

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

PROTEÇÃO DO MIOCÁRDIO ISQUÊMICO DE COELHO,
UTILIZANDO-SE PERFUSATO ENRIQUECIDO COM
GLUTATION

JOSÉ GLAUCO LOBO FILHO

FC-00006124-2

Fortaleza - Ceará
1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**PROTEÇÃO DO MIOCÁRDIO ISQUÊMICO DE COELHO,
UTILIZANDO-SE PERFUSATO ENRIQUECIDO COM
GLUTATION**

JOSÉ GLAUCO LOBO FILHO

Dissertação submetida à coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

Fortaleza - Ceará
1998

L783p Lobo Filho, José Glauco

Proteção do miocárdio isquêmico de coelho, utilizando-se perfusato enriquecido com glutathione. – Fortaleza, 1998.

73 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Isquemia miocárdica – Glutathione. 2. Cardioplegia hipercaleêmica. 3. Hipotermia. J. Título.

CDD 616.123

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho da dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética.

José Glauco Lobo Filho

Dissertação aprovada em:

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
- Orientador -

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

“Sopra o espírito onde quer.
Para aquele que não é bafejado pelo sopro do espírito,
loucura seria pretender exprimir o seu pensamento em público.
O menos que lhe poderia acontecer seria a incompreensão dos outros...”

Ana Carrel, 1949

“Ninguém compreendeu que, para ser duradoura,
a civilização se deve edificar,
não sobre princípios filosóficos,
mas sobre conceitos científicos
do ser humano e do meio...
O direito é um princípio filosófico,
a necessidade, um conceito científico.
Na organização da nossa vida coletiva,
demos preferência
aos nossos caprichos intelectuais
sobre os elementos da ciência,
vindo o triunfo das ideologias
a consagrar o desmoronamento da civilização.”

Alexis Carrel, 1950

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação de cirurgião cardíaco.

Ressalto especialmente o nome do Dr. José Glauco Bezerra Lobo, meu pai, com quem desde o primeiro ano de graduação, quando começamos a operar juntos, aprendi o verdadeiro sentido ético e moral da medicina e da cirurgia.

Ressalto a figura do professor Alan Carpentier, com quem aprendi que a cirurgia é uma ciência, e que a pesquisa em cirurgia, o esmero da técnica operatória e a capacidade de trabalho são cruciais na formação do cirurgião e de ser cirurgião.

Dedico também este trabalho ao professor Charles Dubost, o maior de todos os cirurgiões que conheci. Graças ao seu extraordinário conhecimento técnico e científico, aliado à sua virtuosa evolução espiritual e humana, tive a felicidade de descobrir que os referenciais humanos precedem a materialização de um sonho.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento é endereçado ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, pessoa a quem tenho estima e respeito, não apenas pelo seu valor profissional, mas sobretudo, pelo ser humano que representa. Foi o amigo Odorico, meu grande estimulador a retornar aos bancos universitários, quando afastado deles estive desde o final de 1980, época em que terminei a residência médica em cirurgia cardiovascular no Hospital Brousseais, em Paris.

Agradeço, de todo coração, aos colaboradores bolsistas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, através da CAPES e do CNPq, Gustavo Santos de Sousa, Ana Cristina Magalhães Andrade, e Jarbas de Sá Roriz Filho, jovens que, com exemplo de idealismo e vontade de aprender, transmitiram-me muito entusiasmo e estímulo.

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelo profissionalismo, paciência e serenidade com que transmitem os conhecimentos científicos e proporcionam os exemplos práticos de como desvendar o desconhecido.

Sou muito grato também a todos os funcionários do laboratório de pesquisas do Hemoce.

Em nome do fisioterapeuta Vasco Pinheiro Diógenes Bastos, agradeço a todos os funcionários da secretaria do Curso de Mestrado em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelos exemplos de dedicação, cooperação e apoio.

Agradeço também ao Prof. Augusto Reinaldo Pimentel Guimarães, doutor em Nutrição, pela USP, que graças ao seu conhecimento e à sua formação profissional, aliada à sua inteligência e sua capacidade dissertativa, muito contribuiu para elaboração deste trabalho.

Um agradecimento especial ao jovem Flávio Landim de Sá que, desde o início dos trabalhos, quando ainda era estudante bolsista do CNPq, até os dias de hoje, agora médico, foi sempre incansável em nos auxiliar. Desde a fase dos experimentos em laboratório até a etapa dissertativa desta tese, sempre mostrou o quanto é inteligente e disciplinado. Certamente, sem a sua colaboração dificilmente este trabalho estaria sendo apresentado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles. Após estes últimos quatro anos de convivência, cresci minha admiração por este grande professor e pesquisador. Sem dúvida, os seus exemplos diários de trabalho árduo e persistência na pesquisa foram muito importantes para minha formação acadêmica.

Por fim, agradeço a Deus por me haver concedido o privilégio de conviver com tantas pessoas generosas, inteligentes e competentes, que muito contribuíram para minha evolução profissional, espiritual e humana.

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO.....	1
1. Considerações Gerais.....	1
2. Métodos de Preservação do Miocárdio.....	2
2.1. Proteção Celular por Hipotermia.....	3
2.2. Proteção Miocárdica por Manipulação Química.....	4
2.3. Proteção Miocárdica por Perfusão.....	7
3. Metabolismo Energético do Músculo Cardíaco.....	10
4. Glutation.....	12
4.1. Importância do Glutation no Metabolismo da Célula Cardíaca.....	12
4.2. Funções Básicas do Glutation.....	14
4.2.1. Glutation como Redutor Intracelular.....	14
4.2.2. Formação de derivados do Glutation com Substituição do Enxofre.....	15
4.2.3. Função de Coenzima.....	16
4.2.4. Participação no Ciclo Gama-Glutamil.....	16
4.3. Glutation e a Injúria Isquêmica.....	16
5. Sistema de Perfusão Langendorff.....	18



II – OBJETIVOS.....	21
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1. Animais.....	22
2. Procedimento Experimental.....	22
3. Análise Estatística.....	28
IV – RESULTADOS.....	29
1. Protocolo I.....	29
1.1. Inotropismo.....	29
1.2. Pressão de Perfusão.....	33
1.3. Débito Cardíaco.....	39
1.4. Resistência.....	39
2. Protocolo II.....	42
2.1. Inotropismo.....	42
2.2. Pressão de Perfusão e Débito Cardíaco.....	48
2.3. Resistência.....	48
2.4. Consumo de Glutation.....	52
V - DISCUSSÃO	53
VI – CONCLUSÃO.....	62
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Composição em mM da solução de Krebs-Henseleit modificada (Fonteles e col. 1983), utilizada na preparação da solução cardioplégica de potássio..... 26
- TABELA 2** - Efeitos fisiológicos dos corações isolados de coelho, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit a 24°C com parada cardioplégica..... 35
- TABELA 3** - Parâmetros funcionais de corações de coelho, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit a 24°C sem parada..... 37
- TABELA 4** - Efeitos fisiológicos dos corações isolados de coelho perfundidos com solução de Krebs-Henseleit a 30°C com e sem glutatation..... 44

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Sistema de perfusão Langendorff modificado, utilizando-se uma coluna de perfusão que funciona como oxigenador de bolha..... 23
- FIGURA 2** - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento do grupo V do Protocolo I (dois períodos de isquemia de 120 minutos a 24°C com solução cardioplégica)..... 32
- FIGURA 3** - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento do grupo controle C120 do protocolo I (dois períodos de isquemia de 120 minutos a 24°C sem solução cardioplégica)..... 38
- FIGURA 4** - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento da série I do Protocolo II (dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C sem glutathione na solução perfusora)..... 46
- FIGURA 5** - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento da série II do Protocolo II (dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C com glutathione a 0,1mM na solução perfusora)..... 47

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Comportamento da amplitude da Força de Contração medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30(GI), 45(GII), 60(GIII), 90(GIV) e 120(GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia(24°C)..... 31
- Gráfico 2** - Comportamento da Pressão de Perfusão medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30 (GI), 45 (GII), 60 (GIII), 90 (GIV) e 120 (GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia(24°C)..... 36
- Gráfico 3** - Comportamento do Fluxo Cardíaco medido em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30 (GI), 45 (GII), 60 (GIII), 90(GIV) e 120 (GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia (24°C)..... 40
- Gráfico 4** - Comportamento da Resistência medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30(GI), 45(GII), 60(GIII), 90(GIV) e 120(GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia(24°C)..... 41
- Gráfico 5** - Comportamento da amplitude da Força de Contração medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH (SI), com 0,1mM de GSH (SII) e com 0,3mM de GSH (SIII)... 45
- Gráfico 6** - Comportamento da Pressão de Perfusão medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH(SI), com 0,1mM de GSH(SII) e com 0,3mM de GSH(SIII)..... 49
- Gráfico 7** - Comportamento do Fluxo Cardíaco medido em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH(SI), com 0,1mM de GSH(SII) e com 0,3mM de GSH(SIII)..... 50

Gráfico 8 - Comportamento da Resistência medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH (SI), com 0,1mM de GSH (SII) e com 0,3mM de GSH (SIII)..... 51

RESUMO

Durante cirurgias cardíacas, a parada cardioplégica associada à hipotermia é a técnica de proteção do miocárdio mais utilizada durante a isquemia. Neste estudo, pretendeu-se demonstrar o efeito protetor de uma solução cardioplégica com cloreto de potássio, associada à hipotermia moderada e glutation, na preservação do coração submetido à isquemia prolongada. Foram utilizados corações isolados de coelho em sistema de perfusão introduzido por Langendorff, com modificações adaptadas ao estudo. No primeiro protocolo experimental, foi avaliado o efeito citoprotetor da solução cardioplégica hipercalêmica combinada à hipotermia de 24°C, em diferentes intervalos de isquemia. Os resultados obtidos na avaliação da amplitude de inotropismo do músculo cardíaco demonstraram importante efeito protetor dessa combinação.

O segundo protocolo foi realizado com o objetivo de determinar o papel citoprotetor da adição do glutation na solução perfusora em duas concentrações, durante isquemia a 30°C, em que as perdas fisiológicas foram mais evidentes, utilizando cardioplegia prévia com potássio. Quando o coração foi submetido a isquemia com reperfusão sem glutation, observou-se redução de 78% do inotropismo após o segundo período de isquemia em comparação aos resultados observados no início do experimento no mesmo grupo. Esses achados demonstram que o aumento da temperatura determinou importante redução do efeito protetor da cardioplegia sobre o inotropismo do coração isquêmico, confirmando a importância da hipotermia na manutenção da função celular do coração isquêmico. A adição de 0,1mM de glutation à solução perfusora reverteu de maneira significativa esses efeitos adversos observados no grupo anteriormente descrito, sugerindo que esse efeito é, ao menos em parte, consequência da produção de radicais livres. Além disso, com o aumento da concentração de glutation para 0,3mM observou-se diminuição na força de contração em relação à concentração de 0,1mM, levando a crer que fatores adicionais devem estar envolvidos de maneira associada na gênese da injúria isquêmica. O consumo de glutation durante reperfusão também foi estudado com

os corações isolados e perfundidos com solução enriquecida com o tripeptídeo nas concentrações de 0,1mM e 0,3mM após dois períodos de sessenta minutos de isquemia. Os resultados demonstraram que, apesar do aumento em 200% na oferta de glutathione à solução perfusora, isso não foi capaz de manter aumento semelhante no consumo deste substrato pela célula cardíaca após a isquemia, nem levou a incremento adicional na força de contração do miocárdio. Os resultados obtidos apontam para novos caminhos na preservação miocárdica através da combinação de hipotermia, cardioplegia e a adição de glutathione à solução perfusora.

SUMMARY

During cardiac surgery the cardioplegic maneuver associated to high potassium concentration and hypothermia are the techniques most utilized for myocardium protection during surgery. In this study we have attempted to demonstrate the protective effect of a cardioplegic solution with high potassium content associated to moderate hypothermia and high potassium content in addition to glutathione in the cardiac preservation, submitted to prolonged ischemia. We have used the isolated rabbit heart in a perfusion system initially described by Langendorff with a few modifications adapted for this study in our laboratory.

During the first experimental protocol we evaluated the cytoprotector effect of the hyperkalemia solution combined with hypothermia at 24°C at different ischemic intervals. The results obtained during the evaluation of muscle inotropic response demonstrated an important protective effect of this solution in the cardiac tissue. The second protocol was made with the objective to determine the role of glutathione in the protective effect of the perfusate in two concentrations during ischemia at 30°C, where the physiologic function were more decreased by using potassium cardioplegia previously. When the heart was submitted to ischemia with reperfusion without glutathione we observed a 70% reduction in the inotropic response after the second period when compared to the results observed during the beginning of the experiment in the same group.

These findings demonstrate that the increase in the temperature promoted important reduction of the protective effect induced by the cardioplegic solution in the ischemic heart confirming the hypothermic effect in maintenance of the cellular function in the ischemic heart. The addition of 0.1mM of glutathione to the perfusate reverted significantly these adverse effects as described in the previous group, suggesting this effect is at least in part a result of the production of free radicals. Besides this the increase in glutathione concentration to 0.3mM promoted a decrease in the contractile force when compared to 0.1mM, suggesting that

additional factors must be involved in the genesis of the ischemic injury. Glutathion consumption during reperfusion was also studied with the isolated hearts and in perfused with solutions containing 0.1mM and 0.3mM of the tripeptide after two periods of 60 minutes ischemic time. The results demonstrate that the increase in 200% glutathion concentration to the perfusate was unable to maintain similar increase in the consumption of the substrate by the cardiac cells after the ischemic period did not promote any substancial increase in the myocardial contraction.

The current data point out to new ways for the myocardial protection through the combination of cardioplegia, hypothermia and the addition of glutathion to the preservative solution.

I - INTRODUÇÃO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A grande maioria dos órgãos dos mamíferos é extremamente sensível à falta de oxigenação de seus tecidos, havendo morte celular num período de três a cinco minutos após o bloqueio da circulação (Armitage, 1981).

Nos últimos 150 anos, a necessidade de submeter órgãos a bloqueios, ao menos parciais, da circulação sangüínea, com conseqüente privação celular de oxigênio para, desta forma, facilitar a realização de procedimentos experimentais e cirúrgicos, tem alimentado esforço em desenvolver técnicas de preservação de órgãos (Armitage, 1981). A perfusão de órgãos isolados tem-se mostrado como uma maneira bastante eficaz para garantir a manutenção da viabilidade celular, seja em experimentos animais, seja em procedimentos clínicos. A este respeito, o coração requer atenção especial. Neste órgão, a elevada taxa metabólica, associada com a baixa reserva energética celular, são fatores predisponentes ao dano que, em geral, ocorre na ausência de ambiente adequado à sua preservação.

O conceito de perfusão artificial de órgãos foi originalmente idealizado por Legallois, (1812). Posteriormente, em 1866, Von Cyon (1899), com o auxílio do que teria sido o primeiro sistema de perfusão, conseguiu manter a função contrátil de um coração isolado de sapo por mais de 24 horas, através de sua perfusão com soro fresco de coelho. Ringer (1881) demonstrou, pela primeira vez, que na perfusão de coração isolado, a presença de sódio e potássio como constituintes da solução era fator importante. Desta forma, estava formulada a primeira solução artificial de perfusão.

Em continuidade a esses trabalhos, Langendorff (1895) descreveu o mais sofisticado sistema de perfusão de coração isolado de gatos e cães com sangue aerado e desfibrinado.

Dominando o período de transição entre estes experimentos históricos e as atuais investigações que envolvem preservação de órgãos, Alexis Carrel com o

auxílio do sistema desenvolvido por Lindbergh, conseguiu para o coração um tempo de sobrevivência de quatro dias (Carrel, 1935, 1938).

Outras soluções foram quase contemporaneamente desenvolvidas. Em 1932, Krebs e Henseleit desenvolveram solução para preservação de órgãos de composição semelhante ao plasma. Melrose e cols. (1955) lançaram as bases da cardioplegia com o desenvolvimento de uma técnica de parada cardíaca em diástole. Para isto, os autores utilizaram o sangue como veículo de citrato de potássio, inaugurando, assim, a era da preservação miocárdica com cardioplegia sangüínea. No entanto, por causa da alta concentração de citrato de potássio utilizada, o dano celular irreversível era achado freqüente.

O conceito de proteção miocárdica por cardioplegia somente foi reintroduzido vinte anos depois com os estudos experimentais de Gay e Ebert (1973). Nestes experimentos, uma solução com 25mEq/l de KCl foi utilizada com o objetivo de garantir a proteção do músculo cardíaco durante períodos até sessenta minutos em anóxia normotérmica.

2. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO MIOCÁRDIO

Os métodos de preservação do miocárdio foram primeiramente elaborados em meados do século XIX, quando Ringer (1881) desenvolveu a primeira solução com a utilização de íons, através da variação empírica das concentrações iônicas de sódio e potássio, mantendo o coração de rãs isolado com atividade contrátil em perfusão, por várias horas.

O dano miocárdico decorrente da isquemia é iniciado, em geral, por uma falha no suprimento adequado das necessidades metabólicas da célula cardíaca. Portanto, durante a preservação, para evitar a progressão da injúria irreversível, deve-se reduzir severamente a atividade metabólica celular ou aumentar a oferta de oxigênio e de nutrientes.

Além destes fatores, o tempo de duração da isquemia desempenha papel importante. Desta forma, para aumentar a eficiência do processo, sem dano celular

significativo, deve-se reduzir o tempo de isquemia e a atividade metabólica celular. O resfriamento controlado e o uso de inibidores metabólicos químicos são úteis apenas para diminuir a progressão da injúria isquêmica. Por outro lado, o congelamento (criopreservação) em temperaturas que suprimem toda a atividade metabólica celular forneceria, teoricamente, preservação do órgão por um período indefinido, havendo, entretanto, necessidade do controle de cristais de gelo, geralmente danosos aos tecidos (Armitage, 1981).

Substâncias crioprotetoras, como a albumina, são capazes de melhorar a viabilidade celular após o reaquecimento. Com exceção do glicerol, estas substâncias apresentam pouca eficácia crioprotetora, com ação em poucos tipos de células. Outros agentes, incluindo dextran, polivinil pirrolidone e sacarose, apresentam alto efeito crioprotetor em diversos sistemas celulares, pois promovem o abaixamento do ponto de congelação. Adiante estão descritas sumariamente as principais formas de preservação do músculo cardíaco de importância prática (Shlafer, 1981).

2.1. PROTEÇÃO CELULAR POR HIPOTERMIA

A hipotermia tem sido vista como recurso importante na preservação de vários órgãos, dentre eles o coração. Fuhrman e cols. (1950) demonstraram que a atividade metabólica de fatias isolados de coração de ratos foi reduzida em 90% com a diminuição da temperatura de 37°C para 10°C.

Greenberg e Edmunds (1961) observaram que o tempo médio de isquemia compatível com a recuperação normal da capacidade de trabalho ventricular aumentou de dez minutos a 37°C para sessenta minutos, quando a temperatura caiu para menos de 10°C.

Talvez, a evidência experimental mais significativa de que a hipotermia oferece proteção miocárdica satisfatória tenha sido demonstrada por Lower e cols. (1962). Nestes estudos, sob hipotemia profunda, foram demonstrados, com sucesso, transplantes ortotópicos de corações em cães após sete horas de isquemia total.

O metabolismo da célula miocárdica apresenta melhor desempenho a 36°C, com adequado funcionamento das mitocôndrias, bombas de sódio, potássio e cálcio, sistemas enzimáticos e tampões (Salerno, 1992). O frio diminui o consumo energético, mas, por outro lado, reduz a eficiência de produção de energia e interfere reduzindo o funcionamento normal da bomba de cálcio. Desse modo, alguns autores têm sugerido que a utilização de baixas temperaturas poderia levar a um aumento final no gasto energético na célula cardíaca (Buckberg, 1979). Não obstante, a hipotermia continua atualmente sendo ainda bastante utilizada como meio de proteção cardíaca, sobretudo em associação com outros métodos de preservação (Alamani e cols.. 1995, Taylor e cols.. 1995).

2.2. PROTEÇÃO MIOCÁRDICA POR MANIPULAÇÃO QUÍMICA

Embora a hipotermia ofereça proteção considerável contra a lesão anóxica, o uso complementar de agentes farmacológicos ou a manipulação da composição iônica das soluções de manutenção também parecem inibir ou reduzir o metabolismo celular.

A utilização de concentrações elevadas de potássio, nestas soluções, é a alteração mais comumente utilizada. Melrose e cols.. (1955) utilizaram citrato de potássio (240mmol/l) para induzir a parada cardíaca. No entanto, esta técnica permitiu a manutenção de apenas vinte minutos de isquemia quente em cães (Kolff e cols.. 1956) e parece não ter sido realmente eficaz. Na verdade, este método de parada cardíaca pode levar à necrose miocárdica e à dilatação do coração (Armitage, 1981). Apesar da elevada concentração de potássio, o uso do citrato pode ter efeito deletério por inibir a glicólise (Randle e cols.. 1968), responsável pela produção anaeróbica de ATP. O cloreto de potássio parece ser o sal fundamental para a cardioplegia. No entanto, para garantir a boa preservação miocárdica, a concentração utilizada não deve exceder 30 mEq/l. A utilização deste sal nesta concentração tem a finalidade de cessar a atividade eletromecânica do coração com segurança e efetividade (Braile e cols.. 1979).

Tyers e colaboradores (1975) observaram que a solução utilizada por Melrose lesava o coração não somente por causa da sua alta concentração de citrato de potássio, mas também em decorrência de sua hiperosmolaridade, superior a 400mOsm/l. Batty e colaboradores (1990) demonstraram que a melhor osmolaridade de uma solução cristalóide para nove horas de preservação fria de corações isolados de rato era de 290 mOsm.. Estudos mais recentes têm concordado que a osmolaridade das soluções cardioplégicas deve ficar entre 290 e 320 mOsm (McGary e cols. 1991, Stringham e cols. 1994).

Alguns autores também têm sugerido que agentes que protegem a integridade das membranas celulares podem retardar o dano isquêmico (Decker e Wildenthal, 1978). As alterações estruturais e citoquímicas em células miocárdicas de coelho após 45 minutos de isquemia severa são similares às aquelas encontradas em miocárdio de cão, sendo indicativas de lesão irreversível. No entanto, a administração de uma simples dose do esteróide metilprednisolona, antes da isquemia, retarda em quinze minutos o aparecimento de lesões morfológicas características da anóxia (Armitage, 1981).

Por outro lado, vários estudos apontam na direção de que o sódio nas soluções cardioplégicas deve ser utilizado em concentrações normais com o objetivo de reduzir a hiponatremia, que pode estimular a entrada de cálcio para dentro das células, o que provoca danos celulares importantes (Ko e cols. 1995).

A estimulação da atividade da bomba sódio-potássio através da cardioplegia com potássio parece resultar em efeito benéfico sobre a função miocárdica pós-isquêmica. Esse efeito é eliminado, quando se inibe a atividade da enzima com uma dose subtóxica de ouabaina (Ko e cols. 1995).

A ausência do cálcio na solução cardioplégica pode induzir ao fenômeno chamado "paradoxo do cálcio", contudo a concentração ideal desse íon permanece ainda controversa (Stringham e cols. 1994). Este fenômeno, que ocorre durante a reperfusão, consiste na entrada de grandes quantidades de cálcio para o interior das células, quando o sistema coronariano é totalmente lavado por soluções cardioplégicas que não contenham cálcio. As conseqüências da entrada de cálcio podem levar também a alterações importantes da própria membrana celular (Braille e

cols. 1979). Alguns estudos têm sugerido que somente concentrações micromolares de cálcio (50 a 100 $\mu\text{mol/l}$) são necessárias para prevenir o fenômeno e concentrações maiores poderiam aumentar o gasto energético e provocar o desenvolvimento de contratura do músculo cardíaco (Robinson e Harwood, 1991; Kinoshita e Tokunaga, 1991).

O uso de glicose nestas soluções tem sido bastante discutido. Até o momento, não existe consenso sobre a sua utilização. Enquanto vários trabalhos confirmam sua validade (Lazar e cols. 1995, Nilsson e cols. 1994), Hearse e colaboradores (1978) demonstraram efeito deletério da utilização de glicose sobre a capacidade protetora de uma solução perfusora por eles desenvolvida.

A importância da insulina nas soluções de preservação não está ainda completamente definida. A utilização desse hormônio em soluções com potássio e glicose tem demonstrado bons resultados (Lazar e cols., 1995; Nilsson e cols., 1994). Contudo alguns autores observaram que a insulina pode potencializar os efeitos deletérios da glicose durante a parada isquêmica (Hearse e cols., 1978). Soluções cardioplégicas clássicas com insulina na sua composição, como a solução usada por Lacs, já foram citadas (Braille e cols., 1979), embora seu efeito benéfico não seja efetivamente comprovado. A insulina parece exercer um amplo espectro de efeitos benéficos e prejudiciais, de modo que o saldo final dessas propriedades dependeria da natureza dos outros componentes da solução (Hearse e cols., 1978).

Achados recentes demonstram que o pH da solução cardioplégica deve ser alcalino, com a utilização de soluções tampões ou até mesmo álcalis, a fim de neutralizar os ácidos que continuam a ser formados durante o período de isquemia, mesmo com cardioplegia, embora numa proporção infinitamente menor que na parada anóxica normo ou hipotérmica (Tian e cols., 1991). A redução do pH intracelular durante a isquemia inibe as enzimas da via glicolítica anaeróbica, reduzindo a produção anaeróbica de ATP e, conseqüentemente, limitando a atividade das bombas sódio-potássio e cálcio dependentes de ATP (Tian e cols., 1991). A atenuação da acidose durante a isquemia parece ser um fator significativo no prolongamento do tempo de preservação e, desse modo, praticamente, todas as soluções cardioplégicas contêm uma substância tampão para manter o pH adequado

(Buckberg, 1987); bicarbonato, fosfato ou THAM (trihidroximetilaminometano) são as mais utilizadas, contudo o último parece ter ação inotrópica positiva indesejável na condição de cardioplegia. O uso de albumina não é aconselhável pelo risco de formação de precipitados na microcirculação (Braile e cols., 1979).

Das observações até então apresentadas pode-se depreender, portanto, que a utilização de solução cardioplégica adequada é fator decisivo para a preservação cardíaca. Todavia, atualmente muitas dúvidas ainda persistem, o que sugere que estudos adicionais precisam ser realizados.

2.3. PROTEÇÃO MIOCÁRDICA POR PERFUSÃO

A hipotermia e a inibição química permitem que o coração sobreviva por mais longo tempo utilizando suas próprias reservas, enquanto a perfusão, freqüentemente associada à supressão metabólica deveria, teoricamente, aumentar a duração da preservação conseguida com a supressão metabólica sozinha, já que o coração não possui grandes estoques de substratos energéticos (Armitage, 1981).

Conforme já referido, Carrel e Lindbergh estudaram a perfusão como um meio de preservação cardíaca. A partir de então, muitas soluções que contêm desde o sangue total a uma simples solução salina têm sido empregadas na perfusão de coração.

Entre as variáveis que interferem no êxito da perfusão, a duração do processo desempenha papel importante. Embora ainda não se tenha conhecimento sobre o tempo ideal, vários autores consideram que o tempo é a essência da preservação.

Os meios de perfusão devem conter os elementos básicos do sangue, tais como sódio, potássio, cálcio e bicarbonato em concentrações similares à dos fluidos do organismo. Elementos adicionais são acrescentados para prover o balanço eletrolítico, o ajuste de pH, a pressão oncótica, nutrição celular ou outro atributo especial. É sempre necessário adicionar oxigênio e, às vezes, gás carbônico, importante para o equilíbrio do tampão bicarbonato, através de sua reação com água estrutural com produção do ânion bicarbonato.

Por suas propriedades fisiológicas, obviamente o sangue autólogo ou heterólogo seria o perfusato ideal. O sangue total contém várias substâncias com caráter tampão e de boa capacidade de oxigenação celular. Por outro lado, as células vermelhas podem contribuir para melhor perfusão tecidual, desviando temporariamente o fluxo sangüíneo de um capilar para outro (Humphries Jr e Liu, 1974).

Apesar destes efeitos benéficos, o sangue contém quantidade variável de substâncias endógenas que podem influenciar a função cardíaca muitas das quais têm profundo efeito vascular. Além disto, sob hipotermia, as células vermelhas não são necessárias para o transporte de oxigênio, porque o oxigênio se torna mais solúvel, como também as demandas metabólicas diminuem (Humphries Jr e Liu, 1974). Nesta situação, apesar dos processos metabólicos estarem diminuídos, não se encontram de todo supressos. A vantagem de fornecer oxigênio para os processos aeróbicos durante a parada cardíaca com o objetivo de suprir as exigências metabólicas é frustrada pelo fato da dissociação oxi-hemoglobina deslocar-se para a esquerda em baixas temperaturas, resultando em diminuição na liberação de oxigênio para os tecidos (Rousou e cols., 1988).

As conseqüências adversas do uso do sangue total na perfusão levaram os pesquisadores a buscar alternativas. O uso de soluções salinas foi estabelecido a partir dos estudos de Rusch (1898). Este autor demonstrou que estas soluções poderiam ser utilizadas com sucesso, para a perfusão do coração isolado. Posteriormente, nos anos de 1932 e 1950, Krebs e Henseleit e Krebs, respectivamente, preconizaram as bases das soluções salinas perfusoras que, até hoje, são utilizadas, sendo reconhecidamente os trabalhos mais citados na literatura, conforme o Institute for Scientific Information.

Uma outra forma de preservação do coração inclui a utilização do perfusato na forma de plasma. Durante a hipotermia, como já referido, estado em que torna maior a solubilidade do oxigênio, o plasma carrega oxigênio dissolvido suficiente para prover os tecidos (Ledingham e cols., 1988), os quais, como demonstrado por Humphries, Jr. e Liu (1974), já se encontram com os níveis de consumo diminuídos. Esses dois autores também defenderam a utilização de perfusato composto de

plasma crioprecipitado que não conteria células, plaquetas lipoproteínas e um terço a menos de fibrinogênio. Segundo esses autores, a remoção de lipoproteínas de baixa densidade impediria a formação de agregados que obstruiriam os capilares em condições de hipotermia (10°C).

Johnson e cols. (1972) observaram que o plasma crioprecipitado apresentou algumas desvantagens entre as quais a de conter elevada concentração de gorduras instáveis que requerem filtração cuidadosa, altos títulos de aglutininas e maior risco de contaminação com o vírus da hepatite.

O perfusato, constituído de soro ou suas frações, é utilizado para evitar a formação de fibrina no plasma, pois o perfusato de baixa viscosidade apresenta melhores resultados na preservação (Humphries, Jr. e Liu, 1974).

Claes e cols. (1972, 1973) obtiveram bons resultados utilizando perfusato com albumina como único colóide, sendo ele de mais fácil preparação e mais fidedigno que o plasma. Não há risco de contaminação pelo vírus da hepatite e de anticorpos citotóxicos.

Bons resultados foram obtidos na perfusão de coração, utilizando perfusato sem colóide com a mesma constituição iônica do plasma. Copeland e cols. (1972) utilizaram a solução de Krebs modificada no circuito de perfusão para a preservação de coração de cães durante 24 horas, obtendo 100% de sobrevivência após a realização do transplante ortotópico.

A melhoria da preservação miocárdica através da solução cristalóide, sob hipotermia, baseia-se em duas importantes características: a primeira envolve a solubilidade do oxigênio em água que é dependente da temperatura, duplicando quando a temperatura cai de 37,5°C para 0°C. A segunda, e mais importante, é que todo o oxigênio carregado por uma solução cristalóide é prontamente liberado na presença de um gradiente de tensão de oxigênio. Esta propriedade pode ser vista através da curva linear de dissociação do oxigênio na solução cristalóide. Resultados experimentais obtidos com uma solução cristalóide oxigenada a 10°C demonstraram que o conteúdo de oxigênio ($4,03 \pm 0,07$ vol%) dessa solução é completamente liberado. Em contraste, na mesma temperatura, o sangue total arterial e uma solução cardioplégica sangüínea liberaram respectivamente $3,32 \pm 0,18$ vol% e $3,61 \pm 0,10$

vol% de oxigênio. Esses estudos sugerem que quanto maior a concentração de hemoglobina, maior é a competição pelo oxigênio dissolvido no plasma e menor a quantidade de oxigênio liberada (Bodenhamer e cols., 1983).

Collins e cols. (1969) desenvolveram uma solução com composição semelhante ao fluido intracelular. A concentração ideal de íons nestes perfusatos é ainda controversa, contudo parece inegável a sua utilização com diversas vantagens. Todavia, essa solução tem sido utilizada sobretudo em preservação renal.

A utilização da perfusão associada à hipotermia tem produzido resultados importantes. Malinin (1970) perfundiu coração de macaco utilizando o sistema de perfusão de Carrel-Lindbergh (1935,1938), e observou que os corações perfundidos entre 12 e 15° C sobreviviam por nove dias, enquanto perfusões sob maiores ou menores temperaturas demonstraram resultados menos expressivos, como a sobrevivência do órgão durante apenas 24 horas sob perfusão a 37°C.

Linask e cols. (1978) demonstraram que coração de rato sobrevive por seis a nove dias quando perfundido com uma combinação de eletrólitos, aminoácidos e vitaminas em um sistema simples mantido a 22°C.

3. METABOLISMO ENERGÉTICO DO MÚSCULO CARDÍACO

Em condições aeróbicas normais, 60 a 90% das necessidades energéticas do miocárdio são supridas através da oxidação de ácidos graxos (Grynberg e Demaison, 1996). Na célula cardíaca, estes substratos são esterificados em triglicerídeos e incorporados dentro dos grânulos lipídicos. A entrada dos ácidos graxos livres na célula miocárdica ocorre a partir da ação da lipase lipoprotéica presente no endotélio capilar e nos miócitos. A passagem através do sarcolema é determinada por gradientes de difusão e solubilidades diferentes. Neste sítio, os ácidos graxos são transportados pela mioglobina, permitindo a sua fixação no retículo sarcoplasmático e na membrana externa da mitocôndria, na qual são transformados em Acil-Coenzima-A (Acil-CoA). A membrana interna da mitocôndria é impermeável ao Acil-CoA. Desta forma, no espaço entre as duas membranas da mitocôndria, pela ação da carnitina

Acil-CoA transferase, ocorre a transformação do Acil-CoA em Acil-carnitina (transferase I). Na membrana interna da mitocôndria, a enzima transferase II é responsável pela ligação do grupamento Acil com a coenzima-A intramitocondrial (Grynberg e Demaison, 1996).

No interior da mitocôndria, os ácidos graxos são oxidados através da β -oxidação. As moléculas de ácidos graxos metabolizadas no interior da mitocôndria são degradadas em CO_2 e H_2O , fornecendo em média 130 moléculas de ATP por molécula de ácido graxo oxidado. Os principais ácidos graxos utilizados contêm dezesseis a dezoito carbonos, fornecendo em torno de 44 moléculas de ATP para cada seis átomos de carbono. O ácido palmítico fornece aproximadamente 3,7 moléculas de ATP por mol de O_2 consumido (Siess, 1980).

Embora representando menos de 10% da energia total consumida pela célula cardíaca, o lactato é considerado um substrato energético importante para o coração. Sua utilização ocorre através de sua entrada no ciclo do ácido cítrico (aerobiose), pela sua conversão a piruvato, sendo preferível quando sua concentração arterial está elevada. O coração é bioquimicamente adaptado para a oxidação de lactato, porque a isoenzima da lactato-desidrogenase presente no miocárdio favorece o sentido da reação no sentido da conversão de lactato em piruvato, por isso o lactato é oxidado pelo coração mesmo na presença de altos níveis de glicose e ácidos graxos livres (Teoh e cols., 1988). A presença do piruvato ativa diretamente a piruvato-desidrogenase, aumentando a produção do acetil-CoA e conseqüentemente a geração de ATP. Sua incorporação no ciclo do ácido cítrico fornece dezoito moléculas de ATP por molécula de lactato (Teoh e cols., 1988).

Trabalhos recentes demonstram que cerca de 90% do gasto energético da célula cardíaca se destina à execução do trabalho eletro-mecânico e apenas 10% é utilizado para manter a homeostasia e a viabilidade celular (Braille e cols., 1989).

A redução da necessidade energética do miocárdio durante a parada isquêmica eletiva é reconhecida como fundamental para a melhor preservação da função cardíaca (Bodenhamer e cols. 1983).

Na ausência de oxigênio, que ocorre durante a isquemia, a glicólise anaeróbica torna-se a principal fonte energética, produzindo 80 a 90% do fosfato de alta energia

utilizada pelo coração. A glicólise representa a quebra da glicose em dois moles de lactato, com a produção concomitante de dois moles de ATP em condições de ausência de oxigênio (Das e Maulik, 1996).

O ATP é a forma de energia essencial para a sobrevivência celular, e a concentração e a velocidade de deterioração dos fosfatos de alta energia determinam o tempo entre o início da isquemia e o começo da lesão irreversível. Com a parada cardíaca anóxica, os estoques de fosfato de alta energia e fosfato de creatinina são gradualmente depletados (Bodenhamer e cols. 1983). Após seis a sete minutos de isquemia, o fosfato de creatinina praticamente desaparece do tecido miocárdico e, após quinze minutos, a concentração de ATP atinge 60% do valor pré-isquêmico (Levitzky e cols., 1977). A perda de nucleotídeos de adenina decorre da desfosforilação do AMP em adenosina ou de sua deaminação para formar IMP (monofosfato de inosina). A restauração dos nucleotídeos de adenina ocorre por três mecanismos: o primeiro é a síntese de novos resíduos de aminoácidos; o segundo, a condensação de uma base purina (adenina ou hipoxantina) com fosforibosil-fosfato e o terceiro envolve a reação da adenosina com o ATP para formar ADP e AMP, mediada por adenosina-quinase (Levitzky e cols. 1977).

Durante a parada, o metabolismo cardíaco é significativamente mais baixo que com o coração batendo em normotermia (1,1-2,0 x 3,4-8,0 ml de O₂/ 100 mg de ventrículo esquerdo/ min.) (Tabayashi e cols., 1988), sendo ainda mais reduzido com o resfriamento. A demanda metabólica do coração é de 0,31 ml de O₂/100 mg de VE/min. a 22°C, 0,27 a 15°C e 0,13 a 5°C (Tabayashi e cols. 1988). Contudo, alguma demanda energética permanece presente durante a isquemia, como é evidenciado pela depleção dos níveis de fosfato de alta energia, mesmo quando feita com hipotermia muito baixa (Tabayashi e cols., 1988).

4. GLUTATION

4.1. IMPORTÂNCIA DO GLUTATION NO METABOLISMO DA CÉLULA CARDÍACA

Durante a isquemia, muitas alterações bioquímicas ocorrem. Inicialmente elas representam um mecanismo de defesa e proteção contra a injúria isquêmica, como o

aumento do fosfato inorgânico celular que rapidamente inibe a atividade contrátil do músculo cardíaco. Com o prolongamento da isquemia, começam a ocorrer alterações iônicas em associação ao desenvolvimento do estresse oxidativo mediado por radicais livres derivados do oxigênio, os quais, sendo inadequadamente eliminados pelos sistemas celulares antioxidantes, passam a desempenhar papel fundamental no desenvolvimento da injúria durante a isquemia e após reiniciada a perfusão (Ferrari 1995; Pucheu e cols., 1995).

Tem sido mostrado que o sistema enzimático hipoxantina-xantina oxidase é responsável pela produção de grande parte dos radicais livres de oxigênio, sobretudo durante a reperfusão. Esses radicais, quando não eliminados adequadamente pelos sistemas celulares antioxidantes, não apenas lesam diretamente a célula cardíaca, mas sua presença também induz a migração de leucócitos polimorfonucleados para o tecido (Schoenberg e Beger, 1995).

Para combater este efeito, várias intervenções são atualmente realizadas durante a parada isquêmica, visando atingir um ou mais dos seguintes objetivos: a) prevenir a formação desses radicais através da utilização de drogas, como o alopurinol, um inibidor da xantina-oxidase (Menasché e cols., 1992) ou deferoxamina, um inibidor da produção do radical hidroxila catalisado pelo ferro (Menasché e cols. 1988); b) inativar os radicais livres previamente formados através das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) ou glutathion peroxidase (GPx) (Knight e cols. 1991, Beard e cols. 1994), e antioxidantes com baixo peso molecular, dentre eles o glutathion reduzida (GSH) (Meister, 1981).

O glutathion (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) foi primeiramente detectado em meados de 1888 e sua estrutura só foi comprovada por síntese em 1935 (Meister, 1981). É o tiol celular endógeno de baixo peso molecular mais predominante nos tecidos (Yang e cols. 1989).

A síntese do glutathion (GSH) ocorre em duas etapas sucessivas que requerem ATP. Inicialmente, a γ -glutamil-cisteína sintetase catalisa a formação de um grupo amida entre a cisteína e a γ -carboxila do glutamato. Posteriormente, a glutathion sintetase promove a reação da glicina com a carboxila da γ -glutamil-cisteína para formar o tripeptídeo γ -glutamil-cisteinil-glicina (glutathion). Nas células de mamíferos, o

GSH existe na forma de três, ou possivelmente quatro, metabólitos interconversíveis. Em condições normais, a maioria do GSH existe na forma reduzida (GSH). A oxidação do GSH por mecanismos não enzimáticos ou através da ação do glutathione peroxidase leva à formação de GSSG (forma oxidada do glutathione). A redução de GSSG, que é dependente de NADPH pelo glutathione reductase, mantém efetivamente a concentração intracelular de GSSG em níveis muito baixos (5-50 mcg). A quantidade de glutathione que entra no ciclo de óxido-redução, na ausência de estresse oxidativo, ainda não foi determinada *in vitro* ou *in vivo* (Meister, 1981).

Em uma terceira forma, o glutathione celular liga-se a grupamentos sulfidrilas de compostos protéicos ou não, formando dissulfidos mistos. Ésteres de tiol constituem outra forma potencialmente significativa do glutathione celular (Meister, 1981).

Podem-se distinguir perdas reversíveis e irreversíveis de GSH. As reações envolvendo a formação de GSSG, dissulfidos mistos ou ésteres de tiol resultam em perda reversível, já que não é necessária a ressíntese de aminoácidos constituintes do glutathione para manter o conteúdo celular de GSH. Em contraste, as perdas irreversíveis de glutathione são conseqüentes às reações de formação de tiol conjugada (como a reação do glutathione com o ácido mercaptúrico) ou decorrem do efluxo de glutathione nas células com degradação pela γ -glutamyl-transpeptidase. Nas perdas irreversíveis, a síntese de aminoácido é necessária para a restauração dos níveis celulares de glutathione (Tate e Meister, 1981).

4.2. FUNÇÕES BÁSICAS DO GLUTATHIONE

4.2.1. GLUTATHIONE COMO REDUTOR INTRACELULAR

Uma das funções do glutathione é a de formar e manter grupamentos tiol-protéicos necessários para a catálise e envolvidos na síntese e degradação protéicas (Meister, 1981).

O glutathione exerce efeito de proteção de proteínas e membranas celulares contra os ataques dos radicais livres de oxigênio e os peróxidos de hidrogênio, sendo

o principal mecanismo de defesa dos tecidos , inclusive da célula miocárdica, contra esses radicais (Tao e cols. 1995).

O glutathione peroxidase catalisa a reação do GSH com o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para gerar a forma dissulfídica do glutathione (GSSG). A redução do GSSG para o GSH é catalisada pela GSH-redutase com a utilização de NADPH. A estimativa da forma oxidada do glutathione (GSSG) é freqüentemente utilizada como indicador do estresse oxidativo secundário à produção de radicais livres durante o período de reperfusão do órgão (Hirigoyen e cols. 1995).

4.2.2. FORMAÇÃO DE DERIVADOS DE GLUTATHIONE COM SUBSTITUIÇÃO DO ENXOFRE

Em 1879, demonstrou-se que a administração de bromobenzeno ou clorobenzeno em cães levava à excreção urinária de ácidos mercaptúricos (derivados da cisteína com enxofre substituído (Meister, 1981). A descoberta deste efeito proporcionou o desenvolvimento de várias investigações nas quais ultimamente se mostrou que muitos compostos diferentes podem reagir com o glutathione. Este processo, geralmente mediado por enzimas (glutathione S-transferase), leva à formação de derivados do glutathione com o enxofre substituído (Tao e cols. 1995). As partes γ -glutamil e glicina destes derivados são removidos e a parte cisteína resultante é acetilada para formar ácido mercaptúrico. A remoção da porção γ -glutamil é facilitada pela formação de aminoácidos γ -glutamil (Meister, 1975).

Derivados do glutathione também são formados no metabolismo endógeno, envolvendo leucotrienos, esteróides e prostaglandinas (Rossi e Santoro, 1995). Estudos recentes com mioblastos sugerem a participação de prostaglandinas, especialmente do tipo A, na transcrição de uma proteína de baixo peso molecular (p32) que faria parte de um sistema endógeno antioxidante e o sinal para PGA induzir a síntese de RNAm para essa proteína seria a diminuição do nível de GSH intracelular (Rossi e Santoro, 1995).

4.2.3. FUNÇÃO DE COENZIMA

O glutathion atua como coenzima para várias enzimas incluindo a glioxilase, maleil-acetato isomerase, formaldeído desidrogenase e DDT desidroclorinase (Meister, 1981).

4.2.4. PARTICIPAÇÃO NO CICLO DO γ -GLUTAMIL (TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS)

A síntese e degradação de glutathion ocorre por reações do ciclo γ -glutamil. O glutathion é sintetizado por ações seqüenciadas da γ -glutamil-cisteína e glutathion sintetases (Linder, 1991).

A utilização do glutathion é iniciada pela γ -glutamil transpeptidase, uma enzima ligada à membrana que catalisa a transferência da parte γ -glutamil para aceptores de aminoácidos, formando aminoácidos γ -glutamil, que são colocados para o interior da célula. Portanto, a porção γ -glutamil funciona como carreador para o transporte de aminoácidos, de uma maneira semelhante ao transporte de outros dipeptídeos pelas membranas celulares (Carrel e Lindbergh, 1938). A enzima intracelular γ -glutamil ciclotransferase catalisa a conversão de aminoácidos γ -glutamil a 5-oxoprolina (piroglutamato) e aminoácidos. A 5-oxoprolina é convertida pela 5-oxoprolinase a glutamato em uma reação de clivagem de ATP. Gera-se, portanto, a cisteinil-glicina, formada na reação de transpeptidação que é clivada por uma dipeptidase em cisteína e glicina (Goldberg, 1980).

4.3. GLUTATHION E A INJÚRIA ISQUÊMICA

Certamente, a colaboração mais importante do glutathion no metabolismo cardíaco inclui o seu envolvimento nas reações celulares de oxidação. Em condições normais, a célula cardíaca possui intensa atividade respiratória. O desequilíbrio

molecular entre a capacidade da célula em gerar e remover as espécies não pareadas de oxigênio proporciona o aparecimento do estresse oxidativo.

Recentemente, tem sido demonstrado que o glutathione desempenha papel fundamental na proteção celular aos inúmeros agentes oxidativos de injúria celular, sendo de grande importância para este efeito o seu grupo sulfidril. Em várias linhagens celulares, o ciclo de óxido-redução do glutathione ajuda a manter a viabilidade estrutural e funcional das células, a despeito da produção endógena de intermediários reativos de oxigênio, uma inevitável consequência do metabolismo aeróbico, ou durante estados de injúria oxidativa (Tao e cols. 1995).

Espécies reativas de oxigênio como o ânion-óxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) podem ser gerados em várias reações celulares (Burton e cols. 1984). Embora a citocromo oxidase tenha o potencial de catalisar a redução tetravalente da molécula de oxigênio sem produzir radicais livres, a mitocôndria pode produzir o ânion-óxido. A auto-oxidação de substâncias como as catecolaminas podem também produzi-lo (Seeling, 1994). O radical hidroxila é certamente o mais tóxico dos radicais livres de oxigênio (Del Maestro 1980, Guarnieri 1978). Embora esse radical possa ser produzida pela reação de Haber-Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^\cdot + OH^\cdot$) a partir de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, essa reação ocorre muito lentamente (Coudray e cols., 1994). A adição de um metal de transição como o ferro catalisa a reação, aumentando, assim, a produção do radical hidroxila; desse modo o ferro parece exercer um importante papel nas alterações decorrentes da injúria durante a reperfusão (Coudray e cols., 1994).

O principal efeito citotóxico desencadeado pelos radicais livres de oxigênio no coração parece ser a peroxidação de componentes lipídicos das membranas celulares e mitocondriais, resultando na perda da integridade celular e conseqüentemente na injúria irreversível. O radical hidroxila reage com ácidos graxos poliinsaturados, formando peróxidos e hidroperóxidos lipídicos, que podem desencadear um grupo de reações em cadeia, levando a lesão da membrana e à perda da integridade celular (Burton e cols., 1984). A maior fonte de produção de radicais livres durante a isquemia parece ser a reperfusão ou a reoxigenação (Parks e cols. 1982). Uma grande produção de ânion óxido está associado à conversão de

hipoxantina em xantina pela xantina-oxidase, durante a reintrodução de oxigênio (Xia e Zweier, 1995). As enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase normalmente protegem a célula contra o acúmulo de ânion óxido e peróxido de hidrogênio, entretanto em estados patológicos tais enzimas podem ser alteradas ou inibidas (Burton e cols., 1984).

O papel do sistema redutor de glutathion na injúria miocárdica tem sido estudado no modelo de infarto isquemia-reperfusão (Fariss, 1990). Entretanto, a injúria miocárdica por radicais livres não foi observada apenas nos modelos de perfusão e a oclusão coronariana permanente. Também está associada a desenvolvimento de injúria isquêmica, e o infarto resultante é tão suscetível à intervenção farmacológica quanto o observado no modelo de isquemia e perfusão (Fariss, 1990).

Durante a perfusão renal com solução rica em potássio e magnésio, Leibach e cols. (1974) demonstraram depleção de glutathion durante a perfusão do rim isolado do coelho. Em 1976, Fonteles e cols. demonstraram que este peptídeo é captado com grande eficiência pelo rim perfundido e que a adição do peptídeo bloqueava a depleção.

5. SISTEMA DE PERFUSÃO DE LANGENDORFF

Oscar Langendorff merece o crédito de ser o primeiro a desenvolver um método inovador de perfusão coronariana para permitir o estudo da atividade mecânica do coração de mamífero completamente isolado (Langendorff, 1895). Na virada do século, o método de Langendorff foi largamente aceito por fisiologistas e farmacologistas para o estudo de mecanismos, fluxo coronariano e metabolismo do coração de mamífero (Döring, 1990).

O método foi modificado e melhorado durante as décadas seguintes por vários autores (Hedbom 1898, Porter 1898, Müller 1910, Heubner e Mancke, 1928).

Muitos anos mais tarde, Boom e cols. (1973) melhoraram e modernizaram o método. Problemas decorrentes de vazamento da parede ventricular, por causa das

veias tebesianas, levaram Gottlieb e Magnus (1904) a inserirem um cateter balão dentro do ventrículo esquerdo. Com outra modificação, o perfusato é dirigido para o ventrículo esquerdo via o átrio esquerdo e subseqüentemente é ejetado pela aorta (Neely e cols. 1967). Em decorrência do vazamento da valva aórtica especialmente a altas pressões de perfusão (Curtis e cols. 1986) e por causa da drenagem da veia Tebesiana, um menor volume de perfusato pode acumular-se no ventrículo esquerdo (Schewer e Stezoski, 1968), mas normalmente isso só ocorre quando o balão é fixado por uma sutura na base do coração. Para evitar que esse perfusato preencha e dilate o ventrículo, alguns autores realizaram a drenagem do ventrículo esquerdo (Coulson e Rusy, 1973).

A montagem de um sistema de perfusão geralmente requer algumas considerações sobre seu funcionamento, a saber: 1. Utilização ou não de recirculação do perfusato; 2. Pressão constante de perfusão ou fluxo constante de perfusão; 3. Circuito aberto ou fechado; 4. Utilização de câmara única com temperatura controlada ou submersão do órgão no perfusato; 5. Oxigenação aberta ou fechada (Döring, 1990).

No procedimento cirúrgico, a realização de anestesia e ventilação artificial são controversos. Freqüentemente o animal é sacrificado por um golpe no pescoço. Contudo, enquanto a excisão do coração, e subseqüente canulação da aorta é realizada, o ATP é degradado. Em decorrência da falta de precursores, o ATP não pode ser resintetizado durante a circulação extracorpórea subseqüente. Portanto, a cirurgia deve ser realizada com ventilação artificial e sobre anestesia geral (Segel e Rendig, 1986).

No sistema Langendorff, parâmetros mecânicos, bioelétricos e bioquímicos podem ser registrados, bem como análises morfológicas. Dentre os parâmetros mecânicos estão: força contrátil do ventrículo esquerdo, fornecida pela medida da contração isotônica do órgão, ou através do método do balão, pela mensuração da pressão isovolumétrica intraventricular; freqüência cardíaca; fluxo coronariano e pressão de perfusão. Dentre os parâmetros bioelétricos, citam-se: registro de potenciais de ação intra e extracelulares. Pode-se proceder à análise bioquímica de

constituintes estruturais e de metabólitos no tecido miocárdico ou de substratos, oxigênio, íons, e enzimas no perfusato (Döring, 1990).

A função contrátil do miocárdio e os vasos coronarianos podem ser examinados por vários testes com o envolvimento do miocárdio, a musculatura lisa e o endotélio dos vasos coronarianos (Döring, 1990).

A perfusão de coração isolado é largamente utilizada para investigar uma grande variedade de questões em relação a aspectos fisiológicos e farmacológicos. Embora esse modelo seja primariamente utilizado para investigar o efeito agudo de drogas, pode também ser usado para testar a ação de substâncias em animais pré-tratados. Pode-se avaliar, portanto, o efeito de substâncias inotrópicas, relaxantes e constritores da musculatura lisa coronariana, antiarrítmicos e também realizar estudos bioquímicos sobre o metabolismo miocárdico (injúria de reperfusão ou efeitos de removedores de radicais (Edlund e Wennmalm, 1981).

Em virtude da facilidade técnica e de uma grande variedade de parâmetros que podem ser aferidos, um único coração pode fornecer um máximo de informações sobre as condições do miocárdio e dos vasos coronarianos. Portanto, não deve surpreender o fato de que cem anos após sua primeira descrição, o coração isolado de mamífero perfundido, segundo Langendorff, continue a ser um dos métodos mais utilizados em estudos experimentais metabólicos e fisiológicos (Döring, 1990)

II - OBJETIVOS

Foram objetivos do presente trabalho:

1. Estudar os efeitos de uma solução cardioplégica na preservação de corações de coelho perfundidos, segundo o método de Langendorff;
2. Avaliar os efeitos da isquemia e da reperfusão, sob condições de hipotermia e normotermia em parâmetros definidos fisiologicamente.
3. Avaliar ações cardioprotetoras do Glutation usado como removedor de radicais livres, e como agente metabolicamente ativo.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

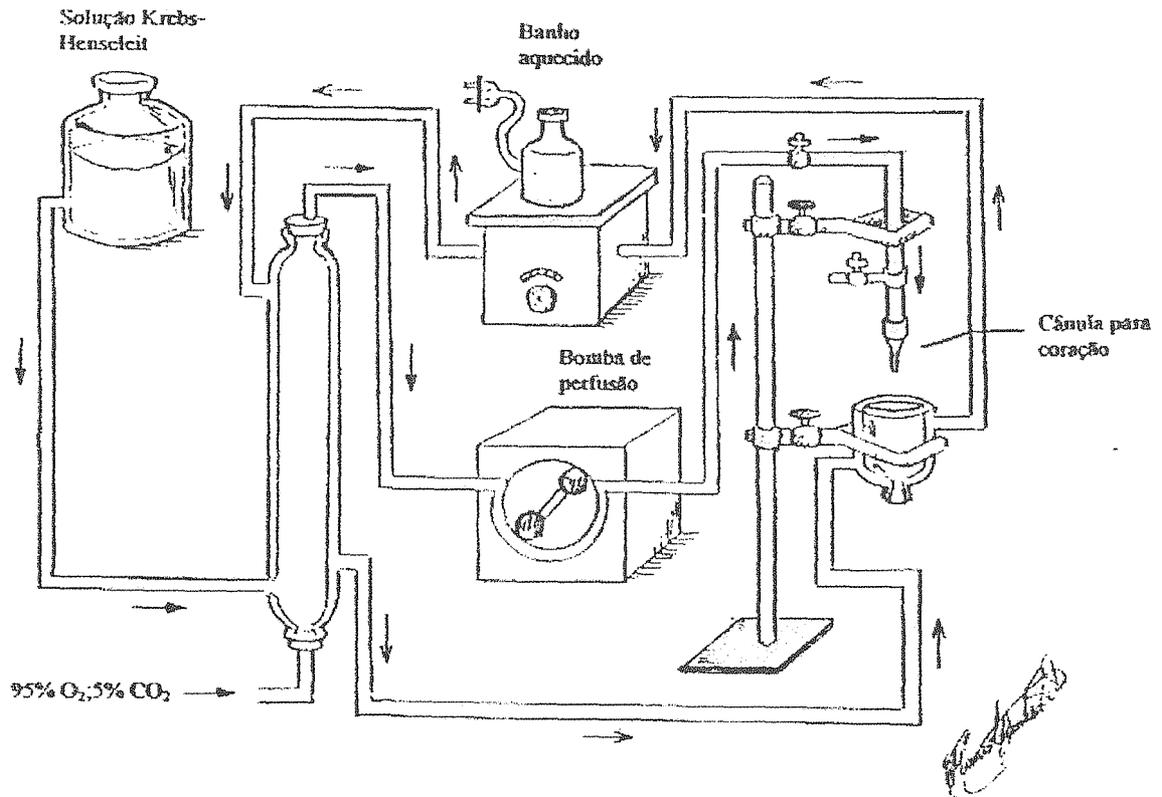
Coelhos Califórnia, com peso médio entre 1,5 e 2,5 Kg, de ambos os sexos, foram submetidos à anestesia com injeção intraperitoneal de uretano na dose de 1,5 g/Kg e com injeção intramuscular de pentobarbital na dose de 40 mg/Kg e em seguida foram traqueostomizados. A ventilação foi mantida por meio de uma bomba Palmer de ventilação artificial.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após tricotomia do tórax, realizou-se esternotomia, seguida de timectomia, pericardiectomia, dissecação dos vasos da base e ligadura do tronco braquiocefálico e da carótida esquerda. A artéria subclávia esquerda não foi ligada. A anticoagulação foi conseguida por meio de injeção de heparina sódica (5mg/Kg) no átrio direito. O coração foi retirado e a aorta canulada, sendo imediatamente instalado em um sistema de perfusão do tipo Langendorff modificado (Edlund e Wennmalm, 1981), através da associação com um pulmão artificial.

Com o auxílio da bomba de Watson-Marlow, de fluxo contínuo, previamente calibrada, perfundi-se o órgão a uma velocidade de 8 ml/Kg/min., de forma anterograda, sem recirculação. O fluxo foi determinado considerando-se 10% do débito cardíaco normal que é de aproximadamente 80 ml/Kg

Figura 1. - Sistema de perfusão Langendorff modificado, utilizando-se uma coluna de perfusão que funciona como oxigenador de bolha.



A perfusão foi realizada com solução de Krebs-Henseleit modificada, pH entre 7,2 e 7,3 com oxigenação contínua a 95% de O₂: 5% de CO₂ de tensão (Edlund e Wennmalm, 1981). Todo o sistema foi mantido a 24°C, nos grupos de experimentos do Protocolo I e, a 30°C, nos grupos de experimentos do Protocolo II. Com o objetivo de promover a retirada de ar do interior das câmaras cardíacas, a ligadura da artéria subclávia esquerda só foi realizada após os primeiros cinco minutos de perfusão (G. Lobo, observação pessoal).

O coração foi mantido em perfusão inicial por vinte minutos para estabilização (controle), seguindo-se a primeira injeção de solução cardioplégica com potássio (24°C) e desligada a bomba de perfusão. O tempo de duração da isquemia foi variável para cada grupo experimental. Após a primeira isquemia, o coração foi submetido a um período de reperfusão de dez minutos (reinício - reperfusão I), seguindo-se a segunda injeção de solução cardioplégica nas mesmas condições da primeira, com mais dez minutos de reperfusão posterior à parada (reinício - reperfusão II). Durante o período em que o coração esteve sob perfusão, os seguintes parâmetros de avaliação da função cardíaca foram monitorizados: 1) A cada cinco minutos, determinou-se a pressão de perfusão (mmHg) em que o coração, em atividade, exercia sobre uma coluna de mercúrio; 2) A amplitude do Inotropismo (g) avaliou-se por meio de um transdutor Statham que conectava o ápice do ventrículo esquerdo a um fisiógrafo Narco-Biosystems, previamente calibrado; 3) O volume (ml de solução perfusora) ejetado pelo coração em cada minuto de perfusão (fluxo cardíaco); 4) Observou-se a resistência fornecida pela relação entre os valores médios da pressão de perfusão e do fluxo em cada período de perfusão (Controle, Reinício I e Reinício II).

De acordo com o protocolo experimental, a cardioplegia foi realizada com uma solução de KCl a 10% diluída em Krebs-Henseleit modificada e oxigenada (95% de O₂: 5% de CO₂), aquecida em banho-maria a 24°C ou 30°C. A concentração de KCl foi de 27,2 mEq.

Tabela 1. Composição em mM da solução de Krebs-Henseleit modificada (Fonteles e col. 1983), utilizada na preparação da solução cardioplégica de potássio.

Na ⁺	143,0
K ⁺	5,8
Ca ⁺⁺	2,5
Mg ⁺⁺	1,2
Cl ⁻	127,7
HCO ₃ ⁻	25,0
SO ₄ ⁻²	1,2
PO ₄ ⁻³	1,2
Glicose	8,3

Desenvolveram-se protocolos independentes para cada um dos objetivos:

Protocolo I : Com esse protocolo, pretendíamos avaliar o efeito protetor da solução cardioplégica de potássio associada à hipotermia de 24°C. Para isso, foram realizados cinco grupos de experimentos com seis animais para cada grupo (G). O procedimento experimental descrito anteriormente (item 2) foi utilizado indistintamente em todos os grupos, alterando-se apenas a duração de cada período isquêmico, que foi de 30, 45, 60, 90 e 120 minutos nos grupos GI, GII, GIII, GIV e GV, respectivamente. Realizaram-se três grupos controles (C), utilizando o mesmo procedimento experimental e submetendo-os a dois períodos de isquemia de sessenta minutos (C60), noventa minutos (C90) e 120 minutos (C120), sob temperatura de 24°C, sem utilizar solução cardioplégica. Nesses grupos, a perfusão era interrompida e os corações continuavam a bater sem perfusão, parando espontaneamente.

Protocolo II - Esta parte do estudo foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito protetor da solução com a adição de glutathione, sob condições de normotermia (30°C). Para isso realizaram-se três séries (S) de seis experimentos em cada série. O mesmo procedimento experimental descrito anteriormente foi utilizado, mantendo-se a duração de cada período de isquemia em sessenta minutos para todas as séries. Na SI, perfundiam-se os corações sem glutathione na solução. Nas séries SII e SIII, adicionou-se 0,1 mM e 0,3mM de glutathione, respectivamente.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados encontrados para cada um dos três parâmetros estudados, de acordo com os intervalos de tempo em que foram mensurados, estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) no período controle (perfusão inicial) e nos dois períodos de reperfusão pós-isquêmica, em cada série. Para determinar a magnitude das diferenças entre os grupos, os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). O teste de Scheffé foi utilizado para identificar se as diferenças dos valores de cada parâmetro em cada grupo foram significantes. Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

IV- RESULTADOS

1. PROTOCOLO I

Avaliação do efeito citoprotetor da solução cardioplégica de potássio associada à hipotermia de 24°C em 5 grupos (n=6) em que foi alterado apenas o período de isquemia que foi de 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, correspondendo aos grupos I a V, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram importante efeito protetor da combinação da solução cardioplégica de potássio utilizada com um grau moderado de hipotermia (24°C), visto que, em todos os grupos realizados neste protocolo, se observou manutenção dos valores de amplitude do inotropismo e pressão de perfusão, sem diferenças estatisticamente significativas em relação aos valores controles (pré-isquemia).

1.1. INOTROPISMO

A avaliação destes dados no tocante à amplitude da força de contração está demonstrada na tabela 2. Pelos resultados obtidos, verifica-se inclusive certo aumento, embora não estatisticamente significativo. Os valores inotrópicos diferem apenas durante a reperfusão do segundo período isquêmico, quando comparado ao controle interno no grupo GII - período isquêmico de 45 minutos (Gráfico 1).

Os corações que foram submetidos a dois períodos isquêmicos de 30 (GI), 60 (GIII), 90 (GIV) e 120 (GV) minutos revelaram incremento final no Inotropismo de 12,8%, 14,9%, 19,7% e 3,2%, respectivamente. No grupo GII, com 45 minutos em cada período de isquemia, ocorreu, como já mencionado, diminuição de 19,9% ($4,6g \pm 0,06$ para $3,7g \pm 0,28$) estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Todavia os controles deste subgrupo estavam sempre abaixo da média. A figura 2 demonstra um gráfico original da amplitude da força de contração em um experimento do grupo GV.

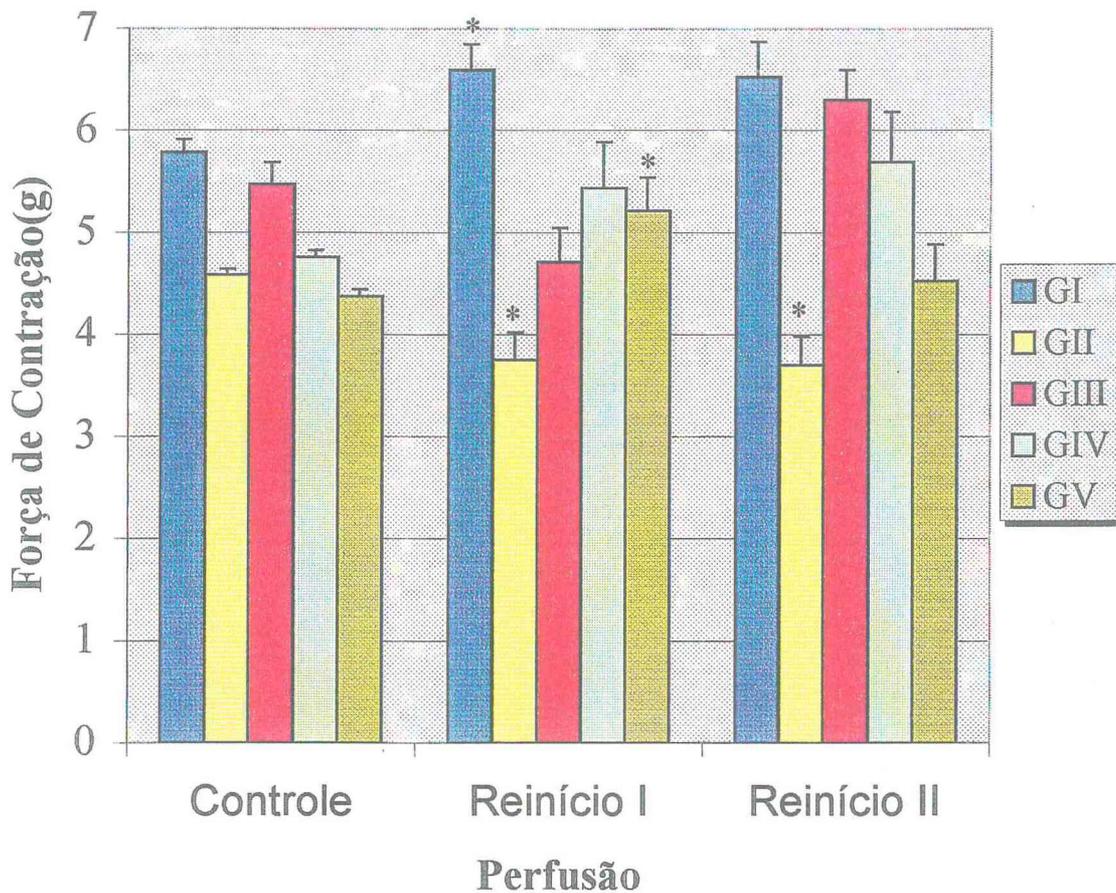
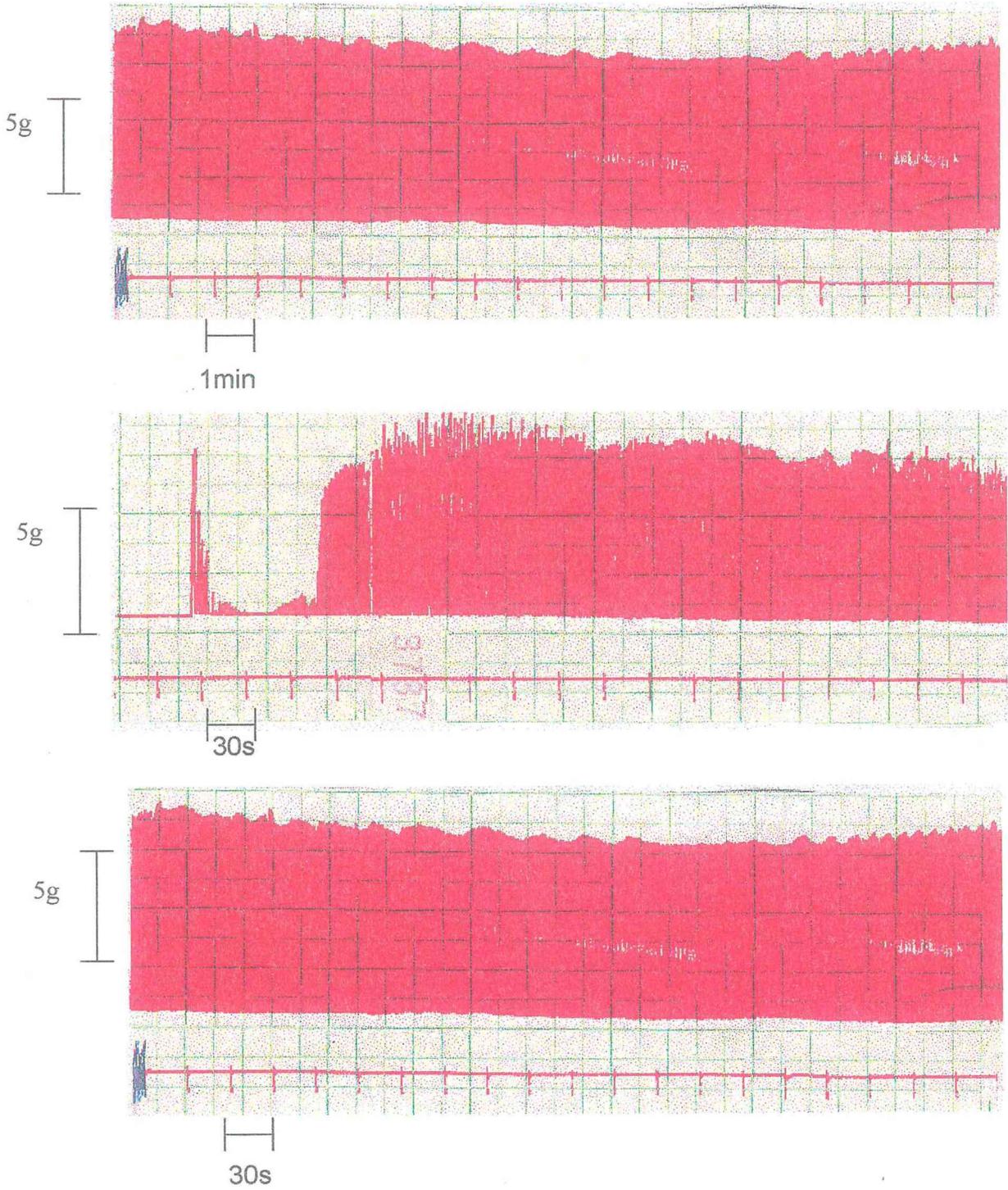


Gráfico 1. Comportamento da amplitude da Força de Contração medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30(GI), 45(GII), 60(GIII), 90(GIV) e 120(GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia(24°C). Cada barra corresponde à média dos valores mensurados a cada dois minutos nos períodos de perfusão indicados no eixo horizontal. (* $p < 0,05$ para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

FIGURA 2 - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento do grupo V do protocolo I (dois períodos de isquemia de 120 minutos a 24°C com solução cardioplégica)



Ao contrário, os resultados apresentados na tabela 3 demonstraram que os corações dos grupos controles submetidos à isquemia sem cardioplegia, apenas com hipotermia a 24°C, apresentaram redução considerável ($p < 0,05$) na amplitude do inotropismo após os dois períodos de isquemia (59,1% após dois períodos de 60 minutos, 84,5% após dois períodos de 90 minutos e 93,5% após 120 minutos de isquemia), quando comparado ao período de pré-isquemia. A figura 3 demonstra um gráfico original da amplitude da força de contração em um experimento do grupo controle C120.

1.2. PRESSÃO DE PERFUSÃO

Embora em todos os grupos estudados, tenha-se observado tendência de aumento na pressão de perfusão (mmHg) no reinício II, quando comparado com o período de pré-isquemia (controle interno), apenas nos grupos GI, GII e GIII ocorreu aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Em GI, após o segundo período de isquemia de trinta minutos, observou-se aumento de 42% ($29,3 \pm 0,9$ para $41,5 \pm 3,0$ nas pressões de perfusão inicial e final, respectivamente) em comparação ao período pré-isquemia. Da mesma forma, em GII o aumento encontrado após dois períodos de 45 minutos de isquemia na pressão de perfusão foi de 39% ($28,5 \pm 1,5$ para $39,5 \pm 2,9$). Por último, no período GIII o aumento observado foi de 13% ($34,6 \pm 0,5$ para $39,0 \pm 1,2$).

Os dados apresentados na tabela 3 referem-se aos experimentos realizados com os grupos controles utilizando hipotermia (24°C) sem cardioplegia submetidos a dois períodos de isquemia de 60, 90 e 120 minutos. Nos resultados de pressão de perfusão apresentados, verifica-se que apenas no grupo C60 ocorreu aumento significativo após os dois períodos de isquemia (14%).

Tabela 2. Efeitos fisiológicos dos corações isolados de coelho perfundidos com solução de Krebs-Henseleit a 24°C com parada cardioplégica.

GI	PP (mmHg)	F (ml/min.)	I (g)
Controle	29,33 ± 0,91	12,57 ± 0,50	5,78 ± 0,13
Reinício I	37,42 ± 3,92*	11,63 ± 0,79	6,59 ± 0,25*
Reinício II	41,50 ± 3,02*	10,68 ± 0,93	6,52 ± 0,35
GII			
Controle	28,46 ± 1,54	13,07 ± 0,75	4,58 ± 0,06
Reinício I	34,50 ± 1,97	12,95 ± 0,89	3,75 ± 0,27*
Reinício II	39,50 ± 2,93*	11,17 ± 1,16	3,70 ± 0,28*
GIII			
Controle	34,60 ± 0,51	14,30 ± 0,94	5,47 ± 0,2
Reinício I	39,67 ± 0,69*	12,90 ± 1,19	4,71 ± 0,3
Reinício II	39,08 ± 1,23*	11,88 ± 1,29	6,32 ± 0,2
GIV			
Controle	36,53 ± 1,90	11,28 ± 0,38	4,75 ± 0,07
Reinício I	40,67 ± 1,52	9,63 ± 0,32	5,43 ± 0,45
Reinício II	40,67 ± 1,69	7,77 ± 0,64*	5,68 ± 0,49
GV			
Controle	33,20 ± 1,70	12,76 ± 1,34	4,37 ± 0,07
Reinício I	35,50 ± 3,30	10,08 ± 1,59	5,21 ± 0,33*
Reinício II	40,33 ± 2,97	10,63 ± 1,53	4,52 ± 0,36

Obs.: Valores médios absolutos dos parâmetros de função cardíaca avaliados em cada grupo do protocolo I, expressos como a média ± E.P.M. para cada período de perfusão. GI = dois períodos de isquemia de 30 minutos, GII = dois períodos de isquemia de 45 minutos, GIII = dois períodos de isquemia de 60 minutos, GIV = dois períodos de isquemia de 90 minutos e GV = dois períodos de isquemia de 120 minutos. (* p < 0,05 para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

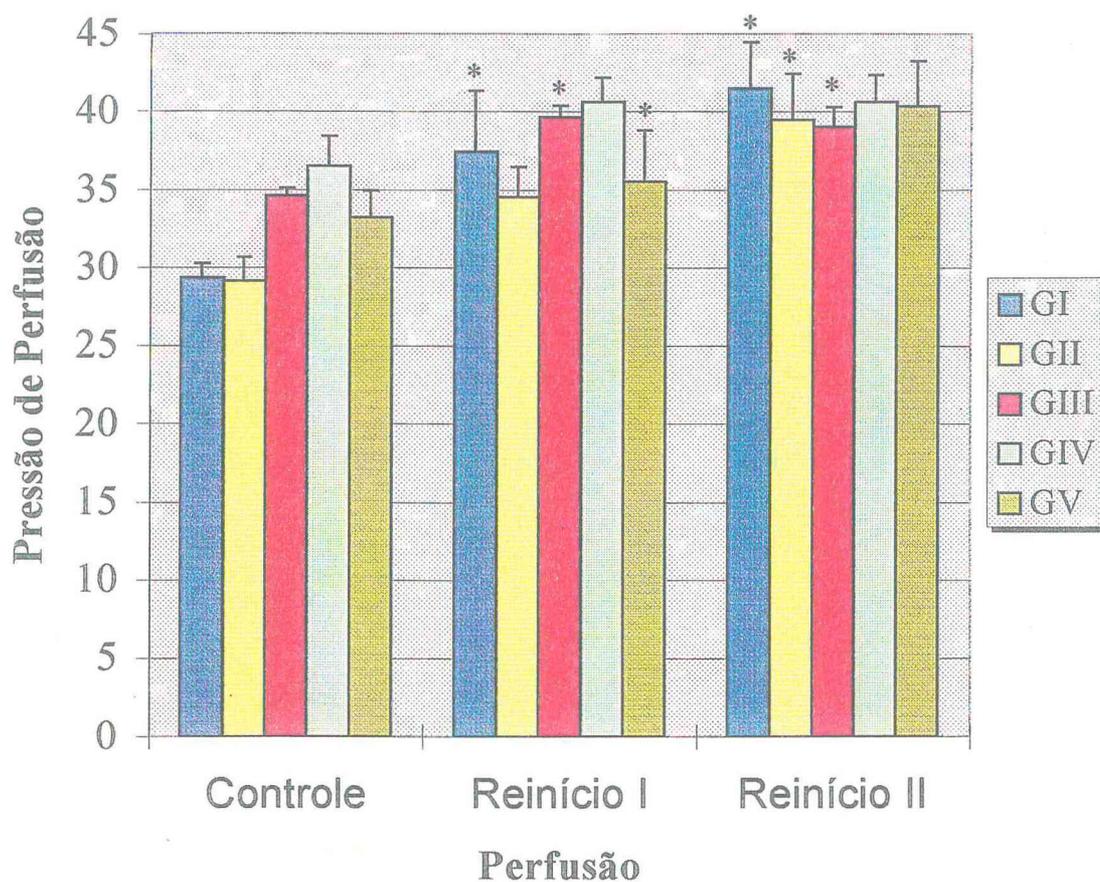


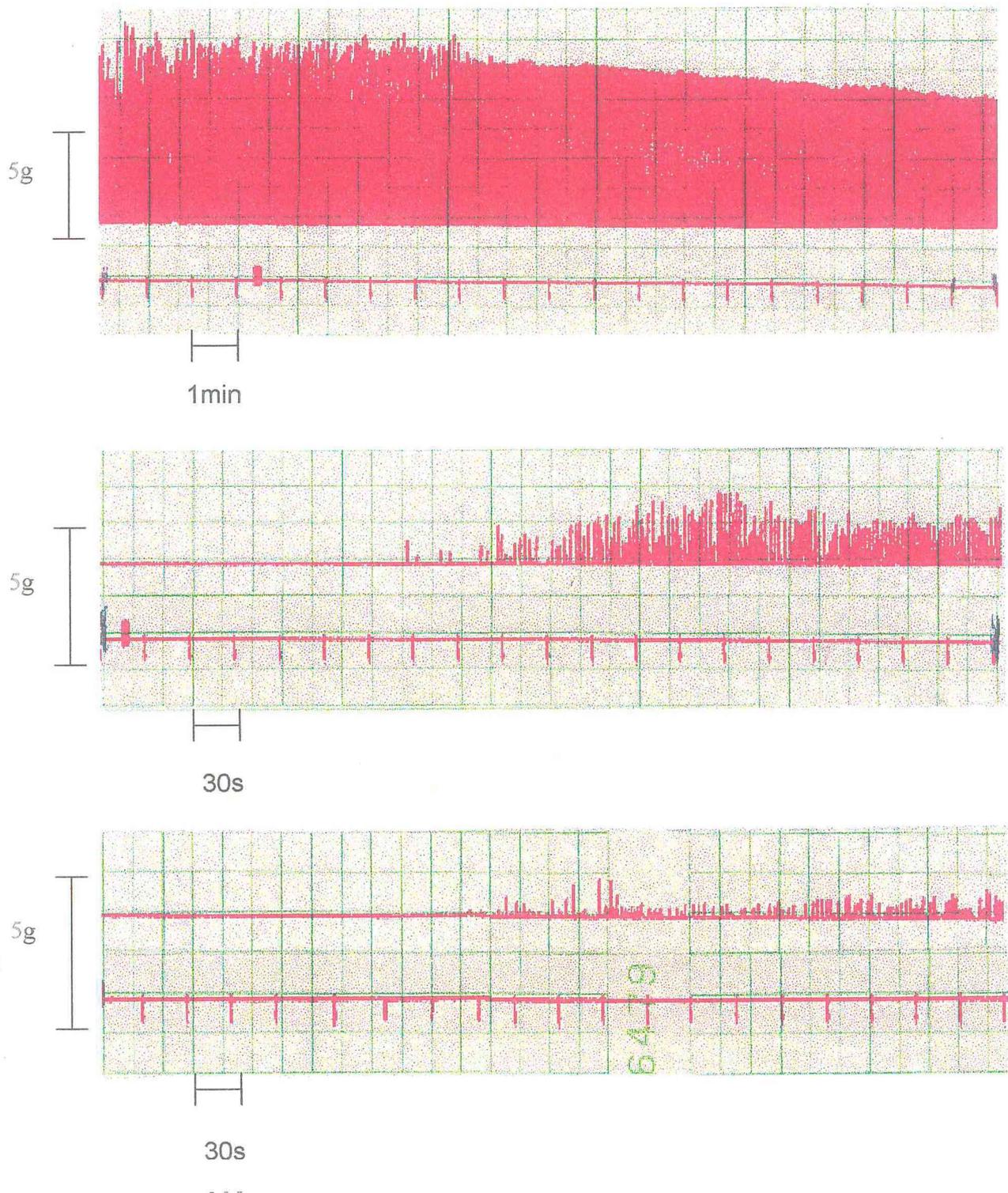
Gráfico 2. Comportamento da Pressão de Perfusão medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30 (GI), 45 (GII), 60 (GIII), 90 (GIV) e 120 (GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia (24°C). As barras correspondem à média dos valores mensurados a cada cinco minutos nos períodos de perfusão indicados no eixo horizontal. (* $p < 0,05$ para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

Tabela 3. Parâmetros funcionais de corações perfundidos de coelho com solução de Krebs-Henseleit a 24°C sem parada.

	PP (mmHg)	F (ml/min.)	I (g)
C60			
Controle	56,20 ± 0,6	17,02 ± 0,38	5,04 ± 0,06
Reinício I	60,75 ± 0,37*	15,05 ± 0,72*	2,33 ± 0,47*
Reinício II	64,00 ± 2,7*	15,15 ± 0,46	2,06 ± 0,53*
C90			
Controle	51,40 ± 0,52	19,02 ± 1,55	5,61 ± 0,27
Reinício I	53,5 ± 0,50	15,35 ± 1,65	2,41 ± 0,54*
Reinício II	53,50 ± 2,06	15,25 ± 1,25	0,87 ± 0,40*
C120			
Controle	55,90 ± 3,16	15,69 ± 0,69	5,10 ± 0,13
Reinício I	65,75 ± 6,61	16,58 ± 1,95	0,63 ± 0,18*
Reinício II	69,12 ± 8,04	14,58 ± 1,55	0,33 ± 0,13*

Obs.: Valores médios absolutos dos parâmetros de função cardíaca avaliados em cada grupo controle do Protocolo I. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. para cada período de perfusão. C60 = dois períodos de isquemia de 60 minutos, C90 = dois períodos de isquemia de noventa minutos, C120 = dois períodos de isquemia de 120 minutos. (* p < 0,05 para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

FIGURA 3 - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento do grupo controle C120 do protocolo I (dois períodos de isquemia de 120 minutos a 24°C sem solução cardioplégica)



1.3. DÉBITO CARDÍACO

Os resultados de avaliação do débito cardíaco sob condições de hipotermia com cardioplegia estão apresentados na tabela 2. O valor médio do volume de solução perfusora ejetado pelo coração durante a perfusão inicial (Controle) apresentou leve tendência de redução após os dois períodos de isquemia, em todos os grupos de experimentos. Contudo, apenas em GIV (90 minutos em cada período de isquemia) a redução foi de 31,1% e estatisticamente significativa para $p < 0,05$ ($11,3 \pm 0,38$ para $7,8 \pm 0,64$).

1.4. RESISTÊNCIA

A resistência é definida como a relação entre a pressão de perfusão e o volume ejetado. Os resultados obtidos e apresentados no gráfico 4 demonstraram apenas tendência de aumento nos grupos após os dois períodos de isquemia, quando comparada ao pré-isquemia. Embora não estatisticamente significante, o aumento percentual para os grupos GI, GII, GIII, GIV e GV foi de 66,52%, 58,74%, 35,95%, 61,42% e 45,77% respectivamente. Os valores absolutos da resistência em cada período de perfusão para cada grupo são mostrados no gráfico 4.

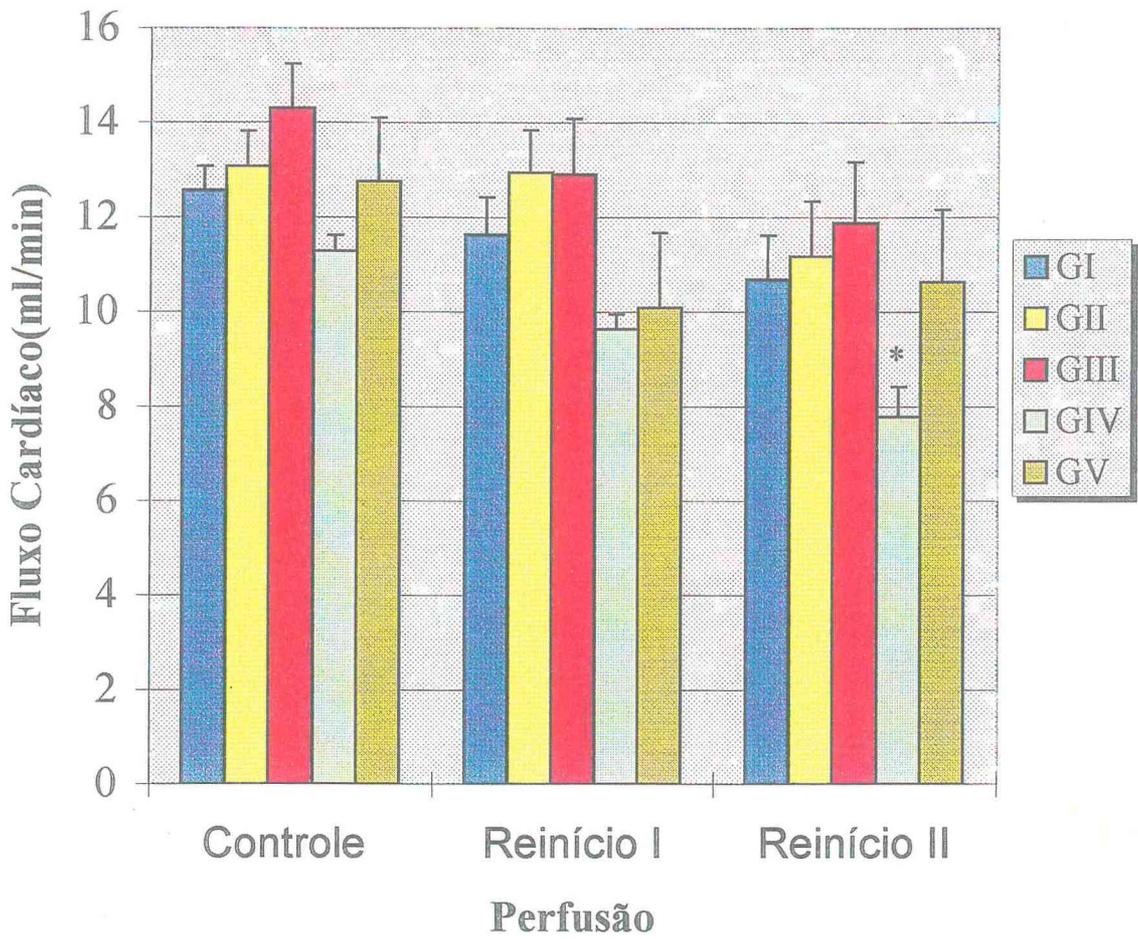


Gráfico 3. Comportamento do Fluxo Cardíaco medido em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30 (GI), 45 (GII), 60 (GIII), 90(GIV) e 120 (GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia (24°C). Cada barra corresponde à média dos valores mensurados a cada dez minutos nos períodos de perfusão indicados no eixo horizontal. (* $p < 0,05$ para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

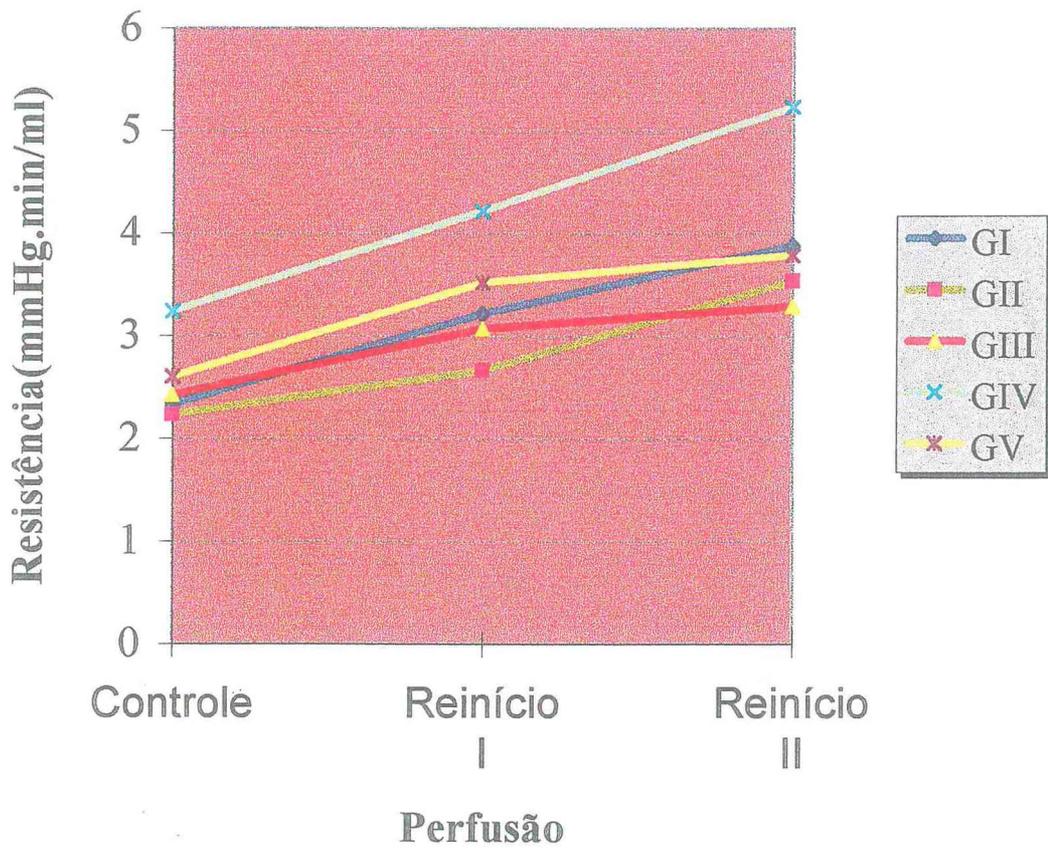


Gráfico 4. Comportamento da Resistência medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de 30 (GI), 45 (GII), 60 (GIII), 90 (GIV) e 120 (GV) minutos, sob cardioplegia induzida por KCl e hipotermia (24°C).. Cada linha corresponde ao comportamento linear da resistência em cada grupo, determinado por um valor médio no eixo vertical para cada período de perfusão indicado no eixo horizontal.

2. PROTOCOLO II

Cardioplegia a 30°C no coração perfundido do coelho: Efeitos da adição do glutathione na solução perfusora. Nestas experiências, resolveu-se fixar o tempo de sessenta minutos para fins de isquemia.

2.1. INOTROPISMO

Os valores médios de Inotropismo (g) encontrados estão apresentados na tabela 4. Em SI, os órgãos foram submetidos à cardioplegia com normotermia com perfusão sem GSH. Os resultados demonstraram redução significativa de 78,2% no inotropismo em relação ao período de pré-isquemia ($5,23\text{g} \pm 0,09$ para $1,14\text{g} \pm 0,28$). A figura 4 demonstra um gráfico original da amplitude da força de contração em um experimento da série SI.

Em SII, o GSH foi adicionado na solução perfusora de Krebs em concentração final de 0,1mM. Durante o reinício II, observou-se que a adição do GSH reverteu consideravelmente a queda na amplitude do inotropismo ($5,48\text{g} \pm 0,13$ para $3,04\text{g} \pm 0,3$) verificada no grupo experimental sem GSH (SI). Tomados como um todo, os dados demonstram que a razão da redução do inotropismo foi 1,32 vezes menor (de 78,2% para 33,7%) quando o GSH foi adicionado à solução perfusora. A figura 5 demonstra um gráfico original da amplitude da força de contração em um experimento da série SII.

Quando a concentração final de GSH na solução perfusora foi aumentada para 0,3 mM (SIII), observou-se queda da amplitude do inotropismo durante os dois períodos de reinício de perfusão (72% e 46%, respectivamente) em comparação ao

controle interno, não havendo benefício pelo aumento da dose de GSH, embora demonstre valores maiores que o controle.

Tabela 4. Efeitos fisiológicos dos corações isolados de coelho perfundidos com solução de Krebs-Henseleit a 30°C com e sem glutatión.

	PP (mm/Hg)	F (ml/min)	I (g)
SI			
Controle	55,63 ± 1,01	13,72 ± 0,66	5,23 ± 0,09
Reinício I	59,00 ± 2,28	11,38 ± 0,72	3,92 ± 0,27*
Reinício II	65,84 ± 3,06*	11,95 ± 1,16	1,14 ± 0,28*
SII			
Controle	47,63 ± 1,13	13,22 ± 0,37	5,48 ± 0,13
Reinício I	52,33 ± 2,24	12,72 ± 0,89	5,46 ± 0,22
Reinício II	57,33 ± 2,26*	11,52 ± 0,46	3,04 ± 0,30*
SIII			
Controle	46,80 ± 2,41	12,25 ± 0,25	5,08 ± 0,10
Reinício I	51,17 ± 4,17	11,02 ± 0,77	3,67 ± 0,27*
Reinício II	56,50 ± 5,22	11,20 ± 0,48	2,33 ± 0,38*

Obs.: Os valores médios absolutos dos parâmetros de função cardíaca avaliados em cada série do protocolo II expressos como média ± E.P.M. para cada período de perfusão. SI = solução perfusora sem glutatión, SII = solução perfusora com 0,1mM de glutatión e SIII = solução perfusora com 0,3mM de glutatión. (* $p < 0,05$ para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

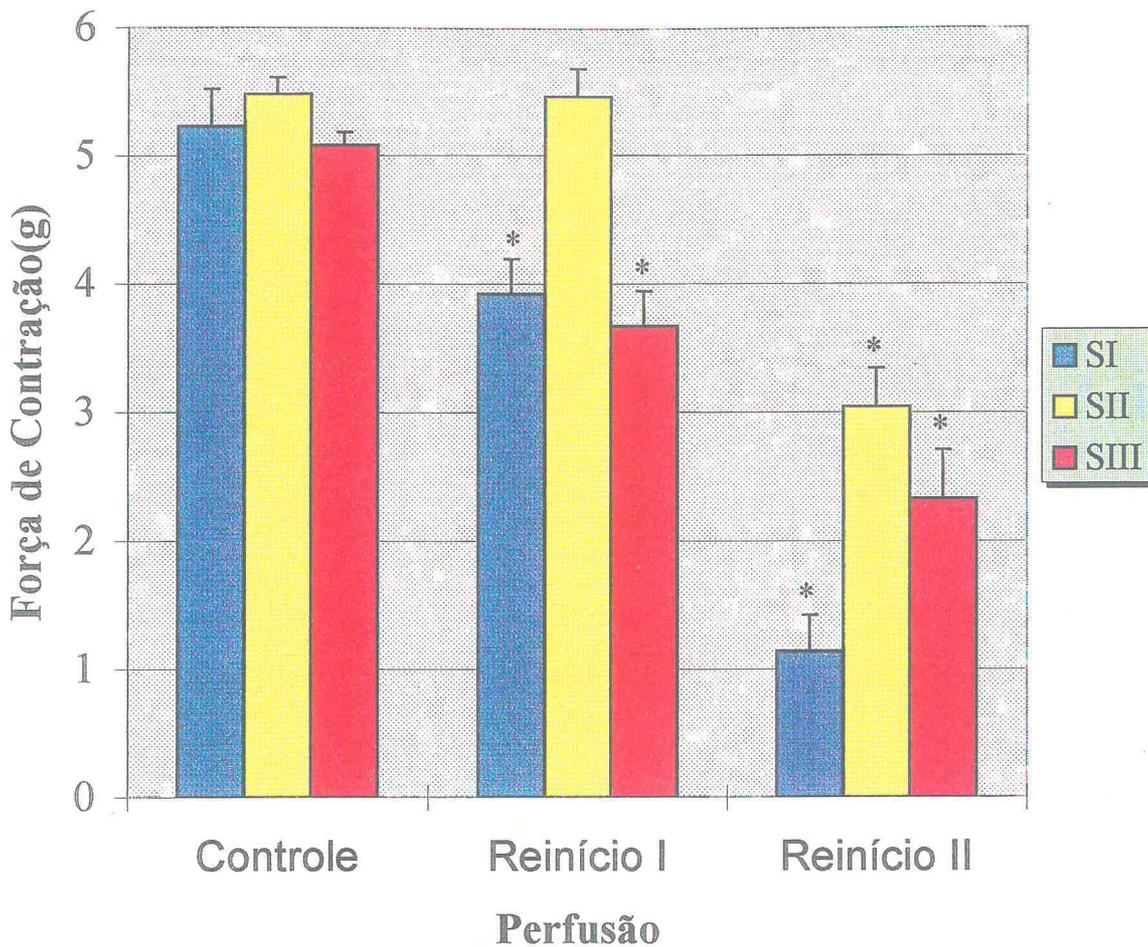


Gráfico 5. Comportamento da amplitude da força de contração medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de sessenta minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH (SI), com 0,1mM de GSH (SII) e com 0,3mM de GSH (SIII). Cada barra corresponde à média dos valores mensurados a cada dois minutos nos períodos de perfusão indicados no eixo horizontal. (* $p < 0,05$ para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

FIGURA 4 - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento da série I do protocolo II (dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C sem glutatona na solução perfusora).

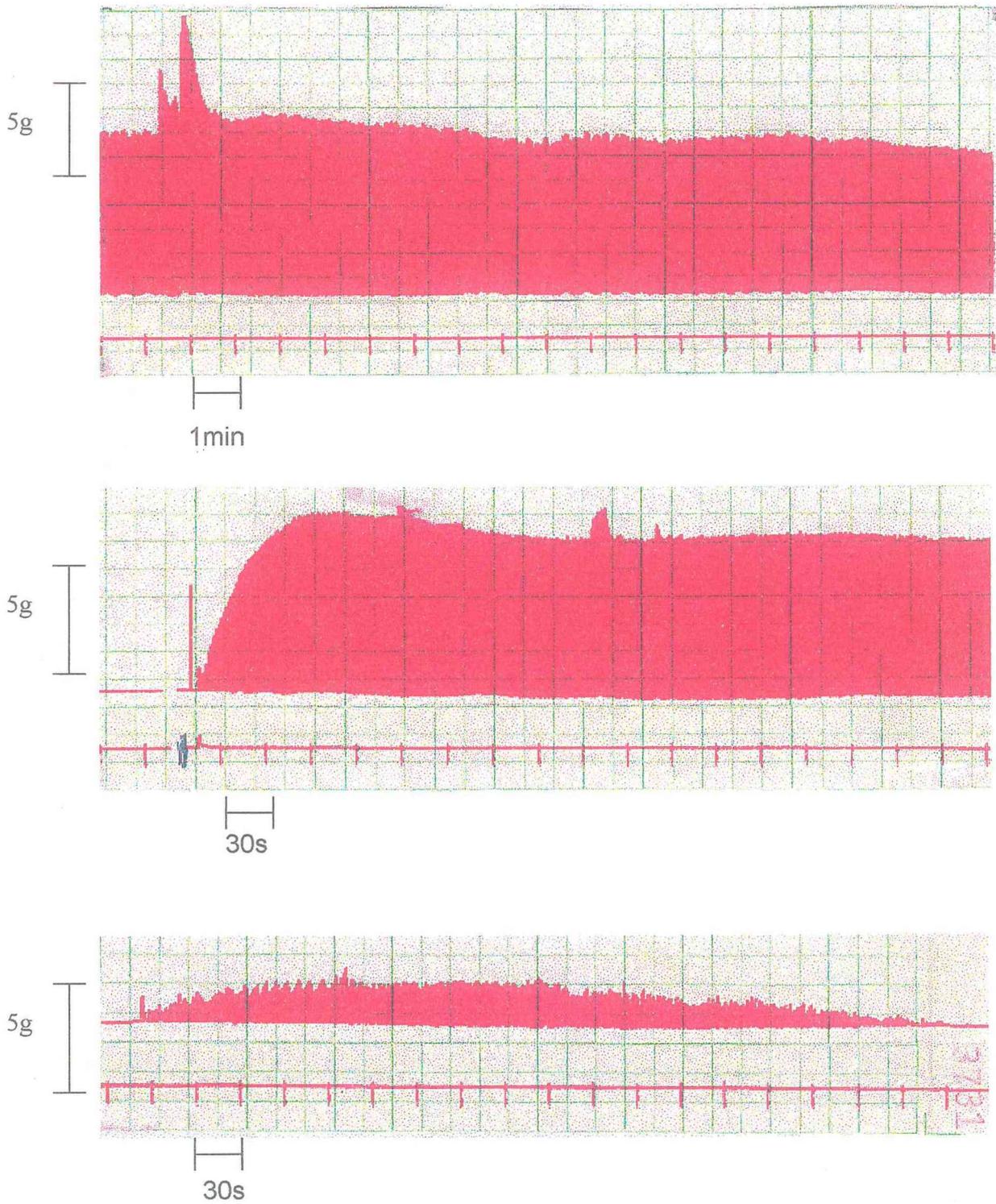
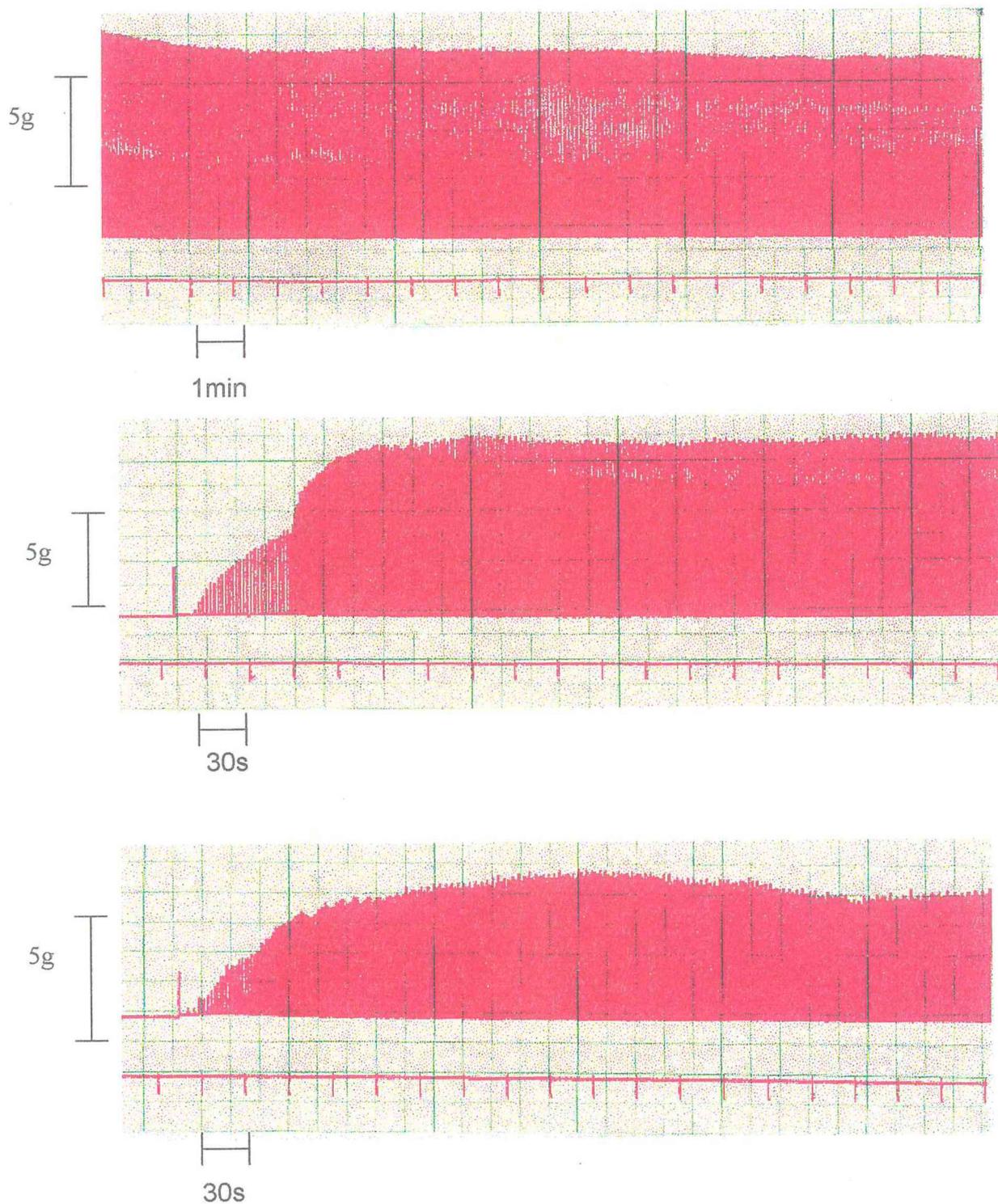


FIGURA 5 - Comportamento da amplitude da Força de Contração em um experimento da série II do protocolo II (dois períodos de isquemia de 60 minutos a 30°C com glutatona a 0,1mM na solução perfusora).



2.2. PRESSÃO DE PERFUSÃO E DÉBITO CARDÍACO

Os resultados apresentados na tabela 4 demonstraram que a adição de GSH nas concentrações de 0,1 mM (SII) ou 0,3 mM (SIII) sob normotermia não provocou mudanças relevantes na pressão de perfusão, bem como no débito cardíaco, após os períodos de isquemia em comparação ao grupo sem GSH (SI).

2.3.RESISTÊNCIA

A relação entre a pressão de perfusão e o volume ejetado (Resistência) aumentou em todos os grupos após os dois períodos de isquemia, quando comparada ao Controle. O aumento percentual na série I foi de 36,05%, na série II de 38,33% e na série III de 31,94% (Gráfico 8).

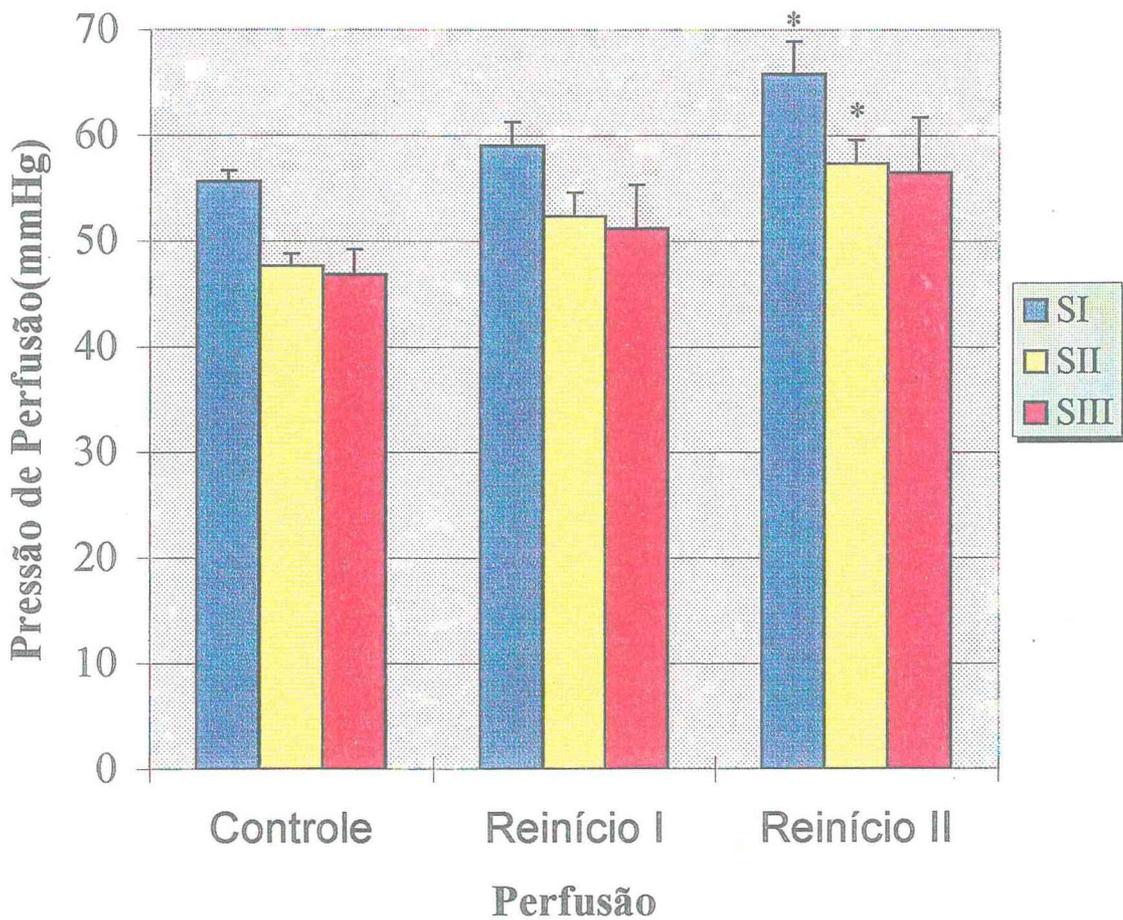


Gráfico 6. Comportamento da Pressão de Perfusão medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de sessenta minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH (SI), com 0,1mM de GSH(SII) e com 0,3mM de GSH(SIII). Cada barra corresponde à média dos valores mensurados a cada cinco minutos nos períodos de perfusão indicados no eixo horizontal. (* $p < 0,05$ para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

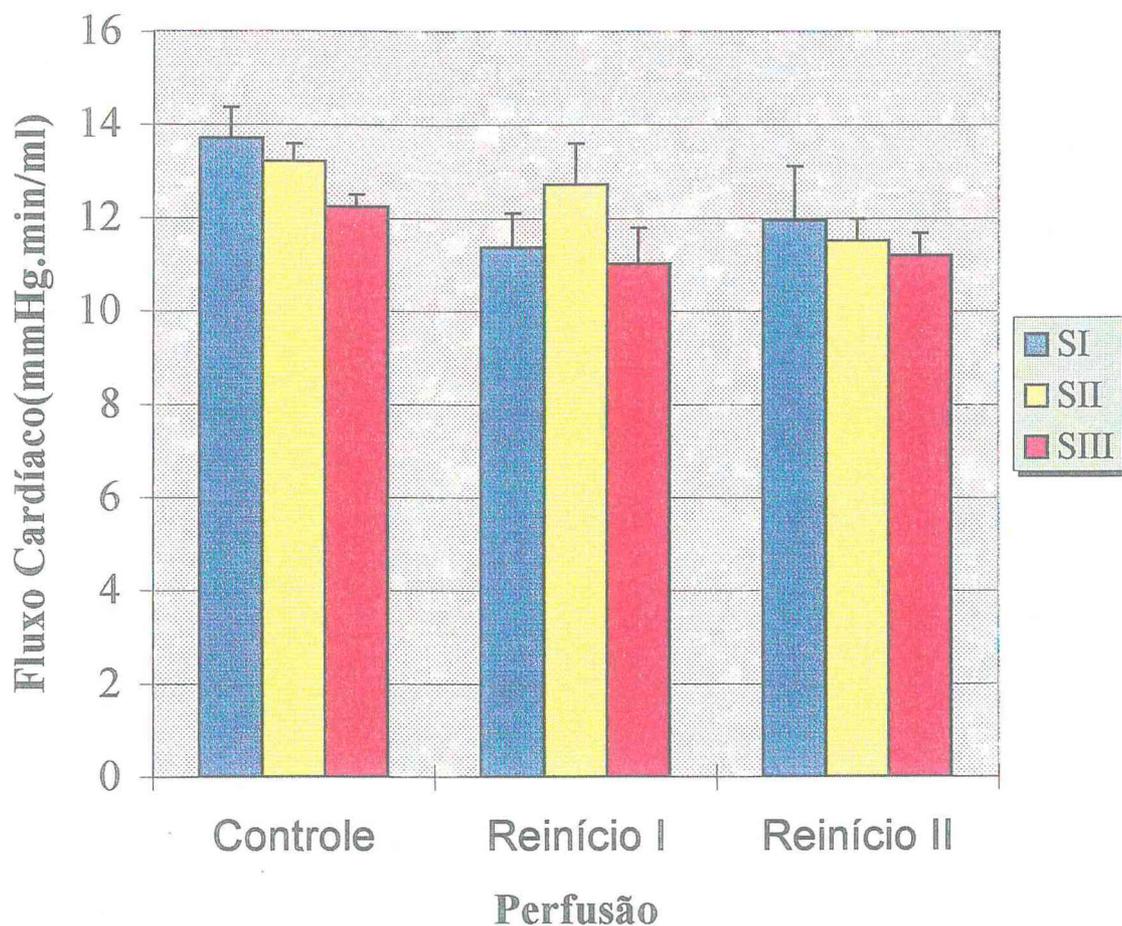


Gráfico 7. Comportamento do Fluxo Cardíaco medido em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de sessenta minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH(SI), com 0,1mM de GSH(SII) e com 0,3mM de GSH (SIII). Cada barra corresponde à média dos valores mensurados a cada dez minutos nos períodos de perfusão indicados no eixo horizontal. (* $p < 0,05$ para comparação entre os grupos experimentais (Reinício I ou Reinício II) e o grupo controle).

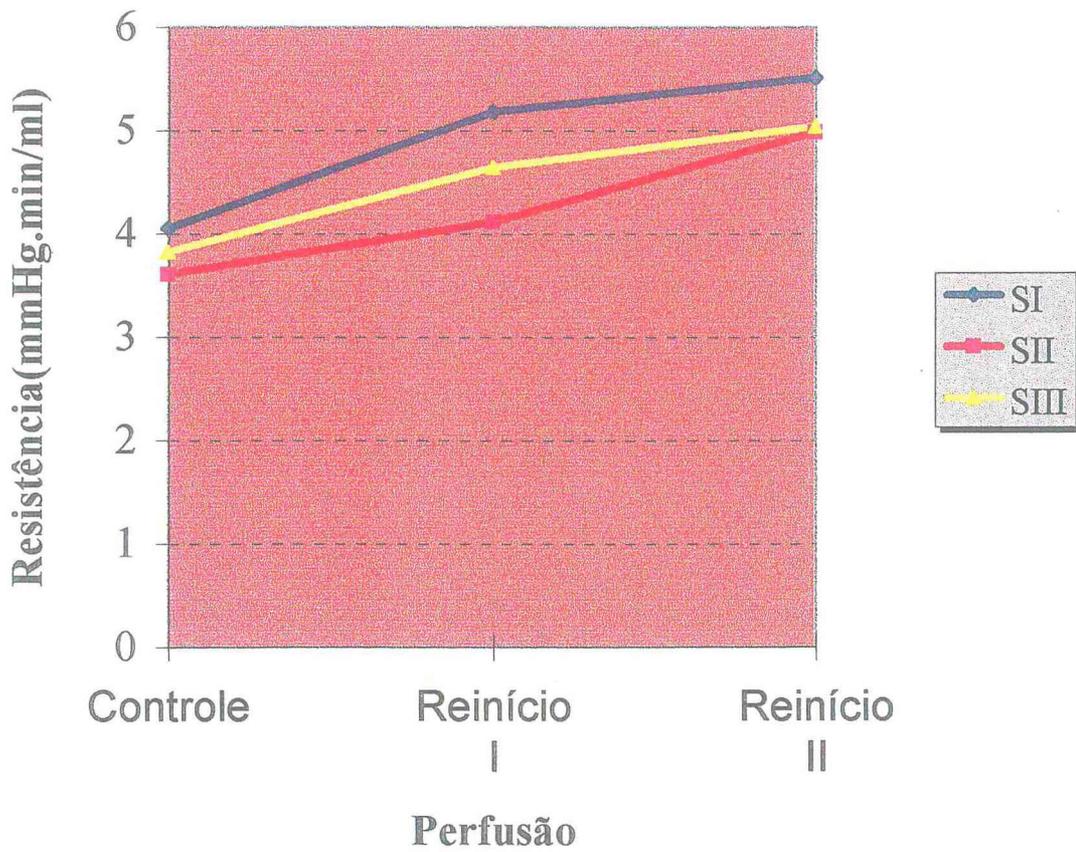


Gráfico 8. Comportamento da Resistência medida em corações de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit submetidos a dois períodos de isquemia de sessenta minutos a 30°C sob cardioplegia induzida por KCl sem GSH (SI), com 0,1mM de GSH (SII) e com 0,3mM de GSH (SIII). Cada linha corresponde ao comportamento linear da resistência em cada série, determinado por um valor médio no eixo vertical para cada período de perfusão indicado no eixo horizontal.

2.4. CONSUMO DE GLUTATION

Para determinação do consumo de Glutation, os corações de coelhos foram perfundidos em solução de Krebs e submetidos a dois períodos de isquemia de sessenta minutos (sessenta minutos, reinício I e 120 minutos, reinício II) a 30°C sob cardioplegia com concentrações de 0,1 mM e 0,3 mM (séries II e III, respectivamente). No grupo tratado com 0,1 mM de GSH (SII), verifica-se que antes da primeira isquemia, o coração consumiu 18,58% do GSH total presente na solução perfusora. Durante a reperfusão, após a primeira isquemia (reinício I) a média de consumo de GSH foi de 30,2% e após a segunda isquemia o consumo de GSH foi de 24,15%. Quando se aumentou a concentração final de GSH para 0,3 mM (SIII), verifica-se que no período pré-isquemia, reinício I e reinício II o consumo de GSH presente na solução foi, respectivamente 42%, 32,5% e 35,6%.

V- DISCUSSÃO

Aumentar os limites de preservação do explante cardíaco tornou-se um fator crucial para o sucesso do transplante em animais e humanos, à medida que a manipulação gênica poderá tornar exequível o xenotransplante. Esse tem sido um ponto de interesse prático em virtude da possibilidade de proteção mais eficiente que permitiria, entre outros aspectos, maior tranquilidade durante a cirurgia, maior oferta de órgãos, pois as barreiras de tempo e distância seriam minimizadas; melhor seleção do receptor adequado, através do estudo de antígenos linfocitários; e menor custo hospitalar acompanhado de melhor prognóstico (Stringham e cols., 1994).

Conforme mencionado nas seções anteriores, a parada cardioplégica e a hipotermia são as técnicas atuais de proteção do miocárdio durante a isquemia. A associação do potássio e o resfriamento do miocárdio para a preservação miocárdica durante cirurgias cardíacas são comumente utilizados (Tabayashi e cols., 1988). Teoricamente, a cardioplegia eficaz deveria ser obtida com condições menos severas possíveis, ou seja, com leve hipotermia ou mínima elevação da concentração de potássio. Além disso, a cardioplegia deve ser realizada o mais rapidamente possível e com a menor interferência nos desvios metabólicos do coração, com proteção suficiente para permitir recuperação adequada após o reinício.

Embora vários mecanismos estejam associados a disfunções do miocárdio após isquemia, muitos são conseqüentes da redução dos níveis intracelular de ATP e do aumento da concentração de íons hidrogênio. Neste sentido, diversas estratégias têm sido objeto de intensas investigações. Há muitos anos tem sido afirmado que o potássio, assim como a hipotermia, reduz a necessidade energética e também o consumo de oxigênio do coração isquêmico (Gay & Ebert, 1973). Esses efeitos ocorrem por meio de mecanismos distintos: enquanto a hipotermia reduz o metabolismo energético através da diminuição das reações enzimáticas temperatura-dependentes, o potássio exerce seu efeito alterando o gradiente eletroquímico da célula cardíaca (Raffa e cols., 1977; Hickey e cols., 1987). Essas observações ratificam os trabalhos realizados por Hearse e cols. em 1975 que sugeriam efeitos aditivos da associação de potássio e hipotermia. Esta associação, como estratégia

de preservação, minimiza a quantidade de potássio necessária para a cardioplegia, reduzindo os riscos do uso de altas concentrações deste íon e se constituíram em um dos principais propósitos da presente pesquisa.

No modelo experimental deste trabalho, os estudos foram conduzidos em coração isolado de coelho, utilizando-se o sistema de perfusão introduzido por Langendorff (1895) modificado pelo acoplamento de um oxigenador. As limitações deste modelo são bem conhecidas (Baker e cols., 1988). No protocolo experimental I, foi avaliado o efeito citoprotetor da solução cardioplégica de potássio associada à hipotermia a 24°C em diferentes intervalos de isquemia. Embora esta associação tenha sido bastante estudada por outros autores, esses ensaios iniciais foram realizados no sentido de padronizar, em nosso meio, o modelo experimental adotado, já que a literatura não demonstra estudo sistemático da variação do tempo de isquemia a curtos intervalos, bem como estabelecer com segurança as condições ideais para as avaliações posteriores com glutathione.

Nestas condições, os resultados obtidos na avaliação da amplitude de inotropismo do músculo cardíaco (tabela 2) demonstram importante efeito protetor da combinação da solução cardioplégica de potássio utilizada na temperatura de 24°C. A exceção do GII, nos demais grupos estudados observou-se a manutenção da tendência de aumento dos valores de amplitude inotrópica, mesmo após dois períodos de 120 minutos de isquemia, o que é de certo modo admirável. A redução flagrante da força de contração nos grupos submetidos à isquemia sob hipotermia a 24°C sem cardioplegia prévia, em contraste com a manutenção deste parâmetro, conforme citado previamente, nos grupos com cardioplegia, sugerem que a hipotermia moderada por si só se revela incapaz de manter adequadamente a contratilidade cardíaca e, por outro lado, a eficiência da associação destes dois métodos na preservação cardíaca durante isquemia prolongada, considerando um total de quatro horas de isquemia no grupo GV, demonstrando claramente o sinergismo desses processos. Estas observações já foram anteriormente demonstradas por Bretschneider e cols. (1975).

A força de contração corresponde ao funcionamento do coração, ou seja, representa um dado objetivo da eficiência do músculo cardíaco. Pelos resultados

apresentados do parâmetro de amplitude de inotropismo, pode-se inferir que a solução cardioplégica de potássio na temperatura de 24°C assegurou a manutenção contrátil do músculo cardíaco.

Durante vários anos, os estudos têm utilizado diferentes temperaturas de hipotermia e obtido resultados contraditórios sobre a proteção miocárdica. De qualquer modo, parece que todos os autores concordam que a hipotermia tem a vantagem de conferir considerável proteção ao miocárdio, reduzindo as necessidades metabólicas (Proctor, 1972; Griep e cols., 1973). Contudo, do ponto de vista prático parece consenso que as soluções hipotérmicas devem ser utilizadas para manter a temperatura do miocárdio entre 12°C e 20°C (Lajos e cols., 1993). Nossos resultados demonstram achados interessantes com hipotermia menos profunda que as apresentadas por esses autores.

A tendência de aumento na pressão de perfusão observada em todos os grupos estudados durante esse protocolo experimental poderia ser explicada por maior resistência do coração ao fluxo do perfusato logo após a isquemia. No entanto, o aumento da resistência não parece ter sido suficientemente importante para comprometer a função cardíaca global, se se considerar que, em apenas um grupo (G IV, noventa minutos em cada período de isquemia), houve redução estatisticamente significativa do débito cardíaco e que, em nenhum grupo, se observou declínio na amplitude da força de contração.

Além disso, não se verificou correlação direta entre o prolongamento da duração da isquemia e um maior prejuízo dos parâmetros de avaliação da função cardíaca, sugerindo-se que, na presença de cardioplegia com potássio associada à hipotermia moderada, o tempo de isquemia não parece ter sido um fator limitante da recuperação cardíaca pós-reperfusão.

A isquemia miocárdica induz redução ou perda de funções celulares especializadas e necessidade de melhor proteção miocárdica durante o período de isquemia. Um dos recentes mecanismos propostos para dano celular durante a isquemia envolve a interação de íons de hidrogênio e formação de radicais livres de oxigênio (Hearse e cols., 1982).

A formação de radicais livres ocorre naturalmente dentro da célula. Contudo, as células possuem diversos sistemas endógenos para minimizar a agressão celular de radicais livres e, por conseguinte, o dano decorrente de sua presença, evitando assim a instalação do estresse oxidativo. Estes sistemas incluem enzimas, como a superóxido dismutase (SOD-CuZn – superóxido dismutase cobre e zinco dependente e SOD-Mn – superóxido dismutase manganês dependente), glutathione peroxidase e a catalase, e ainda substâncias redutoras como o GSH (Yang e cols., 1989). Outros mecanismos não menos importantes de remoção de radicais livre incluem a pró-vitamina A, as vitaminas D e E, além dos minerais zinco, selênio, magnésio e cromo.

Os relatos mais atuais demonstram que radicais livres derivados do oxigênio têm sido implicados como um mecanismo geral de injúria celular na inflamação, injúria por radiação, toxicidade oxidativa, e isquemia (Messana e cols., 1988, Gharagozloo e cols., 1988)

No campo da isquemia miocárdica, vários estudos demonstram que nesse órgão o fenômeno isquêmico também está associado à maior produção de radicais livres tóxicos derivados do oxigênio, com a perda dos mecanismos antioxidantes protetores (Burton e cols., 1984; Ferrari e cols., 1985).

Após adaptação e padronização do modelo de perfusão estabelecido por Langendorff (1895), realizou-se o Protocolo II no intuito de determinar o papel citoprotetor da adição do glutathione na solução perfusora em duas diferentes concentrações, durante isquemia a 30°C, em que as perdas fisiológicas foram mais evidentes, utilizando cardioplegia prévia com potássio. O aumento da temperatura do meio de preservação miocárdica, nesta etapa de experimentos, objetivou, sobretudo, maximizar os resultados eventualmente obtidos com a inclusão de glutathione à solução perfusora.

Nestas condições experimentais, determinou-se, inicialmente, a amplitude da força de contração em meio de perfusão sem adição (SI) ou enriquecido com glutathione nas concentrações de 0,1mM (SII) ou 0,3mM (SIII). Na temperatura de 30°C, quando o coração foi submetido a isquemia com reperfusão sem glutathione, observou-se redução de 78% do inotropismo após o segundo período de isquemia em comparação aos resultados encontrados no GIII do Protocolo I. Estes achados

sugerem que o aumento da temperatura determinou importante redução do efeito protetor da cardioplegia sobre o inotropismo do coração isquêmico. Além disto, confirma a importância da hipotermia na manutenção da função celular cardíaca, embora como mencionado previamente, resultados mais satisfatórios devem ser obtidos quando se associa ao controle da temperatura a cardioplegia.

Portanto, parece razoável mencionar que a elevação da temperatura de preservação para 30°C, realizada neste protocolo, causou significativo prejuízo sobre a eficácia da proteção oferecida apenas pela cardioplegia com potássio, observando-se recuperação inadequada da função cardíaca após a reperfusão.

Por outro lado, a adição de 0,1mM de glutathione (GSH) conseguiu reverter de maneira significativa esses efeitos adversos anteriormente observados em SI, sugerindo que esse efeito é, ao menos em parte, conseqüência da produção de radicais livres tóxicos, que estariam envolvidos nas lesões celulares de isquemia e reperfusão e teriam sua ação deletéria neutralizada pelo glutathione.

Tem sido demonstrado que o glutathione desempenha papel fundamental na defesa celular contra inúmeros agentes de injúria, sendo de grande importância para esse efeito o grupo sulfidril (Arrick & Nathan, 1984). O efeito protetor do glutathione parece ser devido à supressão do estresse oxidativo. Este substrato é metabolizado intracelularmente pela glutathione peroxidase, enzima que catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

Vários estudos têm apontado no sentido de que a isquemia sem reperfusão diminui o conteúdo de glutathione reduzido em cães (Romero e cols., 1987), porcos (Singh e cols., 1989) e coelhos (Curello e cols., 1985). Entretanto, outros estudos sugerem que a reperfusão adicional resulta em pouca ou nenhuma redução extra do conteúdo de glutathione do miocárdio (Curello e cols., 1985; Singh e cols., 1989).

Por outro lado, tem-se observado que drogas indutoras da depleção de glutathione tornaram o miocárdio mais suscetível aos danos isquêmicos (Blaustein e cols., 1989; Singh e cols., 1989). Além disso, a administração de glutathione ou N-acetilcisteína, que elevam o conteúdo miocárdico de glutathione, parecem causar benefícios em modelos animais de infartação (Blaustein e cols., 1989; Singh e cols.,

1989). Fonteles e cols. também demonstraram depleção de glutathion durante a perfusão renal (1976).

Neste estudo, o aumento da concentração de glutathion na solução perfusora para 0,3mM não minimizou a redução no inotropismo, além da observada anteriormente em SII. Embora vários trabalhos tenham demonstrado o papel do glutathion na remoção de radicais livres durante a isquemia, os resultados obtidos com a elevação da concentração de glutathion demonstraram a importância do controle da temperatura para a adequada preservação da célula cardíaca, sugerindo que fatores adicionais devem estar envolvidos de maneira associada na gênese da injúria da isquemia. Apesar de o glutathion (GSH) ser um importante fator de proteção contra a injúria química, por servir como substrato para as glutathion-transferases e para a glutathion-peroxidase, sabe-se que a proteção antioxidante envolve um sistema complexo de enzimas e outros substratos que possuem a capacidade de remover as substâncias quimicamente constituídas por elétrons não pareados em excesso e que, eventualmente, podem causar efeitos deletérios em diversos compartimentos celulares. Portanto, a via metabólica de utilização do glutathion pode ser responsável por apenas uma parte da proteção antioxidante da célula. Certamente, estudos adicionais envolvendo a determinação das modificações nas outras vias de proteção antioxidante celular precisam ser realizados.

Por outro lado, resultados experimentais apontam no sentido de que a oclusão coronária e a conseqüente isquemia reduzem o conteúdo de glutathion, como mostrado em outros estudos (Curello e cols., 1985; Singh e cols., 1989).

Cabe ressaltar que a meia-vida plasmática do glutathion é muito curta (Ammon e cols., 1986), sugerindo que a administração exógena em situações de aumento na geração de radicais livres, como as que ocorrem durante a isquemia, parece ser importante na proteção celular. Recentemente, foi demonstrado que o nível intracelular de GSH cai em 40% do controle durante 35 minutos de isquemia a quente (Scaduto et al., 1988). Estudos posteriores (Such e cols., 1993) demonstraram que cães submetidos à ligação coronária permanente apresentaram baixo conteúdo miocárdico de glutathion em três e seis horas após a oclusão. A administração de glutathion reverteu a situação, quando o período de isquemia foi de três horas. Ao

contrário, resultados similares não foram verificados quando a oclusão permaneceu por seis horas.

No sentido de se verificar o consumo de glutathione durante reperfusão, os corações de coelho foram isolados e perfundidos com solução com glutathione nas concentrações de 0,1 mM ou 0,3 mM após dois períodos de sessenta minutos de isquemia. No período de pré-isquemia, os resultados apontaram que durante os experimentos com 0,3 mM, o consumo de glutathione foi duas vezes superior ao observado quando o coração foi tratado com 0,1mM, demonstrando que já se havia atingido o efeito máximo, aliado ao maior consumo. Após dois períodos de isquemia, na perfusão final, o consumo de glutathione foi apenas 30% maior no grupo mantido com 0,3 mM de glutathione. Estes resultados demonstraram que, paradoxalmente, o aumento em 200% na oferta de glutathione à solução não foi capaz de manter o aumento proporcional de consumo deste substrato pela célula cardíaca após a isquemia. Os mecanismos para explicar estes efeitos ainda não são completamente conhecidos.

O glutathione exógeno parece ser de menor efeito benéfico contra o dano resultante da oclusão coronária permanente e o glutathione endógeno pode ter papel limitado na proteção contra isquemia miocárdica sem reperfusão. Isso fortalece a idéia de que diferenças substanciais existem nos mecanismos patogênicos e no tratamento farmacológico da isquemia miocárdica com ou sem reperfusão (Such e cols., 1993).

Os trabalhos de De Boer e cols. (1993) demonstraram que a proteção induzida pelo piruvato em corações de ratos se deve à prevenção da formação de radicais livres, o que corrobora nossa proposta sobre o glutathione. Além disso, glutathione exógeno também protege contra injúria oxidativa no túbulo proximal de rins de coelhos (Messana e cols., 1988).

Estudos adicionais demonstraram que a inclusão de superóxido dismutase e catalase à solução cardioplégica, durante oclusão coronariana em animais, causou recuperação de cerca de 61% da função do miocárdio isquemiado após reperfusão, sugerindo a participação efetiva de outras vias metabólicas de proteção no controle da lesão celular por isquemia (Gharagozloo e cols., 1988). Sem dúvida, os

resultados aqui obtidos apontam para novos caminhos na preservação miocárdica através da combinação de hipotermia, cardioplegia e a adição de glutatión à solução perfusora.

A nova lei brasileira de doação de órgãos, recentemente aprovada, aumenta em muito as perspectivas de que mais órgãos e tecidos estejam disponíveis para transplantes (Lei nº 9.434 de 4 de fevereiro de 1997; substitutivo do Senador Lúcio Alcântara). Como consequência, torna-se imperativo o estudo da preservação de componentes biológicos, utilizando-se de modernas tecnologias que contemplem o uso de melhores métodos para o aproveitamento do vasto potencial agora criado em nosso país. Todavia, parece existir pouca tradição em laboratórios nacionais em relação a pesquisas nessa área.

O presente trabalho abre novas avenidas para o estudo da preservação miocárdica utilizando solução de Krebs-Henseleit (1932), ligeiramente modificada (Fonteles e cols., 1983), como meio de prover viabilidade miocárdica, utilizando hipotermia moderada, contrariamente aos trabalhos clássicos das décadas de 70 e 80 (Hearse e cols., 1975; Roe e cols., 1977; Baker e cols., 1978). Na verdade, observa-se que corações que morrem em três a cinco minutos, após exeresse corpórea, comportam-se fisiologicamente muito próximo da normalidade, quando submetidos à isquemia até duas horas, desde que sejam preservados por cardioplegia com cloreto de potássio a 24°C. Os resultados obtidos em nosso meio também demonstram que a elevação da temperatura para 30°C, com hipotermia leve, torna-se deletéria para o órgão, mesmo na presença de solução cardioplégica. Isso condiz com observações anteriores de Fonteles & Karow em 1976 que verificaram preservação funcional e fisiológica de rins de coelhos perfundidos a 25°C. De fato, esses autores observaram que a resposta a estimulação alfa-adrenérgica foi substancialmente potencializada a essa temperatura.

O mais interessante é que o órgão suportou dois períodos consecutivos de 120 minutos de isquemia, sem os efeitos deletérios dos fenômenos de reperfusão. No entanto, os mecanismos celulares de proteção antioxidantes são complexos, interdependentes e fortemente envolvidos com diferentes respostas celulares às agressões externas e ainda precisam ser completamente esclarecidos. Isto sugere a

necessidade da realização de outros estudos que, espera-se, tenham continuidade neste e em outros centros de pesquisas.

Por fim, ressaltamos a importância dos estudos pioneiros de Alexis Carrel (1905), que no início do século teve a coragem e a ousadia de manipular os tecidos de maneira inspirada e inteligente, ao ponto de proporcionar ao mundo científico questões tão complexas e intrigantes, que ao final do século ainda não foram inteiramente respondidas.

VI – CONCLUSÃO

1. Corações isolados de coelho perfundidos em sistema de Langendorff com solução modificada de Krebs-Henseleit mostram-se adequados para utilização em experimentos de viabilidade miocárdica em estudos de isquemia.
2. Os corações submetidos a um processo isquêmico sob cardioplegia hipercalêmica a 24°C e reperfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada apresentaram manutenção adequada do inotropismo cardíaco, mesmo após dois períodos de 120 minutos de isquemia.
3. O aumento da temperatura de preservação para 30°C determinou importante redução do efeito protetor isolado da cardioplegia sobre o inotropismo do coração isquêmico, confirmando a importância da hipotermia moderada na manutenção da função da célula miocárdica.
4. Sob tais condições, observou-se queda significativa no inotropismo, sugerindo que somente a cardioplegia com potássio é incapaz de promover preservação satisfatória do coração submetido à isquemia a 30°C.
5. A adição de 0.1mM de glutathione na solução perfusora reverteu significativamente os efeitos negativos da isquemia a 30°C sobre o inotropismo cardíaco.
6. O aumento de 200% na concentração de glutathione à solução perfusora não foi capaz de manter incremento semelhante no consumo deste substrato pela célula cardíaca após a isquemia, nem levou a aumento adicional na força de contração do miocárdio.
7. A dosagem do glutathione na solução ejetada pelo coração, quando comparada a solução injetada durante os períodos de perfusão pré- e pós-isquemia, demonstrou consumo considerável desse tripeptídeo adicionado à solução perfusora.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alamani, F.; Agrifoglio, M; Pompilio, G.; Spirito, R.; Sala, A.; Arena, V.; Roberto, M. Biglioli, P. Aortic arch surgery: pros and cons of selective cerebral perfusion. A multivariable analysis for cerebral injury during hypothermic circulatory arrest. **J. Cardiovasc. Surg. Torino** 36(1): 31-7, 1995.
- Ammon, H.P.T.; Melien, M.C.M.; Verspohl, E.J. Pharmacokinetics of intravenously administered glutathione in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.** 38:721-5 1986.
- Armitage, W.J. In: **Organ preservation for transplantation**, Kaarow, Jr, A.M. and Pegg, D.E. Marcel Dekker Eds., 2nd Ed., 1981, 577-597, N.Y.
- Arrick, B.A. & Nathan C.F. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. **Cancer Res.** 44:4224-32, 1984.
- Baker, J.E.; Boerboom, L.E.; Olinger, G.N. Age-related changes in the ability of hypothermia and cardioplegia to protect ischemic rabbit myocardium. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 96(5):717-24, 1988.
- Batty, P.R.; Hicks, G.L.; De Weese, J.A.; Wang, T.C. Optimal osmolarity for cold storage of the cardiac explant. **J. Surg. Res.** 48:601-5, 1990.
- Beard, T.; Carrie, D.; Boyer, M.J.; Boudjemaa, B.; Ferrieres, J.; Delay, M.; Bernadet, P.; Thouvenot, J.P. Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by thrombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde. **Arch. Mal. Coeur. Vaiss.** 87(10): 1289-96, 1994.
- Blaustein, A; Deneke, S.M.; Stolz, R.I.; Baxter, D.; Healey, N.; Fanburg, B.L. Myocardial glutathione depletion impairs recovery after short periods of ischemia. **Circulation** 80:1449-1457, 1989.
- Bodenhamer, R.M.; DeBoer, L.W.V.; Geffin, G.A.; O'Keefe, D.D.; Fallon, J.T.; Aretz, T.H.; Haas, G.S.; Daggett, W.M. Enhanced myocardial protection during ischemic arrest. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 65(5):769-80, 1983.
- Boom, H.B.K.; Van der Gon, J.D.; Nieuwenhuijs, J.H.T.; Schiereck, P. Cardiac contractility: actin-myosin interaction as measured from the left ventricular pressure curve. **Eur. J. Cardiol.** 1(2):217-24, 1973.

- Braile D.M.; Bilaqui, A.; Anacleto, J.C.; Araújo, J.D.; Bellini, A.J.; Garzon, S.A.C.; Greco, O.T.; Ardito, R.V.; Ayoub, J.C.A.; Baúcia, J.A.; Wichtendahl, R.F.T.; Kuroda, G.Y.; Lorga, A.M. Proteção miocárdica por cardioplegia. **Arq. Bras. Cardiol.** (Supl. I): 199-210; 1979.
- Braile, D.M.; Ardito, R.V.; Zaiantchick, M.; Santos, J.L.V.; Sores, M.J.F. Cardioplegia sanguínea contínua normotérmica. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.** 4(2):109-38, 1989.
- Bretschneider, H.J.; Hubner, G.; Knoll, D.; Lohr, B.; Nordbeck, H.; Spieckermann, P.G. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. **J. Cardiovasc. Surg. Torino.**16(3): 241-60, 1975.
- Buckberg G.D. A proposed "solution" to the cardioplegic controversy. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 77:803-15, 1979.
- Buckberg, G.D. Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid and reverse ischemic and reperfusion damage. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 93(1):127-39, 1987.
- Burton, K.P.; McCord, J.M.; Ghai, G. Myocardial alterations due to free-radical generation. **Am. J. Physiol.** 246: H776-H783, 1984.
- Carrel, A. & Guthrie, C.C. The transplantation of viens and organs. **Am. Med.** 10:1101, 1905.
- Carrel, A. & Lindbergh, C.A. The culture of whole organs. **Science** 81:621, 1935.
- Carrel, A. & Lindbergh, C.A. **The culture of whole organs.** New York: Hoeber, 1938.
- Claes, G.; Blohme, I.; Gelin, L.E.; Pettersson, S. Albumin as perfusate in continuous perfusion for renal perservation (Abstract). **Fourth Int. Transplant Conf. New York: Grune & Stratton**, p.46, 1972.
- Claes, G.; Blohme, I.; Gelin, L.E.; Pettersson, S. Experimental and clinical results of continuous perfusion in the Gambro perfusion machine. In **Int. Course on Transplant Villembanne**, France: Simep, p.239, 1973.
- Collins, G.M.; Bravo-Shugarman, M.; Terasaki, P.I. Kidney preservation for transplantation: initial perfusion and 30 hours'ice storage. **Lancet** 2:1219, 1969.

- Copeland, J.G.; Jones, M.; Spragg, R.; Stinson, E.B. Successful orthotopic transplantation of canine hearts after *in vitro* preservation for 24 to 28 hours. **Surg. Forum** 23:202, 1972.
- Coudray, C.; Pucheu, S.; Boucher, F.; Arnauld, J.; de Leiris, J.; Favier, A. Effect of ischaemia/reperfusion sequence on cytosolic iron status and its release in the coronary effluent in isolated rat hearts. **Biol. Trace. Elem. Res.** 41(1-2): 69-75, 1994.
- Coulson, R.L. & Rusy, B.F. A system for assessing mechanical performance, heart production and oxygen utilization of isolated perfused whole hearts. **Cardiovasc. Res.** 7:859-69, 1973.
- Curello, S.; Ceconi, C.; Bigoli, C.; Ferrari, R.; Albertini, A.; Guarnieri, C. Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. **Esperientia** 41:42-3, 1985.
- Curtis, M.J.; Macleod, B.A.; Tabrizchi, R.; Walker, M.J. An improved perfusion apparatus for small animals hearts. **J. Pharm. Meth.** 15:87-94, 1986.
- Das, D.K.; Marlik, N. Bioenergetics, its chemico-structure and reperfusion injury. **Exs.** 76:155-173, 1996.
- DeBoer, L.W.; Bekx, P.A.; Han, L.; Steinke, L. Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. **Am. J. Physiol.** 265(5 Pt 2): H1571-6, 1993.
- Decker, R.S. & Wildenthal, K. Influence of methyl-prednisolone on ultrastructural and cytochemical changes during myocardial ischemia. **Am. J. Pathol.** 92:1, 1978.
- Del Maestro, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta. Physiol. Scand. Suppl.** 492:153-68, 1980.
- Döring, H.J. The isolated perfused heart according to Langendorff technique - function - application. **Physiol. Bohemoslovaca** 39(6):482-502, 1990.
- Edlund, A & Wennmalm. A Oxygen consumption in rabbit Langendorff hearts perfused with a saline medium. **Acta. Physiol. Scand.** 113(1):117-122, 1981.
- Fariss, M.W. Oxygen toxicity: unique cytoprotective properties of vitamin E succinate in hepatocytes. **Free Radical Biology & Medicine** 9:333-43, 1990.

- Ferrari, R. Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion. **Am. J. Cardiol.** 76(6): 17B-24B, 1995.
- Ferrari, R.; Ceconi, C.; Curello, C.; Guarnieri, C.; Caldarera, C.M.; Albertini, A.; Visioli, O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. **J. Moll. Cell. Cardiol.** 17:937-45, 1985.
- Fonteles, M.C. & Karow, Jr. AM. An alphaadrenotropic study of the isolated rabbit kidney at normal and hypothermia. **Arch. Int. Farmacodyn.** 223:196-214, 1976.
- Fonteles, M.C.; Cohen, J.J.; Black, A.J.; Wenistein, S.J. Support of kidney function by long-chain fat acid derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** 13:F239-F246, 1983.
- Fonteles, M.C.; Pillion, D.J.; Jeske, A.H.; Leibach, F. Extraction of glutathione by the isolated perfused rabbit kidney. **J. Surg. Res.** 21:169-74, 1976.
- Fuhrman, G.J.; Fuhrman, F.A. & Field, J. Metabolism of rat heart slices, with special reference to effects of temperature and anoxia. **Am. J. Physiol.** 163:642, 1950.
- Gay, W.A.Jr. & Ebert, P.A. Functional, metabolic and morphologic effects of potassium induced cardioplegia. **Surgery** 74:284, 1973.
- Gharagozloo, F.; Melendez, F.J.; Hein, R.A.; Austin, R.E.; Shemin, R.J.; DiSesa, V.J.; Cohn, L.H. The effect of oxygen free radical scavengers on the recovery of regional myocardial function after acute coronary occlusion and surgical reperfusion. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 95(4):631-6; 1988.
- Goldberg, D.M. Structural, functional and clinical aspects of gamma-glutamyltransderose. (CRC) **Crit. Ver. Clin. Lab. Sci.** 12(1):1-58, 1980.
- Gottlieb, R. & Magnus, R. Digitalis und herzarbeit. Nach versuchen am überlebenden warmblüterherzen. **Arch. Exper. Path. U. Pharmakol.** 51:30-63, 1904.
- Greenberg, J.J. & Edmunds, L.H. Effect of myocardial ischemia at varying temperatures on left ventricular function and tissue oxigen tension. **J. Thorac Cardiovasc. Surg.** 42:84, 1961.
- Griep, R.B.; Stinson, E.B.; Shumway, N.E.; Calif, S. Profound local hypothermia for myocardial protection during open-heart surgery. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 66(5):731-41, 1973.
- Grynberg, A. & Demaison, L. Fatty acid oxidation in the heart. **J. Cardiovasc.**

- Pharmacol.** 28 (Sup 1): 511-517, 1996.
- Guarnieri, C.; Ferrari, R.; Visioli, O.; Caldarera, C.M.; Nayler, W.G. Effect of alfa-tocopherol on hypoxic-perfused and reoxygenated rabbit heart muscle. **J. Moll. Cell. Cardiol.** 10:893-906, 1978.
- Hearse, D.J.; Stewart, D.A.; Braimbridge, M.V. Myocardial protection during ischemic cardiac arrest. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 76(1):16-23, 1978.
- Hearse, D.J.; Stewart, D.A.; Braimbridge, M.V. Metabolic and miocardial protection during elective cardiac arrest. **Circ. Res.** 36:481-89, 1975.
- Hearse, D.J.; Shattock, M.J.; Manning, A.S. Effects of hydrogen peroxide on cardiac function and post-ischaemic functional recovery in the isolated 'working' rat heart. **Pharmacology.** 24(2):118-122, 1982.
- Hedbom, K. Über die Einwirkung verschiedener stoffe auf das isolierte säugethierherz. Erste abhandlung: die einwirkung gewisser organextracte. **Skand. Arch. Physiol.** 8:147-68, 1898.
- Hess, M.L.; Manson, N.H.; Okabe, E.: The role of free radicals in the pathophysiology of ischemic heart disease. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 60:1382-1389, 1982.
- Heubner, W. & Mancke, R. Ein apparat für vergleichende untersuchungen am wermbblätterherzen in der versuchsanordnung nach Langendorff. **Arch. Exp. Path. Pharmakol.** 137:257-63, 1928.
- Hickey, P.R.; Andersen, N.P. Deep hypothermic circulatory arrest: a review of pathophysiology and clinical experience as a basis for anesthetic management. **J. Cardiothorac. Anesth.** 1(2): 137-55, 1987.
- Hirigoyen, M.B.; Manasia, A; Zhang, W.; Greenstein, A.S.; Lu, Y.; Benjamin, E.; Urken, M.L.; Weinberg, H. Glutathione disulphide as a marker of reperfusion injury in ischaemic skin flaps. **Br. J. Plast. Surg.** 48(2):77-82, 1995.
- Humphries, Jr. A.L. & Liu, W.P. In: **Preservation media: perfusates.** Karow, Jr. A.M.; Abouna, G.J.M.; Humphries, Jr. A.L. Little, Brown and Company eds., 1sted., 1974, 22-50, Boston.
- Johnson, R.W.G.; Anderson, M.; Flear, C.T.G.; Murray, S.G.; Taylor, R.M.; Swinney, J. Evaluation of a new perfusion solution for kidney preservation. **Transplantation** 13:270, 1972.

- Kinoshita, K.Oe.M. & Tokunaga, K. Superior protective effect of low-calcium, magnesium-free potassium cardioplegic solution on ischemic myocardium: clinical study in comparison with St. Thomas' Hospital solution. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 101:695-702, 1991.
- Knight, K.R., Angel, M.F., Lepore, D.A.; Abbey, P.A.; Arnold, L.I.; Gray, K.A.; Mellow, C.G.; Brien, B.M. Secondary ischaemia in rabbit skin flaps: the roles played by thromboxane and free radicals. **Clin. Sci. Colch.** 80(3): 235-40, 1991.
- Ko, T.; Otani, H.; Imamura, H.; Omori, K.; Inagaki, C. Role of sodium pump activity in warm induction of cardioplegia combined with reperfusion of oxygenated cardioplegic solution. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 110(1):103-10, 1995.
- Kolff, W.J.; Effer, D.B.; Groves, L.K.; Peereboom, G.; Aoyama, S.; Sones, F.M. Elective cardiac arrest by the Melrose technic. **Cleveland Clinical Quartely** 23:98, 1956.
- Krebs, H.A. & Henseleit, K. Untersuchungen über die harnstoffbildung im tierkörper. **Z. Physiol. Chem.** 210:33-66, 1932.
- Krebs, H.A. Body size and tissue respiration. **Biochim. Biophys. Acta.** 4:249-69, 1950.
- Lajos, T.Z.; Espersen, C.C.; Lajos, P.S.; Fiedler, R.C.; Bergsland, J.; Joyce, L.T. Comparison of cold versus warm cardioplegia. Crystalloid antegrade or retrograde blood? **Circulation.** 88(5 Pt 2): 11344-9, 1993.
- Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden saugethierherzen. **Pfluegers Arch. Ges. Physiol.** 61:291, 1895.
- Lazar, H.L.; Zhang, X.; Rivers, S.; Bernard, S.; Shemin, R.J. Limiting ischemic myocardial damage using glucose-insulin-potassium solutions. **Ann. Thorac. Surg.** 60(2):411-6, 1995.
- Ledingham S.J.M.; Braimbridge, M.V.; Hearse, D.J. Improved myocardial protection by oxigenation of the St. Thomas' Hospital cardioplegic solutions. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 95:103-11, 1988.
- Legallois, C.J. Expériences sur le principe de vie, notamment sur celui des mouvements du colur et sur le siège de le principe: Suivies du rapport fait à la première classe de L'Institut sur celles relatives aux mouvements du coeur. Paris: D' Hautel, 1812.

- Leibach, F.H.; Fonteles, M.C.; Pillion, D.; Kaiow, A. Glutathione in the isolated perfused rabbit kidney. **J. Surg. Res.** Oct 17(4): 228-31, 1974.
- Levitzky, S; Wright, R.N.; Rao, K.S.; Holland, C.; Roper, K.; Engelman, R.; Feinberg, H. Does intermittent coronary perfusion offer greater myocardial protection than continuous aortic cross-clamping? **Surgery** 82(1):51-9, 1977.
- Linask, J.; Votta, J., Willis, M. Perfusion preservation of hearts for 6-9 days at room temperature. **Science** 199:299, 1978.
- Lower, R.R.; Stofer, R.C.; Hurley, E.J. Successful homotransplantation of the canine heart after anoxic preservation for seven hours. **Am. J. Surg.** 104:302, 1962.
- Malinin, T.I. Pulsatile perfusion of hearts with bloodless fluids. In T.I. Malinin (Ed.), *Microcirculation, perfusion and transplantation of organs*. New York: **Academic Press**. p.349, 1970.
- McGary, S.A.; Pae, W.E.; Miller, C.A.; Waldhausen, J.A. Optimal osmolarity for cardiac explant preservation in university of Wisconsin solution. **Surg. Forum** 42:297-9, 1991.
- Meister, A. In *Metabolism of sulfur compounds*, **Metabolic pathways**, ed. Greenberg, D.M. (Academic, New York), 3rd Ed., Vol. 7, pp. 101-108, 1975.
- Meister, A.; *Metabolism and functions of glutathione*. **Trends. Biochem. Sci.** 6(9):231-4, 1981.
- Melrose D.G.; Dreyer, B.; Bental, H.H.; Baker, J.B. Elective cardiac arrest. **The Lancet** 2:21-22; 1955.
- Menasché, P.; Grousset, C.; Graudet, Y.; Movas, C.; Piwnica, A. Maintenance of the myocardial thiol pool by N-acetylcysteine. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 103(5):936-44, 1992.
- Menasché, P.; Pasquier, C.; Jaillon, P.; Piwnica, A. Deferoxamine reduces neutrophil-mediated free radical production during cardiopulmonary bypass in man. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 96:582-9, 1988.
- Messana, J.M.; Cieslinski, D.A.; O'Connor, R.P.; Humes, H.D. Glutathione protects against exogenous oxidant injury to rabbit renal proximal tubules. **Am. J. Physiol.** 255:F-874/F-884;1988.

- Müller, F. Die künstliche durchblutung resp. Durchspülung von organen. In: **E. Abderhalden Hrgh. Handb. Biochem. Arbeitsmethoden** 3:321-57, 1910.
- Neely, J.R.; Liebermeister, H.; Battersby, E.; Morgan, H.E. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. **Am. J. Physiol.** 212:804-14, 1967.
- Nilsson, B.; Berggren, H.; Ekroth, R.; Mantovani, V.; Nilsson, F.; Svensson, S.; Wiklund, L. Glucose-insulin-potassium (GIK) prevents derangement of myocardial metabolism in brain-dead pigs. **Eur. J. Cardiothorac. Surg** 8(8):442-6, 1994.
- Parks, D.G.; Burkley, G.B.; Granger, D.N.; Hamilton, S.R.; McCord, J.M. Ischemic injury in the cat small intestine; Role of superoxide radicals. **Gastroenterology** 82(1):9-15, 1982.
- Porter, W.T. A new method for the study of the isolated mammalian heart. **Am. J. Physiol.** 1:511-8, 1898.
- Proctor, E. Preservation of the heart. **Guys. Hosp. Rep.** 121(1): 73-89, 1972.
- Pucheu, S.; Coudray, C.; Vanzetto, G.; Favier, A.; Manchecourt, J.; de Leiris, J. Time-course of changes in plasma levels fo trace elements after thrombolysis during the acute phase fo myocardial infarction in humans. **Biol. Trace. Elem. Res.** 47(1-3):171-82, 1995.
- Raffa, J.; Mavroudis, C.; Trunkey, D.D.; Ebert, P.A. Recovery of cardiac intracellular membrane potentials after potassium cardioplegia and hypothermia. **Surg. Forum.** 28: 224-6, 1977.
- Randle, P.J.; Denton, R.M.; England, P.J. Citrate as a metabolic regulator in muscle and adipose tissue. *Metabolic roles of citrate* (T.W. Goodwin, ed.). **London: Academic Press:87-103, 1968.**
- Ringer, S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. **J. Physiol. (Lond.)** 3:380, 1881.
- Robinson, L.A. & Harwood, D.C. Lowering the calcium concentration in St. Thomas' Hospital cardioplegic solution improves protection during hypothermic ischemia. **J. Thorac Cardiovasc. Surg.** 101:314-25, 1991.

- Roe, B.B. ; Hutchinson, J.C.; Fishman, N.H.; Ulliot, D.J.; Smith, D.L. Myocardial protection with cold, ischemic, potassium-induced cardioplegia. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 73(3):366-74, 1977.
- Romero, F.J.; Montoro, A.; Alberola, A. Gil, F.; Saez, G.T.; Viña, J.; Such, L. Myocardial glutathione alterations in acute coronary occlusion in the dog. **Free Rad. Res. Commun.** 4:27-30, 1987.
- Rossi, A & Santoro, M.G. Induction by prostaglandin A1 of haem oxygenase in myoblastic cells: na effect independent of expression of the 70Kda heat shock protein. **Biochem. J.** 308(Pt2):455-63, 1995.
- Rousou J.A.; Engelman, R.M.; Breyer, R.H.; Otani, H.; Lameshow, S.; Das, D. K. The effect of temperature and hematocrit level of oxygenated cardioplegic solutions on myocardial preservation. **J. Thorac. Cardiovasc .Surg.** 95(4):625-30, 1988.
- Rusch, H.: Experimentelle Studien über die Ernährung des isolierten Säugetier herzens. **Pflügers Arch.**, 73: 535-554, 1898.
- Salerno, T.A. Invited letter concerning myocardial temperature management during aortic clamping for cardiac surgery-protection, preoccupation and perspective. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 1019-1028, 1992.
- Scaduto, R.C., Jr.; Gattone, V.H.; Grotyohann, L.W.; Wertz, J.; Martin, L.F. Effect of an altered glutathione content on renal ischemic injury. **Am. J. Physiol.** 255: F-911, 1988.
- Schewer, J. & Stezoski, S.W. Effects of high energy phosphate depletion and repletion on the dynamics and eletrocardiogram of isolated rat hearts. **Circ. Res.** 23:519-30, 1968.
- Schoenberg, M.H. & Beger, H.G. Oxygen radicals and postischemic organ damage: pathophysiology, clinical relevance and therapy. **Zentralbl. Chir.** 120(3):174-85, 1995.
- Seeling, M.S. Consequences of magnesium deficiency on the enhancement of stress reactions - preventive and therapeutic implications. **J. Am. Coll. Nutr.** 13(5): 429-46, 1994.
- Segel, L.D. & Rendig, S.V. Sodium pentobarbital effects on cardiac function and response to dobutamine. **J. Thorac. Pharmacol.** 8:392-7, 1986.

- Shlafer, M. In: **Organ preservation for transplantation**. Karow, Jr., A.M. and Pegg, D.E. Marcel Dekker eds., 2nded., 1981, 577-97, New York.
- Siess, M. Some aspects on the regulation of carbohydrate and lipid metabolism in cardiac tissue. **Basic. Res. Cardiol.** 75 (1):47-56, 1980.
- Singh, A.; Lee, K.J.; Lee, C.Y.; Goldfarb, R.D.; Tsan, M.F. Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia-reperfusion injury. **Circulation** 80:1795-1804, 1989.
- Stringham, J.C.; Paulsen, K.L.; Southard, J.H.; Mentzer, R.; Belzer, F. Forty-hour preservation of the rabbit heart: optimal osmolarity, [Mg²⁺], and pH of a modified UW solution. **Ann. Thorac. Surg.** 58:7-13, 1994.
- Stringham, J.C.; Paulsen, K.L.; Southard, J.H.; Mentzer, Jr., R.M.; Belzer, F.O. Prolonging myocardial preservation with a modified University of Wisconsin solution containing 2,3-butanedione monoxime and calcium. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 107(3):822-8, 1994.
- Such, L.; Alberola, A.; Gil, F.; Bendala, E.; Viña, J.; Morcillo, E.J. Effect of glutathione on canine myocardial ischaemia without reperfusion. **J. Pharm. Pharmacol.** 45:298-302; 1993.
- Tabayashi, K.; McKeown, P.P.; Miyamoto, M.; Luedtke, A.E.; Thomas, R.; Allen, M.D.; Misbach, G.A.; Ivey, T.D. Ischemic myocardial protection. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 95:239-46, 1988.
- Tao, S.; Calza, G.; Lerzo, F.; Virgone, A.; Camassa, N.; Panizzon, G.; Brunelli, L.; Moretti, R.; Grasso, P.; Ghiggeri, B.M. Activation of the intracellular glutathione system by oxidative stress during cardiopulmonary bypass and myocardial perfusion. **Perfusion** 10(1): 45-50, 1995.
- Tate, S.S. & Meister, A. Gamma-glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. **Moll. Cell. Biochem.** 39:357-68, 1981.
- Taylor, M.J.; Bailes, J.E.; Elrifai, A.M.; Shih, S.R.; Teeple, E.; Leavitt, M.L.; Baust, J.G.; Maroon, J.C. A new solution for life without blood. Asanguineous low-flow perfusion of a whole-body perfusate during 3 hours of cardiac arrest and profound hypothermia. **Circulation** 91(2):431-44, 1995.

- Teoh, K.H.; Mickle, D.A.G.; Weisel, R.D.; Madonik, M.M.; Ivanov, J.; Harding, R.D.; Romaschin, A.D.; Mullen, J.C. Improving myocardial metabolic and functional recovery after cardioplegic arrest. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 95(5):788-98; 1988.
- Tian, G.; Mainwood, G.W.; Biro, G.P.; Smith, K.E.; Butler, K.W.; Lawrence, D.; Deslauriers, R. The effect of high buffer cardioplegia and secondary cardioplegia in cardiac preservation and postischemic functional recovery: a PNMR and functional study in Langendorff perfused pig hearts. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 69:1760-8; 1991.
- Tyers, G.F.O.; Todd, G.J.; Niebauer, I.M.; Manley, N.H.; Waldhausen, J.A. The mechanism of myocardial damage following potassium citrate (Melrose) cardioplegia. **Surgery** 78:45-53, 1975.
- Von Cyon, E. Die physiologischen Hertzgifte. IV Theil. Alte und Neue Methoden zum Studium der isolierten intra- und extra-cardialen, neu- und centralen. **Pfluegers Arch. Ges. Physiol.** 77: 215, 1899.
- Xia, Y. & Zweier, J.L. Substrate control of free radical generation from xanthine-oxidase in the postischemic heart. **J. Biol. Chem.** 270(32):18797-803, 1995.
- Yang, H.C.; Gattone, V.H.; Martin, L.F.; Grotyohann, L.W.; McElroy, J.; Scaduto, R.C. The Effect of Glutathione Content on Renal Function following Warm Ischemia. **J. Surgical Res.** 46(6):633-6, 1989.