cardiologia, pelo incentivo, nosso reconhecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Cardiologia, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, em especial aos Profs. Drs. Iseu Affonso da Costa, Lubomira Veronika Oliva e Cláudio Pereira da Cunha, pelos ensinamentos recebidos durante o Curso de Mestrado em Cardiologia.

Aos Profs. Drs. Gustavo Ballejo Olivera, Alexandre Pinto Corrado e Sérgio Henrique Ferreira, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, pelas valiosas sugestões e incentivo.

A meu caro amigo, Dr. José Eduardo Teixeira, por ter acreditado em nosso trabalho e pela inestimável cooperação, nosso reconhecimento.

Às Profas. Iara José Taborda de Messias e Shirley Ramos da Rosa Utyama, e aos colegas do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Humoral do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, e aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão - Universidade de São Paulo e do Biotério do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da mesma Instituição, pela colaboração e apoio técnico.

Ao Prof. Luiz Caleffe, Professor Adjunto do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, pela inestimável colaboração na elaboração da análise estatística.

Ao Prof. Braz Heleno de Oliveira, Professor Adjunto do Departamento de Química Orgânica, e ao Prof. Manoel Francisco Guimarães, Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelas valiosas sugestões.

Ao Sr. Daniel Müller Júnior e Sra. Izabel Cristina Guareschi Müller, Assessores de Informática do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Paraná, e à Srta. Silmara Rego, pela valiosa colaboração na digitação e editoração do presente trabalho.

Às Sras. Ivanir Gonçalves Pencal e Maria de Lourdes Gonçalves, secretárias do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná, e à Sra. Elisa do Carmo V. Fernandes da Cruz, à Srta. Lúcia Lemiszka e à Sra. Valéria Knapp, secretárias do Curso de Pós-Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Paraná, pela cordialidade com a qual sempre nos atenderam.

Aos funcionários do Serviço de Análises Clínicas, em especial à Dra. Elvira Missako Doi, e à Dra. Cristina Habul, Chefe da Farmácia Hospitalar do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração.

Aos funcionários da Biblioteca Central da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, à Sra. Josefina Santos e ao Sr. Jocy Dias Cristo, da Biblioteca do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na coleta dos dados bibliográficos.

Ao Dr. Alberto Orsini, ao Sr. Luiz Sérgio V. Barros e ao Dr. Ronaldo Abud, dos Laboratórios Baldacci S. A., que nos proporcionaram o mononitrato-5 de isossorbida para a realização dos experimentos e pelo auxílio financeiro que nos prestaram na etapa final do trabalho:

Em especial, aos doadores voluntários, que com sua compreensão, tornaram possível a realização deste estudo.

E, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xvi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xviii
LISTA DE TABELAS .....	xix
RESUMO .....	xxi
ABSTRACT .....	xxii
RESUMEN .....	xxiii
INTRODUÇÃO .....	1
O SISTEMA DE COMPLEMENTO .....	4
Ativação do Sistema de Complemento .....	8
Via clássica de ativação do Sistema de Complemento .....	8
Via alternativa de ativação do Sistema de Complemento .....	11
Complexo lítico de membrana .....	14
Regulação da ativação da cascata de Complemento .....	17
Receptores de membrana para o Complemento .....	21
IMPLICAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PATOGÊNESE DA LESÃO TECIDUAL ISQUÊMICA E DE REPERFUSÃO MIOCÁRDICA .....	23
Evidências da ativação do Sistema de Complemento na isquemia miocárdica .....	24
- Deposição de componentes e produtos da ativação do Sistema de Complemento na área isquêmica .....	24
- Mecanismos de ativação do Sistema de Complemento na isquemia miocárdica .....	25
Evidências da ativação do Sistema de Complemento em pacientes com infarto agudo de miocárdio .....	26
Implicação dos polimorfonucleares-neutrófilos na patogênese da lesão isquêmica e de reperfusão .....	31

- Infiltração e acúmulo de polimorfonucleares-neutrófilos na área isquêmica .....	32
- Liberação de radicais livres de oxigênio pelos polimorfonucleares-neutrófilos .....	33
- Liberação de enzimas proteolíticas pelos polimorfonucleares-neutrófilos .....	34
- Liberação de tromboxano e leucotrienos pelos polimorfonucleares-neutrófilos .....	35
Interação do Sistema de Complemento com as plaquetas .....	35
APLICAÇÃO DOS NITRATOS ORGÂNICOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA ISQUÊMICA MIOCÁRDICA .....	36
Mecanismos de ação dos nitratos orgânicos .....	36
Biotransformação dos nitratos orgânicos .....	39
Propriedades farmacológicas dos nitratos orgânicos .....	39
- Efeito vasodilatador dos nitratos orgânicos .....	39
- Efeito dos nitratos orgânicos sobre a agregação plaquetária .....	40
Aplicações clínicas dos nitratos orgânicos .....	41
ÓXIDO NÍTRICO .....	42
ANÁLISE DO EFEITO ANTICOMPLEMENTAR DE DETERMINADA SUBSTÂNCIA .....	43
OBJETIVOS .....	46
MATERIAL E MÉTODOS .....	48
1 COMPLEMENTO HUMANO (C.H.) .....	49
2 MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA .....	49
3 SOLUÇÕES UTILIZADAS .....	50
4 HEMÁCIAS DE CARNEIRO .....	52
5 HEMOLISINA .....	53
6 HEMÁCIAS DE COELHO .....	53
7 SISTEMA INDICADOR DE HEMÓLISE .....	54
7.1 VIA CLÁSSICA - Sensibilização de Hemácias de Carneiro ...	54
7.2 VIA ALTERNATIVA .....	54

8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA .....	55
9 EXPERIMENTO I - DETERMINAÇÃO DA C-50. ....	56
9.1 VIA CLÁSSICA .....	56
9.2 VIA ALTERNATIVA .....	60
10 EXPERIMENTO II - ANÁLISE DO EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA .....	63
10.1 VIA CLÁSSICA .....	63
10.2 VIA ALTERNATIVA .....	66
11 EXPERIMENTO III - EFEITO INIBITÓRIO DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO .....	68
11.1 VIA CLÁSSICA .....	68
11.2 VIA ALTERNATIVA .....	68
12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	69
RESULTADOS .....	70
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA .....	71
1 EXPERIMENTO I - DETERMINAÇÃO DA C-50. ....	71
1.1 Via Clássica .....	71
1.2 Via Alternativa .....	73
2 EXPERIMENTO II - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA .....	76
2.1 Via Clássica .....	76
2.2 Via Alternativa .....	78
3 EXPERIMENTO III - EFEITO INIBITÓRIO DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO .....	80
3.1 Via Clássica .....	80
3.2 Via Alternativa .....	82
4 REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO .....	84

DISCUSSÃO .....	87
INTERVENÇÃO NO PROCESSO INFLAMATÓRIO IMPLICADO NA PATOGÊNESE DA LESÃO ISQUÊMICA MIOCÁRDICA .....	89
Glucocorticóides .....	89
Antiinflamatórios não-esteróides .....	91
Inibidores do tromboxano .....	93
Prostaciclina .....	95
Intervenções sobre os polimorfonucleares .....	96
Aplicação de antioxidantes .....	97
CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE COMPLEMENTO NO TECIDO ISQUÊMICO .....	99
INTERVENÇÕES SOBRE O SISTEMA DE COMPLEMENTO .....	103
EVIDÊNCIAS DO EFEITO PROTETOR DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE O TECIDO MIOCÁRDICO ISQUÊMICO .....	106
Estudos experimentais .....	107
Estudos clínicos .....	110
Evidências do efeito benéfico dos nitratos orgânicos sobre a incidência de arritmias causadas por isquemia .....	114
DISCUSSÃO DO MÉTODO APLICADO PARA A ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA .....	116
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO .....	118
SOBRE O MECANISMO DE AÇÃO .....	125
CONCLUSÕES .....	130
ANEXOS .....	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	138

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	- catalase
CLM	- complexo lítico de membrana
CR <sub>1</sub>	- receptor de Complemento tipo 1
CR <sub>2</sub>	- receptor de Complemento tipo 2
CR <sub>3</sub>	- receptor de Complemento tipo 3
DO	- densidade óptica
EDTA	- ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	- ácido etileno glicol-bis (B-aminoetil éter) N,N,N',N'- tetracético
Hb	- hemoglobina
INHCl <sub>1</sub>	- inibidor de C <sub>1</sub>
kD	- kilodaltons
M	- molar
min	- minutos
MN-5 ISO	- mononitrato-5 de isossorbida
mS	- miliSiemens
NADPH	- fosfato de nicotinamida adenildinucleotídeo (reduzido)
nm	- nanômetros
NO	- óxido nítrico
O <sub>2</sub>	- oxigênio
P	- properdina
PAM	- pressão arterial média
PE <sub>1</sub>	- prostaglandina E <sub>1</sub>
PE <sub>2</sub>	- prostaglandina E <sub>2</sub>

PI <sub>2</sub>	- prostaciclina
PMNs	- polimorfonucleares
RLO <sub>2</sub>	- radicais livres de O <sub>2</sub>
SC	- Sistema de Complemento
seg	- segundos
SHN	- soro humano normal
SOD	- superóxido dismutase
TEA	- trietanolamina
Tx	- tromboxano
ul	- microlitros

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	ATIVACÃO DA CASCATA DE COMPLEMENTO .....	9
2	ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS NITRATOS ORGÂNICOS .....	37
3	FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO I - VIA CLÁSSICA .....	58
4	DETERMINAÇÃO DO T 1/2 - VIA CLÁSSICA .....	59
5	FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO I - VIA ALTERNATIVA .....	61
6	DETERMINAÇÃO DO T 1/2 - VIA ALTERNATIVA .....	62
7	FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO II - VIA CLÁSSICA .....	65
8	FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO II - VIA ALTERNATIVA .....	67
9	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO COMPLEMENTO OBTIDA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MN-5 ISO. DETERMINAÇÃO DA C-50 - VIA CLÁSSICA. ....	74
10	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO COMPLEMENTO OBTIDA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MN-5 ISO. DETERMINAÇÃO DA C-50 - VIA ALTERNATIVA .....	75
11	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO (0,113 M) - VIA CLÁSSICA .....	77
12	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO (0,146 M) - VIA ALTERNATIVA .....	79
13	EFEITO INIBITÓRIO DO MN-5 ISO (0,113 M) SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO - RELAÇÃO COM O TEMPO DE INCUBAÇÃO - VIA CLÁSSICA .....	81
14	EFEITO INIBITÓRIO DO MN-5 ISO (0,146 M) SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO - RELAÇÃO COM O TEMPO DE INCUBAÇÃO - VIA ALTERNATIVA .....	83

LISTA DE TABELAS

1	COMPONENTES PLASMÁTICOS DA CASCATA DE COMPLEMENTO .....	6
2	PROTEÍNAS SOLÚVEIS QUE REGULAM A ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE COMPLEMENTO .....	19
3	PROTEÍNAS DA MEMBRANA CELULAR QUE REGULAM A ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE COMPLEMENTO .....	20
4	RECEPTORES DE MEMBRANA PARA O COMPLEMENTO .....	22
5	T 1/2 E PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO OBTIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MN-5 ISO SOBRE UMA SOLUÇÃO DE COMPLEMENTO (45 ul de SHN/ml tampão) - VIA CLÁSSICA .....	72
6	T 1/2 E PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO OBTIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MN-5 ISO SOBRE UMA SOLUÇÃO DE COMPLEMENTO (380 ul de SHN/ml tampão) - VIA ALTERNATIVA .....	73
7	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTICOMPLE- MENTAR DO MN-5 ISO - VIA CLÁSSICA .....	76
8	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTICOMPLE- MENTAR DO MN-5 ISO - VIA ALTERNATIVA .....	78
9	EFEITO INIBITÓRIO DO MN-5 ISO SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO E O EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO - VIA CLÁSSICA .	80
10	EFEITO INIBITÓRIO DO MN-5 ISO SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO E O EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO - VIA ALTERNA- TIVA .....	82
11	CÁLCULO DAS VARIÂNCIAS PARA OS EXPERIMENTOS DA VIA CLÁSSICA .	85
12	CÁLCULO DAS VARIÂNCIAS PARA OS EXPERIMENTOS DA VIA ALTERNA- TIVA .....	85

13	REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO OBTIDOS EM 3 EXPERIMENTOS - VIA CLÁSSICA .....	86
14	REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO OBTIDOS EM 3 EXPERIMENTOS - VIA ALTERNATIVA .....	86
15	MEDIDA DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO - VIA CLÁSSICA .....	134
16	MEDIDA DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO - VIA ALTERNATIVA .....	134
17	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO - VIA CLÁSSICA (SHN: 45 ul/ml tampão) .....	135
18	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO - VIA CLÁSSICA (SHN: 33 ul/ml tampão) .....	135
19	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO - VIA CLÁSSICA (SHN: 26,5 ul/ml tampão) .....	136
20	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO - VIA ALTERNATIVA (SHN: 380 ul/ml tampão) .....	136
21	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO - VIA ALTERNATIVA (SHN: 580 ul/ml tampão) .....	137

## RESUMO

O Complemento é um sistema proteico constituído por vários componentes presentes no plasma sanguíneo e na membrana celular, que desempenham papel relevante em diversos tipos de reações imunológicas. A literatura médica evidencia a implicação do Sistema de Complemento na patogênese da lesão tecidual isquêmica miocárdica. Os nitratos orgânicos ocupam um lugar relevante na terapêutica da doença coronariana devido a seu conhecido efeito vasodilatador e à provável atividade antiagregante plaquetária, mecanismos através dos quais exercem uma ação protetora sobre o tecido miocárdico isquêmico. A atividade anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida é analisada no presente trabalho através do estudo do efeito da droga sobre a atividade hemolítica do Sistema de Complemento, em ambas as vias de ativação da cascata, *in vitro*. Para isto, empregou-se um método cinético, com a determinação do tempo necessário para que dada solução de Complemento cause a lise de 50% das hemácias de uma suspensão padronizada destas. O método consiste num ensaio turbidimétrico desta lise, através da mensuração contínua da densidade óptica da suspensão de hemácias. Os resultados mostram que o mononitrato-5 de isossorbida, em altas concentrações, causa a inibição da atividade lítica do Complemento, em ambas as vias de ativação, *in vitro* sendo esta inibição dependente da concentração da droga. Conclui-se que o mononitrato-5 de isossorbida, em altas concentrações, tem uma atividade anticomplementar em ambas as vias de ativação da cascata de Complemento. Embora o mecanismo desta atividade anticomplementar não esteja determinado, são sugeridas algumas hipóteses a respeito. Estes resultados permitem levantar a possibilidade de que o efeito anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida demonstrado no presente trabalho represente um mecanismo adicional dos nitratos orgânicos na proteção do tecido miocárdico isquêmico.

## ABSTRACT

The Complement System includes serum and membrane proteins, which plays an important role in many immunological reactions. Recent evidences suggest an involvement of the Complement System in the pathogenesis of ischemic myocardial tissue injury. Organic nitrates take an important place in the treatment of coronary disease. Their protective action in ischemic myocardial tissue may rest on their known vasodilating effect, and their potential antiplatelet activity. The anticomplementary activity of isosorbide 5 mononitrate is examined in the present study, analyzing the effect of this drug on the haemolytic activity of the Complement System by two pathways of activation *in vitro*. A kinetic method was applied determining the time required to cause lysis of one-half of the available cells of an erythrocyte suspension by a known Complement solution. The method consists in a turbidimetric assay of the erythrocyte lysis, by a continuous measurement of the optical density of the cell suspension. The results show an inhibition of the haemolytic activity of the Complement System by isosorbide 5 mononitrate in high concentrations *in vitro*. This inhibition is concentration-dependent. In conclusion, isosorbide 5 mononitrate has an anticomplementary activity in both pathways of Complement activation. Although the mechanism of this anticomplementary activity is not determined, some hypothesis are suggested. These results allow us to suppose that the anticomplementary effect of isosorbide 5 mononitrate demonstrated in the current study represents an additional mechanism of organic nitrates in the protection of ischemic myocardial tissue.

## RESUMEN

El Sistema de Complemento está constituido por varios componentes proteicos presentes en el plasma sanguíneo y en la membrana celular, que cumplen un papel relevante en diversos tipos de reacciones inmunológicas. Existen evidencias de la implicación del mismo en la patogénia de la lesión tisular isquémica miocárdica. Los nitratos orgánicos ocupan un lugar relevante en la terapéutica de la enfermedad coronaria debido a su conocido efecto vasodilatador y la probable actividad antiagregante plaquetaria, mecanismos a través de los cuales ejercen una acción protectora sobre el tejido miocárdico isquémico. En el presente trabajo es analizada la actividad anticomplementar del mononitrato-5 de isosorbide a través del estudio del efecto de esta droga sobre la actividad hemolítica del Sistema de Complemento, por ambas vías de activación, *in vitro*. Fue empleado un método cinético, con la determinación del tiempo necesario para que dada solución de Complemento cause la lisis de 50% de los hematíes de una suspensión padronizada de éstos. El método consiste en un ensayo turbidimétrico de esta lisis, a través de la medición continua de la densidad óptica de la suspensión de hematíes. Los resultados muestran que el mononitrato-5 de isosorbide, en altas concentraciones, causa una inhibición de la actividad hemolítica del Complemento, en ambas vías de activación, *in vitro*, siendo esta inhibición dependiente de la concentración de la droga. Se concluye que el mononitrato-5 de isosorbide, en altas concentraciones, ejerce una actividad anticomplementar en ambas vías de activación de la cascada de Complemento. Apesar de no estar determinado el mecanismo de esta actividad anticomplementar, son sugeridas algunas hipótesis. Los resultados del presente trabajo permiten levantar la posibilidad de que el efecto anticomplementar del mononitrato-5 de isosorbide demostrado, represente un mecanismo adicional de los nitratos orgánicos en la protección del tejido miocárdico isquémico.

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

Está bem evidenciada na literatura médica a implicação do processo inflamatório na etiopatogenia da lesão tecidual isquêmica, sendo que a ativação do Sistema de Complemento foi demonstrada em estudos experimentais e clínicos (LANGLOIS, GAWRYL, 1988; PINCKARD et al., 1975; ROSSEN et al., 1988, YASUDA et al., 1990).

Os efeitos deletérios desta ativação seriam consequência da ação das anafilotoxinas sobre o músculo cardíaco e o fluxo coronário (DEL BALZO, LEVI, POLLEY, 1985; ITO et al., 1990; MARTIN et al., 1988; STAHL et al., 1990); a formação de fatores quimiotáticos, com a consequente infiltração de polimorfonucleares neutrófilos na área isquêmica (MULLANE et al., 1984; ROSSEN et al., 1985) e a ativação destes (CRAWFORD et al., 1988; MARTIN et al., 1988; MEHTA et al., 1989). Um outro produto da ativação do Complemento que pode estar implicado na lesão tecidual isquêmica é o complexo lítico de membrana (CLM) (SCHAFER et al., 1986; HUGO et al., 1990)

Há mais de um século atrás, Thomas Lauder BRUNTON sugeriu o uso de vasodilatadores como "remédio" para o tratamento da doença coronariana. Em 1879 William MURRELL demonstrou o efeito benéfico da nitroglicerina no tratamento da angina pectoris (FYE, 1986).

Posteriormente, outros nitratos orgânicos foram sintetizados, incluindo o dinitrato de isossorbida, o mononitrato-5 de isossorbida e o tetranitrato de pentaeritritol. Todos eles se ca-

racterizam por ter na sua estrutura uma ou mais ligações éster-nitrato ( $R-O-NO_2$ ) (AHLNER et al., 1991)

Atualmente considera-se que os nitratos orgânicos e derivados são pró-drogas que liberam o óxido nítrico (NO), seja no interior da célula ou no plasma sanguíneo (AHLNER et al., 1991; ARMSTRONG et al., 1980; FUNG, 1987), o qual por sua vez estimula a guanilato ciclase solúvel do músculo liso vascular ou da plaqueta, levando à vasodilatação e a uma inibição da agregação plaquetária (AHLNER, AXELSSON, 1987; GERZER et al., 1989).

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que a aplicação dos nitratos orgânicos e derivados no infarto agudo de miocárdio (IAM) leva a uma redução da lesão isquêmica e da mortalidade (BUSSMANN et al., 1981a; CHICHE et al., 1977; FITZGERALD, BENNET, 1990; FLAHERTY et al., 1975; GROSSER et al., 1983; JOHNSON III et al., 1990a; JUGDUTT, 1983a; ZASLAVSKAYA, POKAZEEVA, TEIBLIUM, 1985).

No presente estudo, é analisada a atividade anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida, *in vitro*, determinando-se o efeito da droga sobre a atividade lítica do Complemento.

Para isto é aplicado um método cinético baseado na propriedade lítica do Sistema de Complemento, que consiste na determinação do tempo necessário para que dada solução de Complemento cause a lise de 50% das hemácias de uma suspensão padronizada destas (BARBOSA, 1983).

É analisado o efeito da droga sobre ambas as vias de ativação da cascata de Complemento.

## O SISTEMA DE COMPLEMENTO

Em 1888, NUTTAL observou que o sangue desfibrinado de diversos animais exercia uma ação bactericida para determinados germens e que esta propriedade desaparecia após esquentá-lo a 55°C. Um ano depois, BUCHNER demonstrou que esta era uma propriedade do soro isento de elementos celulares, e que tratava-se de um poder citotóxico geral; sendo as hemácias provenientes de organismos distintos particularmente sensíveis a este efeito. Este princípio sanguíneo que provoca a destruição de bactérias e hemácias estranhas foi designado por BUCHNER com o nome de alexina.

Em 1894, PFEIFFER e ISSAEF observaram que a inoculação intraperitoneal de vibriões coléricos em cobaias previamente imunizadas contra a cólera, causava a desintegração dos mesmos. Em 1895, BORDET observou que o soro imune, após aquecimento a 55°C por 30 minutos ou mesmo deixado à temperatura ambiente por 1 ou 2 dias, perdia a sua atividade bactericida e que a mesma era restabelecida ao se adicionar soro fresco não imune de diferentes espécies animais. BORDET concluiu que o soro imune continha dois tipos de substâncias: uma específica e termoestável, o anticorpo de vacinação, e outra inespecífica e termolábil, constituinte normal de qualquer soro, a qual chamou de Complemento. Foi tal a importância deste trabalho que, em 1920, foi concedido a BORDET o Prêmio Nobel (FASQUELLE et al. , 1968; VERMES, 1989; WILLIAMS, BURKS, STEELE, 1988).

Designa-se com o nome de Sistema de Complemento (SC) a um complexo proteico polimolecular, constituído por várias substâncias que se encontram no plasma sanguíneo e nas membranas celulares.

res e desempenham um papel importante em diferentes tipos de reações imunológicas (MARGNI, 1982). A tabela 1 mostra algumas propriedades dos componentes plasmáticos do Complemento.

Os componentes da via clássica, assim como da via terminal, são designados com o símbolo "C" seguidos com o número correspondente (C1, C3, etc.). Já os componentes da via alternativa, exceto C3, são designados com nomes convencionais ou símbolos diferentes (exemplo: fator D, fator B, properdina) (RUDDY, 1981). A designação dos componentes ativados é feita por uma barra colocada sobre o símbolo da proteína ou do complexo proteico correspondente (exemplo:  $\overline{C1-C4b2a}$ , fator  $\overline{B}$ , etc.). Os produtos da clivagem enzimática são designados por letras minúsculas que seguem o símbolo de determinado componente (exemplo: C5a, C5b). Quando o componente ou fragmento é inativado, é adicionada a letra "i" (exemplo: C3bi, Bbi) (MARGNI, 1982).

As proteínas do Complemento são sintetizadas principalmente nos hepatócitos, macrófagos e monócitos (BURGER, 1988; COLE, COLTEN, 1988; FASQUELLE et al., 1968). As proteínas reguladoras ligadas à membrana celular, são sintetizadas nas células sobre as quais estão expressas (LAW, REID, 1988).

Pelo fato de alguns componentes serem termolábeis (C1, C2, C5, C8, C9, fator B, fator D), o Complemento pode ser inativado pelo aquecimento a 56°C por 30 minutos, sendo inestável, mesmo a 4°C, mas preservado pelo congelamento a -70°C, ou pela liofilização (FASQUELLE et al., 1968; MARGNI, 1982; RUDDY, 1985).

TABELA 1 - COMPONENTES PLASMÁTICOS DA CASCATA DE COMPLEMENTO

COMPONENTE	PESO MOLECULAR (kD)	CONCENTRAÇÃO SÉRICA (ug/ml)	TERMOLABILIDADE	PRODUTOS DA ATIVAÇÃO	COMENTÁRIOS SOBRE AS FUNÇÕES
<b>VIA CLÁSSICA</b>					
C1 (C1q e C1r e C1s)	900				Inicia a ativação da via clássica
C1q	410	75	+		Liga-se à porção Fc da Ig
C1r	85	50	+	C1r	C1r é uma protease sérica, cliva C1s
C1s	85	50	+	C1s	C1s é uma protease sérica, cliva C4 e C2
C4	210	200-500	-	C4a C4b	C4a é uma anafilotoxina C4b forma ligações covalentes com as superfícies ativadoras, onde faz parte da C3 convertase
C2	110	20	+	C2a C2b	C2a é uma protease sérica, faz parte da C3 e C5 convertases
<b>VIA ALTERNATIVA</b>					
Fator B	93	200	+	Ba Bb	Bb é uma protease sérica, faz parte de C3 e C5 convertases.
Fator D	25	1-2	+	D	Protease que circula na forma ativa; cliva o Fator B
C3 (faz parte também da via clássica)	195	550-1200	-	C3a C3b	C3a é uma anafilotoxina C3b forma ligações covalentes com a superfície ativadora, onde é parte da C3 e C5 convertases, atuando também como opsonina
Properdina	220	25			Estabiliza a C3 convertase da via alternativa
<b>VIA EFETORA COMUM</b>					
C5	190	70	+	C5a C5b	C5a é uma anafilotoxina C5b inicia a formação do CLM
C6	128	60			Componente do CLM
C7	121	60			Componente do CLM
C8	155	60	+		Componente do CLM
C9	79	60	+		Componente do CLM, sofre polimerização para formar o CLM

kD = kilodalton

CLM = complexo lítico de membrana

Ig = Imunoglobulina

Tabela construída com base nos dados obtidos de ABBAS e cols., 1991; LAW, REID, 1988; MARGNI, 1982; UNANUE, BENACERRAF, 1986.

O SC constitui-se num dos principais efetores da imunidade humoral assim como da inflamação (ABBAS et al., 1991; FRANK, 1987; FRANK, FRIES, 1991).

O SC participa dos seguintes processos biológicos: fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos, liberação de histamina dos mastócitos e basófilos, contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade dos vasos, agregação plaquetária, vasoconstricção e citólise (FERRI, CALICH, VAZ, 1977; HORST, 1986; MADALINSKI, 1986; BJORK, HUGLI, SMEDEGARD, 1985).

Está demonstrado também, que a ativação do SC pode levar à lesão tecidual. De fato, na resposta inflamatória aguda a microorganismos, ocorre uma destruição de células hospedeiras normais. Também nas doenças por imunocomplexos ocorrem processos destrutivos como a vasculite ou a glomerulonefrite por imunocomplexos, os quais resultam da deposição do complexo antígeno-anticorpo nas paredes dos vasos e glomérulos com a conseqüente ativação da cascata de Complemento (ABBAS et al., 1991).

Estudos recentes sugerem que durante a lesão isquêmica miocárdica e de reperfusão, pode ocorrer uma ativação do Sistema de Complemento, com o conseqüente efeito deletério deste processo (PINCKARD et al., 1975; REYES et al., 1984; ROSSEN et al., 1988; SEMB et al., 1990; YASUDA et al., 1990).

É sabido também que durante a circulação extracorpórea há uma ativação da cascata de Complemento (KUTSAL et al., 1989; VIDEM et al., 1988; VIDEM et al., 1989).

Dados da literatura sugerem ainda a possibilidade da participação do Complemento na aterogênese (HAMMERSCHMIDT et al., 1981b; SEIFERT, KAZATCHKINE, 1988).

## Ativação do Sistema de Complemento

Para que o Complemento exerça as suas funções, o mesmo deve ser ativado, originando assim uma série de fragmentos com diferentes características e funções específicas.

São conhecidas duas vias que levam a ativação do Complemento, a via clássica e a via alternativa. Cada uma delas é desencadeada por fatores diferentes, sendo o início da ativação diferente para cada uma, mas que convergem em uma via comum a partir da formação de C3b (ABBAS et al., 1991; FRANK, 1989; MARGNI, 1982; UNANUE, BENACERRAF, 1986; VERMES, 1989).

A figura 1 mostra as duas vias de ativação da cascata de Complemento.

### Via clássica de ativação do Sistema de Complemento

Foi assim denominada por ser a primeira a ser descrita (FRANK, 1989). Formam parte dela os componentes C1, C4, C2 e C3 ativados em cascata.

Componente C 1 - é um complexo molecular multimérico com p.m. de 900 kD, composto de uma subunidade C1q, associada a duas moléculas C1r e duas moléculas C1s por ligações dependente de cálcio.

C1q é a subunidade que se liga à molécula de Ig. C1r e C1s são esterases necessárias para a progressão da ativação da cascata (ABBAS et al., 1991; BURGER, HAMMER, 1988).

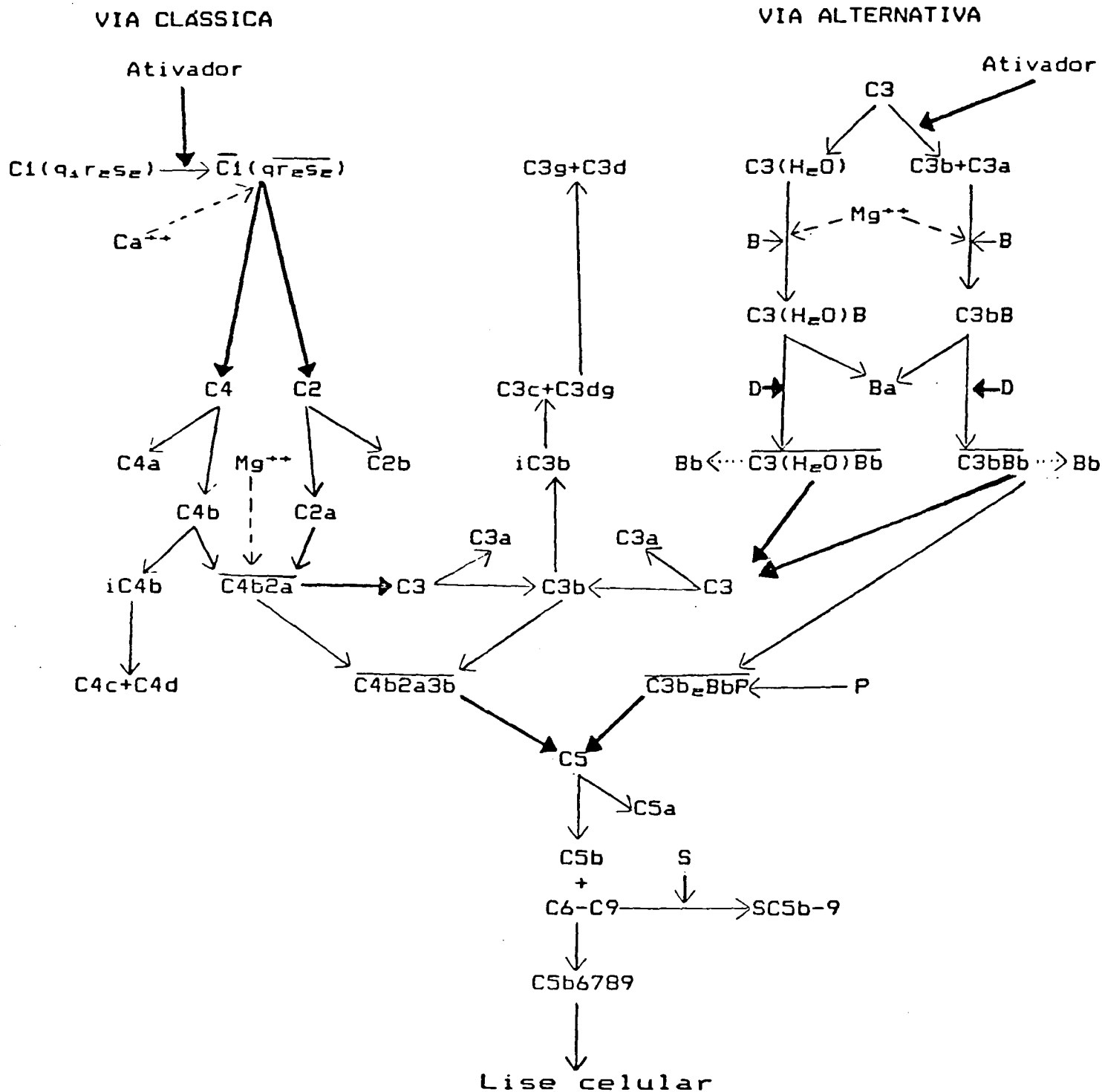


FIGURA 1- ATIVAÇÃO DA CASCATA DE COMPLEMENTO

Componente C 4 - é a segunda proteína sérica a ser ativada nesta via. É uma betaglobulina composta por três cadeias polipeptídicas denominadas alfa, beta e gama, com p.m. de 210 kD. A molécula de C4 contém uma ligação tioéster na cadeia alfa (BURGER, HAMMER, 1988). A clivagem de C4 forma C4a e C4b. Como resultado desta clivagem, a ligação tioéster da cadeia alfa converte-se em uma ligação inestável, susceptível ao ataque de grupos nucleofílicos (ABBAS et al., 1991; BURGER, HAMMER, 1988).

Componente C 2 - consiste de uma cadeia polipeptídica com p.m. de 110 kD. A clivagem desta molécula forma C2a e C2b (ABBAS et al., 1991; BURGER, HAMMER, 1988).

O componente C3 será descrito posteriormente.

#### - Ativação da via clássica do Sistema de Complemento

A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo; imunoglobulinas agregadas (COOPER, 1980) e outras substâncias, incluídos alguns constituintes subcelulares do miocárdio (GLICAS, PINCKARD, OLSON, 1979; KAGIYAMA et al., 1989; PINCKARD et al., 1973; PINCKARD et al., 1975).

As imunoglobulinas humanas que iniciam a ativação do Complemento pela via clássica pertencem às classes IgM e às subclasses IgG1, IgG2, IgG3 (COOPER, 1980).

A ativação da via clássica se inicia com a ativação de C1.

A reação entre o antígeno e o anticorpo forma um imunocomplexo criando um sítio na porção Fc da imunoglobulina acessível à ligação com C1q, iniciando-se assim a ativação de C1 (WINKELSTEIN, 1985). Após a geração sequencial de diferentes sítios enzi-

máticos em C1r, é exposto um novo sítio enzimático em C1s transformando-se este em uma enzima proteolítica, a  $\overline{C1}$ -esterase (SILVA, KIPNIS, 1984); íons  $Ca^{++}$  são essenciais a fim de prevenir a dissociação de  $\overline{C1}$ -esterase de C1q, o qual permanece ligado à membrana alvo através das imunoglobulinas (LOOS, 1988). A C1-esterase cliva dois outros componentes do Complemento: C4 e C2, formando C4b que adere-se à membrana celular através de sua ligação tioéster, e C2a que permanece ligado a C4b na presença de íons Mg, formando assim  $\overline{C4b2a}$ , chamada também de C3 convertase da via clássica, a qual por sua vez cliva C3 em C3a e C3b. Sequencialmente, C3b se liga a C3 convertase, formando  $\overline{C4b2a3b}$ ; este novo complexo molecular pode agora clivar C5, sendo por isso chamado de C5 convertase da via clássica, formando-se C5a e C5b. C5b inicia a formação do complexo lítico de membrana (CLM) (ABBAS et al., 1991), descrito posteriormente.

Moléculas de C3b formadas através da via clássica podem servir de substrato para a ativação da via alternativa. Este mecanismo é chamado de alça de amplificação (COOPER, 1980).

#### Via alternativa de ativação do Sistema de Complemento

Em 1954, PILLEMER demonstrou que o Complemento podia ser ativado por outros agentes além do complexo antígeno-anticorpo, pela evidência de que a incubação de soro não imune com polissacarídeos como o zimosan, podia levar ao consumo do Complemento.

Uma nova proteína sérica denominada Properdina, parecia estar envolvida neste processo (WILLIAMS, BURKS, STEELE, 1988).

Atualmente sabe-se que a ativação da via alternativa de-

pende dos seguintes fatores: fator D, fator B, Properdina e C3 (ABBAS et al., 1991; MARGNI, 1982).

O fator B (pró-ativador de C3) é uma betaglobulina termolábil, com p.m. de 93 kD, que consiste de uma única cadeia polipeptídica (ABBAS et al., 1991; UNANUE, BENACERRAF, 1986).

O fator D é uma alfa globulina termolábil, de p.m. de 25 kD, que consiste de uma cadeia polipeptídica única (UNANUE, BENACERRAF, 1986). É uma enzima que existe no organismo já na forma ativada (WILLIAMS, BURKS, STEELE, 1988), e que cliva o fator B formando Bb.

A Properdina é uma gama globulina tetramérica com p.m. de 220 kD (UNANUE, BENACERRAF, 1986). É uma das proteínas reguladoras da via alternativa do Complemento, sendo sua principal função estabilizar a convertase de C3 e C5 (LAW, REID, 1988).

A molécula de C3 cumpre um papel importante no SC, já que faz parte de ambas as vias de ativação da cascata. É uma betaglobulina com p.m. de 195 kD. A molécula de C3 contém uma ligação tioéster interna inerte, a qual pode sofrer o ataque de grupos nucleofílicos para depois formar ligações covalentes, principalmente com grupos hidroxila ou amina presentes nas membranas biológicas. Esta ligação tioéster pode ser também hidrolisada pela água. A hidrólise espontânea desta ligação forma  $C3(H_2O)$ , iniciando assim a ativação da via alternativa. Após a hidrólise, forma-se um grupo sulfidrila e outro éster (ABBAS et al., 1991; LAW, REID, 1988).

## - Ativação da via alternativa do Sistema de Complemento

A presença de certos agentes como determinados fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos com determinadas características, especialmente a ausência de ácido siálico na membrana, são suficientes para ativar a via alternativa, através da ligação de uma ou mais moléculas de C3b na sua superfície (VERMES, 1989). A membrana da hemácia de coelho possui também esta propriedade (PLATTS-MILLS, ISHIZAKA, 1974).

A via alternativa pode também ser ativada por polissacarídeos, lipossacarídeos, enzimas tipo tripsina, alguns imunocomplexos, o fator de veneno de cobra (COOPER, 1980), assim como por alguns constituintes subcelulares do músculo cardíaco (GLICAS, PINCKARD, OLSON, 1979), entre outros.

C3 é também ativado continuamente em pouca intensidade na fase fluída. Isto ocorre através de proteases séricas, moléculas nucleofílicas ou água que atacam a ligação tioéster. Quando esta ligação é hidrolisada, forma-se C3(H<sub>2</sub>O) (ABBAS et al., 1991; LAW, REID, 1988).

A molécula de C3(H<sub>2</sub>O), com uma conformação similar a C3b, na presença de íons Mg, interage com o fator B formando C3(H<sub>2</sub>O)B, sobre o qual atua o fator  $\bar{D}$  para formar  $\overline{C3(H_2O)Bb}$ , complexo chamado de C3-convertase de iniciação. Esta enzima por sua vez cliva novas moléculas de C3 em C3a e C3b. A ligação tioéster das moléculas de C3b sofre hidrólise, depositando-se sobre aceptores da superfície celular das partículas ditas ativadoras da via alternativa, como células infectadas por vírus, células

tumorais, bactérias gram-negativas, fungos, protozoários (SILVA, KIPNIS, 1984).

Na presença de íons magnésio, C3b pode também se ligar ao fator B para formar C3bB. O fator  $\bar{D}$  que circula como enzima ativa e não é consumido na reação, atua então na porção B da molécula para formar C3bBb, molécula lábil, sendo porém estabilizada pela agregação de uma molécula de Properdina (P). A enzima  $\overline{C3bBbP}$  resultante, é denominada de C3 convertase de amplificação da via alternativa, clivando a seguir novas moléculas de C3 em C3a e C3b, sendo que este último pode ingressar na chamada "alça de amplificação", oferecendo mais C3b para a fase inicial desta via, ou se ligar ao complexo molecular C3bBb para formar  $\overline{C3bBb}$  (C3b), denominada de C5 convertase da via alternativa, que como  $\overline{C4b2a3b}$  da via clássica, cliva C5 em C5a e C5b. Esta última molécula inicia a formação do CLM (C5b6789) (SILVA, KIPNIS, 1984; WILLIAMS, BURKS, STEELE, 1988).

#### Complexo lítico de membrana

O CLM é formado após a ativação de C5, C6, C7, C8 e C9.

Componente C5 - é uma betaglobulina com p.m. de 190 kD, similar a C3 e C4, mas não contendo a ligação tioéster. A clivagem de C5 pela C5 convertase, tanto da via clássica como alternativa, forma C5a e C5b. C5a é uma potente anafilotoxina além de ser o mais importante fator quimiotático derivado do Complemento (BURGER, HAMMER, 1988).

Os componentes C6 e C7 são beta-2-globulinas com características similares. Ambos estão compostos de cadeias simples, com

p.m. aproximado de 125 kD (BURGER, HAMMER, 1988).

Componente C8 - é uma gama-1-globulina com p.m. de 155 kD, composta de três cadeias alfa, beta e gama. A cadeia beta contém o sítio de interação com C5b67 (ABBAS et al., 1991; BURGER, HAMMER, 1988).

Componente C9 - é uma alfa-globulina constituída por uma cadeia simples, com p.m. de 79 kD (ABBAS et al., 1991; BURGER, HAMMER, 1988). Uma característica importante desta molécula é a sua capacidade de formar polímeros (PODACK, TSCHOPP, 1982), propriedade que poderia ter um papel importante na formação do CLM (YAMAMOTO, MIGITA, 1983).

#### - Formação do complexo lítico de membrana

Uma vez formadas as C5 convertases, da via clássica ou alternativa, estas atuam sobre as moléculas de C5 clivando-as em dois fragmentos, o menor C5a que se dissocia na fase fluída, e o maior C5b. A formação de C5b marca o início da via efetora comum de ataque à membrana. C5b, fracamente ligado a C3b, liga-se a C6 para formar o complexo C5b-6 e posteriormente a C7, formando o complexo C5b67, dissociando-se de C3b (LAW, REID, 1988).

O complexo C567 dispõe de um sítio de ligação metaestável para membranas, fosfolipídios ou outras proteínas (BIESECKER, 1983). Na ausência de substratos apropriados, o complexo C5b67 sofre uma auto-agregação na fase fluída (BIESECKER, 1983; LAW, REID, 1988), perdendo sua potencial atividade citolítica. A ligação de C5b67 à membrana ocorre predominantemente através de interações iônicas e hidrofóbicas na superfície da membrana (BIESEC-

KER, 1983). Após a ligação de C8, a molécula de C9 é incorporada para formar o complexo C5b6789 (LAW, REID, 1988).

O complexo C5b678 tem a capacidade de causar a lesão de membranas celulares (BIESECKER, 1983), no entanto, para formar um complexo altamente citolítico, é necessário que várias moléculas de C9 liguem-se ao complexo C5b678 formando C5b678(9)<sub>n</sub> (ABBAS et al., 1991; LAW, REID, 1988). Esta adição de C9 acelera o processo lítico consideravelmente (HANSCH, 1988).

Está demonstrado que várias moléculas de C9 podem se ligar ao complexo C5b678, sendo que o tamanho da lesão na membrana dependerá do número de moléculas de C9 ligadas (HANSCH, 1988). A ligação de várias moléculas de C9 resultaria da polimerização destas envolvendo pontes dissulfeto (YAMAMOTO, MIGITA, 1983).

O CLM insere-se na membrana alvo, levando a alterações na estrutura e função desta, ocorrendo a saída de material citoplasmático de baixo peso molecular, a entrada de H<sub>2</sub>O e sais, levando ao intumescimento celular e conseqüente rompimento das membranas por lise osmótica (ABBAS et al., 1991; HANSCH, 1988; VERMES, 1989).

O mecanismo exato da lise celular mediada pelo Complemento continua sendo objeto de discussões. Existem duas hipóteses a respeito.

Uma teoria propõe que as superfícies polares dos últimos componentes do Complemento venham formar conjuntamente um canal hidrofílico através da membrana, o chamado *doughnut model* (MAYER, 1972). O outro modelo propõe que as proteínas do Complemento inseridas na membrana causariam uma distorção local da camada fosfolipídica da membrana, resultando nos chamados *leaky patches*

(ESSER et al., 1979).

As divergências entre ambas as teorias deu lugar a uma apaixonante discussão entre os defensores de cada uma delas (BHAKDI, TRANUM-JENSEN, 1991; ESSER, 1991).

Independente do mecanismo de ação, está demonstrado que o CLM causa a lesão de vários tipos de membranas celulares (HANSCH, 1988).

Existem, tanto no plasma sanguíneo como na membrana celular, proteínas que regulam e inibem a formação do CLM, protegendo principalmente células homólogas da ação lítica de aquele (BHAKDI, TRANUM-JENSEN, 1983; LACHMANN, 1991; LAW, REID, 1988)

#### Regulação da ativação da cascata de Complemento

Uma ativação descontrolada do Complemento pode levar à formação do CLM no próprio tecido e a uma formação excessiva de mediadores da inflamação. Isto normalmente não ocorre porque a ativação é regulada por várias proteínas plasmáticas e outras ligadas à membrana celular com funções específicas. Além disto, as C3 e C5 convertases se dissociam rapidamente e C4b, C3b e C5b7 manifestam uma capacidade apenas transitória para a ligação à superfície alvo apropriada.

Então, o Complemento de dada espécie é relativamente ineficiente para causar a lise de células autólogas.

Graças a estes mecanismos de regulação existe um delicado equilíbrio entre a ativação e a inibição da cascata de Complemento, o que previne a lesão de células e tecidos próprios, mas permite a destruição efetiva de organismos estranhos (ABBAS et al.,

1991; LACHMANN, 1991, LAW, REID, 1988).

As tabelas 2 e 3 mostram algumas propriedades das proteínas reguladoras.

TABELA 2 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS QUE REGULAM A ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE COMPLEMENTO

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (kD)	CONCENTRAÇÃO SÉRICA (ug/ml)	INTERAÇÃO ESPECÍFICA COM:	FUNÇÃO
Inibidor de C1 (INH C1)	110	200	C1r, C1s	- Forma um complexo equimolar covalente com C1r e C1s, inibindo a atividade enzimática destes - Liga-se a C1 inativo e previne a sua ativação espontânea
Proteína de associação a C4 (C4bp)	500	250	C4b	- Liga-se a C4b, inibindo competitivamente a ligação deste a C2a - Atua como cofator do Fator I na clivagem de C4b - Acelera a dissociação de C3 convertase da via clássica
Fator H	150	480	C3b	- Acelera a dissociação de C3 convertase da via alternativa (C3bBb) por dissociação de Bb - Atua como cofator do Fator I na clivagem de C3b - Inibe competitivamente a ligação do fator B a C3b
Fator I	88	35	C4b, C3b	- Cliva C4b e C3b, tendo C4bp, Fator H, CR1 e PCH como cofatores
Inativador de anafilotoxina	310	35	C3a, C4a, C5a	- Inativa C3a, C4a e C5a, clivando a arginina C-terminal
Proteína S (vitronectina)	83	505	C5b-7	- Liga-se ao complexo C5b-7 no seu sítio de ligação à membrana, prevenindo a inserção do CLM à membrana
SP 40,40	80	50	C5b-9	- Modula a formação do CLM
Properdina	220	20	C3bBb	- Estabiliza a convertase da via alternativa

kD = kilodaltons

CLM = complexo lítico de membrana

CR1 = receptor de complemento tipo 1

PCH = proteína cofatora de membrana

Tabela construída com base nos dados obtidos de ABBAS e cols., 1991; LAW, REID, 1986; UHANUE, BENACERRAF, 1986; VERMES, 1989.

TABELA 3 - PROTEÍNAS DA MEMBRANA CELULAR QUE REGULAM A ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE COMPLEMENTO

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (kD)	DISTRIBUIÇÃO CELULAR	INTERAÇÃO ESPECÍFICA COM:	FUNÇÃO
Receptor de complemento tipo 1 (CR1)	190-280	E, B, G, M, L miócito *	C3b, C4b, iC3b	- Acelera a dissociação de C3 e C5 convertase da via clássica e alternativa - Atua como cofator do Fator I na clivagem de C3b e C4b - Promove a eliminação de imunocomplexos da circulação
Proteína cofatora de membrana (MCP)	45-70	B, T, N, M células endoteliais células epiteliais fibroblastos miócito *	C3b, C4b	- Atua como cofator do Fator I na clivagem de C3b e C4b
Fator acelerador da dissociação (DAF)	70	E, L, P miócito *	C4b2a, C3bBb	- Acelera a dissociação das C3 convertases - Previne a associação de C3b com Fator B e de C4b com C2
Fator de restrição homólogo (HRF) (C8bp)	65	E, L, M, N, P miócito **	C8, C9	- Interfere na ligação de C8 e C9 prevenindo a formação do CLM em células homólogas
Inibidor de membrana da lise reativa (HIRL) (CD59) (Protectina)	18	E, L, M, N, P miócito **	C7, C8	- Bloqueia a ligação de C7 e C8 ao complexo C5b-6

kD = kilodaltons

E = eritrócitos

B = linfócitos B

G = granulócitos

M = monócitos

L = leucócitos

T = linfócitos T

N = neutrófilos

P = plaquetas

CLM = complexo lítico de membrana

\* fraca expressão

\*\* forte expressão

Tabela construída com base nos dados obtidos de ARBAS e cols., 1991; LACHMANN, 1991; LAW, REID, 1988; VAKOVA, LAURILA, MERI, 1992; VERMES, 1989.

## Receptores de membrana para o Complemento

Para o Complemento cumprir sua função é necessária a interação com diversos receptores expressos na membrana de vários tipos de células. Estes podem ser classificados em três categorias funcionais (ABBAS et al., 1991):

- receptores para fragmentos de C3, que se ligam à membrana celular;
- receptores para as anafilotoxinas C3a e C5a, que mediam os efeitos inflamatórios do Complemento;
- receptores que regulam a cascata de Complemento, ligando-se a componentes específicos deste, inibindo suas funções.

A tabela 4 mostra algumas propriedades dos mesmos.

TABELA 4 - RECEPTORES DE MEMBRANA PARA O COMPLEMENTO

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (kD)	INTERAÇÃO ESPECÍFICA COM:	DISTRIBUIÇÃO CELULAR	FUNÇÃO
Receptor tipo 1 (CR1)	190-280	C3b, C4b, iC3b	E miócito  N, M, ■  e B T	- Promove a eliminação de imunocomplexos da circulação - Acelera a dissociação de C3 e C5 convertases de ambas as vias  - Atua como cofator do Fator I na clivagem de C3b e C4b - Incrementa a fagocitose mediada pelo receptor Fc - Intervém na fagocitose independente do receptor Fc - ? - ? - ?
Receptor tipo 2 (CR2)	145	iC3b, C3dg, C3d, C3b, VEB	B	- Regulação das funções de linfócitos B - Receptor para VEB
Receptor tipo 3 (CR3)	260	iC3b	M, N, ■	- Participa da adesão, quimiotaxia e fagocitose
Receptor tipo 4 (CR4)	145	iC3b	N, M, P	- Incrementa a fagocitose mediada pelo receptor Fc - Intervém na fagocitose independente do receptor Fc
Receptor para C3a/C4a	?	C3a, C4a	B, mastócitos  células do músculo liso	- Ligação de anafilotoxinas C3a, C4a - Liberação de histamina e outros mediadores da inflamação - Contração (independente de histamina ?)
Receptor para C5a	45	C5a, C5a des Arg	B, mastócitos Células endoteliais N, M, ■, P	- Ligação de anafilotoxina C5a - Liberação de histamina e outros mediadores - Incremento da permeabilidade vascular - Promove a quimiotaxia
Receptor C1q	65	C1q	B, M, P, ■ Células endoteliais	- Intermedia a ligação de imunocomplexos a células fagocitárias

kD = kilodaltons

E = eritrócitos

B = linfócitos B

G = granulócitos

M = monócitos

L = leucócitos

VEB = vírus Epstein-Barr

T = linfócitos T

N = neutrófilos

P = plaquetas

■ = macrófagos

e = eosinófilos

Tabela construída com base nos dados obtidos de ABBAS e cols., 1991; DIERICH, 1988; LAW, REID, 1988; VAKOVA, 1992; VERMES, 1989.

## IMPLICAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PATOGÊNESE DA LESÃO TECIDUAL ISQUÊMICA E DE REPERFUSÃO MIOCÁRDICA

Os mecanismos pelos quais ocorre lesão tecidual após IAM não estão bem definidos (Mc MANUS et al., 1983; YASUDA et al., 1990).

A implicação do processo inflamatório como um dos mecanismos etiopatogênicos da lesão tecidual isquêmica e de reperfusão é sugerida em trabalhos recentes (HILL, WARD, 1971; PINCKARD et al., 1975; PINCKARD et al., 1980; REYES et al., 1984; SEMB, 1990; YASUDA et al., 1990).

Os fenômenos inflamatórios implicados na patogênese da lesão tecidual isquêmica e de reperfusão são, entre outros:

- agregação e ativação de plaquetas (HIRSCH, 1987; NIDORF et al., 1989);
- ativação do Sistema de Complemento (HILL, WARD, 1971; LANGLOIS, GAWRYL, 1988; PINCKARD et al., 1975; REYES et al., 1984; ROSSEN et al., 1988; SEMB et al., 1990; YASUDA et al., 1990);
- infiltração e acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos (ENGLER et al., 1986; JACOB, HAMMERSCHMIDT, 1981; MULLANE et al., 1984);
- liberação pelos neutrófilos de radicais livres de oxigênio, enzimas proteolíticas, metabólitos do ácido araquidônico, como o tromboxano e leucotrienos (BURRELL, BLAKE, 1989; CRAWFORD et al., 1988; MARTIN et al., 1988; MEHTA et al., 1989).

## Evidências da ativação do Sistema de Complemento na isquemia miocárdica

### - Deposição de componentes e produtos da ativação do Sistema de Complemento na área isquêmica

Estudos recentes em modelos experimentais sugerem que a isquemia aguda de miocárdio está associada com a ativação do Sistema de Complemento. Assim, vários trabalhos têm demonstrado a deposição de componentes e produtos da ativação do SC na área isquêmica.

PINCKARD e cols. (1980), em modelo experimental em macacos, demonstraram a localização uniforme de C3 nas áreas infartadas, sendo que nas áreas normais não foi detectada a presença do mesmo. Um outro grupo de animais foi submetido previamente à depleção de Complemento com o fator de veneno de cobra. Nestes não foi detectada a presença de C3 em nenhuma área, inclusive na infartada. Segundo os autores, a deposição de C3 em áreas infartadas inicia-se 4 horas após a ligação da artéria coronária.

Em 1983, este mesmo grupo de pesquisadores (McMANUS et al., 1983) confirmou os resultados anteriores, demonstrando além disso a localização extensa de C4 e C5 na maioria das fibras miocárdicas infartadas, em material obtido 24 horas após a ligação da artéria coronária, não ocorrendo isto em tecido normal. Segundo os autores, tais achados sugerem uma ativação *in situ* do Sistema Complemento como consequência da isquemia miocárdica.

ROSSEN e cols. (1985) demonstraram o acúmulo significativo

de C1q marcado com  $^{125}\text{I}$  no miocárdio isquêmico de cães, após 45 minutos ou mais da oclusão da artéria coronária circunflexa, sendo que este acúmulo de C1q persistia após a reperfusão coronária.

Foi também detectado o acúmulo nestas áreas, de neutrófilos marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Já em 1986, SCHAFER e cols. (1986), mediante o uso de anticorpos poli e monoclonais, mostraram a existência de depósitos do complexo C5b9 em células miocárdicas localizadas na zona de infarto em material de autópsia derivado de pacientes com IAM.

- Mecanismos de ativação do Sistema de Complemento na isquemia miocárdica

Um outro tipo de análise, realizada com o intuito de demonstrar a implicação da ativação do SC na gênese da lesão tecidual durante a isquemia miocárdica, é o referente aos possíveis mecanismos de ativação deste.

Os primeiros estudos realizados por HILL e WARD (1971), demonstraram que a incubação de homogeneizados de músculo cardíaco de camundongo com soros de camundongo gera uma atividade quimiotática. Os autores sugerem que C3 seria clivado por uma protease tecidual presente no miocárdio de camundongo liberada após a ocorrência do infarto, e que os produtos desta clivagem, com atividade quimiotática, levariam a um acúmulo de neutrófilos na área infartada, já que a depleção de C3 com o fator de veneno de cobra reduzia significativamente a infiltração de polimorfonucleares.

Posteriormente, PINCKARD e cols. (1973), demonstraram haver uma ativação do Sistema Complemento independente do complexo

antígeno-anticorpo, sugerindo que a interação de C1q com membranas cardíacas intracelulares, principalmente mitocondriais, levaria à ativação daquele.

Estes mesmos autores em 1975 (PINCKARD et al., 1975), confirmaram estes resultados e demonstraram que em pacientes após IAM havia um consumo de Complemento nas primeiras 72 horas, sugerindo que a necrose celular miocárdica leva a uma liberação de constituintes de membranas intracelulares, capazes de ativar o SC.

Em 1979, este mesmo grupo de pesquisadores (GLICAS, PINCKARD, OLSON, 1979) estudou os mecanismos de ativação da cascata de Complemento por membranas mitocondriais, mostrando que ambas as vias de ativação da cascata estão envolvidas, já que o bloqueio seletivo de cada uma delas não evita a ativação do Complemento, medida pela depleção de C3.

ROSSEN e cols. (1988), em modelo experimental, confirmaram que constituintes de mitocôndrias cardíacas ligados a C1q podem ativar a cascata de Complemento. Os constituintes intracelulares capazes de ativar a cascata seriam liberados como consequência da isquemia miocárdica.

Evidências da ativação do Sistema de Complemento em pacientes com infarto agudo de miocárdio.

Vários trabalhos (LANGLOIS, GAWRYL, 1988; PINCKARD et al., 1975; YASUDA et al., 1990) têm demonstrado a ativação do Complemento em pacientes com IAM.

PINCKARD e cols. (1975) demonstraram pela primeira vez ha-

ver uma queda dos níveis séricos de alguns componentes do Complemento em pacientes imediatamente após a ocorrência de IAM. Os autores detectaram uma queda nos níveis de C1, C4 e C3 em 6 pacientes com IAM estudados, sendo que a queda máxima de C1, C4 e C3 ocorria na maioria dos pacientes dentro das primeiras 24 horas, retornando a seus valores normais ao 3º dia de hospitalização; houve também uma queda não significativa de C6 e do Complemento hemolítico total (CH50) nos 6 pacientes estudados. O grupo controle, composto por pacientes com dor precordial mas sem evidências de IAM, mostrou alterações não significativas dos níveis C1, C4, C3 e CH50.

LANGLOIS e GAWRYL (1988) quantificaram os seguintes produtos da ativação do Complemento em 41 pacientes após IAM: o complexo terminal de complemento (CTC), o complexo inibidor C1rC1s-C1, o complexo C3bBbP, C3a des-Arg e C5a des-Arg formados após a ativação da via clássica e alternativa, além de determinar o CH50.

Os resultados mostram que dentro das primeiras 16 horas após diagnóstico do IAM ou da admissão hospitalar, houve um aumento em 32 vezes do complexo terminal do complemento, assim como um aumento em 8 vezes do complexo inibidor C1rC1s-C1. Já os valores do complexo C3bBbP, de C3a des-Arg e C5a des-Arg estavam aumentados em 2 vezes.

No entanto, os pacientes com insuficiência cardíaca congestiva de outra etiologia e pacientes submetidos a revascularização miocárdica sem infarto prévio, mostravam apenas mínimas alterações nas concentrações plasmáticas destes produtos da ativação do Complemento. Os pacientes com IAM mostraram também uma di-

minuição do CH50

Dois dados adicionais deste trabalho são dignos de mencionar:

O primeiro é que os autores demonstraram uma correlação dos níveis do complexo terminal do complemento, do complexo inibidor C1rC1s-C1 e de C3a des-Arg com a classificação funcional de KILLIP e KIMBALL (KILLIP, KIMBALL, 1967), havendo um aumento significativo nas concentrações destes em pacientes com classe IV, comparados com pacientes da classe I, mostrando uma possível relação das manifestações hemodinâmicas subsequentes ao IAM com o grau de ativação da cascata de Complemento.

Um segundo dado importante é a elevação dos níveis destes produtos da ativação do Complemento, em 5 pacientes com reinfarto do miocárdio.

YASUDA e cols. (1989) analisaram o comportamento dos seguintes componentes do Complemento em pacientes após IAM: C4, C3, C3a e os títulos do complemento hemolítico total (CH50) num período de 1 a 10 dias após a ocorrência do infarto.

Os níveis de C3a encontravam-se claramente elevados em todos os pacientes, comparados com controles normais, do 1º ao 10º dia, sendo que os níveis do 5º ao 10º dia eram significativamente maiores aos níveis do 1º e 2º dia. Já os níveis de C3 eram significativamente maiores aos níveis do grupo controle nos dias 8º, 9º e 10º. No entanto, os níveis de C4 neste grupo de pacientes encontravam-se significativamente aumentados em comparação com o grupo controle, já no 1º dia, sofrendo um aumento constante até o 10º dia; os níveis eram significativamente maiores a partir do 8º dia, comparados com os do 1º e 2º dia.

O título do CH50, no 1º e 2º dia manteve-se dentro dos valores normais, já no 5º dia em diante houve um aumento significativo deste, comparado com os valores do grupo controle assim como com os do 1º e 2º dia.

Os autores enfatizam a dificuldade de detectar alterações do Sistema de Complemento após a ocorrência do IAM através da avaliação dos níveis de C3, C4 e CH50, já que estes refletem tanto uma síntese como uma degradação constante, sendo que níveis elevados de C3, C4 e CH50 indicam uma maior síntese destes componentes somente se esta excede à degradação simultânea consequente à ativação do Complemento.

Em 1990, este mesmo grupo de autores, juntamente com KOLB e TAMERIOUS (YASUDA et al., 1990) analisaram o comportamento dos níveis de alguns produtos da ativação do Sistema Complemento em pacientes com IAM, angina instável e angina estável, comparados com controles normais. Foram quantificados: C4d, C3d, iC3b, Ba, Bb e SC5b-9. Nos pacientes com angina estável e angina instável a análise foi realizada no 1º dia da admissão, no entanto nos pacientes com IAM, a análise foi feita no 5º dia após a admissão. C3d, C4d, iC3b, Ba, Bb e SC5b-9 foram dosados pelo método de ELISA e o fator C3a pelo método de radioimunoensaio.

Os resultados mostram que os níveis de C3d eram significativamente maiores em pacientes com IAM e angina instável comparados com controles normais, sendo que nos pacientes com IAM os níveis de C3d eram também significativamente maiores comparados com os níveis dos pacientes com angina estável e angina inestável. Os níveis plasmáticos de iC3b e C3a mostraram um comportamento similar aos descritos para C3d.

Nos pacientes com IAM, os níveis séricos de C4d eram significativamente maiores comparados com os controles normais, o mesmo acontecendo com os níveis de Bb, Ba e de SC5b-9.

Os autores demonstraram também uma correlação direta dos níveis plasmáticos de SC5b-9 com o pico máximo de CPK e uma relação inversa com a fração de ejeção em pacientes com IAM; os níveis plasmáticos de SC5b-9 nos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva eram significativamente maiores comparados com os níveis em pacientes sem insuficiência cardíaca congestiva após IAM.

Com estes resultados os autores demonstram haver uma ativação do Sistema de Complemento no IAM através das duas vias: a clássica e a alternativa, além de mostrar uma associação entre esta ativação e o grau de lesão isquêmica.

Recentemente, FRANGI e cols. (1992) mostram que a terapia fibrinolítica com estreptoquinase em pacientes com IAM, leva a uma ativação do Complemento. Houve uma elevação importante de C3a des-Arg, C4a des-Arg e do complexo C5b9, 30 minutos após a infusão da estreptoquinase.

Em alguns estudos não foi comprovada a ativação da cascata de Complemento a nível sistêmico em pacientes com IAM ou o com episódios transitórios de isquemia. Assim MOLLNES e cols. (1988) quantificaram os níveis plasmáticos de C3, C4, dos produtos da ativação de C3 e do complexo SC5b-9 no 1º, 2º, 3º e 6º dia em pacientes com infarto não complicado.

Os resultados mostram níveis de C3 e C4 similares ao do grupo controle. Os níveis dos produtos da ativação de C3 e do complexo SC5b-9 eram maiores aos do grupo controle, não atingindo

no entanto uma diferença significativa. Os autores concluem que o IAM não complicado não está associado com uma ativação sistêmica do Complemento, sugerindo a ocorrência de uma ativação local, a qual pode ser detectada na circulação coronária, considerando-se os resultados obtidos em outros trabalhos.

Um outro estudo recente (MONTALESCOT et al., 1991) mostra que a indução de breves períodos de isquemia reversível por estimulação atrial em pacientes com angina estável, não está associada com uma ativação sistêmica da cascata de Complemento. Foram quantificados os níveis plasmáticos de C5a, C3a e do complexo C5b-9.

Os resultados obtidos nos trabalhos citados, sugerem que o grau de isquemia e necrose determinaria o grau de ativação do Sistema Complemento, sendo esta maior, e por conseguinte detectável na circulação periférica, quando o grau de isquemia ou necrose fosse maior. Já no caso de quadros isquêmicos mais leves, esta ativação seria detectável unicamente na circulação coronária.

#### Implicação dos polimorfonucleares-neutrófilos na patogênese da lesão isquêmica e de reperfusão

Estudos experimentais mostram a implicação de uma resposta inflamatória mediada pelos polimorfonucleares neutrófilos na patogênese da lesão isquêmica (CRAWFORD et al., 1988), e de reperfusão (MULLANE et al., 1984).

A infiltração dos neutrófilos é um processo ativo estimulado por fatores quimiotáticos, entre outros, os produtos da ativação do Sistema Complemento, como C5a (ABBAS et al., 1991; LAW,

REID, 1988; TILL, 1988), C3a (LAW, REID, 1988; TILL, 1988) e C5b67 (HORST, 1986), o leucotrieno B4 (LtB4) (GOETZL, PICKETT, 1981) e o fator de transferência (BOARETTI, 1977; MENDES et al., 1978).

Os mecanismos pelos quais os polimorfonucleares-neutrófilos teriam um efeito deletério sobre o tecido isquêmico são: o acúmulo destes na área isquêmica, a liberação de radicais livres de oxigênio ( $RO_2$ ), enzimas proteolíticas e metabólitos do ácido araquidônico.

- Infiltração e acúmulo de polimorfonucleares-neutrófilos na área isquêmica

O acúmulo de polimorfonucleares (PMNs) na área isquêmica causaria um aumento da resistência regional, uma redução do fluxo durante a isquemia, e o chamado *no-reflow phenomenon*; este consiste na obstrução mecânica de capilares pelos leucócitos o que teria como consequência o aumento da resistência regional e a redução do fluxo durante a reperfusão miocárdica (ENGLER, SCHMID-SCHONBEIN, PAVELEC, 1983; ENGLER et al., 1986).

KATORI e cols. (1989) sugerem que o acúmulo de polimorfonucleares nas primeiras 12 horas de IAM é causado pelo leucotrieno B4 (LtB4), já o acúmulo posterior seria causado por fatores quimiotáticos derivados da ativação do Complemento. Outros fatores quimiotáticos estariam também implicados.

- Liberação de radicais livres de oxigênio pelos polimorfonucleares-neutrófilos

Os PMNs ativados têm a capacidade sintetizar e liberar os chamados radicais livres de oxigênio ( $\text{RLO}_2$ ), (BABIOR, KIPNES, CURNUTE, 1973), através da ativação da NADPH oxidase (COHEN, 1989). São estes o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o oxigênio singular ( $^1\text{O}_2$ ) (ZARCO, 1989). CSa provoca a liberação de  $\text{RLO}_2$  pelos PMNs (BABIOR, 1978)

Os  $\text{RLO}_2$  estão implicados na patogênese da lesão isquêmica e de reperfusão (BURRELL, BLAKE, 1989; LARNER, CONWAY, 1989; SOUTHRN, POWIS, 1988; WERNS, SHEA, LUCCHESI, 1986) embora alguns autores coloquem em dúvida este aspecto (PRZYKLENK, KLONER, 1989).

Um estudo recente sugere que a liberação de  $\text{RLO}_2$  pelos PMNs ativados possa ser uma das causas da recuperação incompleta da função ventricular ou da disfunção da mesma após circulação extracorpórea (PRASAD et al., 1992).

Além dos PMNs (BURRELL, BLAKE, 1989; ENGLER, 1989), outras prováveis fontes de  $\text{RLO}_2$  seriam a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, a degradação de catecolaminas, a ação da xantina oxidase sobre metabólitos purínicos, entre outros (FORMAN, VIRMANI, PUETT, 1990; LARNER, CONWAY, 1989). A importância de cada uma destas fontes seria espécie-específica (KLONER, PRZYKLENK, WHITTAKER, 1989).

Há também evidências de que os  $\text{RLO}_2$  seriam causadores da

lesão do endotélio vascular, revisado por WARREN e WARD (1986)

Os  $RLO_2$  causam a lesão celular através da peroxidação de lipídios da membrana celular causando um dano estrutural e funcional da mesma; da degradação de proteínas, além de causar alterações na síntese de colágeno (BURRELL, BLAKE, 1989; WERNS, SHEA, LUCCHESI, 1986). Os  $RLO_2$  poderiam também causar a oxidação de proteínas específicas da contração, com o conseqüente efeito deletério (ENGLER, 1991).

Há também evidências que a liberação pelo endotélio do fator relaxante dependente do endotélio (FRDE), pode ser inibida pelo radical superóxido (DMAR et al., 1991).

- Liberação de enzimas proteolíticas pelos polimorfonucleares-neutrófilos

É sabido que os polimorfonucleares ativados por fragmentos de Complemento, entre outros, liberam várias enzimas como as proteases neutras do tipo collagenase, elastase, catexina-G, as mieloperoxidases, a lisosima e hidrolases ácidas. Algumas destas enzimas, principalmente as proteases neutras, são capazes de atacar o tecido hospedeiro (WEISSMAN, SMOLEN, KORCHAK, 1980).

Diversos autores sugerem ser este um outro mecanismo da ação deletéria dos PMNs na lesão isquêmica (ENGLER, COVELL, 1987; JOLLY et al., 1986; LITT et al., 1989; MULLANE et al., 1984), sendo que MEHTA e cols. (1989), demonstraram haver um incremento importante na liberação de elastase pelos neutrófilos em pacientes com angina inestável e IAM.

## - Liberação de tromboxano e leucotrienos pelos polimorfonucleares-neutrófilos

Trabalhos experimentais tem mostrado a liberação de tromboxano (GOLDSTEIN et al., 1978) assim como de leucotrienos (AEHRINGHAUS et al., 1982; BORGAERT, citado em GOETZL, PICKETT, 1981) pelos polimorfonucleares ativadas.

Estudos experimentais tem demonstrado os leucotrienos serem potentes constritores de vasos coronários (EZRA et al., 1983). Já o tromboxano tem uma conhecida ação vasoconstritora e pró-agregante plaquetária (GRYGLEWSKI, 1981).

Alguns trabalhos clínicos têm mostrado haver uma ativação dos PMNs no IAM, assim como na angina inestável (BELL et al., 1990; MEHTA et al., 1989; NASH et al., 1989).

## Interação do Sistema de Complemento com as plaquetas

Sabe-se também da interação do SC e as plaquetas. Assim, a agregação plaquetária, a liberação por estas de substâncias vasoativas, e a atividade pró-coagulante das mesmas são potencializados por produtos da ativação do Complemento, assunto revisado recentemente por SIMS e WIEDMER (1991).

## APLICAÇÃO DOS NITRATOS ORGÂNICOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA ISQUÊMICA MIOCÁRDICA

O uso dos nitratos no tratamento da doença isquêmica miocárdica estende-se por mais de cem anos. Em 1847, o trinitrato de glicerila é sintetizado por SOMBRERO. Em 1859, o nitrito de amilo é descoberto e utilizado por GUTHRIE. Em 1867, BRUNTON publica os primeiros artigos sobre a ação do trinitrato de glicerila e o nitrito de amilo. Em 1879, numa série de artigos publicados no LANCET, William Murrel afirmava que o trinitrato de glicerila tem um valor terapêutico no tratamento da angina pectoris. PORJÉ na Suécia, em 1946, e HARRIS nos Estados Unidos, em 1950, demonstram o efeito benéfico do uso do dinitrato de isossorbida (AHLNER et al., 1991; BERLIN, 1987; FYE, 1986).

Posteriormente, outros nitratos foram sintetizados, incluindo o mononitrato-5 de isossorbida e o tetranitrato de pentaeritritol. A molécula de todos estes fármacos contém na sua estrutura uma ou mais ligações éster-nitrato ( $R-O-NO_2$ ) (fig. 2).

Este grupo químico proporciona a estes compostos uma propriedade biológica única, a vasodilatação (AHLNER et al., 1991).

### Mecanismos de ação dos nitratos orgânicos

Os efeitos farmacológicos dos nitratos sobre a musculatura lisa vascular assim como o provável efeito sobre as plaquetas são objeto de intensos estudos.



Foram propostos vários mecanismos para explicar o efeito vasodilatador dos nitratos, assunto revisado por AHLNER e AXELSSON (1987), entre eles:

- inibição da atividade da ATPase nas artérias;
- interação com um receptor específico no músculo liso vascular ;
- hiperpolarização da membrana celular;
- estimulação da liberação de prostaglandinas vasoativas, como por exemplo a prostaciclina .

Atualmente considera-se que estes compostos são na realidade pró-drogas, as quais liberam o óxido nítrico (NO) o qual por sua vez leva a um aumento dos níveis de 3',5'-monofosfato de guanosina (GMPcíclico) intracelular através da estimulação da guanilato ciclase solúvel (AHLNER et al., 1991).

Não é conhecido o mecanismo exato através do qual os nitratos orgânicos causam o relaxamento do músculo liso vascular. É sugerido que este incremento de GMPc teria como consequência a ativação de processos intracelulares, como a redução da concentração de cálcio livre citosólico, alterações na fosforilação de proteínas contráteis, levando assim ao relaxamento do músculo liso vascular (AHLNER, AXELSSON, 1987; AHLNER et al., 1991).

O possível efeito antiagregante plaquetário dos nitratos seria consequência do incremento dos níveis de GMP cíclico intraplaquetário, produto da ativação pelo óxido nítrico (NO) da guanilato ciclase intraplaquetária (GERZER et al., 1989; MELLION et al., 1981).

## Biotransformação dos nitratos orgânicos

O metabolismo dos nitratos ocorre no espaço intracelular, seja no hepatócito, na hemácia ou parede vascular, entre outros, assunto revisado por AHLNER e cols. (1991); mas também no plasma sanguíneo, sendo este um processo muito mais lento do que o intracelular (ARMSTRONG et al., 1980; COSSUM, ROBERTS, 1985; FUNG, 1987; TAYLOR, JOANNIDES, PARKE, 1989).

## Propriedades farmacológicas dos nitratos orgânicos

Estas propriedades estão relacionadas ao efeito vasodilatador dos nitratos assim como a um provável efeito antiplaquetário dos mesmos.

### - Efeito vasodilatador dos nitratos orgânicos

A aplicação terapêutica dos nitratos na doença isquêmica miocárdica está relacionada a esta propriedade vasodilatadora (AHLNER et al., 1991).

Esta vasodilatação dá-se a nível periférico, já que os nitratos causam a dilatação tanto do sistema venoso de capacitância, levando a uma queda da precarga, como dos vasos arteriais, com uma queda da resistência vascular sistêmica que vai acompanhada de uma redução da pressão arterial, e por conseguinte da pós-carga. Estes dois efeitos periféricos levam a uma queda do consumo de oxigênio pelo miocárdio (AHLNER et al., 1991; AMTORP, 1987).

Os nitratos têm também uma ação sobre a circulação coronária com um efeito vasodilatador direto, o que leva a um incremento da oferta de oxigênio para o miocárdio, tanto em coronárias normais (DODGE, BROWN, 1984), como também em coronárias com lesões estenóticas excêntricas (AMTORP, 1987).

#### - Efeito dos nitratos orgânicos sobre a agregação plaquetária

Nos últimos anos tem-se estudado um possível efeito inibitório dos nitratos sobre a agregação plaquetária. Esta propriedade poderia contribuir para os efeitos benéficos dos mesmos no tratamento da doença isquêmica miocárdica, dada implicação da agregação plaquetária na fisiopatologia da mesma (HIRSCH, 1987; NIDORF et al., 1989).

Estudos realizados *in vitro* (AHLNER et al., 1985; DE CATERINA et al., 1984; DE CATERINA et al., 1988; SCHAFER, ALEXANDER, HANDIN, 1980) têm demonstrado que os nitratos orgânicos utilizados em altas concentrações, até 100.000 vezes a concentração terapêutica (AHLNER et al., 1991) mostram um efeito inibitório sobre a agregação plaquetária. No entanto, como foi demonstrado num trabalho recente, a inibição da agregação plaquetária *in vitro* pode ser obtida com concentrações próximas às terapêuticas (CHIRKOV et al., 1992).

Os estudos realizados *in vivo* e *ex vivo* são divergentes. FITZGERALD e cols. (1984) obtiveram um efeito inibitório com a aplicação de altas doses de trinitrato de glicerila, somente em um dos 5 voluntários estudados. Outros autores, usando doses terapêuticas de diversos nitratos demonstram uma atividade antia-

gregante plaquetária dos mesmos (DE CATERINA et al., 1984; DE CATERINA et al., 1990; DIODATI et al., 1990; GERZER et al., 1989).

O mecanismo do efeito inibitório dos nitratos orgânicos sobre a agregação plaquetária é objeto de intensas pesquisas. Alguns estudos sugerem que os nitratos estimulariam a síntese de prostaciclina, assim como inibiriam a síntese de tromboxano (LEVIN et al., 1981). Outros autores não conseguiram demonstrar estes efeitos (FITZGERALD et al., 1984). Outros sugerem que a atividade antiagregante plaquetária dos nitratos e derivados estaria relacionada a um incremento de 3',5'-monofosfato de guanosina (GMPc) intraplaquetário (GERZER et al., 1989; MELLION et al., 1981).

#### Aplicações clínicas dos nitratos orgânicos

Os nitratos têm sua aplicação no tratamento da doença isquêmica coronária (AHLNER et al., 1991; CORWIN, REIFFEL, 1985; MANDECKI, 1987; SHUB, VLIETSTRA, McGOON, 1985; SILBER, 1990; WÓJCICKI, 1986), assim como no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (AHLNER et al., 1991; DUPUIS et al., 1990).

Dentro da terapia da doença isquêmica coronária, os nitratos tem seu lugar no tratamento de todos os quadros isquêmicos. Assim, vários estudos mostram o efeito benéfico dos nitratos no tratamento dos ataques isquêmicos agudos (NYBERG, 1987); da angina estável (BELDER, SCHNEEWEISS, CAMM, 1990; BEYERLE, REINIGER, RUDOLPH, 1990; MARANHÃO, 1986; MARTEN, WEISS, HAASE, 1984; RAMIRES et al., 1992; REHNQVIST et al., 1987; SHUB, 1990); no tratamento da isquemia silenciosa (CHATTERJEE, 1987; FENG, FENG, SCH-

NEEWEISS, 1990); da angina de Prinzmetal (NORDLANDER, 1987; PRAZERES DE SÁ, SOARES DA COSTA, RIBEIRO, 1989), da angina inestável (KAPLAN et al., 1983; MIKOLICH et al., 1980; MUNGER, OH, 1990; NORDLANDER, 1987), e do infarto agudo de miocárdio (BUSSMANN et al., 1981a; BUSSMANN, 1981b; BUSSMANN, ROSE, 1984; CHICHE et al., 1977; DERRIDA et al., 1978; FLAHERTY et al., 1975; FLAHERTY et al., 1976; FLAHERTY, 1987, GUNNAR et al., 1990; JAFFE et al., 1983; JUGDUTT, WARNICA, 1988; PIEGAS et al., 1989).

## ÓXIDO NÍTRICO

Diversas substâncias que liberam óxido nítrico, assim como as possíveis funções deste, são objeto de intensas pesquisas, (MONCADA, 1990; MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991). Estudos analisam as possíveis fontes do NO no organismo (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1989; PALMER, MONCADA, 1989), assim como as suas possíveis funções (AMEZCUA et al; 1989; BRUNE, LAPETINA, 1989; FERREIRA, DUARTE, LORENZETTI, 1991; MONCADA, PALMER, HIGGS, 1989; PALMER, FERREIGE, MONCADA, 1987; RESS, PALMER, MONCADA, 1989), inclusive no mecanismo de defesa inespecífica (LIEW, COX, 1991).

Há evidências da inibição e citoproteção dos polimorfonucleares leucócitos por estimuladores da guanilato e adenilato ciclasas (KORBUT, TRABKA-JANIK; GRYGLEWSKI, 1989; SCHRODER et al., 1990).

## ANÁLISE DO EFEITO ANTICOMPLEMENTAR DE DETERMINADA SUBSTÂNCIA

Uma determinada substância pode ter sobre a cascata de Complemento uma ação inibitória, bloqueando a qualquer nível o processo de ativação da mesma, ou pelo contrário, uma ação pró-complementar ativando a cascata, seja pela via clássica ou alternativa.

Uma substância com atividade inibitória, bloqueia a ativação da cascata de Complemento causada por um determinado ativador, podendo ser analisada a quantidade de moléculas restantes que não foram consumidas, assim como a quantidade de produtos de degradação formados até o inibidor causar seu efeito.

Já uma substância pró-complementar leva ao consumo de uma determinada quantidade dos componentes do Complemento num determinado período de tempo, com uma conseqüente formação de diversos produtos de clivagem dos mesmos.

Então, a análise do efeito de determinada substância sobre a cascata de Complemento pode ser feita de duas maneiras:

a) através da quantificação tanto dos níveis restantes dos diferentes componentes do Complemento, assim como dos distintos fragmentos resultantes da clivagem dos componentes iniciais.

A quantificação das diferentes moléculas é feita com o uso de anticorpos monoclonais através dos seguintes métodos:

- técnicas imuno-químicas, como por exemplo a imuno-eletroforese quantitativa em "foguete" (BOURKE, MOSS, MAINI, 1982; MILGROM et al., 1980; NITSCHKE et al., 1981);
- ensaio imunoenzimático (ELISA) e radioensaio (VAZ, 1989);

- nefelometria (RUDDY, 1985)

Estes ensaios não fornecem informações a respeito do estado funcional do Complemento.

b) através da análise do efeito da substância em estudo, sobre uma das várias atividades biológicas do Complemento, como por exemplo a fagocitose, quimiotaxia, ou lise celular. A análise desta última examina a capacidade lítica do Complemento sobre hemácias, podendo ser avaliado o sistema como um todo, ou cada um dos seus componentes.

Dois tipos de métodos são utilizados para a avaliação da atividade lítica do Complemento (BARBOSA, 1983; FERRIANI, 1988):

- o método estático, que é uma análise de ponto final, o qual determina a quantidade de soro necessária para causar a lise de 50% das hemácias de uma suspensão destas. Diferentes diluições de Complemento são incubadas com o sistema indicador de hemólise por um determinado tempo, após o qual é determinada a quantidade de hemólise obtida com cada diluição em estudo.
- o método cinético, onde é medido o tempo necessário para que uma quantidade fixa de Complemento cause a lise de uma determinada quantidade de hemácias.

Podem ser avaliadas ambas as vias de ativação do Sistema de Complemento: a via clássica, utilizando-se como sistema indicador de hemólise hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpo (hemolisina), suspensas em tampões que contenham íons cálcio e magnésio, o anticorpo ligado à hemácia ativa a via clássica do Complemento (MARGNI, 1982); a via alternativa, utilizando-se como sistema indicador de hemólise hemácias de coelho não sensi-

bilizadas, com uma conhecida propriedade de ativação da via alternativa (PLATTS-MILLS, ISHIZAKA, 1974), e tampões quelantes de cálcio, a fim de bloquear a ativação da via clássica, acrescidos de magnésio.

O método cinético tem uma reprodutibilidade similar ao estático, tendo sobre estes algumas vantagens como a sua simplicidade e maior rapidez de execução (BARBOSA, 1983).

No presente estudo aplicou-se o método cinético, através do qual é medida a atividade lítica do Complemento, após interação deste com a substância em estudo, determinando-se o tempo necessário para ocorrer a lise de 50% de hemácias ( $T_{1/2}$ ). Correlaciona-se este tempo ( $T_{1/2}$ ) com a quantidade de Complemento restante, funcionalmente ativo, após a interação com a substância em estudo.

Este método foi utilizado anteriormente num estudo da atividade anticomplementar de várias substâncias, demonstrando uma reprodutibilidade adequada (BARBOSA, 1983).

**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Dadas as evidências de que a isquemia aguda e o infarto de miocárdio iniciam uma resposta inflamatória aguda, a qual inclui a ativação do Sistema de Complemento, e o fato da aplicação dos nitratos orgânicos estar indicada no tratamento dos mesmos, o presente trabalho tem como objetivo analisar o efeito do mononitrato-5 de isossorbida sobre o processo de ativação da cascata de Complemento *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 COMPLEMENTO HUMANO (C.H.)

Como fonte de Complemento, utilizou-se uma mistura de soro humano normal (SHN) <sup>1</sup>.

Foram colhidos 20 ml de sangue de doadores voluntários, funcionários, estudantes e residentes, junto ao ponto de coleta do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e ao Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Após a coleta, sem anti-coagulante, as amostras de sangue foram mantidas em repouso à temperatura ambiente durante 90 minutos, para retração do coágulo. Após deslocamento do coágulo, procedeu-se a separação do soro por centrifugação (Centrifuge Damon IEC modelo DPR 6000, USA) a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Após a mistura dos soros separou-se alíquotas de 1 ml em tubos de polipropileno e armazenados a -70°C (Bio-Freezer Forma Scientific, USA), até o momento do uso.

### 2 MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA <sup>2</sup>

90 mg do sal, mononitrato-5 de isossorbida absorvido em cloreto de sódio numa relação 9:1, peso a peso, eram diluídas em

<sup>1</sup> Este trabalho foi aprovado pela Comissão de ética Médica e pela Comissão Científica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

<sup>2</sup> Laboratórios NOBEL CHEMICAL - Inglaterra.

1 ml de água destilada, obtendo-se assim 81 mg de mononitrato-5 de isossorbida diluídas em solução fisiológica, (solução estoque). A partir desta solução eram preparadas as diferentes diluições da droga mediante a adição de solução fisiológica isotônica. Condutibilidade da solução 14,4 mS (Konduktometer E 527 MetroHm Herisau - Suíça).

### 3 SOLUÇÕES UTILIZADAS <sup>a</sup>

#### a) Solução Tampão Trietanolamina-Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup> (TEA-Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>)

Trietanolamina .....	28,00 ml	
NaCl .....	75,00 g	
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	1,23 g	
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O .....	0,22 g	
Azida Sódica .....	0,50 g	
HCl .....	q.s.p.	pH final 7,4
Água destilada .....	q.s.p.	1000 ml

Esta solução era diluída 10 vezes para a preparação da solução trabalho, com uma concentração final de íons Ca<sup>++</sup> igual a  $1,5 \times 10^{-4}$  M, e de íons Mg<sup>++</sup> igual a  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Acrescentava-se 0,1% de gelatina a pH 7,4.

<sup>a</sup> Os produtos químicos utilizados e a sua origem estão relacionados no Anexo I.

b) Solução Tampão Trietanolamina-Ácido Etilenodiamino-  
tetracético

(TEA-EDTA)

Trietanolamina .....	28,00 ml	
EDTA .....	37,20 g	
Azida Sódica .....	0,50 g	
NaCl .....	75,00 g	
HCl .....	q.s.p.	pH final 7,4
Água destilada .....	q.s.p.	1000 ml

Esta solução era diluída 10 vezes para a preparação da solução trabalho, com uma concentração final de EDTA igual a 0,01 M. Acrescentava-se 0,1% de gelatina a pH 7,4.

c) Solução Tampão Trietanolamina-Mg<sup>++</sup>

(TEA-Mg<sup>++</sup>)

Trietanolamina .....	28,00 ml	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	4,93 g	
NaCl .....	75,00 g	
Azida Sódica .....	0,50 g	
HCl .....	q.s.p.	pH final 7,4
Água destilada .....	q.s.p.	1000 ml

Esta solução era diluída 10 vezes para a preparação da solução trabalho, com uma concentração final de Mg<sup>++</sup> igual a 0,002 M. Acrescentava-se 0,1% de gelatina a pH 7,4.

d) Solução Tampão Trietanolamina-Ácido Etileno Glicol-Bis  
(B-Aminoetil éter) N, N, N', N'-Tetracético-Mg<sup>++</sup>

(TEA-EGTA-Mg<sup>++</sup>)

Trietanolamina .....	28,00 ml
EGTA .....	30,42 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	4,93 g
NaCl .....	75,00 g
Azida Sódica .....	0,50 g
HCl .....	q.s.p. pH final 7,4
Água destilada .....	q.s.p. 1000 ml

Esta solução era diluída 10 vezes para a preparação da solução trabalho, com uma concentração final de Mg<sup>++</sup> igual a 0,002 M e de EGTA igual a 0,008 M. Acrescentava-se 0,1% de gelatina a pH 7,4. Todas as soluções eram conservadas a 4°C.

#### 4 HEMÁCIAS DE CARNEIRO

Sangue de carneiro, colhido por punção da veia jugular do animal, foi obtido junto ao Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O sangue foi diluído em igual volume de suspensão de Alsever acrescida de azida sódica a 0,05%, e armazenado a 4°C. Para os ensaios, foi preparada uma suspensão de hemácias a 5% em tampão TEA-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup> acrescido de 0,1% de gelatina. No dia do uso, as hemácias eram lavadas 3 vezes em tampão TEA-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup> acrescido de 0,1% de gelatina. Esta suspensão foi utilizada dentro de 6 semanas após a colheita.

## 5 HEMOLISINA

Foi utilizada uma solução de hemolisina obtida junto ao Laboratório de Imunologia Humoral do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, com um título de anticorpos hemolíticos de 1:800.

## 6 HEMÁCIAS DE COELHO

Sangue de coelho, colhido por punção cardíaca, foi obtido junto ao Biotério do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Colhia-se aproximadamente 10 ml de sangue de cada um de 3 coelhos adultos em BRK (volume a volume). Após filtração em gaze, acrescentava-se igual volume de tampão TEA-EDTA, incubando-se a 37°C por 15 minutos (Banho-Maria Unitemp, Fanem Ltda, São Paulo - Brasil). Após isto as hemácias eram separadas por centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos, e lavadas em tampão TEA-Mg<sup>++</sup> por 3 vezes.

As hemácias foram ressuspendidas ao volume original da colheta com Alsever acrescido de ázida sódica a 0,05%, separadas em alíquotas de 2 ml em tubos de ensaio e conservadas a 4°C. No dia do uso, eram lavadas 3 vezes em tampão TEA-EGTA-Mg<sup>++</sup> acrescido de 0,1% de gelatina. Esta suspensão era utilizada dentro de 2 semanas após a colheita.

## 7 SISTEMA INDICADOR DE HEMÓLISE

### 7.1 VIA CLÁSSICA - Sensibilização de Hemácias de Carneiro

Foi preparada uma mistura, volume a volume, de uma suspensão de hemácias de carneiro a 5% contendo aproximadamente  $1,2 \times 10^9$  hemácias por ml de tampão, com uma solução de hemolisina. A mistura era estabilizada por 10 minutos a temperatura ambiente.

As medidas da concentração de hemácias eram realizadas em espectrofotômetro (Coleman Instruments Inc. Model SA no A-35671 - Maywood, I 11, USA).

A suspensão de hemácias sensibilizadas foi diluída em tampão TEA-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup> de maneira tal que 0,4 ml da mesma mais 2,5 ml da solução diluente apresentasse uma densidade ótica (DO) final de  $0,8 \pm 0,04$ , medida em espectrofotômetro (340 Spectrophotometer Sequoia - Turner Corporation), em comprimento de onda de 700 nm.

### 7.2 VIA ALTERNATIVA

Foi preparada uma suspensão de hemácias de coelho não sensibilizadas diluídas em tampão TEA-EGTA-Mg<sup>++</sup> em quantidade suficiente para que 0,4 ml da suspensão final mais 2,5 ml da solução diluente apresentasse uma DO final de  $0,8 \pm 0,04$ , medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 700 nm.

Para a coleta do soro humano, hemácias e a preparação do sistema indicador de hemólise, foram seguidas indicações previamente estabelecidas (BARBOSA, 1983; FERRIANI, 1988).

## 8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA

Utilizou-se o método cinético, modificado, descrito por BARBOSA (1983), que consiste em estabelecer o tempo necessário para que uma determinada solução de Complemento cause a lise de 50% das hemácias de uma suspensão destas.

O método está baseado na medida contínua da absorvância de suspensões de hemácias que sofrem a lise mediada pelo Complemento.

Esta hemólise é analisada num espectrofotômetro no qual é medida a absorvância da suspensão lendo-se a DO em comprimento de onda de 700 nm.

As suspensões das hemácias são turvas devido à dispersão da luz incidente. Com a lise, há uma queda da intensidade da dispersão da luz, e por conseguinte da absorvância, com um incremento da luz transmitida (BOACKLE, PRUITT, 1974).

A substância cuja atividade anticomplementar é estudada, é incubada com a solução de Complemento por um tempo determinado, após o qual é adicionado um volume determinado da suspensão de hemácias, medindo-se a seguir o tempo necessário para que aconteça a lise de 50% das hemácias.

Ao espectrofotômetro é acoplado um registrador gráfico (Servogor 210 - BBC Metrawatt/Goerz, Alemanha), permitindo calcular, a partir do gráfico, o tempo necessário para que aconteça a lise de 50% das hemácias da suspensão ( $T_{1/2}$ ).

## 9 EXPERIMENTO I - DETERMINAÇÃO DA C-50

Com uma solução determinada de Complemento, foram incubadas soluções de mononitrato-5 de isossorbida em diferentes concentrações, a fim de determinar a concentração da droga capaz de inibir em 50% a atividade hemolítica do Complemento. (pH da mistura: 7,2)

### 9.1 VIA CLÁSSICA

#### - Solução de Complemento

Foi utilizada uma solução de Complemento contendo 45 ul de SHN por ml de tampão TEA-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>, mantida a 0°C em banho de gelo.

#### - Mononitrato-5 de isossorbida

Foram utilizadas diferentes diluições da droga, em solução fisiológica isotônica.

#### - Sistema indicador de hemólise

Foi utilizada uma suspensão de hemácias de carneiro sensibilizadas com uma DO final de  $0,8 \pm 0,04$ .

### - Protocolo experimental

Ao início do experimento a solução de Complemento era distribuída em 6 cubetas num volume de 1,5 ml para cada cubeta, sendo pré-incubada a 37°C por 10 minutos no porta cubetas do espectofotômetro termorregulado (fig. 3).

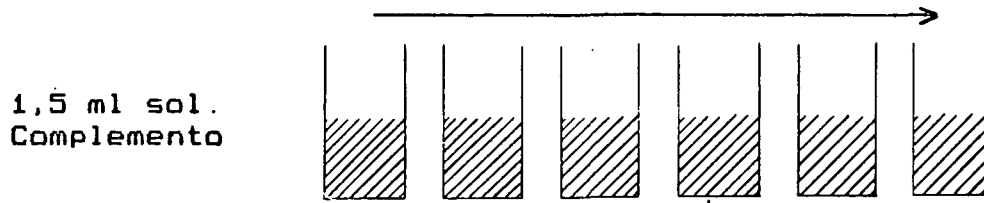
Em seguida era adicionado 1 ml da solução controle, solução fisiológica isotônica, na 1ª cubeta, sendo que nas seguintes eram adicionadas as diferentes diluições da droga em estudo em sentido crescente, todas num volume de 1 ml. As concentrações finais desta, em sentido crescente, eram de 0,0212 M, 0,0425 M, 0,0850 M, 0,113 M e 0,170 M.

Esta mistura era incubada por 5 minutos a 37°C, após os quais eram adicionados 0,4 ml do sistema indicador de hemólise, o qual era mantida a 37°C até a sua aplicação. A ordem de colocação do sistema indicador era do tubo de maior concentração da droga ao tubo controle.

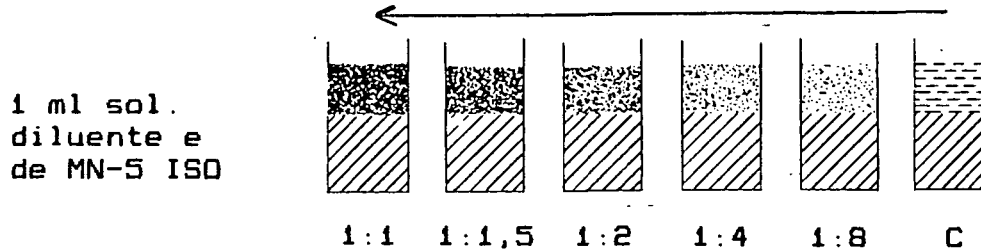
O zero da turvação era ajustado utilizando-se o tubo controle antes da colocação do sistema indicador de hemólise.

Em seguida era lida a DO da solução controle até esta atingir 50% do seu valor inicial, mudando-se então imediatamente a posição do porta-cubetas a fim de proceder a leitura da seguinte cubeta, repetindo-se o procedimento toda vez que a DO atingisse os 50% do seu valor inicial.

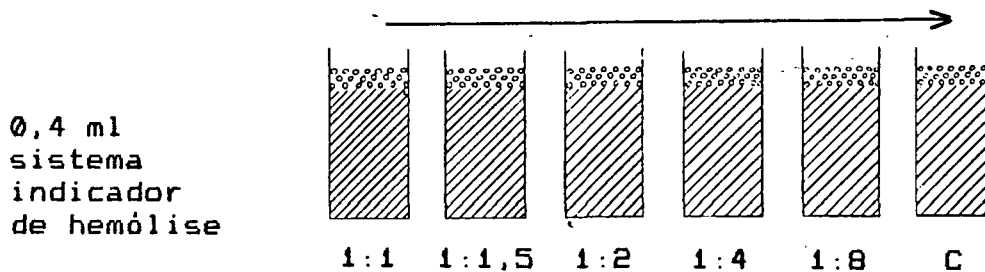
1g) Pré-incubação da solução de Complemento a 37°C por 10 min.



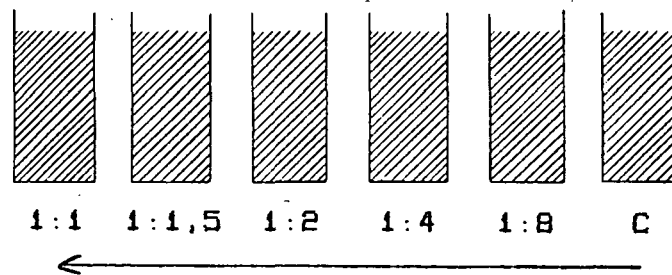
2g) Adição da solução diluente e das soluções de MN-5 ISO em concentrações crescentes (1 ml) e incubação por 5 min. a 37°C.



3g) Adição de 0,4 ml do sistema indicador de hemólise.



4g) Leitura da DO a 700 nm de cada mistura, até atingir 50% do seu valor inicial, procedendo-se então a leitura da seguinte mistura.



LEGENDA:





-  Solução de Complemento
-  Solução salina
-  Soluções de MN-5 ISO
-  Sistema indicador de hemólise

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO I - VIA CLÁSSICA

Era feito um registro gráfico a partir do qual era calculado o tempo necessário para acontecer a hemólise de 50% das hemácias da suspensão (fig. 4).

Este experimento foi repetido 3 vezes.

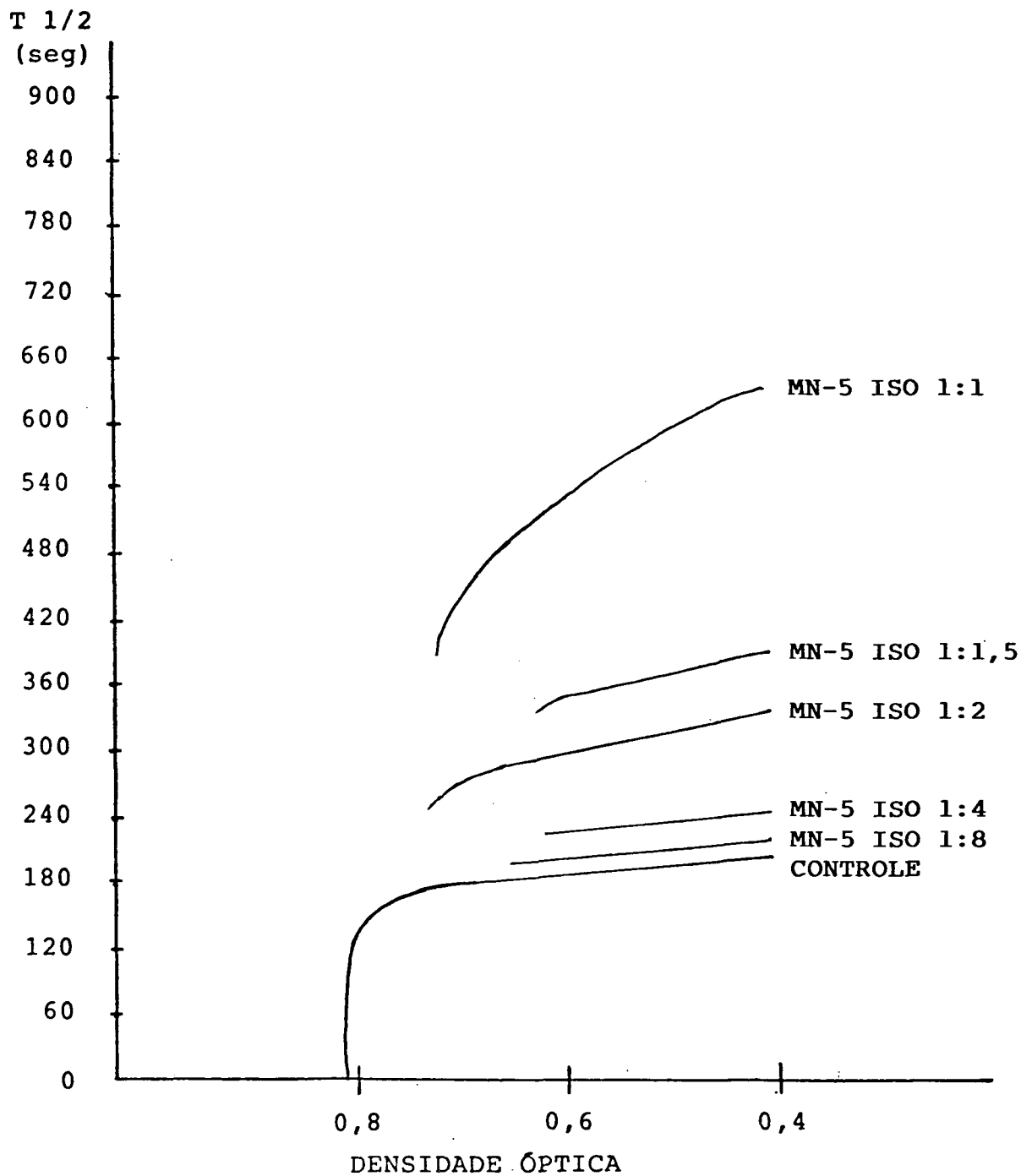


FIGURA 4 - DETERMINAÇÃO DO T 1/2 - VIA CLÁSSICA

## 9.2 VIA ALTERNATIVA

### - Solução de Complemento

Foi utilizada uma solução de Complemento contendo 380 ul de SHN por ml de tampão TEA-EGTA-Mg<sup>++</sup>, mantida a 0°C em banho de gelo.

### - Mononitrato-5 de isossorbida

Foram utilizadas diferentes diluições da droga em estudo em solução fisiológica isotônica.

### - Sistema indicador de hemólise

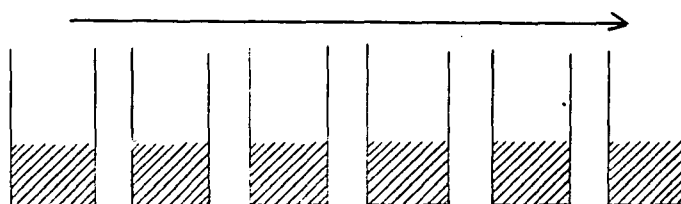
Foi utilizada uma suspensão de hemácias de coelho em tampão TEA-EGTA-Mg<sup>++</sup> acrescido de 0,1% de gelatina, com uma DO final de  $0,8 \pm 0,04$ .

### - Protocolo experimental

Realizou-se um procedimento similar ao do aplicado para o estudo da via clássica, sendo que os volumes utilizados eram de 1,2 ml da solução de Complemento, 1,3 ml da solução controle e da droga em estudo. As concentrações finais desta, em sentido crescente, eram de 0,0275 M, 0,055 M, 0,110 M, 0,146 M e 0,220 M. Após 5 minutos de incubação a 37°C, eram adicionados 0,4 ml do sistema indicador de hemólise mantido a 37°C (fig. 5).

1g) Pré-incubação da solução de Complemento a 37°C por 10 min.

1,2 ml sol.  
Complemento



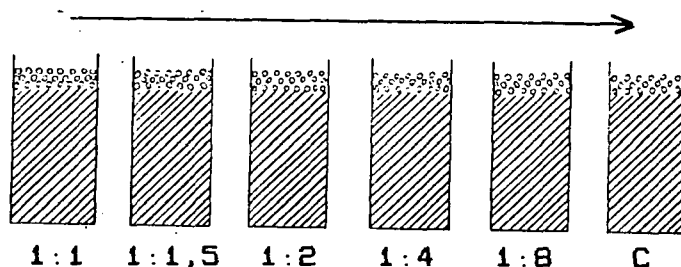
2g) Adição da solução diluente e das soluções de MN-5 ISO em concentrações crescentes (1,3 ml) e incubação por 5 min. a 37°C.

1,3 ml sol.  
diluente e  
de MN-5 ISO

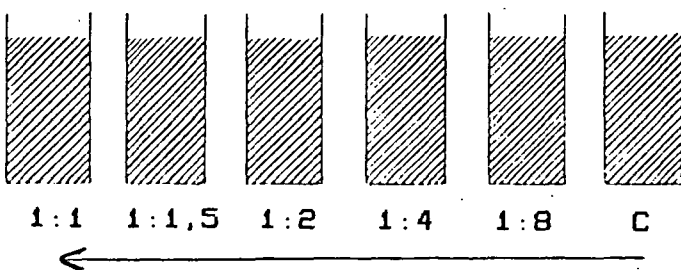


3g) Adição de 0,4 ml do sistema indicador de hemólise.

0,4 ml  
sistema  
indicador  
de hemólise



4g) Leitura da DO a 700 nm de cada mistura, até atingir 50% do seu valor inicial, procedendo-se então a leitura da seguinte mistura.



LEGENDA:





-  Solução de Complemento
-  Solução salina
-  Soluções de MN-5 ISO
-  Sistema indicador de hemólise

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO I - VIA ALTERNATIVA

Foi também feito um registro gráfico para o posterior cálculo do tempo necessário para a hemólise de 50% das hemácias da suspensão (fig. 6).

Este experimento foi repetido 3 vezes.

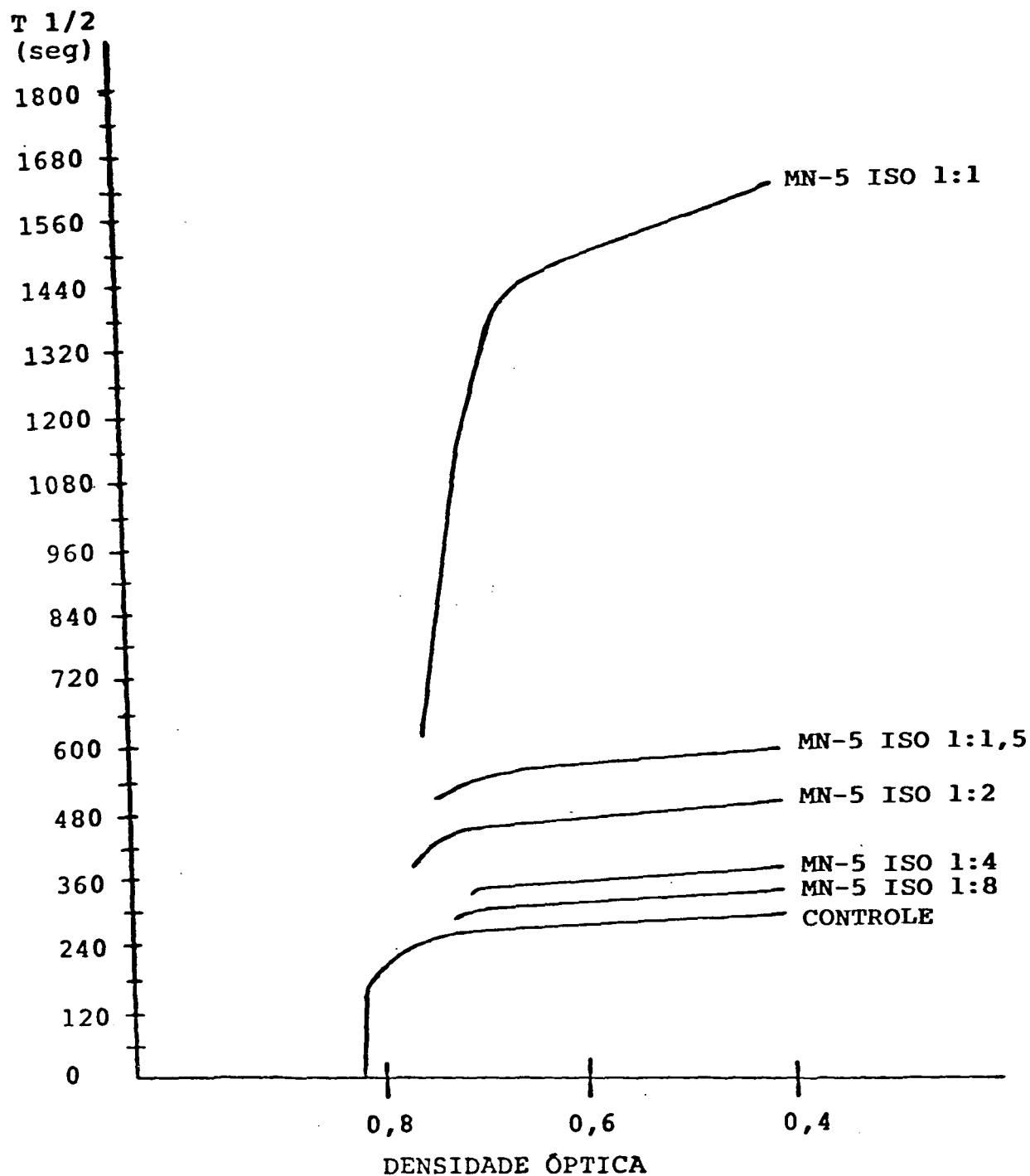


FIGURA 6 - DETERMINAÇÃO DO T 1/2 - VIA ALTERNATIVA

## 10 EXPERIMENTO II - ANÁLISE DO EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA

Uma vez obtida a concentração da droga com um efeito inibitório aproximado de 50% para determinada solução de Complemento, foi analisado o efeito do tempo de incubação utilizando-se uma mesma solução de Complemento e a solução da droga sempre na mesma concentração.

### 10.1 VIA CLÁSSICA

#### - Solução de Complemento

Foi utilizada uma solução de Complemento contendo 45 ul de SHN por ml de tampão TEA-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>, mantida a 0°C em banho de gelo.

#### - Mononitrato-5 de isossorbida

Foi utilizada a concentração da droga com a qual no experimento anterior obteve-se uma inibição aproximada a 50%.

#### - Sistema indicador de hemólise

Foi utilizada a suspensão de hemácias de carneiro sensibilizadas similar à do experimento I, com uma DO final de 0,8 ± 0,04.

## - Protocolo experimental

Ao início do experimento, a solução do Complemento era distribuída em 2 cubetas num volume de 1,5 ml para cada cubeta, sendo pré-incubada a 37°C por 10 minutos no porta cubetas do espectrofotômetro termorregulado, procedendo-se depois a adição de 1 ml da solução controle na 1ª cubeta e de 1 ml da solução da droga na 2ª. A concentração final da droga era de 0,113 M. Incubou-se a seguir estas duas misturas a 37°C por 0 min.

Após este tempo de incubação, eram adicionados 0,4 ml do sistema indicador de hemólise, procedendo-se em seguida a leitura da DO, iniciando-se esta pela solução controle até atingir 50% do valor inicial, mudando-se então imediatamente a posição do porta-cubetas a fim de proceder a leitura da DO da solução-estudo.

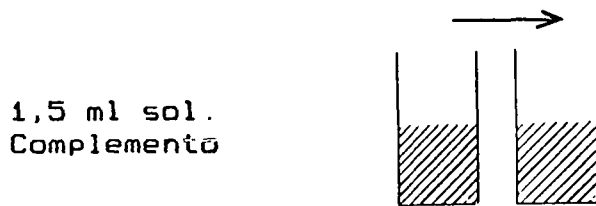
O zero da turvação era ajustado utilizando-se o tubo controle antes da colocação do sistema indicador de hemólise (fig. 7).

O tempo necessário para acontecer a lise de 50% das hemácias da suspensão era calculado a partir de registro gráfico.

Este procedimento repetiu-se para os seguintes tempos de incubação: 5, 15, 30, 60 e 120 min.

Este experimento foi repetido 2 vezes para cada tempo de incubação.

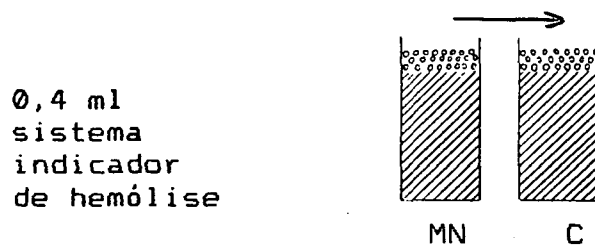
1g) Pré-incubação da solução de Complemento a 37°C por 10 min



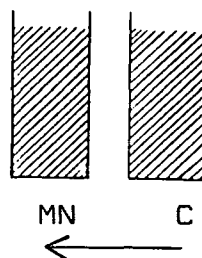
2g) Adição da solução diluente e da solução de MN-5 ISO numa concentração de 0,113 M e incubação por 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min. a 37°C.



3g) Adição de 0,4 ml do sistema indicador de hemólise.



4g) Leitura da DO a 700 nm da solução controle, até atingir 50% do seu valor inicial, procedendo-se então a leitura da solução estudo.



LEGENDA:





-  Solução de Complemento
-  Solução salina
-  Solução de MN-5 ISO
-  Sistema indicador de hemólise

FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO II - VIA CLÁSSICA

## 10.2 VIA ALTERNATIVA

### - Solução de Complemento

Foi utilizada uma solução de Complemento contendo 380  $\mu$ l de SHN por ml de tampão TEA-EGTA-Mg<sup>++</sup>.

### -Mononitrato-5 de isossorbida

Foi utilizada a concentração da droga com a qual no experimento I obteve-se uma inibição aproximada de 50%.

### -Sistema indicador de hemólise

Foi utilizada uma suspensão de hemácias de coelho similar à utilizada no experimento I, com uma DO final de  $0,8 \pm 0,04$ .

### - Protocolo experimental

Realizou-se um procedimento similar ao do aplicado para a via clássica, sendo que foi utilizado um volume de 1,2 ml da solução de Complemento e de 1,3 ml da solução do MN-5 ISO. A concentração final da droga era de 0,146 M. Adicionou-se a seguir 0,4 ml da suspensão de hemácias de coelho (fig. 8).

A leitura da DO foi realizada da mesma maneira que para o experimento anterior, obtendo-se um registro gráfico para o cálculo do T 1/2.

Este experimento foi repetido por 3 vezes.

1g) Pré-incubação da solução de Complemento a 37°C por 10 min.



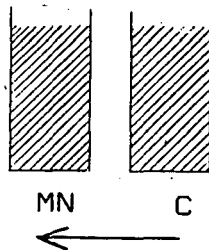
2g) Adição da solução diluente e da solução de MN-5 ISO numa concentração de 0,146 M e incubação por 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min. a 37°C.



3g) Adição de 0,4 ml do sistema indicador de hemólise.



4g) Leitura da DO a 700 nm da solução controle, até atingir 50% do seu valor inicial, procedendo-se então a leitura da solução estudo.







- LEGENDA:
-  Solução de Complemento
  -  Solução salina
  -  Solução de MN-5 ISO
  -  Sistema indicador de hemólise

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO II - VIA ALTERNATIVA

## 11 EXPERIMENTO III - EFEITO INIBITÓRIO DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO

Foram realizados experimentos similares ao experimento II, utilizando diferentes soluções de Complemento.

### 11.1 VIA CLÁSSICA

Para a via clássica foram preparadas duas soluções, de 33 ul de SHN por ml de tampão TEA-Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup> e de 26,5 ul por ml de tampão. O procedimento seguido foi similar ao do experimento II, utilizando-se a mesma concentração da droga e a mesma suspensão de hemácias sensibilizadas.

Os tempos de incubação da droga com as diferentes soluções de Complemento foram de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min, para cada solução.

Este experimento foi repetido por 2 vezes.

Estes resultados foram comparados com os obtidos no experimento II

### 11.2 VIA ALTERNATIVA

Para a via alternativa foi preparada uma solução de Complemento contendo 580 ul de SHN por ml de tampão TEA-EGTA-Mg<sup>++</sup>. O procedimento seguido foi similar ao do experimento II, utilizando-se a mesma concentração da droga e a mesma suspensão de hemácias de coelho.

Os tempos de incubação da droga com as diferentes solu-

ções de Complemento foram de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min, para cada solução.

Este experimento foi repetido por 3 vezes.

Estes resultados foram comparados com os obtidos no experimento II.

## 12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados de  $T_{1/2}$  e de % de inibição obtidos foi feita através dos seguintes cálculos: médias, desvios-padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, variâncias, análise de correlação e regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, com o cálculo do coeficiente de correlação linear de Person ( $r$ ) e o coeficiente de explicação ou determinação ( $r^2$ ).

O teste de similaridade de variâncias (teste de COCHRAN) foi utilizado para testar a homogeneidade das variâncias para a análise da reprodutibilidade do método, sendo considerada significativa uma probabilidade menor a 5% (COSTA NETO, 1977).

**RESULTADOS**

## RESULTADOS

### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA

Experimentos preliminares foram realizados a fim de determinar a concentração da droga capaz de inibir 50% da atividade hemolítica do Complemento. Estes experimentos iniciais foram realizados tanto para a via clássica quanto para a alternativa. A partir destes experimentos escolheu-se as diluições da droga que produzissem inibições menores e maiores de 50%.

#### 1 EXPERIMENTO I - DETERMINAÇÃO DA C-50

A C-50 foi definida como a concentração do MN-5 ISO capaz de inibir 50% da atividade hemolítica do Complemento, nas condições padronizadas.

##### 1.1 Via Clássica

A tabela 5 mostra os resultados do Experimento I obtidos com diferentes concentrações de MN-5 ISO. São apresentados os T 1/2 e as respectivas porcentagens de inibição obtidos com cada concentração (média aritmética de 3 experimentos).

Tabela 5 - T 1/2 e porcentagens de inibição obtidos com diferentes concentrações de MN-5 ISO sobre uma solução de Complemento (45 ul de SHN/ml tampão) - Via clássica.

CUBETA	CONCENTRAÇÃO	T 1/2 (seg)	% INIBIÇÃO
	MN-5 ISO (Molar)	$\bar{X} \pm$ EPM	$\bar{X} \pm$ EPM
C	-	185 $\pm$ 6,56	-
5	0,0212	200 $\pm$ 8,19	7,50 $\pm$ 0,58
4	0,0425	226 $\pm$ 7,00	18,17 $\pm$ 0,44
3	0,0850	304 $\pm$ 12,29	39,17 $\pm$ 0,60
2	0,1130	368 $\pm$ 10,44	50,00 $\pm$ 0,50
1	0,1700	623 $\pm$ 19,15	70,00 $\pm$ 1,17

C - Controle

T - Tempo de incubação a 37°C

$\bar{X} \pm$  EPM - Média aritmética  $\pm$  erro padrão da média

FONTE: Tabela 15 (anexo 2)

Com base nestes dados foi construído um gráfico (fig. 9), projetando-se em abcissa as diferentes concentrações da droga, e em ordenada os percentuais de inibição da atividade hemolítica da solução de Complemento, obtendo-se uma curva que é característica para a substância em estudo. A partir desta curva determinou-se a C-50 que está representada pelo ponto da abcissa, correspondente à intersecção da curva com uma linha paralela ao eixo x e originada na ordenada, no ponto correspondente à inibição de 50%.

A C-50 foi também determinada matematicamente em base à equação  $Y = a + b \cdot X$ , onde:

Y = % de inibição da atividade hemolítica da solução de Complemento causada por X da substância em estudo.

X = quantidade de substância para Y % de inibição da atividade hemolítica da solução de Complemento;

a = intersecção com o eixo da ordenada;

b = inclinação da relação linear entre X e Y;

## 1.2 Via Alternativa

Procedeu-se da mesma forma que para o cálculo da C-50 da via clássica. Assim, a tabela 6 mostra os T 1/2 e as respectivas percentagens de inibição obtidos com diferentes concentrações de MN-5 ISO (média aritmética de 3 experimentos).

Tabela 6 - T 1/2 e percentagens de inibição obtidos com diferentes concentrações de MN-5 ISO sobre uma solução de Complemento (380 ul de SHN/ml tampão) - Via alternativa.

CUBETA	CONCENTRAÇÃO	T 1/2 (seg)		% INIBIÇÃO	
	MN-5 ISO (Molar)	$\bar{X} \pm$	EPM	$\bar{X} \pm$	EPM
C	-	300 $\pm$	3,46	-	
5	0,0275	346 $\pm$	2,00	13,33 $\pm$	0,67
4	0,0550	386 $\pm$	2,00	22,17 $\pm$	1,09
3	0,1100	494 $\pm$	8,72	39,33 $\pm$	0,88
2	0,1460	592 $\pm$	14,42	49,33 $\pm$	1,67
1	0,2200	1522 $\pm$	135,15	80,00 $\pm$	1,76

C - Controle

$\bar{X} \pm$  EPM - Média aritmética  $\pm$  erro padrão da média

FONTE: Tabela 16 (anexo 3)

A figura 10 mostra a curva obtida com estes dados, calculando-se a partir dela a C-50 para a via alternativa, aplicando-se o mesmo procedimento usado para a via clássica.

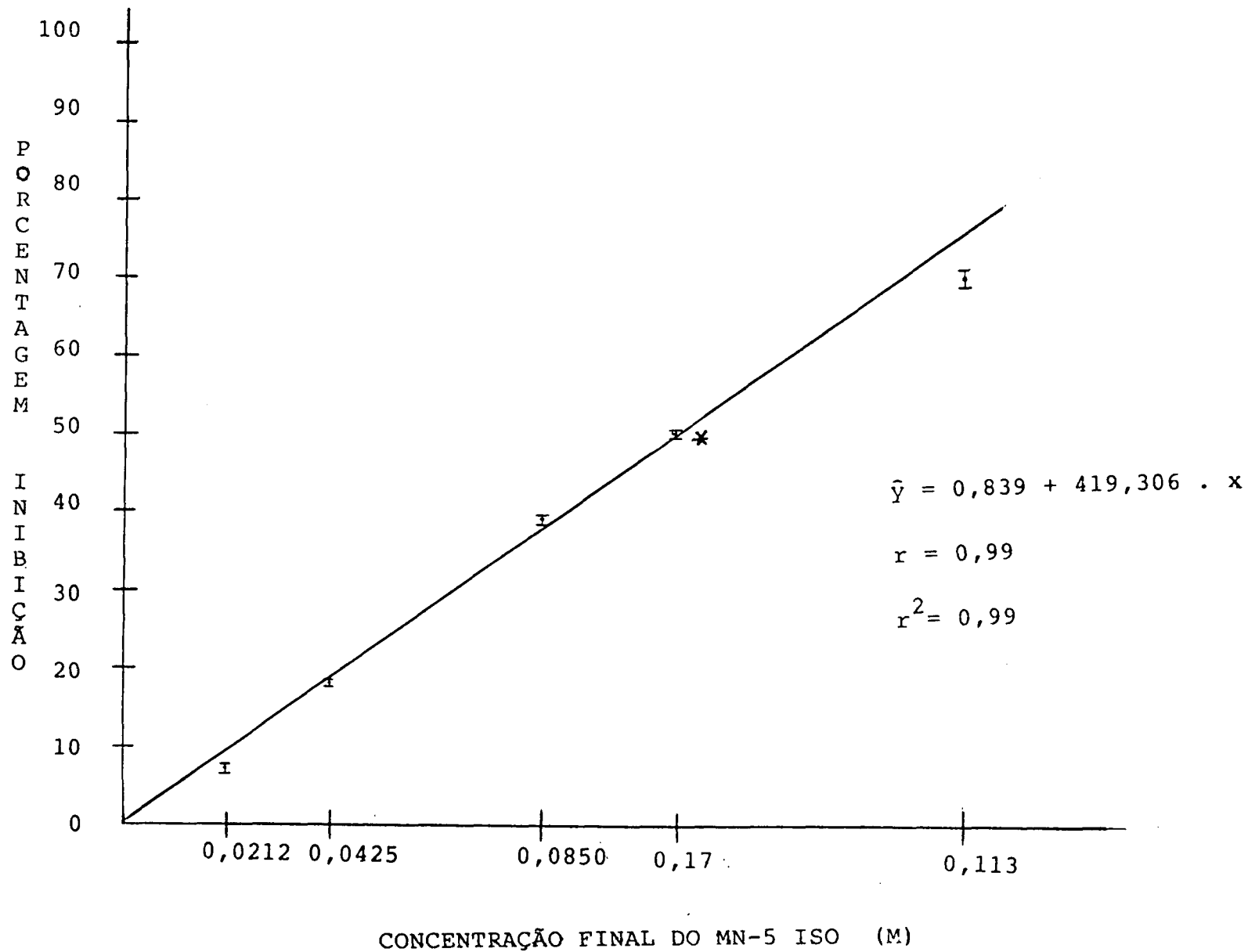


FIGURA 9 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO COMPLEMENTO OBTIDA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MN-5 ISO. DETERMINAÇÃO DA C-50 (\*) - VIA CLÁSSICA. Os dados são apresentados como a média aritmética  $\pm$  EPM (3 experimentos).

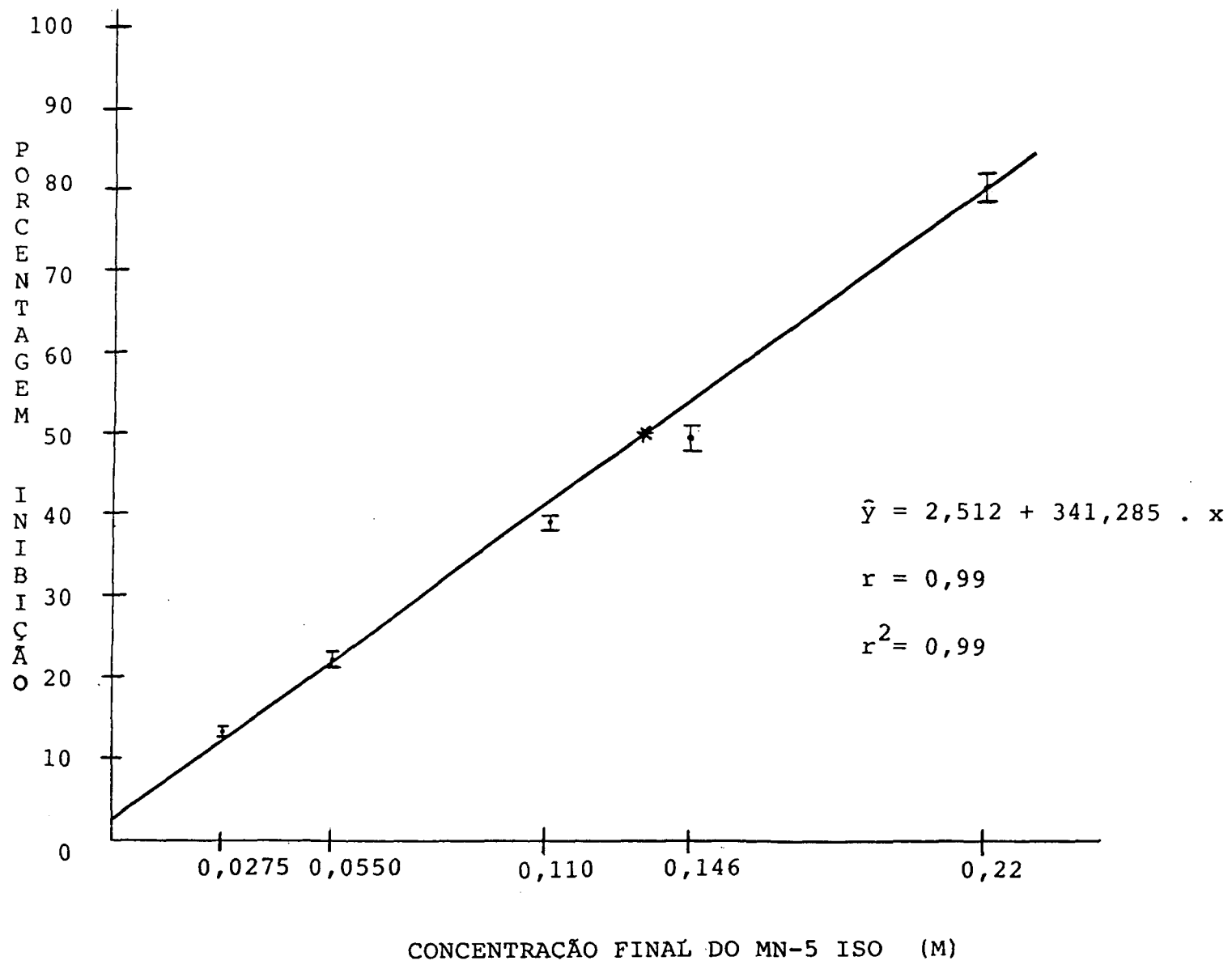


FIGURA 10 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO COMPLEMENTO OBTIDA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MN-5 ISO. DETERMINAÇÃO DA C-50 (\*) - VIA ALTERNATIVA. Os dados são apresentados como a média aritmética  $\pm$  EPM (3 experimentos).

## 2 EXPERIMENTO II - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA

### 2.1 Via Clássica

Na tabela 7 são apresentados os T 1/2 e as porcentagens de inibição da atividade hemolítica do Complemento (média aritmética de 2 experimentos) obtidos com uma mesma concentração de MN-5 ISO (0,113 M) sobre uma mesma solução de Complemento (45 ul SHN/ml tampão); e o efeito do tempo de incubação sobre a atividade anticomplementar da droga.

Tabela 7 - Efeito do tempo de incubação sobre a atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via clássica

T (min)	T 1/2* (seg)		% INIBIÇÃO*
	CONTROLE	MN-5 ISO	
0	225	494	54,50
5	195	459	56,50
15	179	471	62,00
30	195	520	62,50
60	194	546	64,00
120	213	645	67,00

T - Tempo de incubação a 37°C

\* Média aritmética de 2 experimentos.

FONTE: Tabela 17 (anexo 4)

Com base nestes dados foi construído um gráfico (fig. 11).

Verifica-se um aumento moderado da inibição conforme um maior tempo de incubação, ocorrendo uma estabilização a partir do tempo de incubação de 15 min.

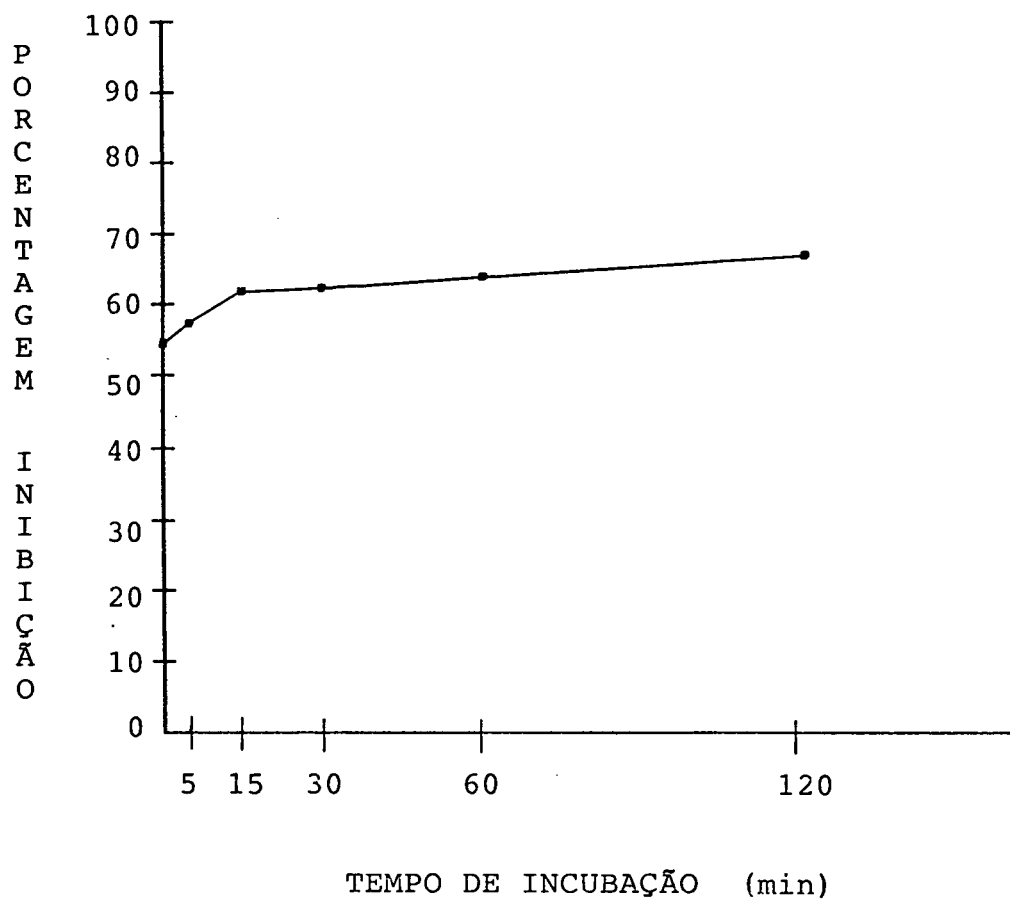


FIGURA 11 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO (0,113 M) - VIA CLÁSSICA.

## 2.2 Via Alternativa

Na tabela 8 são apresentados T 1/2 e as porcentagens de inibição da atividade hemolítica do Complemento (média aritmética de 3 experimentos) obtidos com uma mesma concentração de MN-5 ISO (0,146 M) sobre uma mesma solução de Complemento (380ul SHN/ml tampão); e o efeito do tempo de incubação sobre a atividade anticomplementar da droga.

Tabela 8 - Efeito do tempo de incubação sobre a atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via alternativa.

T (min)	T 1/2* (seg)		% INIBIÇÃO*
	CONTROLE	MN-5 ISO	
0	338	586	42,00
5	298	588	49,00
15	296	560	47,00
30	306	752	59,00
60	342	1025	66,00
120	404	1207	66,00

T - Tempo de incubação a 37°C

\* Média aritmética de 3 experimentos.

FONTE: Tabela 20 (anexo 7)

Com base nestes dados foi construído um gráfico (fig. 12) no qual verifica-se, como no experimento da via clássica, haver um aumento moderado da inibição conforme um maior tempo de incubação, mostrando uma estabilização da mesma a partir do tempo de incubação de 30 min.

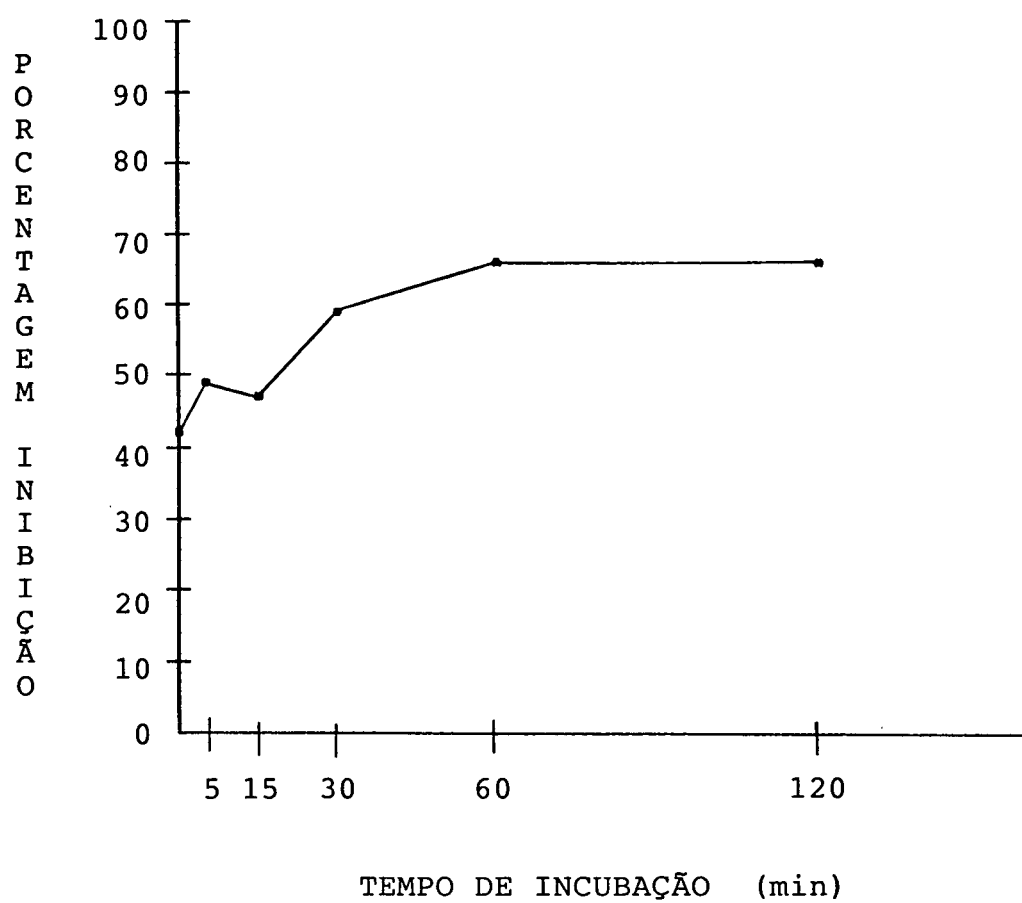


FIGURA 12 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MN-5 ISO (0,146 M) - VIA ALTERNATIVA.

### 3 EXPERIMENTO III - EFEITO INIBITÓRIO DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO

#### 3.1 Via Clássica

Na tabela 9 estão apresentadas as porcentagens de inibição obtidas com uma mesma concentração de MN-5 ISO (0,113 M), sobre diferentes soluções de Complemento (média de 2 experimentos), e a relação destas inibições com o tempo de incubação.

Tabela 9 - Efeito inibitório do MN-5 ISO sobre diferentes soluções de Complemento e o efeito do tempo de incubação - Via clássica.

T (min)	% INIBIÇÃO**		
	SHN (ul/ml de tampão)		
	26,5	33,0	45,0
0	62,0	60,0	54,5
5	69,0	68,0	57,5
15	73,0	68,5	62,0
30	74,0	71,5	62,5
60	84,0	77,0	64,0
120	*	74,5	67,0

\* Experimento não realizado

\*\* Média aritmética de 2 experimentos

T - Tempo de incubação a 37°C

SHN - Soro humano normal

FONTE: Tabelas 17, 18 e 19 (anexos 4, 5 e 6)

Com base nestes dados foi construído um gráfico (fig. 13) o qual mostra que esta inibição está inversamente relacionada ao volume de Complemento, obtendo-se inibições maiores sobre volumes menores de soro.

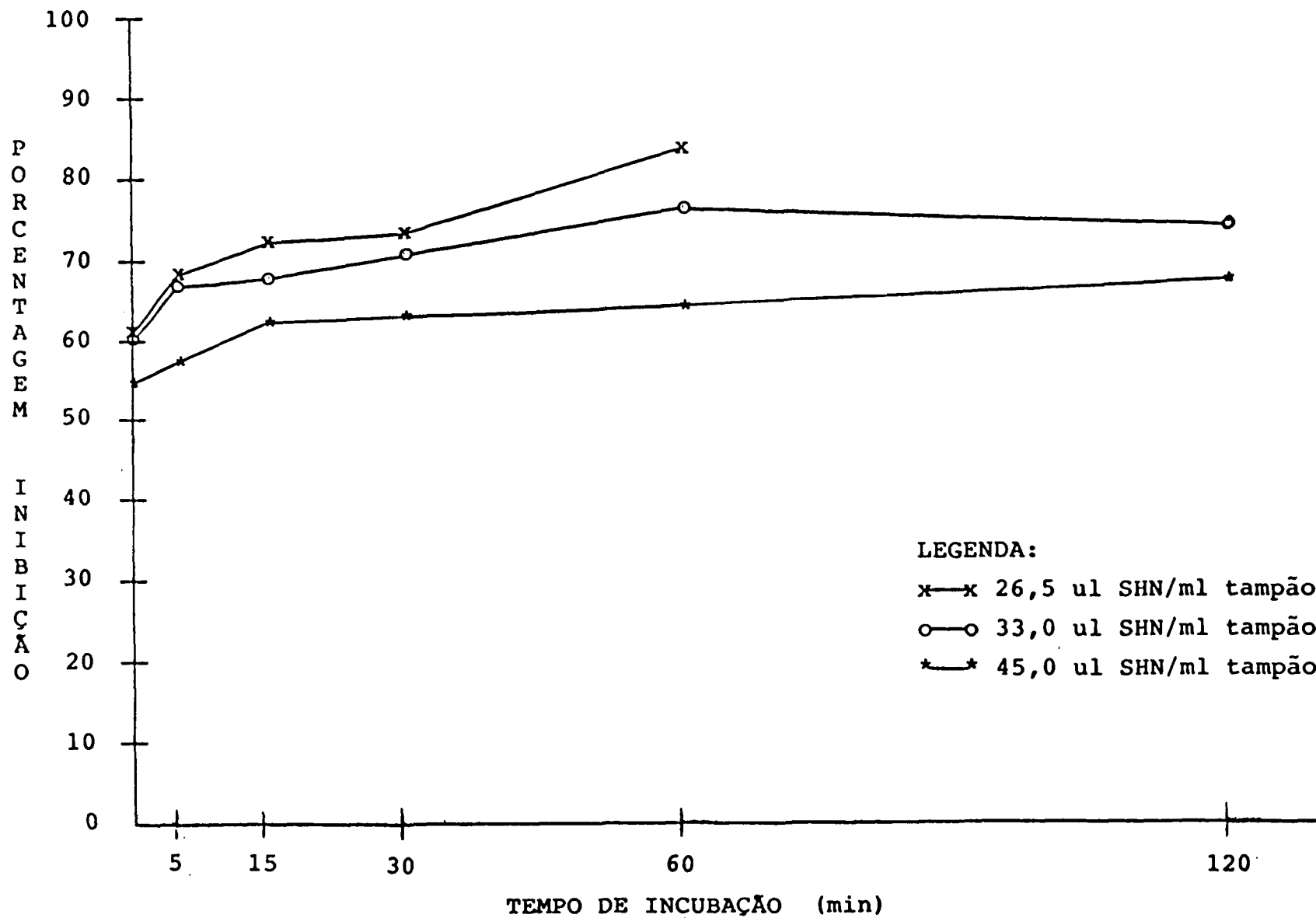


FIGURA 13 - EFEITO INIBITÓRIO DO MN-5 ISO (0,113 M) SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO - RELAÇÃO COM O TEMPO DE INCUBAÇÃO - VIA CLÁSSICA.

### 3.2 Via Alternativa

Na tabela 10 estão apresentadas as porcentagens de inibição obtidas com uma mesma concentração de MN-5 ISO (0,146 M), sobre diferentes soluções de Complemento (média de 3 experimentos), e a relação destas inibições com o tempo de incubação.

Tabela 10 - Efeito inibitório do MN-5 ISO sobre diferentes soluções de Complemento e o efeito do tempo de incubação - Via alternativa.

T (min)	% INIBIÇÃO*	
	SHN (ul/ml de tampão) 380	580
0	42,0	30,0
5	49,0	36,0
15	47,0	42,0
30	59,0	49,0
60	66,0	59,0
120	66,0	61,0

T - Tempo de incubação a 37°C

SHN - Soro humano normal

\* Média aritmética de 3 experimentos

FORTE: Tabelas 20 e 21 (anexos 7 e 8)

Com base nestes dados foi construído um gráfico (fig. 14) o qual mostra, como no experimento da via clássica, que esta inibição está inversamente relacionada ao volume de Complemento, obtendo-se também inibições maiores sobre volumes menores de soro.

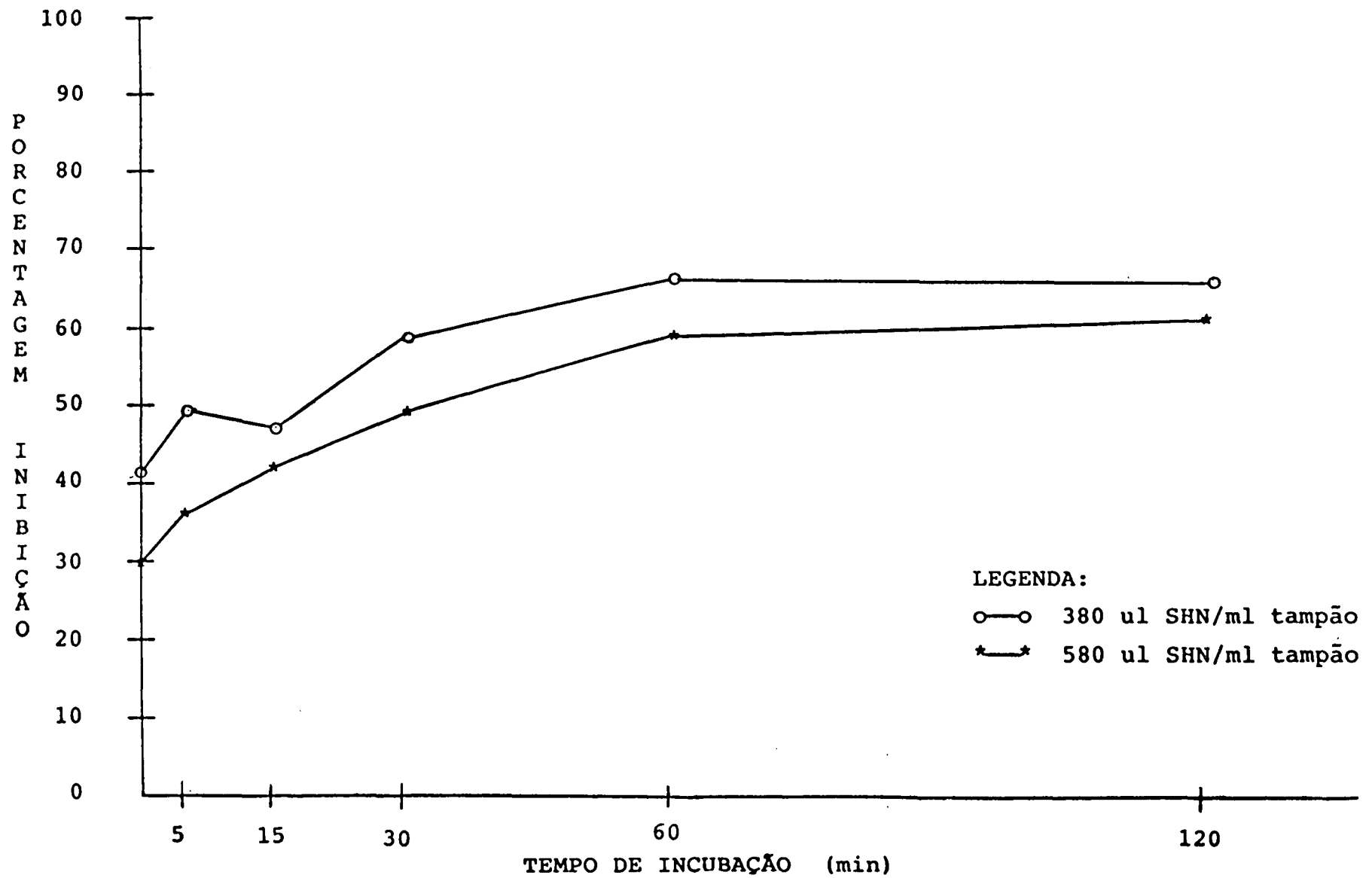


FIGURA 14 - EFEITO INIBITÓRIO DO MN-5 ISO (0,146 M) SOBRE DIFERENTES SOLUÇÕES DE COMPLEMENTO - RELAÇÃO COM O TEMPO DE INCUBAÇÃO - VIA ALTERNATIVA.

#### 4 REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO

O método aplicado neste trabalho mostrou uma reprodutibilidade adequada; por intermédio do teste de similaridade de variâncias (Teste de Cochran) (COSTA NETO, 1977) verificou-se que as variâncias dos valores das porcentagens de inibição obtidos nos diferentes experimentos não se mostraram significativamente diferentes (nível de significância de 5%), tanto para os experimentos da via clássica (tab. 11) como da via alternativa (tab. 12).

Os baixos coeficientes de variação obtidos para as porcentagens de inibição, confirmam também a reprodutibilidade adequada do método, para os experimentos da via clássica (tab. 13) e da via alternativa (tab. 14).

Além disso, o método mostrou-se de execução relativamente simples e rápida, permitindo também fazer uma análise comparativa de várias concentrações da droga em estudo em forma sucessiva, diminuindo assim a possibilidade da ocorrência de variações intra-método.

Tabela 11 - Cálculo das variâncias para os experimentos da via clássica

CUBETA	CONCENTRAÇÃO MN-5 ISO (Molar)	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO		
		1º E	2º E	3º E
5	0,0212	8,5	6,5	7,5
4	0,0425	17,5	19,0	18,0
3	0,0850	39,5	38,0	40,0
2	0,1300	49,0	50,0	51,0
1	0,1700	68,5	70,0	72,5
VARIÂNCIAS*		583,75	628,20	637,32

E - Experimento

\* Não há diferença significativa entre as variâncias  
( $p = 0,05$ )

Tabela 12 - Cálculo das variâncias para os experimentos da via alternativa

CUBETA	CONCENTRAÇÃO MN-5 ISO (Molar)	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO		
		1º E	2º E	3º E
5	0,0275	14,0	14,0	12,0
4	0,0550	23,5	23,0	20,0
3	0,1100	39,0	41,0	38,0
2	0,1460	51,0	51,0	46,0
1	0,2200	76,5	81,5	82,0
VARIÂNCIAS*		599,82	696,96	746,93

E - Experimento

\* Não há diferença significativa entre as variâncias  
( $p = 0,05$ )

Tabela 13 - Reprodutibilidade do Método - Porcentagens de inibição obtidos em 3 experimentos - Via clássica

CUBETA	CONCENTRAÇÃO MN-5 ISO (Molar)	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO					$\bar{X} \pm DP$	CV (%)
		1º E	2º E	3º E				
5	0,0212	8,5	6,5	7,5		$7,5 \pm 1,00$	13,41	
4	0,0425	17,5	19,0	18,0		$18,0 \pm 0,76$	4,22	
3	0,0850	39,5	38,0	40,0		$39,0 \pm 1,03$	2,65	
2	0,1130	49,0	50,0	51,0		$50,0 \pm 1,00$	2,00	
1	0,1700	68,5	70,0	72,5		$70,0 \pm 2,02$	2,89	

E - Experimento

 $\bar{X} \pm DP$  - Média aritmética  $\pm$  desvio padrão

CV - Coeficiente de variação

Tabela 14 - Reprodutibilidade do Método - Porcentagens de inibição obtidos em 3 experimentos - Via alternativa

CUBETA	CONCENTRAÇÃO MN-5 ISO (Molar)	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO					$\bar{X} \pm DP$	CV (%)
		1º E	2º E	3º E				
5	0,0275	14,0	14,0	12,0		$13,33 \pm 1,15$	8,90	
4	0,0550	23,5	23,0	20,0		$22,17 \pm 1,88$	8,57	
3	0,1100	39,0	41,0	38,0		$39,33 \pm 1,52$	3,90	
2	0,1460	51,0	51,0	46,0		$49,33 \pm 2,89$	5,86	
1	0,2200	76,5	81,5	82,0		$80,00 \pm 3,04$	3,81	

E - Experimento

 $\bar{X} \pm DP$  - Média aritmética  $\pm$  desvio padrão

CV - Coeficiente de variação

**DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

O fato de estar demonstrada a implicação do processo inflamatório na patogenia da lesão isquêmica e de reperfusão, e que a ativação deste processo teria uma importância fundamental na etiopatogenia da extensão da lesão isquêmica, deu origem a intensas pesquisas, principalmente experimentais, na tentativa de intervir neste processo.

Foi estudada a eficácia de diversos agentes e métodos, analisando-se o possível efeito protetor destes sobre a lesão isquêmica e de reperfusão, assim como os possíveis mecanismos de ação. Vários deles mostraram-se efetivos limitando a área de necrose miocárdica.

Estudos experimentais como clínicos têm demonstrado que os nitratos orgânicos exercem uma ação protetora sobre o tecido miocárdico isquêmico, reduzindo a área de lesão e a mortalidade após infarto agudo de miocárdio, o que estaria relacionado aos seus efeitos hemodinâmicos, com uma redução do consumo de oxigênio pelo miocárdio; ao efeito vasodilatador coronário e à provável ação antiagregante plaquetária dos mesmos.

Será feita a seguir uma revisão destes assuntos, apresentando-se a seguir a discussão dos resultados obtidos no presente trabalho, com algumas sugestões sobre o possível mecanismo de ação dos nitratos orgânicos sobre o Complemento, e as possíveis implicações destes resultados.

## INTERVENÇÃO NO PROCESSO INFLAMATÓRIO IMPLICADO NA PATOGÊNESE DA LESÃO ISQUÊMICA MIOCÁRDICA

Diversos agentes que limitam a resposta inflamatória ou imune têm sido pesquisados em relação a seus efeitos benéficos na redução da lesão isquêmica tanto em modelos experimentais, como em pacientes.

### Glucocorticóides

Os corticóides foram os primeiros anti-inflamatórios estudados neste sentido, tanto em modelos experimentais, como em pesquisas clínicas, sendo que os resultados são conflitantes.

Em alguns trabalhos experimentais, o uso de corticóides levou à redução da área isquêmica e de infarto, assim como da mortalidade (JOHNSON et al. 1953; LIBBY et al., 1973; SPATH, LANE, LEFER, 1974; VYDEN et al., 1974). Resultados similares foram também obtidos em pesquisas clínicas com a redução do tamanho do infarto e da mortalidade (BARZILAI et al., 1972; MORRISON et al., 1976; SELWYN et al., 1978).

Já outros estudos experimentais não têm demonstrado uma redução da área infartada (MULLANE et al., 1984; VOGEL et al., 1977).

Em outros, clínicos, as altas doses de esteróides administrados nas primeiras horas do infarto não tiveram qualquer efeito deletério ou benéfico (MADIAS, HOOD, 1982; PETERS et al. 1978), ou ainda esta conduta levou a um aumento da área infartada e a uma maior incidência de das arritmias ventriculares (ROBERTS, De-

MELLO, SOBEL, 1976).

Os mecanismos pelos quais os glicocorticóides poderiam ter um efeito benéfico sobre o miocárdio isquêmico seriam: preservando a integridade celular com a estabilização da membrana plasmática (LUZ et al., 1975); evitando ou retardando a liberação de enzimas lisossomais (SPATH, LANE, LEFER, 1974); estabilizando os vacúolos fagocíticos nas células inflamatórias infiltradas (LIBBY et al., 1973). Outros mecanismos seriam: o incremento na oferta sanguínea à área isquêmica, por um aumento das anastomoses inter-arteriais (JOHNSON et al., 1953), e a redução do consumo de oxigênio pelo miocárdio (VYDEN et al., 1974).

Já os efeitos deletérios dos glicocorticóides estão relacionados com a ação destes sobre a cicatrização do tecido infartado.

Tem sido demonstrado que o uso de doses altas após o infarto leva a um retardo da remoção do tecido necrótico com uma fagocitose reduzida, o que resulta em grandes placas de células mortas, mas preservadas na sua arquitetura, fenômeno esse chamado de mumificação (KLONER et al., 1978), provocando também uma alteração da cicatrização (MACLEAN et al., 1977), formando uma cicatriz mais fina, aumentando assim o risco de ruptura ventricular ou de formação de aneurismas (MACLEAN et al., 1978).

O efeito deletério dos corticóides sobre o processo de cicatrização dependeria da dose, o uso de doses altas e repetidas de glicocorticóides acompanhar-se-ia de uma maior incidência de defeitos na cicatrização (HAMMERMAN et al., 1983).

## Antiinflamatórios não-esteróides

Na tentativa de reduzir o processo inflamatório da lesão isquêmica e de reperfusão, foram utilizados alguns antiinflamatórios não esteróides.

Modelos experimentais demonstram o efeito benéfico do uso do ibuprofeno reduzindo a área de lesão isquêmica e de reperfusão (CRAWFORD et al, 1988; EVANS et al., 1985; JUGDUTT et al., 1980; LEFER, POLANSKY, 1979; ROMSON et al., 1982).

Os mecanismos de proteção do ibuprofeno, segundo os autores, estariam relacionados ao seu efeito de estabilização de membranas celulares, como por exemplo as membranas lisossomais, a uma provável redução da demanda de oxigênio pelo miocárdio (LEFER, POLANSKY, 1979), bem como aos efeitos celulares da droga, sendo que ela inibiria a migração de células inflamatórias e a liberação de enzimas lisossomais, além da agregação plaquetária, provavelmente através da inibição da síntese de tromboxano (JUGDUTT et al., 1980).

ROMSON e cols. (1982) atribuem a uma redução da acumulação de PMNs no tecido infartado, o efeito benéfico do ibuprofeno, confirmado também por CRAWFORD e cols. (1988). Esta redução do acúmulo de PMNs na área infartada levaria a uma redução da lesão tecidual, prevenindo a liberação de enzimas lisossomais e  $RLO_2$  pelos PMNs, ou através da prevenção das alterações na reologia da microcirculação cardíaca na área isquêmica, evitando o fenômeno de bloqueio de capilares pelos PMNs.

Já outros trabalhos não demonstram efeito benéfico algum do ibuprofeno na limitação da área infartada (REIMER et al., 1985) e outros ainda mostram um efeito deletério da droga. Assim BROWN JR. e cols. (1983) demonstram que, embora o ibuprofeno reduza a área de infarto, tem também efeitos deletérios sobre a cicatrização do tecido após o infarto, já que o uso de doses altas levaria a uma diminuição da espessura da cicatriz após IAM, efeito similar ao dos glicocorticóides.

Recentemente, CLEMENT e cols. (1990) não conseguiram demonstrar qualquer efeito benéfico do ibuprofeno sobre a lesão de reperfusão miocárdica, atribuindo isto à ação inibidora sobre a ciclooxigenase, o que, embora cause uma diminuição da síntese de tromboxano, o que seria um efeito benéfico, levaria também a um bloqueio da síntese de prostaciclina, diminuindo assim sua ação antiagregante plaquetária e vasodilatadora, além de levar a uma maior síntese de leucotrienos pela via da lipoxigenase, causando uma vasoconstrição, como também uma diminuição da contração miocárdica.

Outros antiinflamatórios não esteróides foram utilizados com este mesmo objetivo, sendo os resultados variáveis de acordo com o tipo de droga usada. Assim, o nafazatrom e o BW755C (BEDNAR et al., 1985; MULLANE et al., 1984), causaram a redução da área infartada em modelos experimentais. Segundo os autores, o efeito benéfico destes fármacos estaria relacionado a ação dos mesmos sobre os leucócitos, já que ambos causam uma diminuição da infiltração de neutrófilos na área isquêmica, além de inibir várias funções destes tanto *in vitro* como *in vivo*, principalmente a liberação de  $RLQ_2$  e o metabolismo do ácido araquidônico através da

via da lipoxigenase (BEDNAR et al., 1985).

Outros antiinflamatórios não esteróides como a indometacina e aspirina não demonstraram nenhum efeito benéfico em trabalhos experimentais (BONOW et al., 1981; MULLANE et al., 1984), ou pelo contrário tiveram um efeito deletério levando a um incremento da área do infarto ou causando alterações na cicatrização da área infartada como é o caso da indometacina (HAMMERMAN et al., 1984; JUGDUTT et al., 1979).

No entanto, estudos clínicos multicêntricos mostram o efeito benéfico da aspirina na prevenção primária do IAM (THE STEERING COMMITTEE OF THE PHYSICIANS' HEALTH STUDY RESEARCH GROUP, 1988), assim como na redução da mortalidade após IAM, (ISIS-2 (SECOND INTERNATIONAL STUDY OF INFARCT SURVIVAL) COLLABORATIVE GROUP, 1988)

#### Inibidores do tromboxano

Em vista das crescentes evidências do papel deletério do tromboxano na patogênese da lesão isquêmica, assunto revisado por METHA e NICHOLS (1990), têm sido analisado o efeito de fármacos que atuem, seja como inibidores da tromboxano sintetase (HOSHIDA et al., 1989; MULLANE, FORNABAIO, 1988; NICHOLS et al., 1989; WARGOVICH et al., 1987) ou com propriedades de antagonistas do receptor do tromboxano A<sub>2</sub> (NICHOLS et al., 1989).

No estudo de WARGOVICH e cols. (1987) é analisado o efeito do inibidor da tromboxano sintetase U-63,557A sobre o tamanho do infarto 48 horas após a ligação da artéria coronária em ratos. O grupo tratado com o inibidor da tromboxano sintetase mostrou ní-

veis de tromboxano significativamente menores que o do grupo controle, além de mostrar uma redução da agregação plaquetária e do acúmulo de polimorfonucleares no miocárdio infartado. O tamanho da área infartada era significativamente menor ao do grupo controle. Os autores concluem que o efeito benéfico da droga se deve por um lado ao efeito sobre a função plaquetária, e por outro, ao menor acúmulo de neutrófilos no miocárdio infartado, por um mecanismo não conhecido.

MULLANE e FORNABAIO (1988) analisam o efeito de dois inibidores da tromboxano sintetase, o benzilimidazol e o OKY-046 sobre o tamanho do infarto após ligação da artéria coronária seguida de reperfusão. Os resultados mostram uma diminuição na síntese de tromboxano B<sub>2</sub>, uma redução no acúmulo de polimorfonucleares no miocárdio, além de uma redução significativa do tamanho do infarto, comparado com o grupo controle. O uso dos fármacos não causou alterações hemodinâmicas significativas.

Posteriormente, NICHOLS e cols. (1989) analisam o efeito de um inibidor da tromboxano sintetase U-63,557A e de um antagonista do receptor de tromboxano A<sub>2</sub>, SQ-29,548, sobre o tamanho do infarto num estudo experimental em ratos. Nenhuma das drogas teve um efeito significativo sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca; no entanto, o tamanho do infarto foi reduzido significativamente por ambas as drogas em comparação com o grupo controle. Os autores concluem que o efeito benéfico de ambos os fármacos estão relacionados à ação destes, tanto sobre as plaquetas como os neutrófilos.

## Prostaciclina

A prostaciclina ( $PI_2$ ), o maior metabólito ativo do ácido araquidônico no endotélio vascular, descoberta em 1976 por MONCADA e cols. (MONCADA et al., 1976), caracteriza-se por sua potente ação inibitória da agregação plaquetária assim como sua ação vasodilatadora, inclusive de vasos coronários (GRYGLEWSKI, 1981). É por isso que alguns autores têm analisado o efeito dela sobre a lesão do infarto de miocárdio (LEFER et al., 1978).

No estudo experimental de RIBEIRO e cols. (1981), a aplicação de  $PI_2$  após a ligação da artéria coronária levou a uma redução da PAM e da resistência vascular periférica, e por conseguinte da demanda de  $O_2$  pelo miocárdio, provocando também uma redução do fluxo sanguíneo para a área não isquêmica, não alterando o fluxo para a área isquêmica. A análise do tamanho de infarto não mostrou diferença significativa entre ambos os grupos. A mortalidade após 24 hs. foi de 35% no grupo controle, sendo alta a incidência de fibrilação ventricular neste grupo de animais; todos os animais tratados com  $PI_2$  sobreviveram a este período.

Segundo os autores, a ação benéfica da  $PI_2$  estaria relacionada ao efeito da mesma sobre o consumo de  $O_2$  pelo miocárdio e sobre a agregação plaquetária, além de provocar um aumento da relação: fluxo para a área isquêmica / fluxo para a área não isquêmica. A redução da incidência de arritmias letais seria consequência destes efeitos da Prostaciclina.

JUGDUTT e cols. (1981b) analisaram o efeito da prostaciclina ( $PI_2$ ), prostaglandina  $E_1$  ( $PE_1$ ) e prostaglandina  $E_2$  ( $PE_2$ ), em modelo experimental de infarto de miocárdio em cachorros. A

administração destes autacóides durante todo o período da oclusão coronária, levou a uma queda em 5 a 10% da pressão arterial média, em relação ao seu valor no início da oclusão. A  $PI_E$  e a  $PE_1$  levaram a um aumento do fluxo colateral à área isquêmica, embora não em todos os animais. Já a  $PE_2$  não teve o mesmo efeito. A análise do tamanho do infarto em todos os grupos de animais mostra que tanto a  $PI_E$  como a  $PE_1$  levaram à uma redução significativa deste, não ocorrendo o mesmo no grupo tratado com  $PE_2$ . Segundo os autores, o efeito benéfico da  $PI_E$  e  $PE_1$  pode ser consequência do aumento do fluxo colateral à área isquêmica e dos efeitos metabólicos e celulares, principalmente sobre as plaquetas e PMNs.

Posteriormente, SIMPSON e cols. (1987) comparam o efeito da  $PI_E$  com um análogo desta, o SC-39902 sobre o tamanho do infarto num modelo experimental de isquemia seguida de reperfusão. Apesar de ter efeitos semelhantes sobre a frequência cardíaca, pressão arterial média, consumo de  $O_2$  e o fluxo coronário, a  $PI_E$  e não o SC-39902 causou uma redução significativa da área de infarto.

Numa análise paralela, os autores mostram que a  $PI_E$ , a diferença de seu análogo, causa uma redução significativa na produção de radical superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) pelos PMNs, além de inibir a infiltração destes. Os autores concluem que o efeito benéfico da  $PI_E$  está relacionado a esta ação sobre os PMNs.

#### Intervenções sobre os polimorfonucleares

Dadas as evidências da literatura sobre o papel deletério dos PMNs na lesão isquêmica e principalmente na lesão de reperfusão

são, vários trabalhos foram realizados a fim de demonstrar que a redução do número de PMNs teria um efeito benéfico sobre o tecido infartado e reperfundido. Para este fim, foram analisados vários métodos, entre os quais o uso de antisoro anti-polimorfonucleares (JOLLY et al., 1986; LORGERIL et al., 1989; ROMSON et al., 1983), assim como o uso de filtros a fim de causar uma neutropenia importante no fluxo de reperfusão do miocárdio isquêmico (LITT et al., 1989).

Independente do método usado para obter uma neutropenia, todos os autores demonstram uma redução significativa da área de lesão isquêmica e de reperfusão.

Resultados similares foram obtidos com o uso de um anti-corpo monoclonal (anti-Mo1(904)) (SIMPSON et al., 1988) dirigido contra a glicoproteína Mo1, presente na membrana plasmática dos neutrófilos, a qual tem um papel importante no processo de adesão destes ao endotélio vascular; ou contra o fragmento deste (F(ab')<sub>2</sub>) (SIMPSON et al., 1990), que, sem reduzir o número de PMNs circulantes, causaram uma inibição da adesão e da agregação destes no tecido reperfundido. Os resultados destes estudos mostram também uma redução da lesão miocárdica secundária à isquemia e reperfusão.

#### Aplicação de antioxidantes

Dadas as crescentes evidências de que os RLO<sub>2</sub> teriam um papel importante na patogênese da lesão isquêmica e de reperfusão (LARNER, CONWAY, 1989; SOUTHORN, POWIS, 1988; WERNS, SHEA, LUCCHESI, 1986), existem na literatura trabalhos nos quais utilizou-se

vários antioxidantes a fim de reduzir as consequências deletérias dos mesmos.

Foram aplicadas algumas enzimas, como a superóxido-dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (JOLLY et al., 1984), ou drogas como o captopril (WESTLIN, MULLANE, 1988), obtendo-se uma redução significativa da área de lesão miocárdica comparada com os grupos controle, embora outros autores não tenham mostrado os mesmos resultados com o uso de SOD e CAT (PRZYKLENK, KLONER, 1989).

ZWEIER e cols. (1987) demonstram que a superóxido dismutase humana recombinante (SOD h-r) reduz a concentração de  $\cdot O_2^-$  no miocárdio reperfundido, o que sugere que o efeito benéfico da SOD h-r é devido à sua ação antioxidante dos  $RO_2$ .

Consideramos importante analisar com mais detalhes o trabalho experimental de JOHNSON III e cols. (JOHNSON III, TSAO, LEFFER, 1990b) onde os autores analisam o efeito cardioprotetor da SOD em doses baixas; o nitrito de sódio, um doador de óxido nítrico (NO), também usado em doses baixas, e o efeito sinérgico de ambos. Os resultados deste trabalho demonstram que a SOD, nas doses usadas não tem um efeito protetor significativo; já o nitrito de sódio acidificado oferece certa proteção, mas a combinação de ambos mostra um sinergismo, com uma proteção significativa do tecido isquêmico comparado com o grupo controle. Os resultados mostram que este efeito protetor é independente do acúmulo de neutrófilos, já que não existia nenhuma diferença significativa entre os grupos na atividade da mieloperoxidase tecidual no tecido miocárdico, a qual representa um índice do conteúdo de neutrófilos. Esse efeito benéfico independe também de um possível efeito hemodinâmico; já que não existia nenhuma diferença signi-

ficativa no que se refere ao índice pressão-freqüência.

Segundo os autores, o uso combinado de SOD e de nitrito de sódio preveniria a lesão celular causada por substâncias tóxicas produzidas pelos PMNs presentes na área isquêmica. Considerando também que o efeito protetor sinérgico de ambas as drogas estaria relacionado a um efeito protetor da SOD sobre o endotélio e ao efeito do óxido nítrico, liberado pelo nitrito de sódio, que tem a propriedade de inibir a adesão e a agregação de plaquetas ao endotélio em ação sinérgica com a  $PI_2$ , existindo então uma interação entre a SOD o óxido nítrico, preservando assim a integridade do endotélio. Não é descartado um efeito direto sobre o miócito.

Outro possível mecanismo sugerido pelos autores é que a SOD, com sua propriedade antioxidante, evitaria o conhecido efeito inativador dos  $RLO_2$  sobre o NO (GRYGLEWSKI, PALMER, MONCADA, 1986)

Os autores mencionam que a magnitude do efeito protetor do nitrito de sódio neste trabalho é comparável àquele obtido com doses maiores do mesmo fármaco, analisado num estudo prévio da mesma autoria (JOHNSON III et al., 1990a), no qual o efeito protetor do nitrito de sódio parece também não estar relacionado à redução do consumo de oxigênio pelo miocárdio.

#### CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE COMPLEMENTO NO TECIDO ISQUÊMICO

Como já foi comentado, vários estudos, experimentais e clínicos, demonstram o papel da ativação do Sistema de Complemen-

to na patogênese da lesão no infarto de miocárdio. São vários os produtos da ativação do Sistema de Complemento implicados.

Trabalhos experimentais têm sido realizados com o objetivo de definir os efeitos cardíacos das anafilotoxinas. DEL BALZO e cols. (DEL BALZO, LEVI, POLLEY, 1985), em estudo realizado em corações de cobaia isolados, mostram que a administração de C3a por via intracoronária, causa taquicardia, alteração da condução atrioventricular, uma disfunção contrátil do ventrículo esquerdo e vasoconstrição coronária. Os autores sugerem que o efeito deletério causado por C3a pode ser mediado pela histamina, leucotrienos e prostanoídes vasoativos, já que estes efeitos deletérios foram antagonizados por drogas que atuam sobre estas substâncias vasoativas.

ITO e cols. (1990), mostram o efeito deletério da infusão intracoronária de C5a em porcos, a qual causou uma queda do fluxo coronário, assim como uma disfunção contrátil. Os autores mostram também uma queda dos níveis de leucócitos no sangue venoso coronário na ausência de alterações nos níveis de leucócitos no sangue arterial, indicando um seqüestro intracardiaco de PMNs. O uso de bloqueadores de receptores de leucotrienos e tromboxano causou uma abolição dos efeitos da anafilotoxina sobre o fluxo coronário e sobre a função contrátil, não tendo efeito sobre o seqüestro de leucócitos no miocárdio induzida pelo C5a. Os autores concluem que a vasoconstrição coronária e a disfunção contrátil em resposta à infusão intracoronária de C5a são mediadas pelo tromboxano e leucotrienos.

STAHL e cols. (1990) mostram o mesmo efeito do C5a sobre o fluxo coronário e a contração miocárdica. Neste trabalho obser-

va-se que o bloqueio da cicloxigenase com ácido acetil-salicílico e o antagonismo do receptor tromboxano  $A_2$ -prostaglandina  $H_2$ , reduzem os efeitos do C5a sobre o fluxo coronário e a contração miocárdica, concluindo que o efeito deletério do C5a é dependente da ação do tromboxano- $A_2$  e provavelmente da prostaglandina- $H_2$ .

Os autores demonstram ainda que a infusão intra-coronária de C5a causa um incremento na produção de lactato no miocárdio e um aumento da extração miocárdica de  $O_2$ , indicando um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio, demonstrando assim que a infusão de C5a produz uma isquemia miocárdica. Deve-se mencionar que a infusão de C5a não teve nenhum efeito hemodinâmico sistêmico, eliminando assim a possibilidade da isquemia ser causada por algum efeito periférico do C5a.

MARTIN e cols. (1988) mostram que a infusão intracoronária de C5a causa uma redução significativa do fluxo coronário regional e uma deterioração da função miocárdica. A administração de C5a não alterou a pressão de perfusão, nem a frequência cardíaca, no entanto, houve uma queda no conteúdo venoso de  $O_2$ , indicando um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio. Além disso, a diferença artério-venosa do número de granulócitos aumentou significativamente após a infusão da anafilotoxina, indicando um seqüestro daqueles no miocárdio.

Em estudo paralelo, os autores mostram que a infusão de C5a em artéria coronária isolada não causa vasoconstrição, mesmo quando reperfundida com sangue total. Os autores sugerem que a queda do fluxo coronário causada por C5a *in vivo* possa estar mediada por neutrófilos.

Um outro produto da ativação do Complemento que pode estar

implicado na lesão tecidual isquêmica, é o CLM.

Recentemente tem sido demonstrada a deposição do CLM em áreas miocárdicas infartadas. Assim um grupo de pesquisadores em dois trabalhos recentes, mostra a deposição do complexo C5b-9 em áreas infartadas em material de autópsia procedente de pacientes com infarto de miocárdio. Num primeiro trabalho (SCHAFER et al., 1986) os autores demonstram que a deposição do complexo C5b-9 ocorre seletivamente nas áreas de infarto, sendo que o complexo foi localizado tanto na membrana de células miocárdicas como também nas estruturas intracelulares. Os autores sugerem que o CLM depositar-se-ia sobre as células miocárdicas isquêmicas com o conseqüente efeito deletério.

Este mesmo grupo de autores (HUGO et al. 1990), em material de autópsia, faz uma análise quantitativa dos dois tipos de complexo C5b-9. O complexo C5b-9 ligado à membrana com atividade citolítica (C5b-9(m)) e o complexo citoliticamente inativo ligado à Proteína S (SC5b-9), comparando o tecido infartado com o não infartado. Os autores demonstram haver uma concentração do complexo C5b-9 três vezes maior no tecido isquêmico comparado com o tecido normal, sendo que os níveis tanto do C5b-9(m) e do complexo SC5b-9 estão elevados na área isquêmica com um ligeiro predomínio do complexo ligado à membrana.

Num trabalho recente, VAKEVA e cols. (VAKEVA, LAURILA, MERI, 1992) demonstram que além de haver depósitos do CLM e lesões que lembram a estrutura deste no tecido miocárdico infartado, existe uma menor expressão de CD59, que como é sabido tem um efeito protetor sobre as células frente à lesão mediada pelo Complemento. Os autores sugerem que esta menor expressão de CD59 se-

ja provavelmente a principal causa que predispõe o tecido miocárdico ao ataque do Complemento no infarto de miocárdio.

## INTERVENÇÕES SOBRE O SISTEMA DE COMPLEMENTO

Alguns autores, em trabalhos experimentais, analisam o efeito de algumas intervenções sobre a ativação do Sistema de Complemento.

MAROKO e cols. (1978) estudaram o efeito do fator de veneno de cobra (FVC) sobre a lesão tecidual isquêmica em modelos experimentais. A proteína do FVC que reduz os níveis de Complemento é o C3b da cobra, o qual interage com o fator B da via alternativa, formando a C3 convertase (KLAUS, 1988; LAW, REID, 1988), levando assim à ativação e como consequência o consumo do Complemento pela via alternativa.

Num primeiro estudo o grupo de MAROKO analisou o efeito do uso do FVC na redução da necrose miocárdica, após oclusão coronária em cachorros (MAROKO et al., 1978), comparando um grupo de animais tratados com o FVC aplicado 30 minutos após a oclusão da artéria coronária descendente anterior, com um grupo controle, no qual não foi aplicada nenhuma terapia. Vinte e quatro horas após a oclusão coronária, os resultados mostram uma redução significativa da extensão da lesão miocárdica tecidual no grupo de animais tratados, sendo que neste grupo os níveis de Complemento total no soro, expressos por sua atividade hemolítica, tiveram uma queda importante após a administração do FVC. Os autores mostram

haver também uma redução importante da infiltração de PMNs na área isquêmica. Os autores concluem que a administração do FVC 30 minutos após a oclusão coronária, causa uma redução da área de infarto, e que este efeito benéfico seria resultado da menor formação de fatores quimiotáticos, evitando assim o aumento do acúmulo de polimorfonucleares na área isquêmica, e a consequente liberação de enzimas lisossomais.

Posteriormente, o mesmo grupo de autores (MACLEAN et al., 1978) analisa o efeito benéfico do uso do FVC 5 minutos após a oclusão coronária, estudo realizado em ratos. Foram analisados dois grupos de animais, um sacrificado 48 horas após a oclusão e um segundo, 3 semanas após a mesma.

Os resultados obtidos são similares aos resultados do trabalho anterior, demonstrando um efeito benéfico do uso do FVC sobre a extensão da área de lesão isquêmica, sendo que este estudo demonstra que o efeito benéfico é essencialmente similar, tanto após 48 horas como 21 dias após a oclusão coronária.

Um outro grupo de pesquisadores confirma os resultados obtidos por MAROKO e cols. em modelos experimentais realizados em primatas (CRAWFORD et al., 1988; PINCKARD et al., 1980). No trabalho publicado em 1988, os autores demonstram que a aplicação do FVC 30 minutos após a ligação coronária, leva à uma redução da área de lesão isquêmica, da infiltração de PMNs e também à uma redução dos níveis plasmáticos de C3, C5 e C6, além de causar uma redução da deposição de C3 e C5 no miocárdio infartado. Os autores sugerem que o efeito benéfico do uso do FVC estaria relacionado tanto a uma redução da infiltração de PMNs no miocárdio isquêmico infartado, o que poderia reduzir a lesão tecidual, pre-

venindo a liberação de enzimas lisossomais e  $RLO_2$  pelos PMNs, assim como a alteração na reologia da microcirculação cardíaca no miocárdio isquêmico causada pelos PMNs; mas, também, através de mecanismos independentes dos PMNs, já que, com um menor acúmulo de C5 no miocárdio isquêmico, haveria uma redução na formação do CLM (C5b-9), evitando assim o efeito deletério deste sobre o tecido miocárdico.

Num outro trabalho WEISMAN e cols. (1990) analisam o efeito benéfico da administração do receptor de Complemento tipo 1, solúvel recombinante (sCR1), num modelo experimental em ratos. O sCR1 é administrado imediatamente antes da oclusão coronária, após a qual o tecido miocárdico é reperfundido.

O receptor de Complemento tipo 1 tem uma atividade inibitória sobre ambas as vias de ativação de Complemento, devido a sua especificidade de ligação com C3b e C4b dos complexos C3 e C5-convertases da via clássica e alternativa. Esta ligação de CR1 com C3b e C4b causa a deslocação das subunidades catalíticas de ambas enzimas (C2a e Bb), além de ter uma atividade de cofator do fator I levando assim à inativação de C3b e C4b, e por conseguinte, das convertases.

Nos animais tratados com sCR1, houve um menor acúmulo de leucócitos na área infartada, e uma menor deposição do CLM no endotélio vascular nesta área. Esta conduta levou à uma redução significativa do tamanho do infarto de miocárdio reperfundido, e a uma redução da frequência de infarto transmural, além de um menor acúmulo de PMNs na área infartada, comparadas com os animais controle. Outro dado importante deste estudo é que a administração de sCR1 não causou uma expansão da área infartada.

Os autores realizaram também uma análise *in vitro* da atividade anticomplementar do sCR1, mostrando que em concentrações de 0,2 a 1 nM, o sCR1 inibe a atividade hemolítica dos soros humano e de rato altamente diluídos.

Dos estudos experimentais citados desprende-se por um lado que o Sistema de Complemento tem um papel importante na patogenia da lesão isquêmica do miocárdio, e por outro, que a intervenção sobre o processo de ativação do Complemento na isquemia é altamente benéfica, principalmente porque reduz significativamente a extensão da área de lesão isquêmica.

#### EVIDÊNCIAS DO EFEITO PROTETOR DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE O TECIDO MIOCÁRDICO ISQUÊMICO

Embora os nitratos sejam usados rotineiramente no tratamento da angina pectoris, até alguns anos atrás, o uso destes era contraindicado no tratamento do IAM, por causar uma queda da pressão arterial sistêmica e o conseqüente incremento da frequência cardíaca, provocando um aumento de consumo de oxigênio pelo miocárdio, o que poderia levar a uma extensão da lesão isquêmica (SMITH et al., 1973). No entanto, trabalhos experimentais e clínicos mostram que o uso dos nitratos na fase aguda do miocárdio pode ser benéfico reduzindo a extensão da área de lesão isquêmica, avaliada tanto anatomicamente como laboratorialmente, pela análise de índices eletrocardiográficos, avaliação da função ventricular e determinação da liberação de creatino-quinase.

## Estudos experimentais

HIRSHFELD JR. e cols. (1974) analisam o efeito do tratamento com nitroglicerina sobre a severidade e extensão do infarto do miocárdio, comparado com um grupo controle. Nos animais nos quais foi administrada a nitroglicerina, foi aplicada uma infusão de metoxamina, um agonista alfa-adrenérgico, a fim de prevenir os efeitos do nitrato sobre a frequência cardíaca e a pressão arterial. Esta conduta levou a uma atenuação das alterações eletrocardiográficas da isquemia, assim como a uma menor incidência de infarto transmural e um aumento da sobrevivência. Os autores concluem que a administração simultânea de nitroglicerina e metoxamina é capaz de prevenir ou de reduzir a lesão isquêmica após oclusão coronária.

Num outro trabalho experimental, MYERS e cols. (1975) analisou o efeito da aplicação da nitroglicerina sobre a isquemia aguda, num modelo experimental com oclusões coronárias crônicas. A administração de nitroglicerina por via intravenosa durante a oclusão aguda da coronária descendente anterior, levou à uma redução da isquemia miocárdica quando a frequência cardíaca reflexa aumentou menos de 50%; já um incremento maior a 50% causou um aumento da isquemia miocárdica. O uso de metoxamina, um agonista alfa-adrenérgico, a fim de prevenir as alterações hemodinâmicas causadas pela nitroglicerina, levou a uma diminuição ainda maior da isquemia.

JUGDUTT e cols. (1981a) analisam o efeito da nitroglicerina no fluxo sanguíneo colateral e no tamanho do infarto. Num pri-

meiro grupo de animais foi administrada solução salina, num segundo a nitroglicerina e num terceiro a nitroglicerina simultaneamente com metoxamina, a fim de prevenir as alterações causadas pelo nitrato na pressão arterial e frequência cardíaca. Comparados com o grupo controle, ambos os grupos de animais tratados mostram uma redução do tamanho do infarto, sendo que a aplicação simultânea de nitroglicerina e metoxamina não causou uma redução no tamanho do infarto maior ao do segundo grupo, no qual foi administrada somente a nitroglicerina; o mesmo acontecendo com o fluxo coronário, já que tanto no segundo como no terceiro grupo houve um incremento similar deste na área de infarto. Os autores concluem que o efeito protetor da nitroglicerina não depende da queda na demanda de oxigênio pelo miocárdio, mas sim de um incremento no fluxo colateral, resultante da vasodilatação coronária. Os autores indicam que, ao contrário dos trabalhos anteriores, a aplicação simultânea de metoxamina não teve um efeito benéfico adicional, possivelmente porque as alterações da frequência cardíaca causadas pela nitroglicerina neste estudo, foram pequenas.

Posteriormente, JUGDUTT (1983a) demonstrou que o uso da nitroglicerina numa dose que reduzisse a pressão arterial em 10%, levaria a uma redução da área de necrose. Já doses maiores não teriam o mesmo efeito benéfico.

Este mesmo autor analisou também os efeitos da nitroglicerina, do ibuprofeno e da prostaciclina sobre a área de infarto, assim como sobre a cicatrização do tecido miocárdico após o infarto (JUGDUTT, 1985). O autor demonstra que a terapia com estes três fármacos leva a uma redução do tamanho do infarto. A nitro-

glicerina e a prostaciclina não alteraram de forma significativa o processo de cicatrização, já o ibuprofeno causou uma marcada expansão do infarto, similar ao grupo controle.

JOHNSON III e cols. (1990a) analisam o efeito protetor do Nitrito de Sódio acidificado, que forma NO, em estudo experimental de isquemia miocárdica seguida de reperfusão. O Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) foi administrado em três doses diferentes, sendo que nenhuma delas causou alterações hemodinâmicas significativas. A lesão isquêmica e o tamanho da área necrótica foram menores nos grupos nos quais foram utilizadas doses maiores de  $\text{NaNO}_2$ .

Foi analisado também o efeito desta conduta sobre o acúmulo de neutrófilos na área isquêmica, mostrando que com doses maiores houve uma redução significativa do mesmo.

Em estudo paralelo *in vitro* os autores obtiveram uma inibição da agregação plaquetária com o  $\text{NaNO}_2$ .

Os autores mencionam como possíveis mecanismos pelos quais o  $\text{NaNO}_2$  exerce seu efeito protetor, o efeito vasodilatador do mesmo; a provável interação com outros mediadores da vasodilatação, como a  $\text{PI}_2$ ; a inibição de mediadores liberados por neutrófilos ou plaquetas com efeito vasoconstritor e citotóxico; e por último, um efeito citoprotetor direto sobre o tecido miocárdico.

Num outro trabalho (JOHNSON III, TSAO, LEFFER, 1990b), comentado anteriormente, o uso concomitante de Nitrito de Sódio e da enzima superóxido dismutase mostrou um efeito protetor, independente da presença de neutrófilos.

O estudo experimental de FUKUYAMA e ROBERTS (1978) não mostra uma redução significativa do tamanho do infarto com a infusão de nitroglicerina num período de 8 horas após a oclusão co-

ronária. Os autores concluem que a nitroglicerina pode ser benéfica no tratamento do espasmo coronário, não o sendo na oclusão coronária prolongada. Com referência a este trabalho, JUGDUTT e cols. (1981a) sugerem que os motivos para este resultado negativo poderiam ser os seguintes: uma queda importante na PAM em alguns dos animais tratados; as altas frequências cardíacas nos animais tratados em comparação com o grupo controle; o pequeno incremento no fluxo coronário colateral obtido e o método de análise do infarto, aonde não foi considerado o tamanho do leito coronário ocluído.

### Estudos clínicos

Vários estudos clínicos têm demonstrado o efeito benéfico dos nitratos, causando uma redução da lesão isquêmica e do tamanho do infarto, assim como uma redução na mortalidade após o mesmo.

FLAHERTY e cols. (1975), mostram que a aplicação intravenosa de nitroglicerina em pacientes com IAM dentro as primeiras 15 horas após o início do quadro, leva a uma melhora da função ventricular e a uma redução da extensão da isquemia miocárdica avaliada pelo somatório das alterações do segmento ST.

Posteriormente, o mesmo grupo de autores (FLAHERTY et al., 1976), analisa o efeito da infusão intravenosa de uma dose maior de nitroglicerina dentro as 24 horas após o infarto, num grupo de pacientes da classe funcional I, II e III. Nos pacientes com infarto anterior, foi realizado um mapeamento seriado do segmento ST, que mostrou uma redução da extensão da isquemia miocárdica

com o uso da nitroglicerina. Os resultados mostram também uma melhora na função ventricular no subgrupo de pacientes com disfunção ventricular esquerda severa.

CHICHE e cols. (1977) mostraram uma redução significativa dos índices de extensão secundária da necrose em pacientes tratados com nitroglicerina. Este estudo mostra também uma redução na mortalidade no grupo de pacientes tratados com nitroglicerina comparados com o grupo controle.

BUSSMANN e cols. (1981a), demonstraram uma redução significativa da liberação de creatino-quinase em pacientes com infarto de parede anterior e posterior, independentemente se a nitroglicerina foi administrada antes ou após oito horas do início dos sintomas.

JAFFE e cols. (1983) mostram uma redução na área do infarto, similar à obtida por BUSSMANN, mas unicamente em pacientes com infarto de parede inferior.

No estudo de JUGDUTT e cols. (1983b), a terapia com nitroglicerina por via parenteral em pacientes com infarto de parede anterior, e em doses que causaram uma queda da PAM de 10% do valor inicial, provocou uma menor extensão da assinergia do ventrículo esquerdo, analisada por ecocardiografia. Este efeito foi associado a uma redução da lesão isquêmica e do tamanho do infarto.

ZASLAVSKAYA e cols. (1985), mostram que o uso de nitroglicerina de ação prolongada leva a uma redução da zona de peri-infarto no terceiro dia de evolução. Uma análise randomizada retrospectiva mostra uma menor incidência de complicações, como a insuficiência de ventrículo esquerdo, distúrbios de ritmo e condução e edema pulmonar.

Recentemente, JUGDUTT e WARNICA (1988) demonstram o efeito benéfico do uso da nitroglicerina sobre a área de lesão, tanto em pacientes com infarto de parede anterior quanto inferior. Já a mortalidade após 3 e 12 meses era menor no grupo com infarto de parede anterior, não acontecendo o mesmo com os pacientes com infarto de parede inferior.

Numa meta-análise, YUSUF e cols. (1988) fazem uma revisão de 10 estudos nos quais a nitroglicerina ou o nitroprussiato de sódio foram aplicados em pacientes com IAM, abrangendo um total de 2.000 pacientes. A análise coletiva destes dados mostra uma forte evidência do efeito benéfico desta conduta, já que os resultados indicam uma redução em 35% no risco de morte nos pacientes tratados comparados com o grupo controle. A redução do risco de mortalidade com a nitroglicerina é de 45%, sendo maior aos resultados obtidos com nitroprussiato de sódio, com uma redução de 23%, embora esta diferença não seja significativa nesta meta-análise. Este estudo mostra também uma redução maior da mortalidade precoce, comparada com a mortalidade tardia. Estes dados sugerem que os nitratos orgânicos aplicados por via intravenosa reduzem a mortalidade quando aplicados precocemente em pacientes com infarto de miocárdio moderado ou severo.

Um outro nitrato aplicado no tratamento de IAM é o dinitrato de isossorbida (DNIS), com resultados conflitantes. Assim GROSSER e cols. (1983) mostram uma redução na mortalidade em pacientes com IAM quando tratados com DNIS por via oral, nas primeiras 8 horas após o início dos sintomas, não ocorrendo o mesmo com os pacientes tratados após as 8 horas. Os autores mostram também uma redução significativa na incidência de arritmias car-

díacas nos primeiros 5 dias após IAM no grupo de pacientes tratados com DNIS.

Já PABÓN OSUNA e cols. (1985), num estudo de pacientes com infarto de parede inferior tratados com DNIS sublingual, não mostram efeito benéfico algum sobre o tamanho do infarto.

MARMOR e KLEIN (1990) analisam o efeito da administração do DNIS em spray sobre a liberação da isoenzima creatino-quinase-MB (CK-MB) após isquemia miocárdica induzida por estimulação atrial em pacientes com doença coronária. Os autores mostram que embora a estimulação atrial causasse uma depressão do segmento ST, o DNIS levou a uma abolição completa da liberação de CK-MB dosada em sangue obtido do seio coronário, concluindo que, independente de se a elevação dos níveis de CK-MB represente uma necrose miocárdica ou uma isquemia miocárdica reversível, estes resultados indicam um possível efeito benéfico do DNIS no processo específico relacionado à liberação de CK-MB pelas células miocárdicas.

FITZGERALD e BENNETT (1990) analisam o efeito do mononitrito-5 de isossorbida (MN-5 ISO) aplicado por via oral, em 360 pacientes com IAM, classificados de acordo com o grau de insuficiência cardíaca. A mortalidade total no grupo tratado e no grupo controle é similar após 5 dias e 6 meses. No entanto, em pacientes com insuficiência cardíaca existe uma redução não significativa na mortalidade no grupo tratado com MN-5 ISO. Já no grupo de pacientes sem insuficiência cardíaca ocorre um incremento não significativo na mortalidade no grupo de pacientes tratados, após 5 dias. Os autores concluem que o MN-5 ISO pode ser benéfico em pacientes com IAM com insuficiência cardíaca, no entanto questio-

nam o uso de nitratos em pacientes sem insuficiência cardíaca.

Evidências do efeito benéfico dos nitratos orgânicos sobre a incidência de arritmias causadas por isquemia

Estudos têm analisado também o efeito dos nitratos sobre a incidência deste tipo de arritmias cardíacas.

KENT e cols. (1974) num modelo experimental, analisaram o efeito da nitroglicerina na estabilidade elétrica do miocárdio isquêmico através da medida do limiar de fibrilação ventricular antes e após isquemia aguda. No grupo de animais tratados com nitroglicerina, o limiar de fibrilação ventricular após 6 minutos de isquemia aguda, teve um aumento significativo. Num outro grupo, no qual foi aplicada a fenilefrina, um agonista alfa-adrenérgico, a fim de evitar a queda da pressão arterial causada pela nitroglicerina, o limiar de fibrilação ventricular teve um aumento ainda maior. Os autores sugerem que este efeito benéfico esteja relacionado provavelmente a uma redução da lesão isquêmica.

Este mesmo grupo de autores (BORER et al., 1974), analisa o efeito da nitroglicerina na incidência de fibrilação ventricular espontânea durante a oclusão coronária. Este trabalho mostra que a infusão intravenosa de nitroglicerina conjuntamente com metoxamina, leva a uma queda significativa da incidência de fibrilação ventricular na isquemia aguda, em comparação com o grupo controle.

Estudos clínicos têm também analisado o efeito dos nitratos orgânicos sobre a incidência das arritmias na isquemia miocárdica aguda. MIHALICK e cols. (1974) mostram que o uso de ni-

troglicerina em pacientes com IAM, reduz a incidência de extrasístoles ventriculares em comparação com o grupo controle.

BECKER e cols. (1978) analisam o efeito do uso de nitroglicerina na incidência de arritmias ventriculares complexas em pacientes com IAM. A análise por sistema Holter 24 horas, mostrou que no primeiro dia de terapia, a incidência deste tipo de arritmias era similar tanto no grupo controle, como no grupo tratado com nitroglicerina. Já no 10º dia após IAM, o grupo de pacientes tratados com nitroglicerina não apresentava nenhum tipo de arritmias ventriculares complexas, já o grupo controle mostrava uma incidência importante das mesmas.

Os resultados dos trabalhos mencionados sugerem que a capacidade da droga em diminuir a lesão isquêmica tem importância funcional (MYERS et al., 1975).

Os efeitos benéficos do uso dos nitratos orgânicos e derivados no tratamento da doença isquêmica coronária, tanto em estudos experimentais como clínicos, estão relacionados, segundo os autores, aos efeitos hemodinâmicos, causando uma redução do consumo de oxigênio pelo miocárdio (AHLNER et al., 1991; AMTORP, 1987), ao efeito vasodilatador coronário (BROWN et al., 1981; DODGE, BROWN, 1984; AMTORP, 1987) e ao provável efeito antiagregante plaquetário dos mesmos (AHLNER et al., 1991; DE CATERINA et al. 1984; DE CATERINA et al., 1990; DIODATI et al., 1990; GERZER et al., 1989).

## DISCUSSÃO DO MÉTODO APLICADO PARA A ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO MONONITRATO-5 DE ISOSSORBIDA

Para análise da atividade anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida foi aplicado neste trabalho um método cinético de análise da atividade lítica do Complemento.

Para a avaliação da atividade lítica do Complemento pela via clássica, foram utilizadas hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina, já para a avaliação da via alternativa foram utilizadas hemácias de coelho com uma conhecida propriedade ativadora da via alternativa (PLATTS-MILLS, ISHIZAKA, 1974).

O método utilizado consiste num ensaio turbidimétrico da lise das hemácias; nas condições aplicadas, a absorvância da suspensão de eritrócitos é diretamente proporcional à concentração das células (POLHILL JR., PRUITT, JOHNSTON JR., 1978). A absorvância de várias amostras pode ser mensurada de forma sucessiva, o que permite uma análise comparativa.

Já que a lise causa uma queda da turbidez da suspensão de hemácias, o processo pode ser seguido continuamente através da mensuração da absorvância em função do tempo. O uso da longitude de onda de 700 nanômetros evita interferências, já que está fora da absorção de banda da hemoglobina, além de que o espectro eritrocitário não contribui significativamente para a absorvância nesta longitude de onda. Portanto, com a lise celular, a absorvância da suspensão cai em proporção direta ao número de células lisadas. O tempo no qual a metade das células são lisadas ( $T_{1/2}$ ) é o tempo no qual a absorvância é equidistante entre seu valor

inicial ao tempo 0, antes da lise, e a absorvância residual, quando todas as células são lisadas (POLHILL JR., PRUITT, JOHNSTON JR., 1978).

As leituras turbidimétricas poderiam ser afetadas pela sedimentação natural das hemácias, no entanto, a velocidade desta sedimentação natural é lenta, já que para acontecer a queda da absorvância em 50% por sedimentação das hemácias de uma suspensão similar à utilizada neste trabalho, são necessários aproximadamente 80 minutos (POLHILL JR., PRUITT, JOHNSTON JR., 1978). No presente trabalho os tempos máximos de leitura de hemólise encontram-se entre 20 a 30 minutos. Portanto, a sedimentação natural das hemácias pode ser considerada sem significância prática. É por este motivo que foram realizados experimentos iniciais a fim de determinar um T 1/2 controle suficientemente curto, para que os T 1/2 das diferentes soluções estudo não tivessem uma duração maior a 30 minutos. Produto disto e também a escolha das diferentes diluições de soro utilizadas nos experimentos tanto para a via clássica, como alternativa.

Como foi mostrado anteriormente, o método aplicado neste trabalho mostrou uma reprodutibilidade adequada, além de ser de execução relativamente simples e rápida (BARBOSA, 1983; FERRIANI, 1988).

Deve-se lembrar também que o tempo hábil para a utilização do sistema indicador de hemólise era limitado, pelo qual teve-se a necessidade de preparar por várias vezes as suspensões de hemácias no transcurso dos experimentos.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO

Este trabalho foi realizado para determinar a atividade anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida *in vitro*. O método utilizado permitiu analisar o efeito da droga sobre a atividade lítica do Complemento, em ambas as vias de ativação, a via clássica e alternativa.

Os resultados do primeiro experimento (tab. 5 e 6, fig. 9 e 10) mostram uma atividade anticomplementar do MN-5 ISO atuando sobre as duas vias. Esta atividade anticomplementar mostra ser dependente da concentração, obtendo-se uma maior inibição da atividade hemolítica do Complemento com o uso de concentrações progressivamente maiores. O fato de o MN-5 ISO atuar sobre ambas as vias de ativação, sugere que este efeito seja exercido sobre a via terminal da cascata de Complemento, ou sobre diversos componentes da mesma.

Os resultados do segundo experimento, no qual se analisa o efeito do tempo de incubação sobre a atividade anticomplementar do MN-5 ISO (tab. 7 e 8, fig. 11 e 12), mostram um aumento moderado da ação anticomplementar, com tempos de incubação de 0 a 30 minutos, sendo que com tempos maiores, houve uma estabilização desta atividade anticomplementar. Estes resultados indicam que o MN-5 ISO exerce sobre a cascata de Complemento um efeito inibitório e não de consumo, já que tempos maiores de incubação, até 120 minutos, levariam a um consumo total do Complemento se a droga ativasse a cascata do Complemento, como foi demonstrado para a gama globulina agregada e a fração ativa do veneno de sapo ( BAR-

BOSA, 1983), o que de fato não ocorreu.

O aumento moderado com tempos de incubação de 0 a 30 minutos não pode ser explicado em base aos resultados obtidos, podendo se tentar dar algumas possíveis explicações. A primeira é que a solução da droga era mantida à temperatura ambiente (22°C), sendo adicionada à solução de Complemento, a qual era pré-incubada a 37°C. Então, esta adição da solução da droga com uma menor temperatura, poderia levar à queda da temperatura da mistura provocando por conseguinte um retardo na interação química droga-Complemento. Esta possibilidade é particularmente válida para explicar as diferenças nos resultados obtidos com tempos de incubação de 0 min, comparados com os tempos de incubação restantes.

É sabido que os nitratos orgânicos sofrem uma biotransformação no plasma sanguíneo (ARMSTRONG et al., 1980; COSSUM, ROBERTS, 1985; TAYLOR, JOANNIDES, PARKE, 1989), sendo esta transformação dependente do tempo, o que levaria a supor da necessidade de um tempo determinado de incubação da droga com a solução de Complemento para esta biotransformação acontecer, com a consequente liberação de metabólitos, os quais seriam responsáveis pelo efeito inibitório sobre a cascata do Complemento. No entanto, dadas as altas concentrações da droga e os pequenos volumes de soro utilizados, esta hipótese é pouco provável, embora não possa ser descartada definitivamente.

O terceiro experimento, no qual analisa-se o efeito inibitório do mononitrato sobre as diferentes soluções de Complemento, tanto pela via clássica como alternativa, foi realizado com o objetivo de eliminar a possibilidade de um provável efeito da droga sobre os componentes dos tampões utilizados, e não sobre os com-

ponentes da cascata de Complemento. Os resultados obtidos (tab. 9 e 10, fig. 13 e 14) demonstram que o efeito inibitório é dependente da solução de Complemento utilizada, já que as soluções que continham uma maior concentração de Complemento sofreram uma inibição menor; devemos recordar que o volume final de todos os experimentos era o mesmo, portanto soluções que continham uma maior concentração de Complemento, continham por sua vez, uma menor concentração dos componentes dos tampões utilizados. Estes resultados eliminam a possibilidade de uma provável ação da droga sobre os componentes dos tampões utilizados.

O fato de que as formas básicas das curvas, independentemente da solução de Complemento utilizada, sejam semelhantes entre si, reforçam a afirmação anterior de que o efeito inibitório da droga é dependente da interação da mesma com algum dos componentes da cascata de Complemento.

Mas os resultados deste experimento sugerem uma outra possibilidade: a de que a droga atuasse diretamente sobre as hemácias, proporcionando a elas uma proteção contra a atividade lítica do Complemento, já que nestes experimentos, a concentração da droga utilizada em todos eles, assim como a solução de hemácias, ambas eram constantes; portanto, a maior inibição obtida sobre uma solução contendo um menor volume de SHN, seria simplesmente consequência do volume de soro utilizado.

A condutibilidade da solução da droga que era de 14,4 mS provavelmente não tenha interferido sobre a atividade lítica do Complemento. BARBOSA (1983) mostra que soluções com uma condutibilidade maior a 20 mS tornam o meio inadequado à atividade do Complemento.

A concentração sérica do MN-5 ISO após uma dose oral de 20 a 80 mg, é  $2 \times 10^{-6}$  M a  $3 \times 10^{-6}$  M (ABSHAGEN, 1984; MAJOR et al., 1984, MEIBNER et al., 1991). Concentrações desta ordem não têm nenhum efeito sobre a atividade hemolítica do Complemento nas condições experimentais aplicadas neste estudo *in vitro*, já que as concentrações utilizadas variaram de  $2,1 \times 10^{-2}$  M a  $1,7 \times 10^{-1}$  M para a via clássica e  $2,7 \times 10^{-2}$  M a  $2,2 \times 10^{-1}$  M para a via alternativa. Frente a isso pode-se colocar em dúvida o significado biológico dos resultados obtidos neste trabalho.

No entanto, pode-se tentar analisar as possíveis causas pelas quais precisou-se de concentrações tão elevadas para obter resultados significativos, no que se refere à inibição da atividade hemolítica do Complemento neste estudo, o qual foi realizado *in vitro* e em condições específicas. Nesta tentativa, citaremos alguns fatos que a nosso juízo poderiam, pelo menos teoricamente, esclarecer esta questão.

Em primeiro lugar, as análises foram realizadas *in vitro*, com condições ideais para o Complemento ser ativado, já que o sistema indicador de hemólise, isto é, o sistema hemolítico nos experimentos da via clássica, e as hemácias de coelho nos experimentos da via alternativa, proporcionam as condições ideais para ativação da cascata do Complemento; além disto, o meio em que se desenvolve a reação consiste de tampões específicos, contendo os íons necessários para a ativação da cascata. Estas condições permitem que volumes pequenos de soro causem a lise de um número considerável de hemácias num curto período de tempo.

Por outro lado, nos experimentos, o alvo do Complemento

humano foram hemácias heterólogas, de carneiro e de coelho. Sabe-se que células autólogas estão protegidas contra o efeito lítico do Sistema Complemento por várias proteínas inseridas na sua membrana e outras solúveis, as quais, através de diferentes mecanismos, fazem com que a lise mediada pelo Complemento seja menos efetiva quando C8 e C9 são homólogos em relação às células alvo (ABBAS et al., 1991; HANSCH, 1988).

As proteínas conhecidas com esta propriedade de proteção de células autólogas são as seguintes proteínas da membrana celular: proteína de associação a C8 (C8bp - C8-binding-protein) chamada também de fator de restrição homólogo (*homologous restriction factor*); o inibidor de membrana da lise reativa, chamado também de protectina (CD59); o fator acelerador da dissociação (DAF - *decay accelerating factor*); a proteína cofatora de membrana (*membrane cofactor protein* (MCP)); e o receptor de Complemento tipo 1 (CR1) (ABBAS et al., 1991; HANSCH, 1988; LACHMANN, 1991; LAW, REID, 1988).

A expressão destas proteínas, além das hemácias, foram demonstradas em células miocárdicas (VAKEVA, LAURILA, MERI, 1992), células endoteliais (BROOIMANS et al., 1992) e plaquetas (MORGAN, 1991), entre outras; embora o trabalho de VAKEVA e cols. (VAKEVA, LAURILA, MERI, 1992) mostrou que nas áreas infartadas a expressão de CD59 estava claramente diminuída.

As proteínas solúveis com esta mesma propriedade são o inibidor de C1, o fator H, o fator I, a proteína de associação a C4 (C4bp) e a proteína S (ABBAS et al., 1991; LAW, REID, 1988; VERMES, 1989).

As propriedades principais destas proteínas foram mencio-

nadas nas tabelas 2 e 3.

Sabe-se que o processo de formação do complexo lítico de membrana C5b-9 para lise de células nucleadas é essencialmente similar àquele dos eritrócitos. Diferenças entretanto existem no que se refere à eficiência da lise, já que é necessário muito mais Complemento para a lise daquelas (HANSCH, 1988).

Segundo KOSKI e cols. (1983), para a lise de uma célula nucleada acontecer, é necessária a formação de mais de um canal transmembrana, o que a diferencia do processo de lise de hemácias, onde a presença de uma única lesão funcional é suficiente (ROMMEL, MAYER, 1973). Portanto, provavelmente, a lesão causada pelo Complemento ativado durante o IAM dependa da formação de vários CLM sobre o miócito.

A cinética da ativação da cascata de Complemento, assim como o efeito lítico desta ativação depende então de vários fatores como a concentração plasmática dos diferentes componentes do sistema, a presença de ativadores da cascata, do local de ativação e a presença de moduladores e inibidores da ativação, e o tipo de célula alvo, entre outros. No miocárdio isquêmico, esta ativação dependerá provavelmente de todos estes fatores.

As concentrações obtidas *in vivo* com doses terapêuticas de nitratos orgânicos, poderiam eventualmente provocar uma inibição da ativação do Complemento como a obtida no presente trabalho, em condições *in vitro*.

Num estudo experimental TORFGARD e cols. (1989) demonstraram que a concentração da nitroglicerina no coração de rato é de 2 a 3 vezes maior do que no plasma sanguíneo.

Devemos lembrar também que a aplicação dos nitratos orgâ-

nicos na terapêutica da isquemia miocárdica inclui a administração por via intracoronária (BROWN et al., 1981; CORWIN, REIFFEL, 1985; DODGE, BROWN, 1984; HACKETT et al., 1987), o que obviamente permite obter-se uma maior concentração deles na circulação coronária.

Pode-se também supor que a interação da droga com os componentes da cascata de Complemento *in vivo* poderia ser diferente das condições apresentadas no estudo *in vitro*, porque, por um lado, a cinética da ativação da cascata de Complemento no IAM provavelmente seja diferente da cinética da ativação *in vitro*, sabe-se que no tecido isquêmico, as alterações histológicas ocorrem de forma evolutiva no tempo, processo denominado por REIMER e JENNEINGS como *wavefront phenomenon* (REIMER et al., 1977; REIMER, JENNINGS, 1979), no qual o processo necrótico avança do sub-endocárdio para o subepicárdio.

Por outro lado, se os resultados obtidos neste trabalho são o produto do efeito de algum metabólito do nitrato, existe a possibilidade de que em condições *in vivo*, a formação deste metabólito ser maior por interação com componentes plasmáticos ou celulares.

Sabe-se que a hemoglobina (Hb) interfere no efeito vasodilatador dos nitratos orgânicos e na sua biotransformação (BENNETT, citado em BENNETT et al., 1988; FEELISCH, NOACK, 1987; MARTIN, W. et al., 1985). É difícil definir o possível efeito da Hb nos experimentos do presente trabalho, já que ocorre uma liberação desta após a lise das hemácias.

Analisando os resultados do presente trabalho, que mostram

que o MN-5 ISO, em concentrações altas leva à inibição do efeito citolítico do Complemento, conjuntamente com os resultados obtidos por JOHNSON III e cols. (1990a), que sugerem que o nitrito de sódio, que libera NO, poderia exercer um efeito citoprotetor direto sobre o miocárdio, e os resultados do estudo de MARMOR e KLEIN (1990), no qual o DNIS aboliu completamente a liberação de CK-MB pelas células miocárdicas isquêmicas, podemos sugerir que os nitratos orgânicos e derivados exercem efetivamente um efeito citoprotetor sobre o tecido isquêmico, inibindo talvez a atividade lítica do Complemento.

Futuros estudos são necessários para estabelecer esta possível interação dos nitratos orgânicos com o Sistema de Complemento, e determinar se a atividade anticomplementar daqueles demonstrada no presente trabalho, representa um mecanismo adicional de proteção do tecido miocárdico isquêmico.

#### **SOBRE O MECANISMO DE AÇÃO**

Com base nos resultados obtidos, não é possível determinar o mecanismo de ação do mononitrato-5 de isossorbida sobre a cascata de Complemento. Na literatura existe uma única referência sobre a interação da nitroglicerina com componentes da cascata de Complemento (ROTHER, 1988). Segundo esta referência a nitroglicerina, numa concentração de 1 ug/ml, causaria a conversão de C3 e do fator B, assim como a depressão de C1. Portanto, a nitroglicerina teria uma ação pró-complementar, ativando a cascata de Complemento pela via alternativa e provavelmente uma ação inibitória da via clássica causando uma depressão de C1. Os resultados obti-

dos no presente trabalho mostram que um outro nitrato, o mononitrato-5 de isossorbida, em concentrações altas, causa uma inibição de ambas as vias de ativação da cascata. É difícil fazer uma análise dos resultados do citado trabalho, já que não dispomos de nenhum dado referente ao método utilizado pelos autores. A divergência com o presente trabalho ser consequência do tipo diferente de fármaco utilizado.

Sabe-se que os nitratos orgânicos, através de seu grupo  $\text{NO}_2$  reagem com grupos sulfidríla (-SH), levando à oxidação destes.

A interação entre estes dois grupos químicos está implicada em vários aspectos farmacológicos dos nitratos orgânicos. NEEDLEMAN e cols. (1973) demonstraram que o ácido etacrínico, um alquilante dos grupos SH, produz uma queda na sensibilidade de vasos sanguíneos a vários vasodilatadores, entre eles o trinitrato de glicerila, sugerindo que o efeito vasodilatador deste dependeria da interação com o grupo tiol presente num receptor específico para nitratos. A biotransformação dos nitratos orgânicos estaria relacionada também com a interação com grupos SH (AHLNER et al., 1991; FEELISCH et al., 1991; LUSCHER, 1991; MONCADA, PALMER, HIGGS, 1988).

FEELISCH e NOACK (1987) demonstraram haver uma liberação não enzimática de óxido nítrico dos nitratos quando incubados com cisteína que contém o grupo SH. A velocidade de liberação de NO aumenta com o número de grupos  $\text{NO}_2$  na molécula, sendo o trinitrato de glicerila mais ativo que o dinitrato de isossorbida e o mononitrato-5 de isossorbida.

A ativação da guanilato ciclase pelos nitratos também requereria da interação destes com grupos tiol, (IGNARRO, GRUETTER, 1980; KUKOVETZ, HOLZMANN, SCHMIDT, 1991), embora seja isto objeto de discussão (CRAVEN, DeRUBERTIS, 1983; GRUETTER, LEMKE, 1986).

Outros autores mostram que a interação da nitroglicerina com N-acetilcisteína, que contém um grupo SH reduzido, leva a uma potencialização de diversos efeitos farmacológicos daquela (revisado por FLAHERTY, 1989; FUNG et al., 1988; HOROWITZ et al. 1983; HOROWITZ et al., 1988; LOSCALZO, 1985; STAMLER, CUNNINGHAM, LOSCALZO, 1988). Por último, estudos mostram que a atenuação dos efeitos da nitroglicerina é revertida, pelo menos parcialmente, pela cisteína (KUKOVETZ, HOLZMANN, SCHMIDT, 1991) ou N-acetilcisteína (FUNG et al., 1988).

Um estudo recente (STAMLER et al., 1992) demonstrou a formação de S-nitroso proteínas resultantes da interação do NO com proteínas que contém grupos tiol livres. As S-nitroso proteínas conservam as propriedades farmacológicas do NO.

Várias proteínas do Complemento contém na sua estrutura o grupo SH livre, ou participando da formação de ligações disulfeto ou tioester, com funções específicas. Citaremos algumas delas.

Cada uma das cadeias de C1q (A, B, C) possui na posição 171 uma cisteína livre (SIM, REID, 1991), a qual pode estar envolvida na formação de pontes disulfeto entre C1q e IgG, que também contém radicais SH livres (MARTIN, KAUL, LOOS, 1990; SIM, REID, 1991).

A ligação tioester, presente nas moléculas de C3 e C4, cumpre uma função importante no processo de ativação da cascata

de Complemento. Após a ativação de C4 e C3 por convertases, a ligação tioéster é exposta, e na presença de aceptores apropriados, forma ligações éster ou amida, por exemplo com a membrana da célula alvo (BURGER, HAMMER, 1988). A hidrólise espontânea desta ligação da molécula de C3 inicia a ativação da cascata pela via alternativa (LAW, REID, 1988).

Esta ligação tioéster que se caracteriza por sua labilidade (BURGER, HAMMER, 1988), pode também sofrer o ataque de grupos nucleofílicos, gerando moléculas hemoliticamente inativas (HOSSETTER, GORDON, 1987).

Além disto, segundo JACQUIER e cols. (JACQUIER, GABERT, COLOMB, 1991), um grupo SH livre, formado após o rompimento da ligação tioéster de C3, estaria envolvido na formação de ligações com alguns aceptores.

PODACK e TSCHOPP (1982) demonstraram ocorrer uma polimerização espontânea de C9 após a incubação prolongada a 37°C. A estrutura resultante desta polimerização é similar àquela do complexo lítico de membrana.

YAMAMOTO e cols. (1982), em estudo *in vitro*, demonstraram que o glutátion, um peptídeo que possui um grupo SH na sua molécula, catalisa a formação de ligações disulfeto entre moléculas de C9, o que leva à polimerização destas moléculas. Os autores sugerem que este tipo de ligações disulfeto ocorreriam no complexo lítico de membrana nas hemácias, processo mediado por moléculas de glutátion presentes em ditas membranas.

Num trabalho posterior (YAMAMOTO, MIGITA, 1983), este mesmo grupo de autores demonstrou que a formação de ligações covalentes tipo disulfeto pode também ocorrer espontaneamente após a

incubação prolongada a 37°C, sugerindo que o provável mecanismo desta polimerização espontânea seria através da redução espontânea de ligações disulfeto presentes na molécula de C9, formando grupos SH, os que posteriormente participariam da formação de ligações disulfeto com uma outra molécula de C9.

A polimerização de C9 influenciaria no tamanho da lesão causada pelo complexo lítico de membrana (HANSCH, 1988).

Em base a estes dados da literatura, podemos sugerir, embora hipoteticamente, que o efeito anticomplementar do mononitrato-5 de isossorbida poderia estar relacionado à interação do grupo NO<sub>2</sub> da sua molécula, com o grupo SH de alguma das moléculas dos diferentes componentes do Complemento, ou da membrana aceptora do CLM, intervindo, por exemplo, no processo de ligação das moléculas C1q com o fragmento Fc do anticorpo, ou na formação do CLM, além de poder interagir com as ligações tioester presentes em C4 e C3, interferindo no processo de ativação destas moléculas.

O fato de o mononitrato-5 de isossorbida ter um efeito inibitório sobre ambas as vias de ativação da cascata de Complemento, sugere que esta ação seja exercida na etapa final, comum a ambas as vias, ou sobre diferentes componentes da cascata.

Certamente, podem existir outros mecanismos de ação do mononitrato-5 de isossorbida sobre o Complemento, causando uma inibição da atividade hemolítica deste.

**CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

- 1 - O mononitrato-5 de isossorbida, em altas concentrações, tem uma atividade anticomplementar, *in vitro*.
- 2 - Esta atividade anticomplementar é exercida sobre ambas as vias de ativação da cascata de Complemento.
- 3 - Novos estudos são necessários para determinar se a atividade anticomplementar, demonstrada neste estudo para o mononitrato-5 de isossorbida, é comum a todos os nitratos orgânicos e derivados, e se a mesma representa um mecanismo adicional destes na proteção do tecido miocárdico isquêmico.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 - PRODUTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

Trietanolamina: Mallinckrodt, St. Louis, Missouri, 63134, USA.

Cloreto de Sódio: Merck S.A. Ind. Químicas, Brasil.

Cloreto de Cálcio: Merck S.A. Ind. Químicas, Brasil.

Azida Sódica: Merck S.A. Ind. Químicas, Brasil.

Ácido Etilenodiamino-tetracético (EDTA): Merck S.A. Ind. Químicas, Brasil.

Ácido Clorídrico: Merck S.A. Ind. Químicas, Brasil.

Ácido Etileno Glicol-Bis (B-Aminoetil éter) N, N, N', N' - Tetracético (EGTA): Merck S.A. Ind. Químicas, Brasil.

Sulfato de Magnésio: J. T. Becker Chemical.

Gelatina: DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

## ANEXO 2

Tabela 15 - Medida da atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via clássica

CUBETA	CONCENTRAÇÃO MN-5 ISO (Molar)	T 1/2 (seg)			% INIBIÇÃO		
		1º E	2º E	3º E	1º E	2º E	3º E
C	-	198	177	180	-	-	-
5	0,0212	216	189	195	8,5	6,5	7,5
4	0,0425	240	219	219	17,5	19,0	18,0
3	0,0850	327	285	300	39,5	38,0	40,0
2	0,1130	387	351	366	49,0	50,0	51,0
1	0,1700	627	588	654	68,5	70,0	72,5

C - Controle  
E - Experimento

## ANEXO 3

Tabela 16 - Medida da atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via alternativa

CUBETA	CONCENTRAÇÃO MN-5 ISO (Molar)	T 1/2 (seg)			% INIBIÇÃO		
		1º E	2º E	3º E	1º E	2º E	3º E
C	-	294	300	306	-	-	-
5	0,0275	342	348	348	14,0	14,0	12,0
4	0,0550	384	390	384	23,5	23,0	20,0
3	0,1100	480	510	492	39,0	41,0	38,0
2	0,1460	600	612	564	51,0	51,0	46,0
1	0,2200	1254	1620	1692	76,5	81,5	82,0

C - Controle  
E - Experimento

## ANEXO 4

Tabela 17 - Efeito do tempo de incubação na atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via clássica (SHN: 45 ul/ml tampão)

T (min)	T 1/2 (seg)				% INIBIÇÃO	
	CONTROLE		MN-5 ISO		1º E	2º E
	1º E	2º E	1º E	2º E		
0	240	210	533	456	55	54
5	210	180	477	439	56	59
15	189	168	497	442	62	62
30	204	186	537	503	62	63
60	201	186	543	531	63	65
120	222	204	694	600	68	66

T - Tempo de incubação a 37° C

SHN - Soro humano normal

E - Experimento

## ANEXO 5

Tabela 18 - Efeito do tempo de incubação na atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via clássica (SHN: 33 ul/ml tampão)

T (min)	T 1/2 (seg)				% INIBIÇÃO	
	CONTROLE		MN-5 ISO		1º E	2º E
	1º E	2º E	1º E	2º E		
0	240	240	600	600	60	60
5	210	228	656	712	68	68
15	204	240	728	686	72	65
30	216	216	720	800	70	73
60	234	258	1114	1032	79	75
120	258	270	1075	1000	76	73

T - Tempo de incubação a 37° C

SHN - Soro humano normal

E - Experimento

## ANEXO 6

Tabela 19 - Efeito do tempo de incubação na atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via clássica (SHN: 26,5 ul/ml tampão)

T (min)	T 1/2 (seg)				% INIBIÇÃO	
	CONTROLE		MN-5 ISO		1º E	2º E
	1º E	2º E	1º E	2º E		
0	276	294	767	735	64	60
5	288	276	960	862	70	68
15	276	306	1022	1177	73	74
30	252	276	1050	1022	76	73
60	276	324	2123	1705	87	81
120*	-	-	-	-	-	-

\* Experimento não realizado

T - Tempo de incubação a 37° C

SHN - Soro humano normal

E - Experimento

## ANEXO 7

Tabela 20 - Efeito do tempo de incubação na atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via alternativa (SHN: 380 ul/ml tampão)

T (min)	T 1/2 (seg)						% INIBIÇÃO		
	CONTROLE			MN-5 ISO			1º E	2º E	3º E
	1º E	2º E	3º E	1º E	2º E	3º E			
0	318	336	360	558	579	621	43	42	42
5	312	276	306	624	552	588	50	50	48
15	282	294	312	558	555	567	49	47	45
30	294	300	330	754	698	805	61	57	59
60	348	342	336	940	1069	1067	63	68	68
120	360	420	432	1000	1312	1309	64	68	67

T - Tempo de incubação a 37° C

SHN - Soro humano normal

E - Experimento

## ANEXO 8

Tabela 21 - Efeito do tempo de incubação na atividade anticomplementar do MN-5 ISO - Via alternativa (SHN: 580 ul/ml tampão)

T (min)	T 1/2 (seg)						% INIBIÇÃO		
	CONTROLE			MN-5 ISO					
	1º E	2º E	3º E	1º E	2º E	3º E	1º E	2º E	3º E
0	300	258	258	419	379	366	28	32	29
5	240	210	198	369	339	305	35	38	45
15	234	210	204	397	368	346	41	43	41
30	222	204	228	453	392	430	51	48	47
60	252	264	288	649	600	720	61	56	60
120	312	300	300	725	769	833	57	61	64

T - Tempo de incubação a 37° C

SHN - Soro humano normal

E - Experimento

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABBAS, A. K. et al. The complement system. In : ABBAS, A. K. et al. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1991. p. 260-282.
- 2 ABSHAGEN, U. Pharmacokinetics of ISDN, sustained-release ISDN and IS-5-MN. In: COHN, J. N.; RITTINGHAUSEN, R. International Symposium on Mononitrates. Berlin : Springer-Verlag, 1984. p. 53-66.
- 3 AEHRINGHAUS, U. et al. Release of leukotriene C4 from human polymorphonuclear leucocytes as determined by radioimmunoassay. Febs Lett., Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 111-114, Sep. 1982.
- 4 AHLNER, J. et al. Effects of dipyridamole on the glyceryl-trinitrate-induced inhibition of coronary artery muscle tone and platelet aggregation in relation to cyclic nucleotide metabolism. Acta Pharmacol. Toxicol., Copenhagen, v. 57, n. 2, p. 88-95, Aug. 1985.
- 5 AHLNER, J.; AXELSSON, K. L. Nitrates. Mode of Action at a cellular level. Drugs, New York, NY, v. 33, n. 4, suppl. 4, p. 32-38, Apr. 1987.
- 6 AHLNER, J. et al. Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. Pharmacol. Rev., Baltimore, MD, v. 43, n. 3, p. 351-423, Sept. 1991.
- 7 AMEZCUA, J. L. et al. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. Br. J. Pharmacol., London, v. 97, n. 4, 1119-1124, Aug. 1989.
- 8 AMTORP, D. Haemodynamic effects of nitrates, with special reference to the coronary circulation. Drugs, New York, NY, v. 33, n. 4, suppl. 4, p. 39-42, Apr. 1987.
- 9 ARMSTRONG, J. A. et al. Rapid disappearance of nitroglycerin following incubation with human blood. Can. J. Physiol. Pharmacol., Ottawa, v. 58, n. 5, p. 459-462, May 1980.
- 10 BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms. J. Clin. Invest., New York, NY, v. 52, n. 3, p. 741-744, Mar. 1973.
- 11 BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N. Engl. J. Med., Boston, MA, v. 298, n. 12, p. 659-668, Mar. 1978.

- 12 BARBOSA, J. E. Determinação cinética da atividade anticomplementar. Ribeirão Preto - SP, 1983. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 13 BARZILAI, D. et al. Use of hydrocortisone in the treatment of acute myocardial infarction. Summary of a Clinical Trial in 446 patients. Chest, Park Ridge, IL, v. 61, n. 5, p. 488-491, May 1972.
- 14 BECKER, L. et al. Reduction of late complex ventricular arrhythmias by nitroglycerin in patients with acute myocardial infarction results of a prospective randomized trial. Circulation, Dallas, TX, v. 57/58, suppl. 2, p. II61, June 1978.
- 15 BEDNAR, M. et al. Nafazatrom-induced salvage of ischemic myocardium in anesthetized dogs is mediated through inhibition of neutrophil function. Circ. Res., Dallas, TX, v. 57, n. 1, p. 131-141, July 1985.
- 16 BELDER, M. A. de; SCHNEEWEISS, A.; CAMM, A. J. Evaluation of the efficacy and duration of action of isosorbide mononitrate in angina pectoris. Am. J. Cardiol., New York, NY, v. 65, n. 21, p. 6J-8J, June 1990.
- 17 BELL, D. et al. Inflammatory response, neutrophil activation, and free radical production after acute myocardial infarction: effect of thrombolytic treatment. Br. Heart J., London, v. 63, n. 2, p. 82-87, Feb. 1990.
- 18 BENNETT, B. M. et al. Effect of in vitro organic nitrate tolerance on relaxation, cyclic GMP accumulation, and guanylate cyclase activation by glyceryl trinitrate and the enantiomers of isosorbide dinitrate. Circ. Res., Dallas, TX, v. 63, n. 4, p. 693-701, Oct. 1988.
- 19 BERLIN, R. Historical aspects of nitrate therapy. Drugs, New York, NY, v. 33, n. 4, suppl. 4, p. 1-4, Apr. 1987.
- 20 BEYERLE, A.; REINIGER, G.; RUDOLPH, W. Long-acting, marked antiischemic effect maintained unattenuated during long-term interval treatment with once-daily isosorbide-5-mononitrate in sustained-release form. Am. J. Cardiol., New York, NY, v. 65, n. 22, p. 1434-1437, June 1990.
- 21 BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Membrane damage by complement. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 737, n. 3-4, p. 343-372, Aug. 1983.
- 22 BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Complement lysis: a hole is a hole. Immunol. Today, Cambridge, ENG, v. 12, n. 9, p. 318-320, Sept. 1991.

- 23 BIESECKER, G. Membrane attack complex of complement as a pathologic mediator. *Lab. Invest.*, Baltimore, MD, v. 49, n. 3, p. 237-249, Sept. 1983.
- 24 BJORK, J.; HUGLI, T. E.; SMEDEGARD, G. Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 134, n. 2, p. 1115-1119, Feb. 1985.
- 25 BOACKLE, R. J.; PRUIT, K. M. A convenient method for the study of anticomplementary substances in biological fluids. In: PETERS, H. *Protides of the biological fluids*. Oxford: Pergamon Press, v. 21, 1974. p. 613-617
- 26 BOARETTI, A. C. Atividade quimiotática para neutrófilos periféricos humanos do fator de transferência, sobrenadante de aquecimento de linfócitos e dialisato de soro humano. São Paulo, 1977. Tese (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) - Escola Paulista de Medicina.
- 27 BONOW, R. O. et al. Lack of effect of aspirin on myocardial infarct size in the dog. *Am J. Cardiol.*, New York, NY, v. 47, n. 2, p. 258-269, Feb. 1981.
- 28 BORER, J. S. et al. Nitroglycerin-induced reduction in the incidence of spontaneous ventricular fibrillation during coronary occlusion in dogs. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 33, n. 4, p. 517-520, Apr. 1974.
- 29 BOURKE, B. E.; MOSS, J. K.; MAINI, R. N. Measurement of the complement C3 breakdown product C3d by rocket immunoelectrophoresis. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 97-108, Jan. 1982.
- 30 BRODIMANS, R. A. et al. Relative roles of decay accelerating factor (DAF), membrane cofactor protein (MCP), and CD59 in the protection of human endothelial cells against complement mediated lysis. *Immunobiology*, Stuttgart, v. 184, n. 4-5, p. 416, May 1992.
- 31 BROWN, B. G. et al. The mechanisms of nitroglycerin action: stenosis vasodilatation as a major component of the drug response. *Circulation*, Dallas, TX, v. 64, n. 6, p. 1089-1097, Dec. 1981.
- 32 BROWN JR., E. J. et al. Scar thinning due to ibuprofen administration after experimental myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 51, n. 5, p. 877-883, Mar. 1983.
- 33 BRUNE, B.; LAPETINA, E. G. Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, MD, v. 264, n. 15, p. 8455-8458, May 1989.

- 34 BURGER, M.; HAMMER, C. H. Complement and complement reactions. The components. Properties of the components. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. The complement system. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 5-17.
- 35 BURGER, R. Complement biosynthesis. Factors of the alternative pathway. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. The complement system. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 70-80.
- 36 BURRELL, C. J.; BLAKE, D. R. Reactive oxygen metabolites and the human myocardium. *Br. Heart J.*, London, v. 61, n. 1, p. 4-8, Jan. 1989.
- 37 BUSSMANN, W.-D. et al. Reduction of CK and CK-MB indexes of infarct size by intravenous nitroglycerin. *Circulation*, Dallas, TX, v. 63, n. 3, p. 615-622, Mar. 1981a.
- 38 BUSSMANN, W.-D. Nitroglycerin in the treatment of acute myocardial infarction. *Acta Med. Scand.*, v. 210, suppl. 651, p. 165-175, 1981b.
- 39 BUSSMANN, W.-D.; ROSE, D. M. Nitroglycerin therapy in acute myocardial infarction: prognostic aspects. In: HOCHREIN, H.; LANGESCHIED, C. Nitroglycerin 4. Munich : Pharmazeutische Verlagsgesellschaft, 1984. p. 70-80.
- 40 CHATTERJEE, K. Role of nitrates in silent myocardial ischemia. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 60, n. 15, p. 18H-25H, Nov. 1987.
- 41 CHICHE, P. et al. Traitement de l'infarctus myocardique récent par perfusion prolongée de trinitrine. *Nouv. Presse Méd.*, Paris, v. 6, n. 44, p. 4119-4122, dec. 1977.
- 42 CHIRKOV, Y. Y. et al. Reversal of human platelet aggregation, by low concentrations of nitroglycerin in vitro in normal subjects. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 70, n. 7, p. 802-806, Sept. 1992.
- 43 CLEMENT, R. et al. Role of a nonsteroidal anti-inflammatory agent, ibuprofen, in coronary revascularization after acute myocardial infarction. *Cardiology*, Basel, v. 85, n. 1, p. 55-70, Jan./Feb. 1990.
- 44 COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann. Intern. Med.*, v. 111, n. 11, p. 918-931, Dec. 1989.
- 45 COLE, F. S.; COLTEN, H. R. Complement biosynthesis. Factors of the classical pathway. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. The complement system. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 44-70.

- 46 COOPER, N. R. O sistema complemento. In: FUDENBERG, H. H.; STITES, D. P.; CALDWELL, J. L.; WELLS, J. V. *Imunologia básica e clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1980. p. 63-74.
- 47 CORWIN, S.; REIFFEL, J. A. Nitrate therapy for angina pectoris. Current concepts about mechanism of action and evaluation of currently available preparations. *Arch. Intern. Med.*, Chicago, IL, v. 145, n. 3, p. 538-543, Mar. 1985.
- 48 COSSUM, P. A.; ROBERTS, M. S. Nitroglycerin disposition in human blood. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 169-175, Feb. 1985.
- 49 COSTA NETO, P. L. de. *Estatística*. São Paulo : Ed. Edgard Blucher Ltda., 1977. 264 p.
- 50 CRAVEN, P. A.; DeRUBERTIS, F. R. Requirement for heme in the activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 745, n. 3, p. 310-321, June 1983.
- 51 CRAWFORD, M. H. et al. Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury. *Circulation*, Dallas, TX, v. 78, n. 6, p. 1449-1458, Dec. 1988.
- 52 DE CATERINA, R. et al. Inhibition of platelet function by injectable isosorbide dinitrate. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 53, n. 11, p. 1683-1687, June 1984.
- 53 DE CATERINA, R. et al. Organic nitrates: direct antiplatelet effects and synergism with prostacyclin. *Thromb. Haemost.*, Stuttgart, v. 59, n. 2, p. 207-211, Apr. 1988.
- 54 DE CATERINA, R. et al. Inhibition of platelet function during in vivo infusion of isosorbide mononitrates: relationship between plasma drug concentration and hemodynamic effects. *Am. Heart J.*, St. Louis, MO, v. 119, n. 4, p. 855-862, Apr. 1990.
- 55 DEL BALZO, U. H.; LEVI, R.; POLLEY, M. J. Cardiac dysfunction caused by purified human C3a anaphylatoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v. 82, n. 3, p. 886-890, Feb. 1985.
- 56 DERRIDA, J. P. et al. Favorable effects of prolonged nitroglycerin infusion in patients with acute myocardial infarction. *Am. Heart J.*, New York, NY, v. 96, n. 6, p. 833-834, Dec. 1978.
- 57 DIERICH, M. P. The receptors. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. *The complement system*. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 262-272.

- 58 DIODATI, J. et al. Effects of nitroglycerin at therapeutic doses on platelet aggregation in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 66, n. 7, p. 683-688, Sept. 1990.
- 59 DODGE, H. T.; BROWN, B. G. The mechanism of action of nitroglycerin. Stenosis vasodilation as a major component of the drug response. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Oslo, v. 44, suppl. 173, p. 41-45, 1984.
- 60 DUPUIS, J. et al. Sustained beneficial effect of a seventy-two hour intravenous infusion of nitroglycerin in patients with severe chronic congestive heart failure. *Am. Heart J.*, St. Louis, MO, v. 120, n. 3, p. 625-635, Sept. 1990.
- 61 ENGLER, R. L.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W.; PAVELEC, R. S. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, PA, v. 111, n. 1, p. 98-111, Apr. 1983.
- 62 ENGLER, R. L. et al. Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, MD, v. 251, n. 1, p. H93-H100, July 1986.
- 63 ENGLER, R.; COVELL, J. W. Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 61, n. 1, p. 20-28, Jul. 1987.
- 64 ENGLER, R. L. Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 63, n. 10, p. 19E-23E, Mar. 1989.
- 65 ENGLER, R. L. Adenosine. The signal of life? *Circulation*, Dallas, TX, v. 84, n. 2, p. 951-954, Aug. 1991.
- 66 ESSER, A. F. et al. Molecular reorganization of lipid bilayers by complement: a possible mechanism for membranolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v. 76, n. 3, p. 1410-1414, Mar. 1979.
- 67 ESSER, A. F. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol. Today*, Cambridge, ENG, v. 12, n. 9, p. 316-318, Sept. 1991.
- 68 EVANS, R. G. et al. Evaluation of a rat model for assessing interventions to salvage ischaemic myocardium: effects of ibuprofen and verapamil. *Cardiovasc. Res.*, London, v. 19, n. 3, p. 132-138, Mar. 1985.

- 69 EZRA, D. et al. Coronary constriction by leukotriene C4, D4, and E4 in the intact pig heart. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 51, n. 8, p. 1451-1454, May 1983.
- 70 FASQUELLE, R. et al. El complemento o alexina. In: \_\_\_\_\_. *Elementos de imunología general*. Barcelona : Toray-Masson, 1968. p. 24-54.
- 71 FEELISCH, M.; NOACK, E. A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 139, n. 1, p. 19-30, July 1987.
- 72 FEELISCH, M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, NY, v. 17, suppl 3, p. S25-S33, 1991.
- 73 FENG, F.; FENG, X.; SCHNEEWEISS, A. Efficacy of isosorbide-5-mononitrate on painful and silent myocardial ischemia after myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 65, n. 21, p. 32J-35J, June 1990.
- 74 FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 201-, n. 1, p. 121-122, Aug. 1991.
- 75 FERRI, R. G.; CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. In: \_\_\_\_\_. *Imunologia*. São Paulo : Edgard Blucher, 1977. p. 152-168.
- 76 FERRIANI, V. P. L. Avaliação da atividade lítica dependente do complemento (via clássica e via alternativa) no soro de recém-nascidos e lactantes eutróficos. Ribeirão Preto - SP, 1988. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 77 FITZGERALD, D. J. et al. The effects of organic nitrates on prostacyclin biosynthesis and platelet function in humans. *Circulation*, Dallas, TX, v. 70, n. 2, p. 297-302, Aug. 1984.
- 78 FITZGERALD, L. J.; BENNET, E. D. The effects of oral isosorbide 5-mononitrate on mortality following acute myocardial infarction: a multicentre study. *Eur. Heart J.*, London, v. 11, n. 2, p. 120-126, Feb. 1990.
- 79 FLAHERTY, J. T. et al. Intravenous nitroglycerin in acute myocardial infarction. *Circulation*, Dallas, TX, v. 51, n. 1, p. 132-139, Jan. 1975.

- 80 FLAHERTY, J. T. et al. Effects of intravenous nitroglycerin on left ventricular function and ST segment changes in acute myocardial infarction. *Br. Heart J.*, London, v. 38, n. 6, p. 612-621, June 1976.
- 81 FLAHERTY, J. T. Role of nitrates in acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 60, n. 15, p. 35H-38H, Nov. 1987.
- 82 FLAHERTY, J. T. Nitrate tolerance. A review of the evidence. *Drugs*, New York, NY, v. 37, n. 4, p. 523-549, Apr. 1989.
- 83 FORMAN, M. B.; VIRMANI, R.; PUETT, D. W. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation*, Dallas, TX, v. 81, n. 3, sup. IV, p. IV69-IV78, Mar. 1990.
- 84 FRANGI, D. et al. Activation of the complement system during streptokinase (SK) treatment in acute myocardial infarction (AMI). *Immunobiology*, Stuttgart, v. 184, n. 4-5, p. 425, May 1992.
- 85 FRANK, M. M. Complement in the pathophysiology of human disease. *N. Eng. J. Med.*, Boston, MA, v. 316, n. 24, p. 1525-1550, Jun. 1987.
- 86 FRANK, M. M. Complement: a brief review. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, MO, v. 84, n. 4, p. 411-420, Oct. 1989.
- 87 FRANK, M. M.; FRIES, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today*, Cambridge, ENG, v. 12, n. 9, p. 322-326, Sept. 1991.
- 88 FUKUYAMA, T.; ROBERTS, R. Lack of effect of nitroglycerin on morphometrically and enzymatically estimated infarct size. *Circulation*, Dallas, TX, v. 57/58, suppl. 2, p. II99, June 1978.
- 89 FUNG, H.-L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of organic nitrates. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 60, n. 16, p. 4H-9H, Nov. 1987.
- 90 FUNG, H.-L. et al. Mechanisms for the pharmacologic interaction of organic nitrates with thiols. existence of an extracellular pathway for the reversal of nitrate vascular tolerance by N-acetylcysteine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, MD, v. 245, n. 2, p. 524-533, May 1988.
- 91 FYE, W. B. T. Lauder Brunton and amyl nitrite: a Victorian vasodilator. *Circulation*, Dallas, TX, v. 74, n. 2, p. 222-229, Aug. 1986.

- 92 GERZER, R. et al. Inhibition of platelet activating factor-induced platelet aggregation by molsidomine, SIN-1, and nitrates in vitro and ex vivo. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, NY, v. 14, suppl. 11, p. S115-S119, 1989.
- 93 GICLAS, P. C.; PINCKARD, R. N.; OLSON, M. S. In vitro activation of complement by isolated human heart subcellular membranes. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 122, n. 1, p. 146-151, Jan. 1979.
- 94 GÖETZE, O. The alternative pathway of activation. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. *The complement system*. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 154-168.
- 95 GOETZL, E. J.; PICKETT, W. C. Novel structural determinants of the human neutrophil, chemotactic activity of leukotriene B. *J. Exp. Med.*, New York, NY, v. 153, n. 2, p. 482-487, Feb. 1981.
- 96 GOLDSTEIN, I. M. et al. Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, New York, NY, v. 148, n. 3, p. 787-792, Sept. 1978.
- 97 GROSSER, K. D. et al. Oral ISDN for the treatment of patients with acute myocardial infarction. *Z. Kardiol.*, Darmstadt, v. 72, suppl. 3, p. 147-151, 1983.
- 98 GRUETTER, C. A.; LEMKE, S. M. Effects of sulfhydryl reagents on nitroglycerin-induced relaxation of bovine coronary artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Ottawa, v. 64, n. 11, p. 1395-1401, Nov. 1986.
- 99 GRYGLEWSKI, R. *Prostacyklina a miażdzyca*. Wrocław Wszechnica Polskiej Akademii Nauk, 1981. 95 p.
- 100 GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, London, v. 320, n. 6061, p. 454-456, Apr. 1986.
- 101 GUNNAR, R. M. et al. ACC/AHA Guidelines for the early management of patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, Dallas, TX, v. 82, n. 2, p. 664-707, Aug. 1990.
- 102 HACKETT, D. et al. Intermittent coronary occlusion in acute myocardial infarction. *The New Engl. J. Med.*, Boston, MA, v. 317, n. 17, p. 1055-1059, Oct. 1987.
- 103 HAMMERMAN, H. et al. Dose-dependent effects of short-term methylprednisolone on myocardial infarct extent, scar formation, and ventricular function. *Circulation*, Dallas, TX, v. 68, n. 2, p. 446-453, Aug. 1983.

- 104 HAMMERMAN, H. et al. Drug-induced expansion of infarct: morphologic and functional correlations. *Circulation*, Dallas, TX, v. 69, n. 3, p. 611-617, Mar. 1984.
- 105 HAMMERSCHMIDT, D. E. et al. Complement-induced granulocyte aggregation in vivo. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, PA, v. 102, n. 2, p. 146-150, Feb. 1981a.
- 106 HAMMERSCHMIDT, D. E. et al. Cholesterol and atheroma lipids activate complement and stimulate granulocytes. A possible mechanism for amplification of ischemic injury in atherosclerotic states. *J. Lab. Clin. Med.*, St. Louis, MO, v. 98, n. 1, p. 68-77, July 1981b.
- 107 HANSCH, G. M. The complement attack phase. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. *The complement system*. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 202-230.
- 108 HILL, J. H.; WARD, P. A. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J. Exp. Med.*, New York, NY, v. 133, n. 4, p. 885-900, Apr. 1971.
- 109 HIRSCH, J. Hyperreactive platelets and complications of coronary artery disease. *N. Eng. J. Med.*, London, v. 316, n. 24, p. 1543-1544, June 1987.
- 110 HIRSHFELD JR., J. W. et al. Reduction in severity and extent of myocardial infarction when nitroglycerin and methoxamine are administered during coronary occlusion. *Circulation*, Dallas, TX, v. XLIX, n. 2, p. 291-297, Feb. 1974.
- 111 HOROWITZ, J. D. et al. Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine. *Circulation*, Dallas, TX, v. 68, n. 6, p. 1247-1253, Dec. 1983.
- 112 HOROWITZ, J. D. et al. Combined use of nitroglycerin and N-acetylcysteine in the management of unstable angina pectoris. *Circulation*, Dallas, TX, v. 77, n. 4, p. 787-794, Apr. 1988.
- 113 HORST, A. Zapalenie (molekularne podłoże procesów zapalnych). In: \_\_\_\_\_ *Fizjologia patologiczna*. Warszawa : Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1986. p. 513-539.
- 114 HOSHIDA, S. et al. Attenuation of neutrophil function by inhibitors of arachidonate metabolism reduces the extent of canine myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 63, n. 10, p. 24E-28E, Mar. 1989.
- 115 HOSTETTER, M. K.; GORDON, D. L. Biochemistry of C3 and related thiolester proteins in infection and inflammation. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, IL, v. 9, n. 1, p. 97-109, 1987.

- 116 HUGO, F. et al. Quantitative measurement of SC5b-9 and C5b-9(m) in infarcted areas of human myocardium. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v. 81, n. 1, p. 132-136, Jul. 1990.
- 117 IGNARRO, L. J.; GRUETTER, C. A. Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitroso-thiols. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 631, n. 2, p. 221-231, Aug. 1980
- 118 ITO, B. R. et al. Thromboxane A<sub>2</sub> and peptidoleukotrienes contribute to the myocardial ischemia and contractile dysfunction in response to intracoronary infusion of complement C5a in pigs. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 66, n. 3, p. 596-607, Mar. 1990.
- 119 JACOB, H. S.; HAMMERSCHMIDT, D. E. Complement-induced granulocyte aggregation. Importance in myocardial infarction and shock lung (interview). *J.A.M.A.*, Chicago, IL, v. 245, n. 20, p. 2013-2017, May 1981.
- 120 JACQUIER, M.; GABERT, F.; COLOMB, M. G. Description of an esterase-like activity on C3 on surface of B cell clones. *Complement and Inflammation*, Basel, v. 8, n. 3-4, p. 167-168, May/Aug. 1991.
- 121 JAFFE, A. S. et al. Reduction of infarct size in patients with inferior infarction with intravenous glyceryl trinitrate. A randomised study. *Br. Heart J.*, London, v. 49, n. 5, p. 452-460, May 1983.
- 122 JOHNSON, A. S. et al. Effect of cortisone on the size of experimentally produced myocardial infarcts. *Circulation*, Dallas, TX, v. VII, p. 221-228, Feb. 1953.
- 123 JOHNSON III, G. et al. Cardioprotective effects of acidified sodium nitrite in myocardial ischemia with reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, Baltimore, MD, v. 252, n. 1, p. 35-41, Jan. 1990a.
- 124 JOHNSON III, G.; TSAO, P.; LEFER, A. M. Synergism between superoxide dismutase and sodium nitrite in cardioprotection following ischemia and reperfusion. *Am. Heart J.*, St. Louis, MO, v. 119, n. 3, p. 530-537, Mar. 1990b.
- 125 JOLLY, S. R. et al. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 54, n. 3, p. 277-285, Mar. 1984.
- 126 JOLLY, S. R. et al. Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am. Heart J.*, St. Louis, MO, v. 112, n. 4, p. 682-690, Oct. 1986.

- 127 JUGDUTT, B. I. et al. Effect of indomethacin on collateral blood flow and infarct size in the conscious dog. *Circulation*, Dallas, TX, v. 59, n. 4, p. 734-743, Apr. 1979.
- 128 JUGDUTT, B. I. et al. Salvage of ischemic myocardium by ibuprofen during infarction in the conscious dog. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 46, n. 1, p. 74-82, July 1980.
- 129 JUGDUTT, B. I. et al. Effect of intravenous nitroglycerin on collateral blood flow and infarct size in the conscious dog. *Circulation*, Dallas, TX, v. 63, n. 1, p. 17-28, Jan. 1981a.
- 130 JUGDUTT, B. I. et al. Dissimilar effects of prostacyclin, prostaglandin E1, and prostaglandin E2 on myocardial infarct size after coronary occlusion in conscious dogs. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 49, n. 3, p. 685-700, Sept. 1981b.
- 131 JUGDUTT, B. I. Myocardial salvage by intravenous nitroglycerin in conscious dogs: loss of beneficial effect with marked nitroglycerin-induced hypotension. *Circulation*, Dallas, TX, v. 68, n. 3, p. 673-684, Sept. 1983a.
- 132 JUGDUTT, B. I. et al. Persistent reduction in left ventricular asynergy in patients with acute myocardial infarction by intravenous infusion of nitroglycerin. *Circulation*, Dallas, TX, v. 68, n. 6, p. 1264-1273, Dec. 1983b.
- 133 JUGDUTT, B. I. Delayed effects of early infarct-limiting therapies on healing after myocardial infarction. *Circulation*, Dallas, TX, v. 72, n. 4, p. 907-914, Oct. 1985.
- 134 JUGDUTT, B. I. ; WARNICA, J. W. Intravenous nitroglycerin therapy to limit myocardial infarct size, expansion, and complications. Effect of timing, dosage, and infarct location. *Circulation*, Dallas, TX, v. 78, n. 4, p. 906-919, Oct. 1988.
- 135 KAGIYAMA, A. et al. Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 64, n. 3, p. 607-615, Mar. 1989.
- 136 KAPLAN, K. et al. Intravenous nitroglycerin for the treatment of angina at rest unresponsive to standard nitrate therapy. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 51, n. 5, p. 694-698, Mar. 1983.

- 137 KATORI, M. et al. Biphasic accumulation of leukocytes in rat cardiac infarct tissue caused by leukotriene B<sub>4</sub> and complement. *Jpn. J. Pharmacol.*, Kyoto, n. 50, v. 2, p. 234-238, Jun. 1989.
- 138 KENT, K. M. et al. Beneficial electrophysiologic effects of nitroglycerin during acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 33, n. 4, p. 513-516, Apr. 1974.
- 139 KILLIP T.; KIMBALL, J. T. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 20, n. 4, p. 457-464, Oct. 1967.
- 140 KLAUS, G. G. B. Role of complement in the induction of antibody responses. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. *The complement system*. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 327-337.
- 141 KLONER, R. A. et al. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation*, Dallas, TX, v. 57, n. 1, p. 56-63, Jan. 1978.
- 142 KLONER, R. A.; PRZYKLENK, K.; WHITTAKER, P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation*, Dallas, TX, v. 80, n. 5, p. 1115-1127, Nov. 1989.
- 143 KORBUT, R.; TRABKA-JANIK, E.; GRYGLEWSKI, R. J. Cytoprotection of human polymorphonuclear leukocytes by stimulators of adenylate and guanylate cyclases. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 171-172, June 1989.
- 144 KOSKI, C. L. et al. Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v. 8, n. 12, p. 3816-3820, Jun. 1983.
- 145 KUKOVETZ, W. R.; HOLZMANN, S.; SCHMIDT, K. Cellular mechanisms of action of therapeutic nitric oxide donors. *Eur. Heart J.*, London, v. 12, suppl. E, p. 16-24, Nov. 1991.
- 146 KUTSAL, A. et al. Complement activation during cardiopulmonary bypass. *J. Cardiovasc. Surg.*, Torino, v. 30, n. 3, p. 359-363, May/June 1989.
- 147 LACHMANN, P. J. The control of homologous lysis. *Immunol. Today*, Cambridge, ENG, v. 12, n. 9, p. 312-315, Sept. 1991.
- 148 LANGLOIS, P. F.; GAWRYL M. S. Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p. 95-105, Mar. 1988.

- 149 LARNER, A.; CONWAY, M. A. Free radicals in acute myocardial infarction. *Q. J. Med.*, Oxford, v. 70, n. 263, p. 205-212, Mar. 1989.
- 150 LAW, S. K. A.; REID, K. B. M. *Complement*. Oxford : Ilpress, 1988. 72 p.
- 151 LEFER, A. M.; POLANSKY, E. W. Beneficial effects of ibuprofen in acute myocardial ischemia. *Cardiology*, Basel, v. 64, n. 5, p. 265-279, 1979.
- 152 LEFER, A. M. et al. Prostacyclin: a potentially valuable agent for preserving myocardial tissue in acute myocardial ischemia. *Science*, Washington, DC, v. 200, n. 4337, p. 52-54, Apr. 1978.
- 153 LEVIN, R. I. et al. Nitroglycerin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 67, n. 3, p. 762-769, Mar. 1981.
- 154 LIBBY, P. et al. Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 52, n. 3, p. 599-607, Mar. 1973.
- 155 LIEW, F. Y.; COX, F. E. G. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol. Today*, Cambridge, ENG, v. 12, n. 3, p. A17-A21, Mar. 1991.
- 156 LITT, M. R. et al. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation*, Dallas, TX, v. 80, n. 6, p. 1816-1827, Dec. 1989.
- 157 LOOS, M. "Classical" pathway of activation. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. *The complement system*. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 136-154.
- 158 LORGERIL, M. de et al. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am. Heart J.*, St. Louis, MO, v. 117, n. 3, p. 523-532, Mar. 1989.
- 159 LOSCALZO, J. N-acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 76, n. 2, p. 703-708, Aug. 1985.
- 160 LUSCHER, T. F. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur. Heart J.*, London, v. 12, suppl. E, p. 2-11, Nov. 1991.

- 161 LUZ, P. L. da. et al. Myocardial reperfusion in acute experimental ischemia. Beneficial effects of prior treatment with steroids. *Circulation*, Dallas, TX, v. 53, n. 5, p. 847-852, May 1975.
- 162 MACLEAN, D. et al. Effects of corticosteroids on myocardial infarct size and healing following experimental coronary occlusion. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 39, n. 2, p. 280, Feb. 1977.
- 163 MACLEAN, D. et al. Long-term preservation of ischemic myocardium after experimental coronary artery occlusion. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 61, n. 3, p. 541-551, Mar. 1978.
- 164 MADALINSKI, K. Układ dopelniacza. In: MACKIEWICZ, S. *Immunologia*. Warszawa : Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1986. p. 66-80.
- 165 MADIAS, J. E.; HOOD JR., W. B. Effects of methylprednisolone on the ischemic damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, Dallas, TX, v. 65, n. 6, p. 1106-1112, June 1982.
- 166 MAJOR, R. M. et al. Isosorbide 5-mononitrate kinetics. *Clin. Pharmac. Ther.*, Oxford, v. 35, n. 5, p. 653-659, May 1984.
- 167 MANDECKI, T. Leki rozszerzające naczynia krwionośne. In: GIEC, L; HERMAN, Z. S. *Farmakoterapia chorób układu sercowo-naczyniowego*. Warszawa : Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1987. p. 119-142.
- 168 MARANHÃO, M. F. C. Intradisc. Estudo multicêntrico em larga escala. *Rev. Bras. Clín. Terap.*, São Paulo, v. XV, n. 4, p. 109-114, abr. 1986.
- 169 MARGNI, R. A. Complemento. In : \_\_\_\_\_. *Inmunologia e Imunoquímica : fundamentos*. 3. ed. Buenos Aires : Ed. Médica Panamericana, 1982. p.187-223.
- 170 MARMOR, A.; KLEIN, R. Prevention of creatine kinase-MB release in coronary artery disease and pacing-induced myocardial ischemia by isosorbide dinitrate spray. *Am. J. Cardiol.*, New York, v. 65, n. 21, p. 36J-38J, June 1990.
- 171 MAROKO, P. R. et al. Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 61, n. 3, p. 661-670, Mar. 1978.
- 172 MARTEN, W.; WEISS, M.; HAASE, W. Treatment of coronary heart disease with isosorbide mononitrate ('Elantan'20): a multi-center study in hospital and general practice. *Curr. Med. Res. Opin.*, London, v. 9, n. 2, p. 96-106, 1984.

- 173 MARTIN, H.; KAUL, M.; LOOS, M. Disulfide bridge formation between C1q and IgG *in vitro*. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v. 20, n. 8, p. 1641-1645, Aug. 1990.
- 174 MARTIN, S. E. et al. C5a decreases regional coronary blood flow and myocardial function in pigs: implications for a granulocyte mechanism. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 63, n. 2, p. 483-491, Aug. 1988.
- 175 MARTIN, W. et al. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, MD, v. 232, n. 3, p. 708-715, Mar. 1985.
- 176 MAYER, M. M. Mechanism of cytolysis by complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v. 69, n. 10., p. 2954-2958, Oct. 1972.
- 177 McMANUS, L. M. et al. Complement localization in ischemic baboon myocardium. *Lab. Invest.*, Baltimore, MD, v. 48, n. 4, p. 436-447, Apr. 1983.
- 178 MEHTA, J. et al. Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation*, Dallas, TX, v. 79, n. 3, p. 549-556, Mar. 1989.
- 179 MEHTA, J. E.; NICHOLS, W. W. The potential role of thromboxane inhibitors in preventing myocardial ischaemic injury. *Drugs*, New York, NY, v. 40, n. 5, p. 657-665, Nov. 1990.
- 180 MEIBNER, A. et al. Pharmacokinetics of oral isosorbide-5-mononitrate in patients with ischemic heart failure. *Klin. Wochenschr*, Berlin, v. 69, p. 213-219, 1991.
- 181 MELLION, B. T. et al. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*, Duluth, MN, v. 57, n. 5, p. 946-955, May. 1981.
- 182 MENDES, N. F. et al. Granulocyte chemotactic activity of preparations containing the receptor of human T lymphocytes for sheep erythrocytes. *Cell. Immunol.*, New York, NY, v. 40, n. 2, p. 427-430, Oct. 1978.
- 183 MIHALICK, M. J.; RASMUSSEN, S.; KNOEBEL, S. B. The effect of nitroglycerin on premature ventricular complexes in acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 33, n. 1, p. 157, Jan. 1974.

- 184 MIKOLICH, J. R. et al. Relief of refractory angina with continuous intravenous infusion of nitroglycerin. *Chest*, Park Ridge, IL, v. 77, n. 3, p. 375-379, Mar. 1980.
- 185 MILGROM, H. et al. Activation of the fourth component of complement (C4): assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 124, n. 6, p. 2780-2785, June 1980.
- 186 MOLLNES, T. E. et al. Acute phase reactants and complement activation in patients with acute myocardial infarction. *Complement*, Basel, v. 5, n. 1, p. 33-39, Jan. 1988.
- 187 MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, London, v. 263, n. 5579, p. 663-665, Oct. 1976.
- 188 MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, Dallas, TX, v. 12, n. 4, p. 365-372, Oct. 1988.
- 189 MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1709-1715, June 1989.
- 190 MONCADA, S. The First Robert Furchgott Lecture: from endothelium-dependent relaxation to the L-Arginine:NO pathway. *Blood Vessels*, Basel, v. 27, n. 2-5, p. 208-217, Mar./Oct. 1990.
- 191 MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, MD, v. 43, n. 2, p. 109-142, June 1991.
- 192 MONTALESCOT, G. et al. Evaluation of thromboxane production and complement activation during myocardial ischemia in patients with angina pectoris. *Circulation*, Dallas, TX, v. 84, n. 5, p. 2054-2062, Nov. 1991.
- 193 MORGAN, B. P. Isolation and characterisation of the complement inhibiting protein CD-59 antigen from platelet membranes. *Complement and Inflammation*, Cambridge, ENG, v. 8, n. 3-4, p. 196-197, May/Aug. 1991.
- 194 MORRISON, J. et al. Modification of myocardial injury in man by corticosteroid administration. *Circulation*, Dallas, TX, v. 53, n. 3, suppl. 1, p. I200-I203, Mar. 1976.
- 195 MULLANE, K. M. et al. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, MD, v. 228, n. 2, p. 510-522, Feb. 1984.

- 196 MULLANE, K. M.; FORNABAIO, D. Thromboxane synthetase inhibitors reduce infarct size by a platelet-dependent, aspirin-sensitive mechanism. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 62, n. 4, p. 668-678, Apr. 1988.
- 197 MUNGER, T. M.; OH, J. K. Unstable angina. *Mayo Clin. Proc.*, Rochester, MN, v. 65, n. 3, p. 384-406, Mar. 1990
- 198 MYERS, R. W. et al. Effects of nitroglycerin and nitroglycerin-methoxamine during acute myocardial ischemia in dogs with pre-existing multivessel coronary occlusive disease. *Circulation*, Dallas, TX, v. 51, n. 4, p. 632-640, Apr. 1975.
- 199 NASH, G. B. et al. Changes in the flow properties of white blood cells after acute myocardial infarction. *Br. Heart. J.*, London, v. 62, n. 5, p. 329-334, Nov. 1989.
- 200 NEEDLEMAN, P.; JAKSCHIK, B.; JOHSON JR., E. M. Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, MD, v. 187, n. 2, p. 324-331, Feb. 1973.
- 201 NICHOLS, W. W. et al. Reduced myocardial neutrophil accumulation and infarct size following thromboxane synthetase inhibitor or receptor antagonist. *Angiology*, Greatneck, NY, v. 40, n. 3, p. 209-221, Mar. 1989.
- 202 NIDORF, S. M. et al. Whole blood aggregation, thromboxane release and the lyso-derivative of platelet activating factor in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, London, v. 23, n. 4, p. 273-278, Apr. 1989.
- 203 NITSCHKE, J. F. et al. Rocket immunoelectrophoresis of C4 and C4d. A simple sensitive method for detecting complement activation in plasma. *Am. J. Clin. Pathol.*, Philadelphia, PA, v. 76, n. 5, p. 679-684, Nov. 1981.
- 204 NORDLANDER, R. Use of nitrates in the treatment of unstable and variant angina. *Drugs*, New York, NY, v. 33, n. 4, suppl. 4, p. 131-139, Apr. 1987.
- 205 NYBERG, G. Treatment of acute anginal attacks with nitrates. *Drugs*, New York, NY, v. 33, n. 4, suppl. 4, p. 85-95, Apr. 1987.
- 206 OMAR, H. A. et al. Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 69, n. 3, p. 601-608, Sept. 1991.
- 207 PABÓN OSUNA, P. et al. Isosorbide dinitrate sublingual therapy for inferior myocardial infarction: randomized trial to assess infarct size limitation. *Am. J. Cardiol.*, New York, v. 55, n. 4, p. 330-334, Feb. 1985.

- 208 PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, London, v. 327, p. 524-526, June 1987.
- 209 PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, NY, v. 158, n. 1, p. 348-352, Jan. 1989.
- 210 PETERS, R. W. et al. Effect of therapy with methylprednisolone on the size of myocardial infarcts in man. *Chest*, Park Ridge, IL, v. 73, n. 4, p. 483-488, Apr. 1978.
- 211 PIEGAS, L. S. et al. Emprego do 5-mononitrato de isossorbida no infarto agudo do miocárdio. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 167-172, mar. 1989.
- 212 PINCKARD, R. N. et al. Antibody-independent activation of human C1 after interaction with heart subcellular membranes. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 110, n. 6, p. 1376-1382, May 1973.
- 213 PINCKARD, R. N. et al. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 56, n. 3, p. 730-750, Sept. 1975.
- 214 PINCKARD, R. N. et al. Complement localization and mediation of ischemic injury in baboon myocardium. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 66, n. 5, p. 1050-1056, Nov. 1980.
- 215 PLATTS-MILLS, T. A. E.; ISHIZAKA, K. Activation of the alternate pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 113, n. 1, p. 348-358, July 1974.
- 216 PODACK, E. R.; TSCHOPP, J. Polymerization of the ninth component of complement (C9): Formation of poly (C9) with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v. 79, n. 2, p. 574-578, Jan. 1982.
- 217 POLHILL JR., R. B.; PRUITT, K. M.; JOHNSTON JR., R. B. Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. I. Experimental and mathematical analyses. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 121, n. 1, p. 363-376, July 1978.
- 218 PRASAD, K. et al. Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery. *Am. Heart J.*, St. Louis, MO, v. 123, n. 1, p. 37-45, Jan. 1992.

- 219 PRAZERES DE SÁ, M. E.; SOARES DA COSTA, J. T.; RIBEIRO, C. Curriculum fundamental. Angina variante. Rev. Port. Cardiol., Lisboa, v. 8, n. 11, p. 803-811, nov. 1989.
- 220 PRZYKLENK, K.; KLONER, R. A. "Reperfusion injury" by oxygen-derived free radicals? Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood flow. Circ. Res., Dallas, TX, v. 64, n. 1, p. 86-96, Jan. 1989.
- 221 RAMIRES, J. A. F. et al. Nitroglicerina transdérmica em portadores de angina estável. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 58, n. 2, p. 141-147, fev. 1992.
- 222 REHNQVIST, N. et al. Mononitrates as monotherapy in the prophylactic treatment of angina pectoris. Drugs, New York, NY, v. 33, n. 4, suppl. 4, p. 100-103, Apr. 1987.
- 223 REIMER, K. A. et al. The Wavefront Phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. Circulation, Dallas, TX, v. 56, n. 5, p. 786-794, Nov. 1977.
- 224 REIMER, K. A.; JENNINGS, R. B. The "Wavefront Phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. Lab. Invest., Baltimore, MD, v. 40, n. 6, p. 633-644, June 1979.
- 225 REIMER, K. A. et al. Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models. Circ. Res., Dallas, TX, v. 56, n. 5, p. 651-665, May 1985.
- 226 RESS, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, DC, v. 86, n. 9, p. 3375-3378, May 1989.
- 227 REYES, P. A., et al. Patogenia del infarto del miocardio. I. Activación del complemento *in vivo* y evolución del infarto. Arch. Inst. Cardiol. Mex., Mexico, v. 54, n. 4, p. 327-332, Jul./Aug. 1984.
- 228 RIBEIRO, L. G. T., et al. Prostacyclin in experimental myocardial ischemia: effects on hemodynamics, regional myocardial blood flow, infarct size and mortality. Am. J. Cardiol., New York, NY, v. 47, n. 4, p. 835-840, Apr. 1981.
- 229 ROBERTS, R.; DeMELLO, V.; SOBEL, B. E. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. Circulation, Dallas, TX, v. 53, n. 3, suppl. I, p. I204-I206, Mar. 1976.

- 230 ROMMEL, F. A.; MAYER, M. M. Studies of guinea pig complement component C9: reaction kinetics and evidence that lysis of EAC1-8 results from a single membrane lesion caused by one molecule of C9. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 110, n. 3, p. 637-647, Mar. 1973.
- 231 ROMSON, J. et al. The effect of ibuprofen on accumulation of indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. *Circulation*, Dallas, TX, v. 66, n. 5, p. 1002-1011, Nov. 1982.
- 232 ROMSON, J. L. et al. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, Dallas, TX, v. 67, n. 5, p. 1016-1030, May 1983.
- 233 ROSSEN, R. D. et al. Selective accumulation of the first component of complement and leukocytes in ischemic canine heart muscle. A possible initiator of an extra myocardial mechanism of ischemic injury. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 57, n. 1, p. 119-130, July 1985.
- 234 ROSSEN, R. D. et al. Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 62, n. 3, p. 572-584, Mar. 1988.
- 235 ROTHER, U. Adverse reactions to drugs. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. *The complement system*. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 511-519.
- 236 RUDDY, S. Plasma protein effectors of inflammation: Complement. In: KELLEY, W. N.; HARRIS JR., E. D.; RUDDY, S.; SLEDGE, C. B. *Textbook of rheumatology*. Philadelphia : W. B. Saunders, 1981. v. 1. p. 83-96.
- 237 RUDDY, S. Complement. In: COHEN, A. S. *Laboratory diagnostic procedures in the rheumatic diseases*. 3. ed. Orlando : Grune & Stratton Inc., 1985. p. 137-160.
- 238 SCHAFER, A. I.; ALEXANDER, R. W.; HANDIN, R. I. Inhibition of platelet function by organic nitrate vasodilators. *Blood*, Duluth, MN, v. 55, n. 4, p. 649-654, Apr. 1980.
- 239 SCHAFER, H. et al. Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J. Immunol.*, Baltimore, MD, v. 137, n. 6, p. 1945-1949, Sept. 1986.
- 240 SCHRODER, H. et al. Cyclic GMP mediates SIN-1-induced inhibition of human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 182, n. 2, p. 211-218, July 1990.

- 241 SECOND INTERNATIONAL STUDY OF INFARCT SURVIVAL (ISIS-2) COLLABORATIVE GROUP Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. THE LANCET, London, v. II, n. 8607, p. 349-360, Aug. 1988.
- 242 SEIFERT, P. S.; KAZATCHKINE, M. D. The complement system in atherosclerosis. Atherosclerosis, Amsterdam, v. 73, n. 2-3, p. 91-104, Oct. 1988.
- 243 SELWYN, A. P. et al. Electrocardiographic precordial mapping in anterior myocardial infarction. The critical period for interventions as exemplified by methyl-prednisolone. Circulation, Dallas, TX, v. 58, n. 5, p. 892-897, Nov. 1978.
- 244 SEMB, A. G. et al. Coronary trapping of a complement activation product (C3a des-Arg) during myocardial reperfusion in open-heart surgery. Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., Stockholm, v. 24, n. 3, p. 223-227, Oct. 1990.
- 245 SHUB, C.; VLIETSTRA, R. E.; McGOON, M. D. Selection of optimal drug therapy for the patient with angina pectoris. Mayo Clin. Proc., Rochester, MN, v. 60, n. 8, p. 539-548, Aug. 1985.
- 246 SHUB, C. Stable angina pectoris: 3. Medical treatment. Mayo Clin. Proc., Rochester, MN, v. 65, n. 2, p. 256-273, Feb. 1990.
- 247 SILBER, S. Nitrates: why and how should they be used today? Current status of the clinical usefulness of nitroglycerin, isosorbide dinitrate and isosorbide-5-mononitrate. Eur. J. Clin. Pharmacol., Berlin, v. 38, suppl. 1, p. S35-S51, Mar. 1990.
- 248 SILVA, W. D. da; KIPNIS, T. L. Sistema complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural e um mediador de interações celulares. Rev. Ass. Med. Brasil., São Paulo, v. 30 n. 3/4, p. 67-72, mar./abr. 1984.
- 249 SIM, R. B.; REID, K. B. M. C1: molecular interactions with activating system. Immunol. Today, Cambridge, ENG, v. 12, n. 9, p. 307-311, Sept. 1991.
- 250 SIMPSON, P. J. et al. Prostacyclin protects ischemic reperfused myocardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. Am. Heart J., St. Louis, MO, v. 113, n. 1, p. 129-137, Jan. 1987.

- 251 SIMPSON, P. J. et al. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 81, n. 2, p. 624-629, Feb. 1988.
- 252 SIMPSON, P. J. et al. Sustained limitation of myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody that alters leukocyte function. *Circulation*, Dallas, TX, v. 81, n. 1, p. 226-237, Jan. 1990.
- 253 SIMS, P. J.; WIEDMER, T. The reponse of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol. Today*, Cambridge, ENG, v. 12, n. 9, p. 338-342, Sept. 1991.
- 254 SMITH, E. R. et al. Coronary artery occlusion in the conscious dog. Effects of alterations in arterial pressure produced by nitroglycerin, hemorrhage, and alpha-adrenergic agonists on the degree of myocardial ischemia. *Circulation*, Dallas, TX, v. XLVII, n. 1, p. 51-57, Jan. 1973.
- 255 SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.*, Rochester, MN, v. 63, n. 4, p. 390-408, Apr. 1988.
- 256 SPATH, J. A.; LANE, D. L.; LEFER, A. M. Protective action of methylprednisolone on the myocardium during experimental myocardial ischemia in the cat. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 35, n. 1, p. 44-51, Jul. 1974.
- 257 STAHL, G. L. et al. Role of thromboxane A2 in the cardiovascular response to intracoronary C5a. *Circ. Res.*, Dallas, TX, v. 66, n. 4, p. 1102-1111, Apr. 1990.
- 258 STAMLER, J.; CUNNINGHAM, M.; LOSCALZO, J. Reduced thiols and the effect of intravenous nitroglycerin on platelet aggregation. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 62, n. 7, p. 377-380, Sept. 1988.
- 259 STAMLER, J. S. et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v. 89, n. 1, p. 444-448, Jan. 1992.
- 260 STEERING COMMITTEE OF THE PHYSICIANS' HEALTH STUDY RESEARCH GROUP. Preliminary report: findings from the aspirin component of the ongoing physicians' health study. *N. Eng. J. Med.*, London, v. 318, n. 4, p. 262-264, Jan. 1988.
- 261 TAYLOR, L. W.; JOANNIDES, C.; PARKE, D. V. Organic nitrate reductase: reassessment of its subcellular localization and tissue distribution and its relationship to the glutathione transferases. *Int. J. Biochem.*, Oxford, v. 21, n. 1, p. 67-71, Jan. 1989.

- 262 TILL, G. O. Chemotactic factors. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. The complement system. Berlin : Springer-Verlag, 1988. p. 354-367.
- 263 TORFGARD, K. et al. Tissue distribution of glyceryl trinitrate and the effect on cGMP levels in rat. Pharmacol. Toxicol., Copenhagen, v. 64, n. 4, p. 369-372, Apr. 1989.
- 264 UNANUE, E. R.; BENACERRAF, B. Vias clássica e alternativa de ativação do complemento. In: \_\_\_\_\_. Imunologia. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1986. p. 205-223.
- 265 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. Normas para apresentação de trabalhos. 2. Teses, dissertações e trabalhos acadêmicos. 2. ed. Curitiba : Ed. da UFPR : Governo do Estado do Paraná, 1992. 23 p.
- 266 \_\_\_\_\_. Normas para apresentação de trabalhos. 6. Referências bibliográficas. 2. ed. Curitiba : Ed. da UFPR : Governo do Estado do Paraná, 1992. 43 p.
- 267 \_\_\_\_\_. Normas para apresentação de trabalhos. 7. Citações e notas de rodapé. 2. ed. Curitiba : Ed. da UFPR : Governo do Estado do Paraná, 1992. 19 p.
- 268 VAKEVA, A.; LAURILA, P.; MERI, S. Regulation of complement membrane attack complex formation in myocardial infarction. Immunobiology, Stuttgart, v. 184, n. 4-5, p. 454-455, May 1992.
- 269 VAZ, C. A. C. Interação antígeno-anticorpo *in vitro*. In : CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. Imunologia básica. São Paulo : Artes Médicas, 1989. p. 123-175.
- 270 VERMES, L. M. S. Complemento. In : CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. Imunologia básica. São Paulo : Artes Médicas, 1989. p. 105-122.
- 271 VIDEM, V. et al. Complement activation by extracorporeal circulation: effects of precoating a membrane oxygenator circuit with human whole blood. Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., Stockholm, v. 22, n. 3, p. 251-256, 1988.
- 272 VIDEM, V. et al. Different oxygenators for cardiopulmonary bypass lead to varying degrees of human complement activation *in vitro*. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., St. Louis, MO, v. 97, n. 5, p. 764-770, May, 1989.
- 273 VOGEL, W. M. et al. Inability of methylprednisolone sodium succinate to decrease infarct size or preserve enzyme activity measured 24 hours after coronary occlusion in the dog. Circulation, Dallas, TX, v. 55, n. 4, p. 588-595, Apr. 1977.

- 274 VYDEN, J. K. et al. Effects of methylprednisolone administration in acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, New York, NY, v. 34, n. 6, p. 677-686, Nov. 1974.
- 275 WARGOVICH, T. J. et al. Reduction in myocardial neutrophil accumulation and infarct size following administration of thromboxane inhibitor U-63, 557A. *Am. Heart J.*, St. Louis, MO, v. 114, n. 5, p. 1078-1085, Nov. 1987.
- 276 WARREN, J. S.; WARD, P. A. Review: Oxidative injury to the vascular endothelium. *Am. J. Med. Sci.*, Thorofare, NJ, v. 292, n. 2, p. 97-110, Aug. 1986.
- 277 WEISMAN, H. F. et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of Complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*, Washington, DC, v. 13, n. 249, p. 146-151, Jul. 1990.
- 278 WEISSMAN, G.; SMOLEN, J. E.; KORCHAK, H. M. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, Boston, MA, v. 303, n. 1, p. 27-34, July 1980.
- 279 WERNS, S. W.; SHEA, M. J.; LUCCHESI, B. R. Free radicals and myocardial injury: pharmacologic implications. *Circulation*, Dallas, TX, v. 74, n. 1, p. 1-5, Jul. 1986.
- 280 WESTLIN, W.; MULLANE, K. Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation*, Dallas, TX, v. 77, suppl. 1, p. I30-I39, June 1988.
- 281 WILLIAMS, L. W.; BURKS, A. W.; STEELE, R. W. Complement: function and clinical relevance. *Ann. Allergy*, Bloomington, MN, v. 60, n. 4, p. 293-301, Apr. 1988.
- 282 WINKELSTEIN, J. A. Complement and natural immunity. *Clinics in Immunology and Allergy*, v. 3, n. 3, p. 421-439, Oct. 1985.
- 283 WÓJCICKI, J. Farmakologia kliniczna leków krążeniowych. In: CHODERA, A.; HERMAN, Z. S. Farmakologia kliniczna. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1986. p. 327-375.
- 284 YAMAMOTO, K.; KAWASHIMA, T.; MIGITA, S. Glutathione-catalyzed disulfide-linking of C9 in the membrane attack complex of complement. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, MD, v. 257, n. 15, p. 8573-8576, Aug. 1982.
- 285 YAMAMOTO, K.; MIGITA, S. Mechanisms for the spontaneous formation of covalently linked polymers of the terminal membranolytic complement protein (C9). *J. Biol. Chem.*, Baltimore, MD, v. 258, n. 13, p. 7887-7889, July 1983.

- 286 YASUDA, M. et al. The complement system in the acute phase of myocardial infarction. *Jpn. Circ. J.*, Kyoto, v. 53, n. 9, p. 1017-1022, Sept. 1989.
- 287 YASUDA, M. et al. The complement system in ischemic heart disease. *Circulation*, Dallas, TX, v. 81, n. 1, p. 156-163, Jan. 1990.
- 288 YUSUF, S. et al. Effect of intravenous nitrates on mortality in acute myocardial infarction: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, London, v. 1, n. 8594, p. 1088-1092, May 1988.
- 289 ZARCO, P. Metabolismo cardíaco y radicales libres. *Rev. Clin. Esp.*, Madrid, v. 185, n. 8, p. 415-422, nov. 1989.
- 290 ZASLAVSKAYA, R. M.; POKAZEEVA, Z. T.; TEIBLIUM, M. M. Comprehensive assessment of the effectiveness of nitrates with prolonged action in patients with acute myocardial infarction. *Cor Vasa*, Praha, v. 27, n. 6, p. 397-405, 1985.
- 291 ZWEIER, J. L. et al. Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. *J. Clin. Invest.*, New York, NY, v. 80, p. 1728-1734, Dec. 1987.