

Estudos Hemodinâmicos e da Função Endotelial em Porcas Saudáveis após Injeção em *Bolus* Endovenoso de Azul de Metileno

Hemodynamic and Vascular Endothelium Function Studies in Healthy Pigs After Intravenous Bolus Infusion of Methylene Blue

Antonio Carlos Menardi, Fernanda Viaro, Walter Vilella de Andrade Vicente, Alfredo José Rodrigues, Paulo Roberto Barbosa Évora

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP - Ribeirão Preto, SP

Objetivo: Benefícios clínicos obtidos pelo azul de metileno (AM) no tratamento da vasoplegia induzida pela ação do óxido nítrico (NO) têm sido relatados na sepse, na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em cirurgia cardíaca e no choque anafilático, mas a sua segurança é muitas vezes questionada, principalmente relacionada aos seus efeitos hemodinâmicos e à possibilidade de causar disfunção endotelial. O objetivo deste estudo foi examinar os efeitos hemodinâmicos e a função endotelial da infusão endovenosa *in vivo* do AM em porcos.

Métodos: O protocolo de estudo incluiu dois grupos experimentais de porcas fêmeas: Grupo I (Controle) – os animais (n = 6) não receberam AM; Grupo II (AM) – os animais receberam 3 mg/kg de AM em forma de *bolus* endovenoso. Após quinze minutos de registro dos parâmetros hemodinâmicos os animais foram sacrificados por exsanguinação, e os estudos *in vitro* foram conduzidos usando segmentos de artérias coronária, hepática, mesentérica superior, renal, para determinar o efeito do AM na função endotelial relacionada com a liberação de NO. Mediu-se também o NO plasmático nos dois grupos experimentais.

Resultados: Os resultados obtidos no presente estudo foram: 1) a infusão endovenosa de AM (3,0 mg/kg) não causou nenhuma alteração hemodinâmica significativa; 2) os valores absolutos e percentuais e nitrito/nitrato plasmático (NOx) não apresentaram diferenças nos dois grupos experimentais; 3) o estudo *in vitro* dos segmentos arteriais (coronária, hepática, renal e mesentérica superior) não apresentou disfunção endotelial nos dois grupos. Os resultados sugerem que a injeção endovenosa de AM é segura. Esse dado concorda com dados clínicos no qual o AM foi utilizado para tratar a síndrome vasoplégica após circulação extracorpórea, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e anafilaxia. Os resultados não foram inesperados porque os animais não apresentavam vasoplegia, não se esperando que a inibição da guanilato ciclase tenha algum efeito.

Conclusão: A infusão em *bolus* endovenoso *in vivo* na dose investigada (3 mg/kg) não causou alterações hemodinâmicas e comprometimento da liberação *in vitro* de NO.

Palavras-chave: Óxido nítrico, azul de metileno, vasoplegia, choque distributivo.

Objective: Clinical benefit of methylene blue (MB) treating NO-induced vasoplegia has been reported in sepsis, systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in cardiac surgery and anaphylactic shock, but its safety is sometimes questioned, mainly regarding its hemodynamic effects and the possibility of causing endothelium dysfunction. To examine the nitric oxide plasma levels and cardiovascular effects of the infusion of MB *in vivo* and its effects on endothelium-dependent and endothelium-independent *in vitro* vascular relaxation.

Methods: The study protocol included two experimental groups of female pigs: Group I (Control) - the animals (n=6) did not receive MB; Group II (MB) – the animals received 3 mg/kg of MB intravenous bolus infusion. After fifteen minutes of hemodynamic parameter recording the animals were sacrificed by exsanguination, and *in vitro* studies were conducted using segments of coronary, hepatic, superior mesenteric and renal arteries, to determine the effect of MB on the arterial endothelium function with regard to NO release. Nitric oxide plasma levels (NOx) were measured in each of the experimental groups.

Results: The results obtained in the present investigation were: 1) intravenous infusion of MB (3.0 mg/kg) caused no hemodynamic changes; 2) absolute and percent plasma NOx values did not differ between the experimental groups; and 3) *in vitro* study of vascular relaxation showed no significant difference between groups. These results show that MB intravenous infusion seems to be safe. This finding agrees with data from clinical experiments where MB was used to treat vasoplegic syndrome after cardiopulmonary bypass, systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and anaphylaxis. These results were not unexpected because, as in healthy subjects, hemodynamics is only fine tuned and not fully under NO control; therefore, MB inhibiting guanylyl cyclase is not expected to do anything.

Conclusion: Intravenous use of MB, at the investigated dose, did not cause any abnormal hemodynamic responses or impairment of endothelium-dependent relaxation.

Key words: Nitric oxide, methylene blue, distributive shock, vasoplegia.

Correspondência: Paulo Roberto Barbosa Évora •

Rua Rui Barbosa, 367/16 - 14015-120 • Ribeirão Preto, SP

E-mail: prbevora@netsite.com.br

Recebido em 08/04/05 • Aceito em 02/02/06

O óxido nítrico (NO) parece participar da fisiopatologia da modulação das mudanças sistêmicas quando associado à vasoplegia.

Benefícios clínicos com o azul de metileno (AM) no tratamento da vasoplegia têm sido reportados na sepse¹⁻⁶, na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em cirurgias cardíacas⁷⁻¹¹ e no choque anafilático¹²⁻¹⁴.

Estudos experimentais demonstram que a inibição da síntese do NO pelos análogos da L-arginina revertem a hipotensão e antagonizam os efeitos dos vasoconstritores liberados durante os quadros de sepse e anafilaxia. Mas esses inibidores causam queda do débito cardíaco e aumento da resistência vascular pulmonar. Entretanto, é importante enfatizar que os análogos da L-arginina inibem as isoformas, constitucional (eNOS) e induzível (iNOS), da óxido nítrico sintase (NOS). O ideal seria a inibição específica da iNOS, responsável pelas reações vasoplégicas, preservando as atividades da eNOS, a qual é de vital importância para a fisiologia da microcirculação. A atuação na síntese do NO ainda é uma questão controversa, e até mesmo um assunto de bioética. Considerando essas preocupações sobre a síntese do NO, seria uma boa idéia bloquear os efeitos do NO no músculo liso vascular pela inibição da guanilato ciclase, que é responsável por aumentar os níveis de GMPc. O AM, provavelmente, é o agente mais seguro para fazer isso, porque é amplamente empregado em clínica desde o final do século XIX.

O principal objetivo da presente investigação foi, basicamente, responder à seguinte questão: será que o AM pode ter algum efeito agudo indesejável se utilizado independente da situação de vasoplegia com aumento da liberação de NO? O nosso grupo vem estudando o AM nos últimos doze anos em situações de vasoplegia associadas a utilização de protamina, síndrome vasoplégica em cirurgia cardíaca, anafilaxia, pancreatite e isquemia/reperfusão. A idéia fundamental é divulgar que nas doses clássicas não existem efeitos deletérios agudos hemodinâmicos e de reatividade vascular dependente do endotélio. Assim, o presente estudo foi conduzido com os seguintes objetivos: 1) avaliar, experimentalmente *in vivo* a ação hemodinâmica do AM, em porcos; 2) avaliar, experimentalmente, as ações do AM, *in vitro*, no tônus vascular dependente do endotélio, em artérias coronária, hepática, renal e mesentérica superior, de porcos saudáveis; e; 3) determinar as alterações do NO plasmático nos grupos experimentais.

Métodos

O protocolo do estudo incluiu dois grupos experimentais, Grupo I (Controle) – os animais foram observados sem a infusão do AM; Grupo II (AM) – Os animais receberam a infusão venosa de AM 3 mg/kg;

Estudo in vivo - Porcas pré-púberes da raça Daland (22-26 kg) foram anestesiadas com a injeção intramuscular de 15 mg/kg de midazolam (Dormid®, Cristália, São Paulo, Brasil), e de 10 mg/kg de tielamina/zolazepan (Telazol®, Fort Dodge, IA, EUA), seguido da infusão contínua de 100 µg/h de sulfentanil (Fastfan®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), e 10 mg/kg/h de propofol (Propovan®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), utilizando-se uma bomba de seringa (Harvard Apparatus, South Natick, MA,

EUA), e relaxante muscular na dose de 6 mg/h de brometo de pancurônio (Pancuron®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil).

As veias jugular ou femoral e as artérias carótidas ou femoral foram isoladas, respectivamente, para se obter acessos venosos e monitorização da pressão arterial. As amostras de NO plasmático foram obtidas em cada etapa dos experimentos, em todos os grupos estudados.

Estudos *in vivo* foram realizados por meio de registro e medida dos parâmetros hemodinâmicos utilizando-se o MP System 100 THE (BioPac System, Santa Barbara, CA, EUA), e pelas medidas contínuas de débito cardíaco por meio do Vigilance System (Monitor e Swan-Ganz CCombo, cateter CCO/SvO₂ 744HF75 – Edwards Lifesciences, Irvine, CA, EUA), e medidas plasmáticas de nitrito/nitrato por concentrações de quimioluminescência pelo Analyser 280i NOA (Sievers, Boulder, CO, EUA).

Estudo in vitro - Os estudos *in vitro* dos segmentos arteriais foram realizados em câmaras de órgãos padronizadas. Após a conclusão das observações *in vivo*, os animais foram exsangüinados, o tórax e o abdome foram rapidamente abertos, e as artérias coronárias (descendente anterior ou circumflexa), hepática, mesentérica superior e renal foram cuidadosamente dissecadas, liberadas do tecido conjuntivo adjacente, e imersas numa solução salina fisiológica, oxigenada, pH 7,4, com a seguinte composição milimolar: NaCl - 118,0; KCl - 4,7; CaCl₂ - 2,5; KH₂PO₄ -1,2; MgSO₄ -1,66; Glicose - 11,1; NaHCO₃ -25,0 (Solução de Krebs-Henseleit). Os protocolos foram analisados e aprovados pela comissão de ética em experimentação animal da Instituição.

Os segmentos vasculares (4 a 5 mm de largura) foram preparados com grande cuidado evitando-se tocar a superfície íntima. Os segmentos arteriais de cada animal foram escolhidos ao acaso; dessa forma, quatro pares de cada artéria (com e sem endotélio) foram dispostos nas mesmas condições experimentais. Em muitos segmentos, a função da musculatura lisa vascular foi testada sem a influência do endotélio. Nesses segmentos, o endotélio foi removido, atritando-se a íntima do vaso pela inserção de uma pinça angulada em sua luz. Esse procedimento, realizado com cuidado, remove o endotélio, sem afetar a habilidade de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular.

Os segmentos arteriais, com e sem endotélio, foram suspensos nas câmaras de órgãos (25 ml), imersos numa solução, oxigenada com uma mistura carbogênica, composta por O₂ 95% e CO₂ 5% (White Martins, Ribeirão Preto, SP, Brasil), aquecida a 37°C e denominada solução padrão. Cadaanel vascular foi suspenso por duas alças de aço inoxidável passadas através da luz arterial. Uma das alças foi ancorada na câmara de órgãos, e a outra conectada ao transdutor de força isométrica Grass FT03 (Grass Instrument Company, Quincy, MA, EUA). Os anéis foram progressivamente estirados até o ponto ótimo da curva de distensão, equivalente à resposta de contração máxima obtida pelo KCl (20 mMol/l). Em todos os experimentos, a presença ou ausência de endotélio foi determinada pela resposta à acetilcolina (Ach: 10⁻⁴M) nos anéis contraídos com KCl (20 mMol/l). As câmaras de órgãos foram lavadas com a solução padrão, e os segmentos arteriais foram equilibrados na linha de base por sessenta minutos na presença de indometacina,

para prevenir a síntese endógena de prostaglandinas. Depois disso, prostaglandina $F_{2\alpha}$ foi acrescentada à câmara de órgãos, atingindo um nível estável de contração.

Agentes utilizados: Difosfato de adenosina (ADP: 10^{-9} to 10^{-4} M), Fluoreto de sódio (0,5 to 9,5 mM), Cálcio ionóforo (A_{23187} - 10^{-9} to 10^{-6} M), Nitroprussiato de sódio (NPS: 10^{-9} to 10^{-4} M), Prostaglandina $F_{2\alpha}$ e Indometacina (todas manufaturadas pela Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Todos os agentes foram diluídos com água destilada, exceto pela indometacina que foi dissolvida em Na_2CO_3 (10^{-5} M). As concentrações foram expressas como concentração final nas câmaras de órgãos. As mudanças nas tensões dos vasos foram expressas em porcentagens em relação à tensão máxima encontrada pela ação da prostaglandina $F_{2\alpha}$, uma convenção que corrige pela variabilidade entre animais a resposta do tecido ao agente. Em todos os experimentos, (n) refere-se ao número de animais dos quais os segmentos vasculares foram coletados.

Análise estatística - Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão, analisados pelo teste estatístico ANOVA, Teste T pareado e, quando necessário, pós-teste de Bonferroni, realizados com o auxílio do programa Prism 3.0 (GraphPad Software Incorporated, 1999). Os valores foram considerados estatisticamente significantes para p menores que 0,05.

Resultados

Quatorze fêmeas foram estudadas e duas morreram durante a manipulação para a passagem do cateter de Swan-

Ganz, que induziram a fibrilação ventricular. O peso médio foi de $22,59 \pm 1,18$ kg. Não houve significância estatística do peso corporal nos grupos estudados. ($p < 0,05$).

Observações hemodinâmicas - A infusão endovenosa de AM (3,0 mg/kg) não causou mudanças na pressão arterial média (PAM), débito cardíaco (DC), resistência vascular periférica (RVS), pressão na artéria pulmonar (PAP), pressão capilar pulmonar (PCP), resistência vascular pulmonar (RVP), e pressão venosa central (PVC), quando comparadas ao grupo controle (figs. 1 e 2).

Nitrito/Nitrato plasmático (Nox) - Valores absolutos e percentuais de nitritos/nitratos plasmáticos (NOx) não diferiram entre os grupos experimentais (fig. 3).

Reatividade vascular dependente do endotélio - Após a contração com $PGF_{2\alpha}$ dos anéis das artérias coronária, hepática, mesentérica superior e renal a adição progressiva de adenosina difosfato (ADP, 10^{-9} a 10^{-4} M) (fig. 4), fluoreto de sódio (0,5 a 9,5 mM) (fig. 5), cálcio ionóforo (A_{23187} , 10^{-9} a 10^{-6} M) (fig. 6), induziram relaxamento das artérias com endotélio, que foram significativamente maiores do que o relaxamento obtido nas artérias sem endotélio. Mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e AM ($n = 6$, $p > 0,05$).

Reatividade vascular independente do endotélio - Após a contração com a $PGF_{2\alpha}$ e a progressiva adição do agonista independente do endotélio, o nitroprussiato de sódio (10^{-9} a 10^{-6} M) induziu a vasodilatação de todas os segmentos arteriais estudados (coronária, hepática, mesentérica superior e renal),

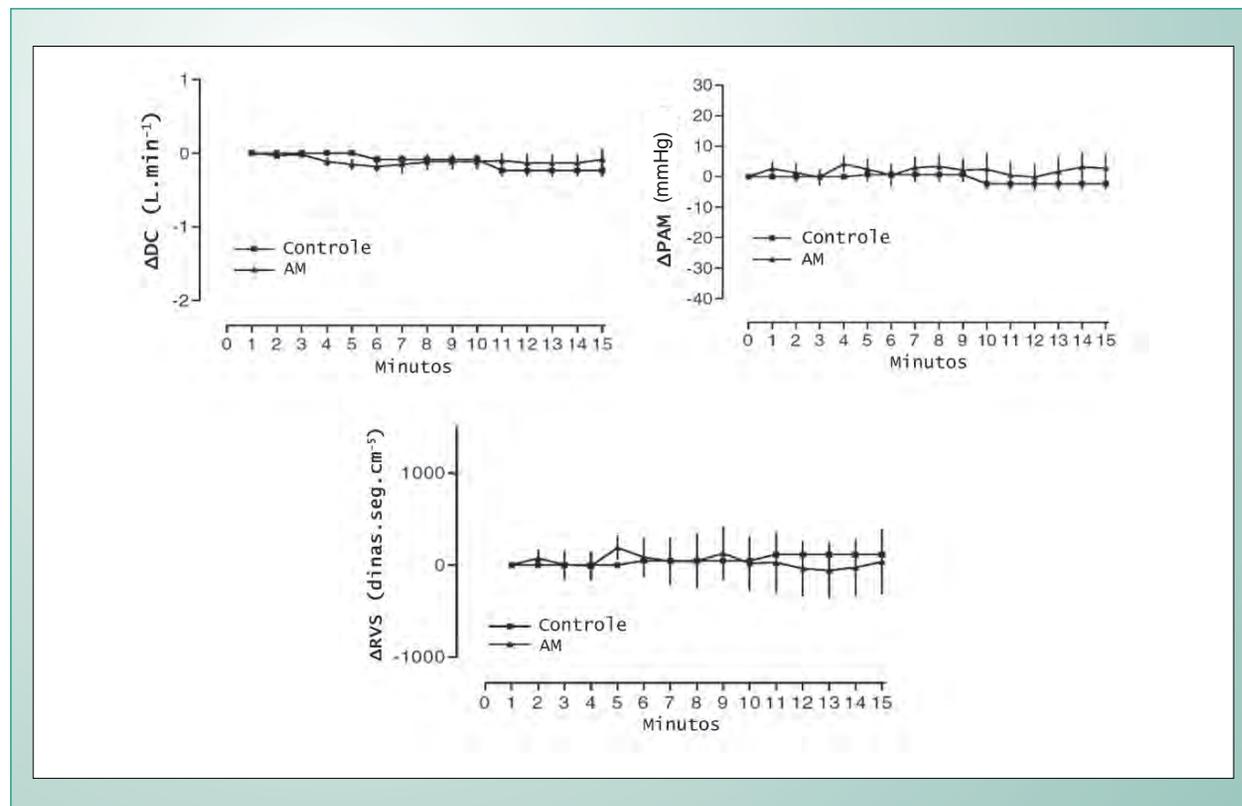


Fig. 1 - A infusão endovenosa de AM (3,0 mg/kg) não causou mudanças na pressão arterial média (PAM), débito cardíaco (DC), resistência vascular periférica (RVS) quando comparadas ao grupo controle. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; $n = 6$; $p < 0,05$.

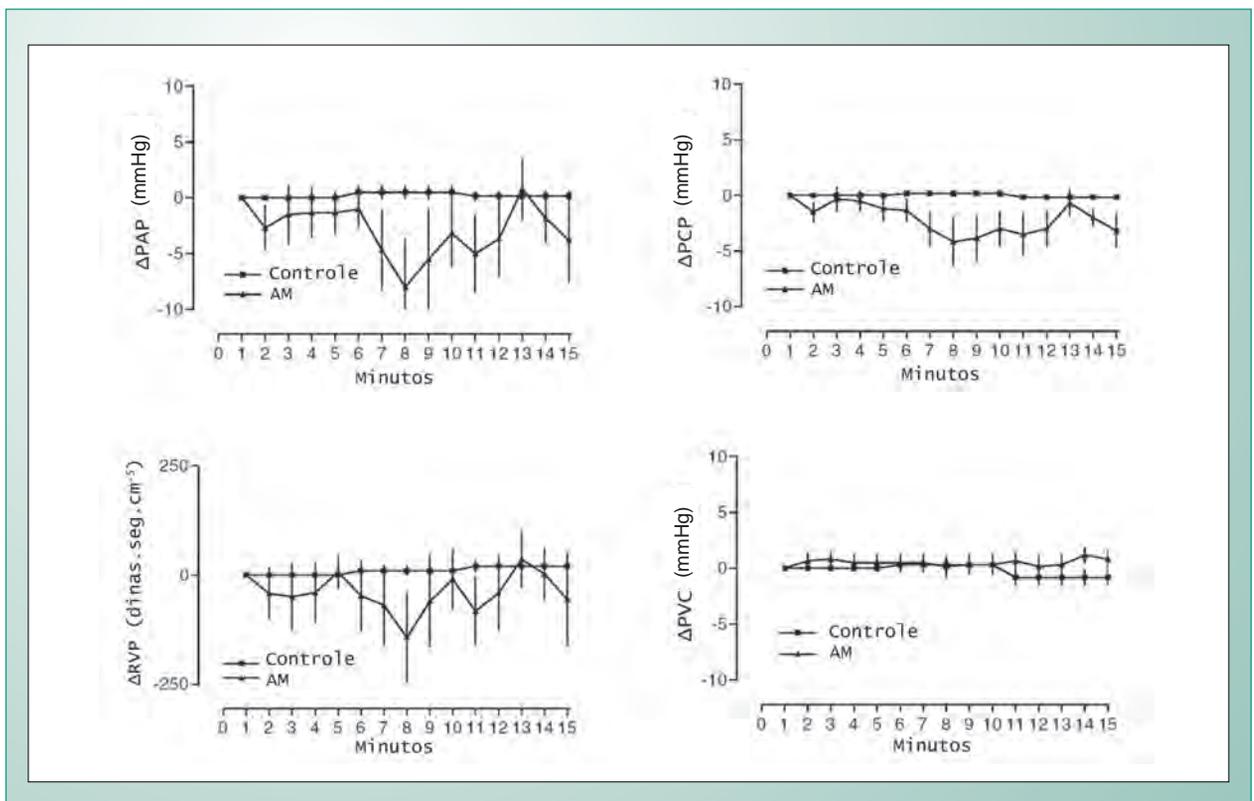


Fig. 2 - A infusão endovenosa de AM (3,0 mg/kg) não causou mudanças pressão na artéria pulmonar (PAP), pressão capilar pulmonar (PCP), resistência vascular pulmonar (RVP), e pressão venosa central (PVC), quando comparadas ao grupo controle. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; n = 6; p < 0,05.

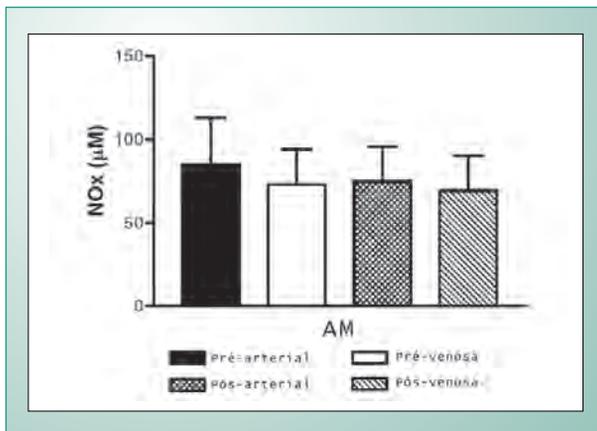


Fig. 3 - Valores absolutos e percentuais de nitritos/nitritos plasmáticos (NOx) não diferiram entre os grupos experimentais. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; n = 6; p < 0,05.

com e sem endotélio. Não houve diferenças estatísticas, entre os grupos, no relaxamento máximo. Houve diferenças intragrupos: 1) Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria coronária, com e sem endotélio, nas doses 3,8; 10^{-7} e 3,7M); 2) Grupo Controle (diferenças entre os segmentos de artéria hepática, com e sem endotélio, nas doses 3,8; 10^{-7} ; 3,7 e 10^{-6} M), e Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria hepática e entre artéria coronária, respectivamente, com e sem endotélio, nas doses 3,8; 10^{-7} e 3,7M); 3) Grupo Controle (diferenças entre os segmentos de artéria mesentérica superior,

com e sem endotélio, nas dosagens 3,8; 10^{-7} ; e 10^{-6} M), Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria mesentérica superior, com e sem endotélio, nas dosagens 3,8; 10^{-7} e 3,7M); 4) Grupo Controle (diferenças entre os segmentos de artéria renal, com e sem endotélio, na dosagem 3,7 e 10^{-6} M) e Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria renal, com e sem endotélio, nas doses 3,7 e 10^{-6} M) (fig. 7).

Entre os anéis com endotélio dos dois grupos experimentais não houve diferença estatística, exceto para os segmentos de artéria mesentérica superior, nos grupos Controle e AM, na dosagem de 10^{-7} M (n = 6, p < 0,05).

Discussão

Na presente investigação observou-se que: 1) a infusão endovenosa do AM não causou alterações hemodinâmicas relevantes; 2) os valores absolutos e percentuais de NOx não apresentaram alterações com o uso de AM; 3) a infusão endovenosa do AM não provocou disfunção endotelial.

Esses resultados mostram que a infusão venosa de AM parece ser segura. Os achados corroboram experimentos clínicos em que o AM foi utilizado para tratar a síndrome vasoplégica pós-cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC,⁷ na síndrome da resposta inflamatória sistêmica – SIRS^{7-11,15-20} e anafilaxia¹²⁻¹⁴. Esses resultados não são inesperados, principalmente quando analisados em animais saudáveis, nos quais o estado hemodinâmico apresenta uma regulação fina, mas não total, sob controle do NO. Nessas condições, nenhuma ação é esperada quando ocorre a inibição da guanilatocilase pelo AM.

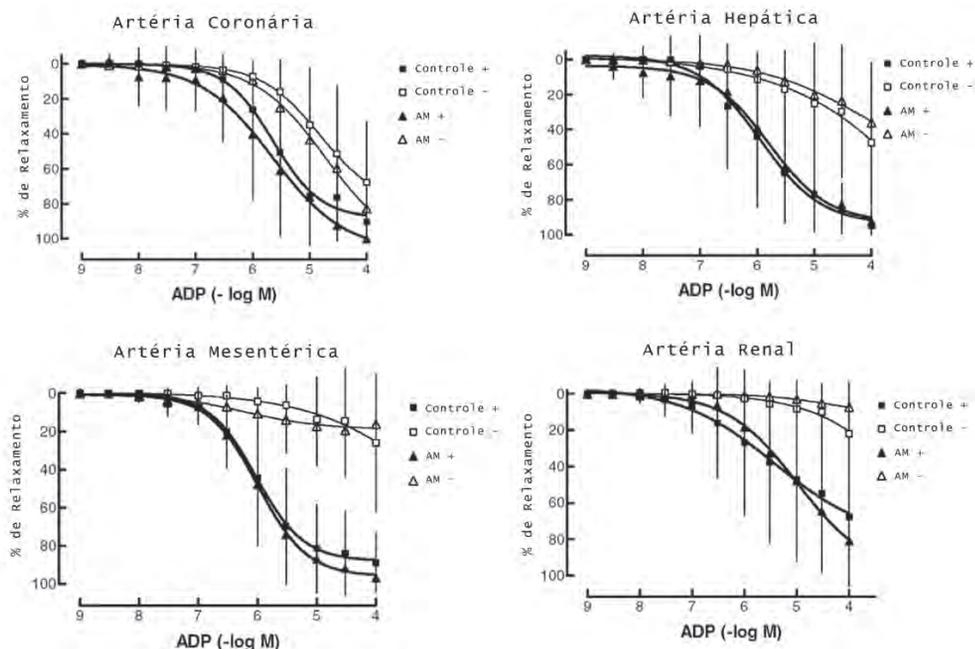


Fig. 4 - Após a contração com $PGF_{2\alpha}$ dos anéis das artérias coronária, hepática, mesentérica superior e renal, a adição progressiva de adenosina difosfato (ADP, 10^{-9} a $10^{-4}M$) induziu relaxamento das artérias com endotélio, que foram significativamente maiores do que o relaxamento obtido nas artérias sem endotélio. Mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e AM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; $n = 6$; $p < 0,05$.

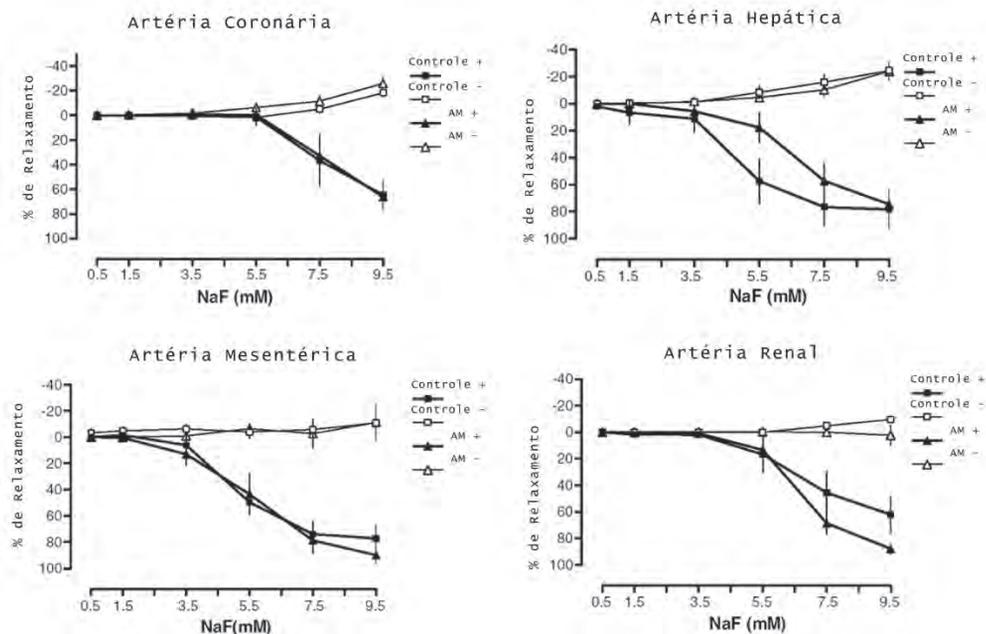


Fig. 5 - Após a contração com $PGF_{2\alpha}$ dos anéis das artérias coronária, hepática, mesentérica superior e renal, a adição progressiva fluoreto de sódio (NaF, 0,5 a 9,5 mM) induziu relaxamento das artérias com endotélio, que foram significativamente maiores do que o relaxamento obtido nas artérias sem endotélio. Mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e AM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; $n = 6$; $p < 0,05$.

A sua eliminação é rápida, bastando observar a mudança na coloração da urina. Nas situações agudas de choque circulatório é conveniente utilizar a infusão em *bolus* seguida de infusão contínua. A razão da observação dos efeitos hemodinâmico por apenas quinze minutos foi realizar o estudo *in vitro* em uma faixa temporal com a provável maior concentração plasmática do AM. A vivência clínica e experimental permite a inferência de que a manutenção da infusão contínua não causa manifestações isquêmicas cardíacas ao ECG, hipertensão pulmonar e, à medida que o tempo passa, observa-se uma tendência a hipertensão arterial à custa de uma melhor resposta a amins, permitindo a supressão tanto do AM e progressiva diminuição das necessidades de vasopressores.

Como era de se esperar, não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos de nitritos/nitratos, confirmando que o AM não interfere na via do NO. Acresça-se, ainda, que, durante a SIRS, os níveis de nitritos/nitratos, proposto como um índice para a ativação do sistema imune, alcançam a concentração de pico somente após vinte horas²¹. Essa observação pode trazer considerações especulativas. Mas, somando-se os resultados do estudo hemodinâmico e da reatividade vascular, não é improvável que a normalidade das dosagens plasmáticas de nitritos/nitratos possa ser uma evidência de função endotelial inalterada no caso da infusão endovenosa *in vivo* do AM.

A segurança do AM em relação à capacidade de o endotélio vascular liberar NO foi comprovada, uma vez que os estudos *in vitro* da reatividade vascular não mostraram diferenças entre os grupos Controle e AM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes,

comparando-se as curvas doses-resposta obtidas por ensaios farmacológicos com: 1) ADP que é um ativador de membrana endotelial dependente de receptor; 2) NaF que é um ativador de G-proteínas e; 3) Cálcio ionóforo A23187 que estimula a liberação de NO independente de receptores.

Observaram-se diferenças nos relaxamentos causados pelo NPS (relaxamento independente de endotélio) nos segmentos arteriais sem endotélio, mas sem diferenças em relação ao relaxamento máximo. O mesmo fato se deu no grupo Controle, o que traz grandes dificuldades para explicar o ocorrido. A conjectura mais razoável é interpretar esse dado em razão da instrumentação para remoção do endotélio, ou ainda relacionar o achado com o tamanho da amostra. Relacionar o achado com os hormônios sexuais^{22,23} é muito improvável, pois as porcas utilizadas eram pré-púberes.

Uma palavra de cautela é necessária para ressaltar que as condições *in vitro* são totalmente diferentes da situação *in vivo*. O acréscimo do AM nos banhos causa uma diminuição de relaxamentos dependentes do endotélio, fato esse que é revertido quando se lava a preparação com solução fisiológica. Mas a idéia aqui é ver se a infusão *in vivo* cria uma condição de disfunção endotelial. O fato de que após os vasos *in vitro* serem lavados passarem a responder normalmente, pode reforçar a idéia de que em razão da eliminação rápida da droga a disfunção endotelial, caso ocorra, é facilmente reversível. Além disso, é preciso ressaltar que a farmacocinética do azul de metileno é complexa. A diminuição da excreção urinária entre quatro e 24 horas indica que a meia-vida do AM gira em torno de 5,25 horas, com grande queda da concentração plasmática dentro da primeira hora²⁴.

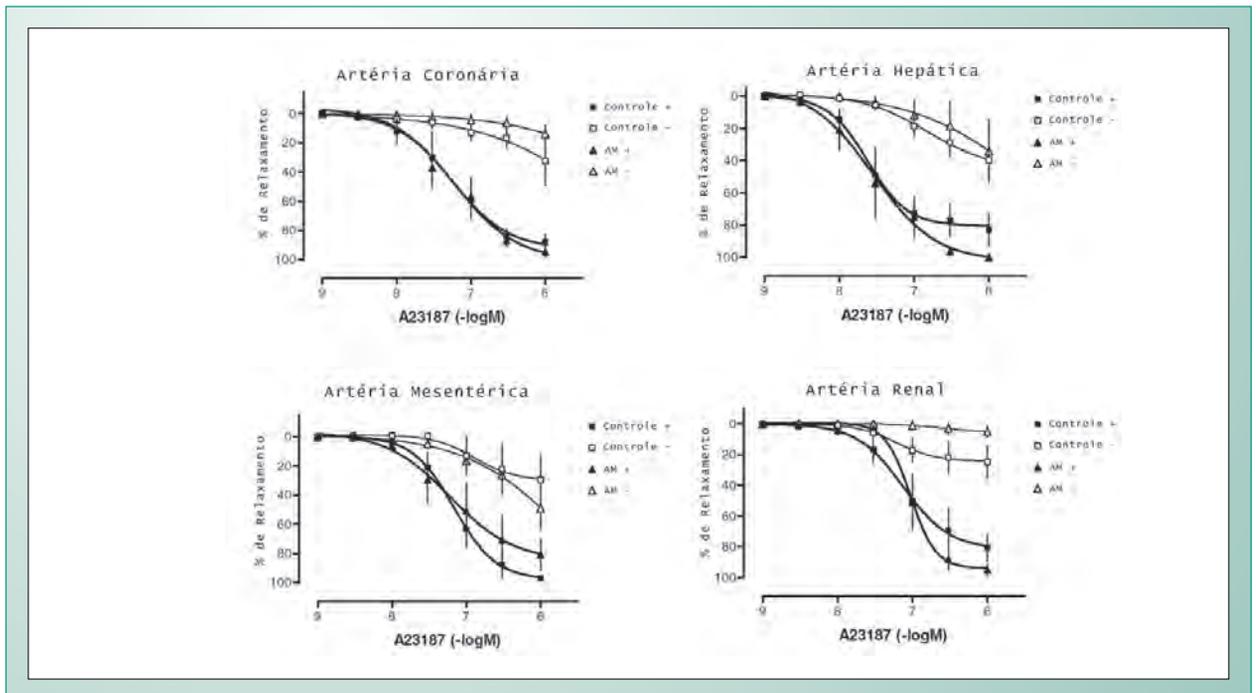


Fig. 6 - Após a contração com $PGF_{2\alpha}$ dos anéis das artérias coronária, hepática, mesentérica superior e renal, a adição progressiva de cálcio ionóforo (A23187, 10^{-9} a $10^{-6}M$) induziu relaxamento das artérias com endotélio, que foram significativamente maiores do que o relaxamento obtido nas artérias sem endotélio. Mas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e AM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; n = 6; p < 0,05.

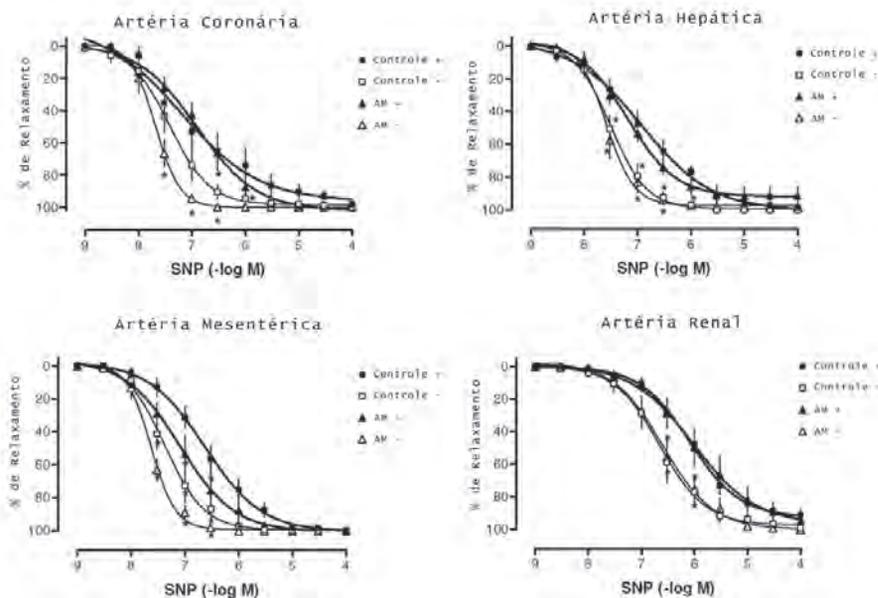


Fig. 7 - Após a contração com a $PGF_{2\alpha}$ e a progressiva adição do agonista independente do endotélio, o nitroprussiato de sódio (10^9 a 10^6 M), induziram a vasodilatação de todas os segmentos arteriais estudados (coronária, hepática, mesentérica superior e renal), com e sem endotélio. Não houve diferenças estatísticas, entre os grupos, no relaxamento máximo. Houve diferenças intragrupos: 1) Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria coronária, com e sem endotélio, nas doses 3,8; 10^7 e $3,7M$); 2) Grupo Controle (diferenças entre os segmentos de artéria hepática, com e sem endotélio, nas doses 3,8; 10^7 ; 3,7 e 10^6M), e Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria hepática e entre artéria coronária, respectivamente, com e sem endotélio, nas doses 3,8; 10^7 e $3,7M$); 3) Grupo Controle (diferenças entre os segmentos de artéria mesentérica superior, com e sem endotélio, nas dosagens 3,8; 10^7 ; e 10^6M), Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria mesentérica superior, com e sem endotélio, nas dosagens 3,8; 10^7 e $3,7M$); 4) Grupo Controle (diferenças entre os segmentos de artéria renal, com e sem endotélio, na dosagem 3,7 e 10^6M) e Grupo AM (diferenças entre os segmentos de artéria renal, com e sem endotélio, nas doses 3,7 e 10^6M). Entre os anéis com endotélio dos dois grupos experimentais não houve diferenças estatísticas, exceto para os segmentos de artéria mesentérica superior, nos grupos Controle e AM, na dosagem de 10^7M . Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; n = 6; p < 0,05.

Conclusões

Considerando a função hemodinâmica cardiovascular e a função endotelial, a presente investigação aumenta a evidência da segurança do AM em humanos, pelo menos agudamente, uma vez que o modelo experimental utilizou a infusão em bolo e a observação por apenas 15 minutos. É evidente que o aparecimento de uma disfunção endotelial mais tardia não pode ser descartado, considerando-se as características enzimáticas da NO-sintase endotelial. Mas essa possibilidade é improvável, pois apenas poucos autores referem a possibilidade do AM inibir a síntese do NO^{25,26}. Como já ressaltado neste texto, o AM age principalmente inibindo a guanilatociclase, e essa ação ocorre na musculatura lisa. Também, não foram observadas

manifestações clínicas depois da injeção intravenosa do AM, com exceção da urina cor verde, confirmando a impressão de variadas publicações clínicas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação de Amparo ao ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (FAEPA).

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

Referências

1. Paya D, Gray GA, Stoclet JC. Effects of methylene blue on blood pressure and reactivity to norepinephrine in endotoxemic rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 21: 926-30.
2. Preiser JC, Lejeune P, Roman A, et al. Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. *Crit Care Med.* 1995; 23: 259-64.
3. Keane Jr JF, Puyana JC, Francis S, et al. Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. *Circ Res.* 1994; 74: 1121-5.
4. Marczin N, Tekeres M, Salzman AL, Szabo C. Methylene blue infusion in septic shock. *Crit Care Med.* 1995; 23: 1936-8.
5. Schneider F. Methylene blue infusion in septic shock. *Crit Care Med.* 1995; 23: 1935-6.
6. Daemen-Gubbels CR, Groeneveld PH, Groeneveld AB, et al. Methylene blue increases myocardial function in septic shock. *Crit Care Med.* 1995; 23: 1363-70.

7. Andrade JC, Batista Filho ML, Evora PR, et al. Utilização do azul de metileno no tratamento da síndrome vasoplégica após cirurgia cardíaca. *Rev Bras Cirurg Cardiovasc.* 1996; 11: 107-14.
8. Evora PR, Ribeiro PJ, de Andrade JC. Methylene blue administration in SIRS after cardiac operations. *Ann Thorac Surg.* 1997; 63: 1212-3.
9. Viaro F, Dalio MB, Evora PR. Catastrophic cardiovascular adverse reactions to protamine are nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate dependent and endothelium mediated: should methylene blue be the treatment of choice? *Chest.* 2002; 122: 1061-6.
10. Evora PR, Levin RL. Methylene blue as drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127: 895-6.
11. Levin RL, Degrange MA, Bruno GF, et al. Methylene blue reduces mortality and morbidity in vasoplegic patients after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2004; 77: 496-9.
12. Oliveira Neto AM, Duarte NM, Vicente WV, Viaro F, Evora PR. Methylene blue: an effective treatment for contrast medium-induced anaphylaxis. *Med Sci Monit.* 2003; 9: CS102-6.
13. Evora PR, Oliveira Neto AM, Duarte NM, Vicente WV. Methylene blue as treatment for contrast medium-induced anaphylaxis. *J Postgrad Med.* 2002; 48: 327.
14. Evora PR, Roselino CH, Schiaveto PM. Methylene blue in anaphylactic shock. *Ann Emerg Med.* 1997; 30: 240.
15. Yiu P, Robin J, Pattison CW. Reversal of refractory hypotension with single-dose methylene blue after coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 118: 195-6.
16. Pagni S, Austin E. Use of intravenous methylene blue for the treatment of refractory hypotension after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 119: 1297-8.
17. Kofidis T, Struber M, Wilhelmi M, et al. Reversal of severe vasoplegia with single-dose methylene blue after heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 122: 823-4.
18. Leyh RC, Kofidis T, Struber M, et al. Methylene blue: The drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125: 1426-31.
19. Grayling M, Deakin CD. Methylene blue during cardiopulmonary bypass to treat refractory hypotension in septic endocarditis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125: 426-7.
20. Dagenais F, Mathieu P. Rescue therapy with methylene blue in systemic inflammatory response syndrome after cardiac surgery. *Can J Cardiol.* 2003; 19: 167-9.
21. Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem.* 1998; 31: 195-220.
22. Teoh H, Quan A, Man RY. Acute impairment of relaxation by low levels of testosterone in porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 1010-8.
23. Lee MY, Man RY. The phytoestrogen genistein enhances endothelium-independent relaxation in the porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol.* 2003; 481: 227-32.
24. Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterburg BH. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000; 56: 247-50.
25. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J.* 1993; 14(Suppl I): 22-6.
26. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45: 367-74.