

Efeitos da N-acetilcisteína no condicionamento isquêmico: estudo em corações isolados de ratos

Effects of n-acetylcysteine on ischemic preconditioning. Study in isolated rat hearts

Denoel Marcelino de OLIVEIRA¹, Eros Silva GOMES², Tofy MUSSIVAND³, Alfredo Inácio FIORELLI⁴, Otoni Moreira GOMES⁵

RBCCV 44205-1047

Resumo

Objetivo: Avaliar se a N-Acetilcisteína (NAC) altera o Precondicionamento Isquêmico (PC) em corações isolados de ratos usando apenas um ciclo de PC.

Métodos: Frequência Cardíaca (FC), Fluxo Coronariano (FLC) e Contratilidade Miocárdica (dP/dt) foram registradas em 30 corações de ratos Wistar. Após anestesia, os corações foram perfundidos em sistema de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit (K-H), equilibrada (95% de O₂ e 5% de CO₂). GI: Controle (n=6); GII: 20 min. isquemia (n=6); GIII: PC (n=6); GIV 50 µg/ml/min NAC antes do PC (n=6); GV: 100 µg/ml/min NAC antes do PC (n=6). Todos os parâmetros foram mensurados após 15 minutos de estabilização (T0) e T3, T5, T10, T15, T20, T25 e T30 minutos de reperfusão. Significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

Resultados: Foram observadas alterações na FC comparando GI com GII em T20 e T25 e comparando GI com GIII e GIV com GV em T10 e T20 ($P < 0,05$). FLC foi diferente comparando GI com GII em T3 e T5, GI com GIV em T10 e GI com GV em T10 e T25 ($P < 0,05$). dP/dt foi semelhante comparando GIII com GI e GV. GIII apresentou maior dP/dt que GIV, mas sem diferença estatística ($P > 0,05$). dP/dt foi maior no GV comparado com GIV, mas com diferença estatisticamente significativa somente em T30.

Conclusão: Os corações condicionados tiveram melhor dP/dt, sendo alteradas pelo uso de NAC no GIV e não alteradas no GV.

Descritores: Precondicionamento isquêmico. Infarto do miocárdio. Contração miocárdica. Radicais livres. Experimentação animal.

Abstract

Objective: The aim of this study is to assess if N-Acetylcysteine (NAC) changes the Ischemic Preconditioning (IP) in isolated rat hearts using only one cycle of IP.

Methods: Heart Rate (HR), Coronary Flow (CF) and Myocardial Contractility (dP/dt) were registered in 30 Wistar rat's hearts. After anesthesia the hearts were removed and perfused with Krebs-Henseleit equilibrated solution with 95% of O₂ and 5% of CO₂ according Langendorff's method. GI: Control (n=6); GII: 20 min. ischemia (n=6); GIII: IP (n=6); GIV 50 µg/ml/min NAC before IP (n=6); GV: 100 µg/ml/min NAC before IP (n=6). Parameters were measured after 15 min. of stabilization (T 0) and T3, T5, T10, T15, T20, T25 and T30 min. after reperfusion. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

1. Mestre em Cirurgia Cardiovascular; Cirurgião Cardiovascular.
2. Especialista em Cardiologia pela SBC; Diretor Clínico do Hospital SERVCOR.
3. Doutor em Cirurgia Cardiovascular; Director, Cardiovascular Devices Division e Chair, Medical Devices and Medical Engineering - University of Ottawa.
4. Doutor em Cirurgia Cardiovascular; Diretor do Departamento de Transplante Cardíaco e Suporte Circulatório do INCOR - USP.
5. Doutor em Cirurgia Cardiovascular; Coordenador da Pós-Graduação em Cirurgia Cardiovascular da Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis.

Trabalho realizado na Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis/ ServCor - Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência:

Denoel Marcelino de Oliveira
Av. Das Américas, 4200 bloco 8-A grupo 208 - Edifício Genève
Centro Empresarial Barra Shopping - Barra da Tijuca - Rio de Janeiro,
RJ, Brasil - CEP: 22640-102.

E-mail: drdenoel@hotmail.com

Artigo recebido em 22 de julho de 2008
Artigo aprovado em 10 de novembro de 2008

Results: There were changes on HR comparing GI with GII at T20 and T25 and comparing GI with GIII, GIV with GV at T10 and T20 ($P<0.05$). CF was different comparing GI with GII at T3 and T5, GI with GIV at T10 and GI with GV at T10 and T25 ($P<0.05$). Myocardial Contractility was similar comparing GIII with GI and GV. GIII had higher dP/dt than GIV but without statistical difference ($P>0.05$). dP/dt was higher in GV than GIV but with statistically significant difference only at T30.

Conclusion: dP/dt was better in preconditioned hearts and was changed if using NAC in GIV. The use of NAC didn't change the effects of preconditioning on myocardial contractility in GV.

Descriptors: Ischemic preconditioning. Myocardial infarction. Myocardial contraction. Free radicals. Animal experimentation.

INTRODUÇÃO

A proteção miocárdica durante cirurgia cardíaca tem sido o foco de pesquisas básicas e clínicas nos últimos 50 anos [1]. Em 1955, Lewis foi o primeiro a realizar cirurgia intracardiaca em humanos com uso de hipotermia. Melrose propôs o uso de parada cardíaca utilizando infusão de potássio na aorta ascendente. Desde então, várias táticas e técnicas de proteção miocárdica foram desenvolvidas.

Murry et al. [2] descreveram os mecanismos do condicionamento isquêmico (PC), ao demonstrarem que curtos episódios de isquemia e reperfusão anteriormente a um evento isquêmico prolongado reduziram o tamanho do infarto e melhoravam a função cardíaca. Em estudos experimentais, esse mecanismo é considerado o meio natural mais potente de cardioproteção [3]. Os trabalhos com PC em cirurgia cardíaca demonstraram resultados conflitantes, porém a maioria confirmou que o PC é um adjunto efetivo na proteção miocárdica [3-5].

Estudos clínicos em cardiologia e cirurgia cardíaca demonstraram tendência para cardioproteção com uso de adenosina, porém os efeitos não são tão evidentes como os observados em pesquisas experimentais [3,4]. Morris e Yellon [6] ressaltaram a existência de um limiar de estimulação, com a necessidade de ativação não só de receptores de adenosina, mas também de bradicinina e de opióides. Pesquisas e investigações sobre os mecanismos moleculares do PC poderão comprovar técnicas ou drogas aplicáveis e com benefício clínico em cirurgia cardíaca.

Os mecanismos bioquímicos de estimulação do PC envolvem uma variedade de receptores G da membrana citoplasmática que levam à translocação de Proteína Cinase C (PKC) do citoplasma para o sarcolema [3]. Nakano et al. [7] demonstraram que a translocação da PKC está relacionada com a ativação do canal $\text{mitoK}^+_{\text{ATP}}$ por meio da estimulação de cinases posicionadas logo abaixo da Proteína Cinase Mitogênica Ativada p38 (MAPK). A regulação do volume mitocondrial e transporte de elétrons são os principais mecanismos responsáveis pela manutenção de sua função e estão interligados à abertura dos canais de $\text{mitoK}^+_{\text{ATP}}$ [8].

A liberação de Radicais Livres de Oxigênio (RLO) é causa de lesão miocárdica na reperfusão após isquemia. Paradoxalmente, Pain et al. [9] and Forbes et al. [10] demonstraram que a liberação de espécies reativas de oxigênio (RLO) participa do mecanismo protetor do PC, através da abertura dos canais $\text{mitoK}^+_{\text{ATP}}$ e ativação de cinases.

N-acetilcisteína é classificado como antioxidante, porém tem ampla utilidade clínica como agente mucolítico, como antídoto para intoxicação por acetaminopheno, na prevenção de disfunção renal por uso de radiocontrastes e como potencializador dos efeitos hemodinâmicos da nitroglicerina. Sochman [11] propôs quatro possíveis mecanismos antioxidantes para a N-acetilcisteína: (1) ligação direta, e eliminação de radicais livres por reação de Redox (cisteína-cistina); (2) modulação do endotélio lesado; (3) produção de disulfito durante reação do grupo sulfídrico da N-acetilcisteína com o da membrana enzimática e como (4) precursor de glutatona.

Forbes et al. [10] demonstraram que a N-acetilcisteína bloqueava a melhoria da função contrátil pós-isquêmica após indução do PC com Diazóxido, um abridor de canais K^+_{ATP} . Chen et al. [12] observaram que a N-acetilcisteína bloqueava a perda de glutatona e o efeito protetor do PC, porém seu protocolo com quatro ciclos de 5 minutos de isquemia e reperfusão resultou em atordoamento do miocárdio antes do período sustentado de isquemia. Pain et al. [9] propuseram que os RLO tinham um papel paradoxal na proteção oferecida pelo PC, estimulando-nos a estudar os efeitos do antioxidante N-acetilcisteína sobre os mecanismos do PC em corações isolados de ratos no modelo de Langendorff.

A N-acetilcisteína tem ampla utilização clínica, e é empregada em vários pacientes submetidos a cirurgia cardíaca. Os estudos de Forbes et al. [10] e Chen et al. [12] demonstraram bloqueio dos efeitos protetores do PC pela N-acetilcisteína, porém Forbes et al. [10] ocasionaram lesão miocárdica com os ciclos excessivos de isquemia e reperfusão e Chen et al. [12] não estimularam o PC mecanicamente, mas com diazóxido. Desta forma, o presente estudo tem o objetivo de estudar os efeitos da N-

acetilcisteína sobre a frequência cardíaca (FC), fluxo coronariano (FLC) e contratilidade do miocárdio (dp/dt) em corações isolados de ratos submetidos a somente um ciclo de PC isquêmico mecânico.

MÉTODOS

Os animais foram tratados de acordo com *the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publication No. 85-23, revised 1985). Foram seguidos os princípios éticos para o uso de animais de laboratório determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

Trinta corações de ratos da raça *Wistar* foram estudados. Todos animais eram adultos, com peso variando de 220 a 330 gramas. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação.

Os animais foram submetidos a anestesia inalatória com éter sulfúrico em campânula fechada. Os grandes vasos foram bem expostos por uma toracotomia anterior e anticoagulação realizada com injeção de 500 UI de heparina sódica. A aorta ascendente foi dissecada e isolada com fio de algodão 2-00, sendo então canulada com cateter 20G, tendo o cuidado de preservar a valva aórtica e óstios coronarianos. A drenagem do ventrículo esquerdo foi realizada pela introdução de cateter 18G multiperfurado, da aurícula esquerda até o ápice do ventrículo esquerdo, passando pela valva mitral. Cuidado especial foi tomado para evitar lesões dos vasos coronarianos, como descrito por de Oliveira et al. [13].

Após 15 minutos de estabilização, um balão de látex era posicionado dentro do ventrículo esquerdo através de atriotomia esquerda e insuflado com água, mantendo uma pressão diastólica de 8 ± 2 mmHg. Isquemia global foi criada pela interrupção do perfusato na linha de fluxo, mantendo o balão desinsuflado. O balão de látex era conectado por uma extensão flexível a um transdutor de pressão. Pressões sistólica e diastólica, frequência cardíaca (FC) e eletrocardiograma (ECG) foram registrados, em biomonitor e impressora (Mod. DH 073, BESE - Bioengenharia, Belo Horizonte, MG). O fluxo coronariano foi mensurado pela coleção do efluente durante o período de um minuto (Figura 1).

Os resultados foram expressos em porcentagem dos valores de controle (média \pm desvio padrão). O teste *t de Student* foi usado para avaliar significância estatística de diferenças entre observações pareadas. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

A comparação de médias entre os grupos foi realizada usando teste *t de Student* e teste de Bartlett para avaliar homogeneidade de variância. ANOVA foi aplicada quando

havia homogeneidade de variância e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, quando as variáveis não se apresentavam homogêneas no teste de Bartlett.

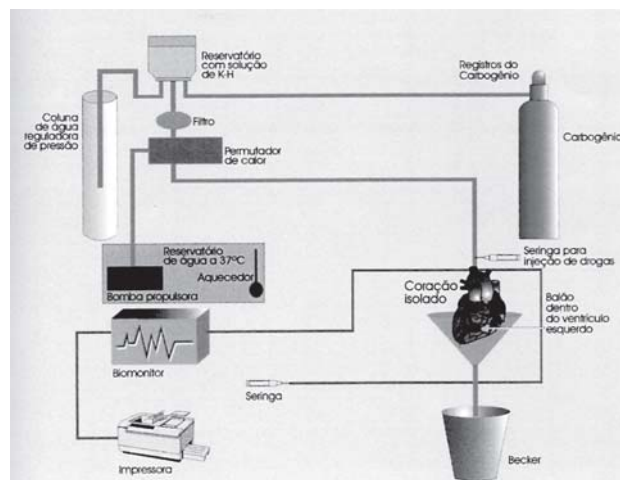


Fig. 1 - Desenho esquemático do sistema descartável de estudo de coração isolado pelo método de Langendorf. A solução de perfusão de Krebs-Henseleit é pressurizada pelo borbulhamento de carbogênio no reservatório. Sob uma pressão mantida em 100 cm de água, a solução perfunde o coração isolado com temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ após passar pelo permutador de calor. Um balão de látex é posicionado dentro do ventrículo esquerdo, com pressão diastólica mantida em 8 ± 2 mmHg, para monitorização da contratilidade e registro em impressora. Uma via de injeção de drogas é posicionada anteriormente ao coração isolado

Protocolos dos grupos estudados

O Grupo Controle (GI) foi constituído por seis corações preparados pelo método descrito e perfundidos com solução de *Krebs-Henseleit* a 37°C durante 15 minutos, para estabilização. Depois desse período, o balão de látex foi inserido no ventrículo esquerdo e o coração perfundido durante 30 minutos. Todos os grupos tiveram a frequência cardíaca, pressão ventricular e fluxo coronariano medidos com 3, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de reperfusão. O Grupo de Isquemia (GII) foi constituído por seis corações submetidos a 20 minutos de isquemia global após o período de estabilização e todos parâmetros foram mensurados durante a reperfusão, como descrito anteriormente. O Grupo de Precondicionamento (GIII) foi constituído por seis corações submetidos a cinco minutos de isquemia global, seguidos de cinco minutos de reperfusão anteriormente à isquemia de 20 minutos. Todos os parâmetros foram mensurados nos períodos de reperfusão descritos anteriormente. O Grupo IV (GIV) recebeu infusão de $50 \mu\text{g/ml/min}$ e o Grupo V (GV) $100 \mu\text{g/ml/min}$ de N-acetilcisteína por um minuto na linha de infusão próxima ao coração, anteriormente ao protocolo de condicionamento (Figura 2).

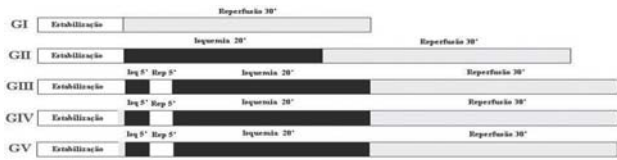


Fig. 2 - Esquema dos protocolos de perfusão com respectivas ações temporais. Isq - isquemia, Rep - reperusão

RESULTADOS

Pesos dos animais e dos corações

O peso dos animais variou de 220,0 a 3300 gramas. A média do peso dos corações pode ser vista na Tabela 1, sendo esta estatisticamente maior no grupo III, se comparado aos demais ($P < 0,05$).

Varição da frequência cardíaca

A Frequência Cardíaca no Grupo I (controle) oscilou com valores inferiores ao tempo inicial, mas sem diferenças estatísticas entre os períodos quando comparadas ao T_0 ($P > 0,05$). No Grupo II, a média da Frequência Cardíaca só apresentou decréscimo estatisticamente significativo no T_{20} ($P < 0,05$). No Grupo III (Precondicionamento Isquêmico), houve diferença estatística no T_{10} e T_{20} se comparadas ao T_0 ($P < 0,05$). O Grupo IV apresentou decréscimo significativo em T_{10} , T_{15} and T_{20} se comparadas ao T_0 . No Grupo V, o valor mais baixo apresentou diferença estatística no T_{30} ($P < 0,05$).

Comparando a frequência cardíaca do Grupo I com a do Grupo II, ocorreu diferença estatística somente em T_{20} e T_{25} ($P < 0,05$). Os Grupos III, IV e V, quando comparados com o Grupo I, mostraram diferença estatística em T_{10} e T_{20} ($P < 0,05$) (Figura 3).

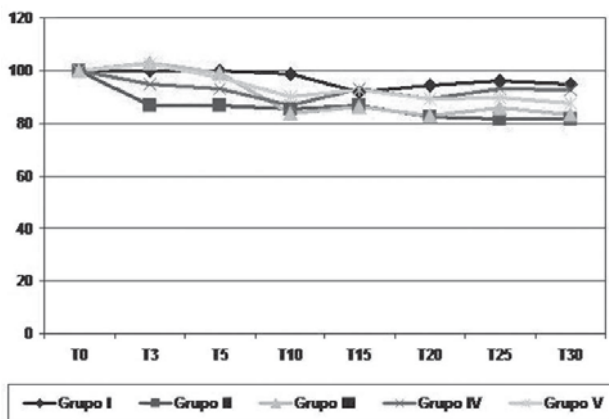


Fig. 3 - Variação percentual da frequência cardíaca em batimentos por minuto, dentro dos períodos estudados em cada grupo

Fluxo coronariano

O fluxo coronariano no Grupo I permaneceu estável durante o estudo, com diferença estatística somente no T_5 ($P < 0,05$). No Grupo II (20 minutos de isquemia), os valores do fluxo coronariano foram diminuindo durante os períodos com diferença estatisticamente significativa em todos os períodos se comparadas ao T_0 ($P < 0,05$). No Grupo III (precondicionamento isquêmico), foram observadas diferenças estatísticas somente no T_{25} , quando comparado ao T_0 ($P < 0,05$). O fluxo coronariano no Grupo IV foi diminuindo, apresentando diferenças estatísticas significativas em todos os períodos, se comparados ao T_0 ($P < 0,05$). No Grupo V, observou-se diferença estatística no T_{25} e T_{30} , se comparados com T_0 ($P < 0,05$).

Comparando o fluxo coronariano do Grupo I com o do Grupo II, ocorreram diferenças estatísticas somente em T_3 e T_5 , com $P < 0,05$. Não ocorreram diferenças entre os Grupos I e III. O fluxo coronariano do Grupo I foi estatisticamente diferente do Grupo IV no T_{10} . O Grupo I, quando comparado ao Grupo V, mostrou diferenças em T_{10} e T_{25} . Outras comparações entre os Grupos não demonstraram diferenças estatísticas no fluxo coronariano (Figura 4).

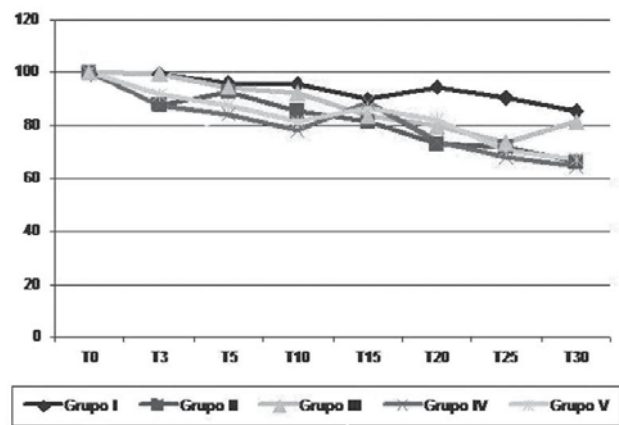


Fig.4 - Variação percentual do fluxo coronariano em mililitros por minutos, dentro dos períodos estudados em cada grupo

Contratilidade miocárdica (dP/dt)

A contratilidade miocárdica (dP/dt) no Grupo I foi diferente estatisticamente somente no T_{30} , se comparado ao T_0 ($P < 0,05$). A dP/dt nos Grupos II e IV ficou estatisticamente deprimida em todos os períodos se comparados ao T_0 ($P < 0,05$). A dP/dt no Grupo III e V não apresentou diferenças estatísticas entre os períodos estudados.

A contratilidade miocárdica foi estatisticamente

deprimida durante todos os períodos, comparando os Grupos I e Grupo III com o Grupo II ($P<0,05$). O Grupo do Precondicionamento Isquêmico (GIII) apresentou dP/dt estatisticamente semelhante ao Grupo controle (GI) e aos Grupos tratados com N-acetilcisteína (GIV e GV), $P>0,05$. Os Grupos GIII, GIV e GV apresentaram contratilidade estatisticamente superior ao GII, em todos os períodos estudados ($P<0,05$). O Grupo IV (50 μ g/ml/min N-acetilcisteína e PC) apresentou dP/dt estatisticamente deprimida ($P<0,05$) em T₁₀, T₁₅ e T₃₀, quando comparadas ao Grupo controle e superior ao Grupo II em T₃ e T₅. O Grupo V (100 μ g/ml/min N-acetilcisteína e PC) teve maior contratilidade miocárdica que o Grupo II, com diferença estatística em todos os períodos e esteve deprimida nos períodos T₁₀ e T₁₅, se comparadas com o Grupo controle (Figura 5) (Tabela 1).

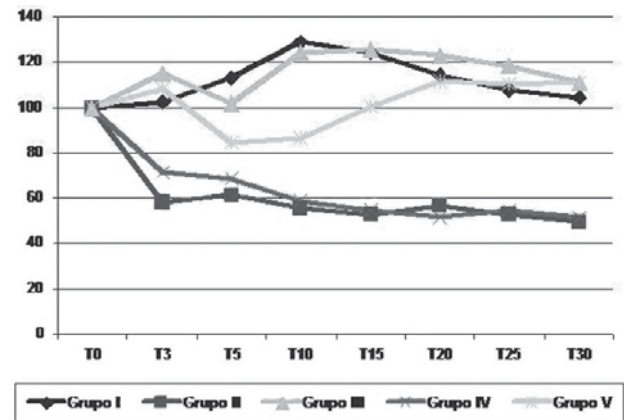


Fig.5 - Variação percentual da contratilidade miocárdica (dP/dT) em milímetros de mercúrio por segundo, dentro dos períodos estudados em cada grupo

Tabela 1. Demonstração da comparação estatística da diferença de percentual da contratilidade miocárdica (dP/dT) entre os grupos estudados.

Comparação entre grupos	Comparação estatística da contratilidade miocárdica entre os grupos estudados em cada período							
	T ₀	T ₃	T ₅	T ₁₀	T ₁₅	T ₂₀	T ₂₅	T ₃₀
GI - GII	% Dif P	43,7 0,009	51,09 0,01	73,5 0,004	71,1 0,004	57,1 0,01	60,3 0,01	54,9 0,004
GI - GIII	0	15,5 0,36	31,7 0,2	39,2 0,11	34,7 0,13	24,4 0,27	27,7 0,26	24,1 0,28
GI - GIV	0	20,5 0,12	35,9 0,08	49,6 0,019	46,4 0,019	37,2 0,07	38,1 0,08	33,7 0,04
GI - GV	0	13,9 0,27	34,0 0,1	47,8 0,01	40,7 0,03	28,6 0,17	29,4 0,19	18,9 0,21
GII - GIII	0	-56,5 0,004	-40,4 0,006	-68,8 0,004	-72,7 0,004	-69,4 0,004	-65,7 0,004	-61,4 0,004
GII - GIV	0	-34,7 0,004	-23,9 0,02	-36,0 0,07	-37,1 0,07	-29,7 0,18	-33,7 0,06	-31,7 0,07
GII - GV	0	-39,7 0,001	-23,8 0,02	-34,3 0,01	-40,6 0,01	-38,0 0,04	-41,6 0,01	-47,9 0,01
GIII - GIV	0	-3,0 0,6	4,6 0,81	17,3 0,4	11,8 0,64	8,4 0,48	3,2 0,77	-10,5 0,7
GIII - GV	0	-3,0 0,6	4,6 0,81	17,3 0,41	11,8 0,64	8,4 0,48	3,2 0,77	-10,5 0,72
GIV - GV	0	-26,5 0,07	-7,5 0,59	-7,0 0,25	-22,9 0,08	-34,6 0,07	-34,8 0,07	-59,2 0,009

DISCUSSÃO

Cardioproteção durante cirurgia cardíaca continua sendo um tópico que exige muitos estudos [1]. Desde a descrição do PC por Murry et al. [2], em 1986, muitos pesquisadores têm tentado desvendar os mecanismos e vias deste fenômeno [3-10]. Se o PC é considerado a forma natural mais poderosa de cardioproteção conhecida em pesquisas experimentais [3], por que não usar este forte mecanismo protetor em cirurgia cardíaca? Alguns estudos clínicos mostraram efeitos protetores relacionados com a estimulação de vias do PC pelo uso de adenosina e sevoflurano durante cirurgia cardíaca [4,5]. Entretanto, a elucidação de todo o mecanismo poderá demonstrar um novo mediador, canal e ou um efetor final que possa estimular clinicamente os efeitos cardioprotetores poderosos do PC.

Em 1997, Garlid et al. [8] descreveram o canal mitoK⁺ATP como efetor final do PC e, em 2000, Pain et al. [9] descobriram que o canal mitoK⁺ATP era um desencadeador do PC pela geração de (RLO). Jeroudi et al. [14] estabeleceram que altos níveis de RLO eram prejudiciais para o tecido miocárdico. De outra forma, doses moderadas de H₂O₂ e O₂⁻ demonstraram estimular um efeito cardioprotetor semelhante ao observado no PC, como demonstrado por Baines et al. [15]. No presente estudo, o mecanismo protetor do PC foi diminuído pela administração de 50µg/ml/min do antioxidante (N-acetilcisteína), observado pela depressão da dP/dt do Grupo IV, se comparada ao Grupo III.

Chen et al. [12] demonstraram que a N-acetilcisteína bloqueava os efeitos do PC. Entretanto, seu protocolo de condicionamento com quatro ciclos de 5 minutos de isquemia seguidos por 5 minutos de reperfusão resultaram em atordoamento miocárdico, *stunning*, reduzindo a contratilidade do ventrículo esquerdo para 72% do valor inicial, no final do quarto ciclo de reperfusão. No presente estudo, somente um ciclo de PC demonstrou oferecer cardioproteção, comparando a dP/dt dos Grupos II e III com o grupo controle (GI).

A ação protetora da N-acetilcisteína sobre o miócito na injúria de reperfusão é devida aos seus efeitos antioxidantes e de captura de radicais livres de oxigênio, sendo clinicamente utilizada em eventos coronarianos instáveis, como no infarto agudo do miocárdio [11]. Hsu et al. [16] reportaram que a N-acetilcisteína aumenta a produção de óxido nítrico (ON) em estudos experimentais e Delgado et al. [17] demonstraram proteção do endotélio estimulada pelo uso de N-acetilcisteína. Isto confirma a proteção obtida pelo uso de N-acetilcisteína na injúria de reperfusão e liberação de ON com a potencialização dos efeitos da nitroglicerina observadas em estudos prévios [11]. Singh et al. [18] indicaram que agentes redutores, como a glutatona, podem estimular o armazenamento e transporte

de ON. O aumento da produção de ON com o uso de N-acetilcisteína pode explicar porque o Grupo V não apresentou alteração tão significativa da dP/dt, apesar de sua ação antioxidante.

Embora o ON tenha sido relacionado com o desencadeamento e com o efetor final do condicionamento tardio, evidências da sua participação no condicionamento clássico são limitadas, senão controversas, como relatado por Nakano et al. [19]. Bell e Yellon [20] mostraram que, no condicionamento clássico, o ON parece baixar o limiar para a proteção observada, mesmo sabendo não ser ele diretamente um deflagrador do PC clássico.

Em 1993, Kuzuya et al. [21] reportaram uma fase tardia de proteção miocárdica, menos intensa, porém mais prolongada e que durava até 72 horas. Eles atribuíram esse efeito ao incremento das enzimas antioxidantes, como MnSOD. Esta fase tardia foi denominada de Segunda Janela de Proteção (SJP), em inglês, *Second Window of Protection*. A SJP confere proteção pela síntese, modificação e compartimentalização de proteínas.

Hoshida et al. [22] foram os primeiros a demonstrar que o aumento do sistema de enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (MnSOD) poderiam estimular efeitos protetores tardios da isquemia em corações caninos. Os dois principais sistemas de enzimas antioxidantes do coração são a Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase, ambas estimuladas pelo uso de N-acetilcisteína, como descrito anteriormente.

Desde 1994, Baxter e Yellon [23] descrevem o estímulo de receptores de Adenosina 1 como o principal desencadeador da SJP e, em 1999, inferiram que o canal de K⁺ATP mediava os efeitos cardioprotetores da ativação dos receptores de Adenosina A₁. Esse fato apóia a teoria de que a liberação de RLO pela ativação dos canais de K⁺ATP sensíveis é um processo de cardioproteção que se inicia após 12 horas do estímulo e pode durar até 72 horas.

Os resultados da contratilidade do miocárdio no Grupo IV confirmam a hipótese que RLO são importantes no estímulo inicial da proteção do PC clássico. O período de proteção do condicionamento clássico é bastante curto, durando somente de uma a duas horas em animais anestesiados e é perdido ao redor de duas a quatro horas em estudos com coelhos acordados [24]. Takano et al. [25] demonstraram que a SJP do PC protege tanto contra o atordoamento do miocárdio como contra o infarto, e pode ser estimulada pelo uso de doadores de ON.

Se estamos procurando drogas que possam proteger o coração durante a anóxia cirúrgica, tais drogas necessitam incorporar também a segunda fase do mecanismo, que dura entre 12 e 72 horas. A SJP é um forte adjunto, pois poderá também proteger contra os eventos isquêmicos no período de pós-operatório.

O uso de dose mais alta de N-acetilcisteína, no presente

estudo, demonstrou não abolir a fase clássica do Precondicionamento Isquêmico, provavelmente em face do seu efeito sobre o incremento de ON, o qual deve baixar o limiar de proteção do PC. Tal efeito foi observado mesmo não sendo o ON um deflagrador direto do condicionamento precoce [20]. Entretanto, seus efeitos sobre a SJP podem ser enormes, não só pela liberação de ON, mas também pelo incremento de enzimas antioxidantes [25].

CONCLUSÃO

A utilização de apenas um ciclo de isquemia e reperfusão é eficaz para desencadear proteção miocárdica, PC, nesse modelo experimental.

A administração de 50µg/ml/min de N-acetilcisteína inibiu de forma significativa o mecanismo de condicionamento isquêmico estimulado por um ciclo de 5 minutos de isquemia e reperfusão.

A administração de 100µg/ml/min de N-acetilcisteína não alterou de forma significativa o estímulo do PI. Possivelmente, a dose dobrada de N-acetilcisteína compensou a inibição antioxidante do PC, pelos efeitos adjuntos de proteção endotelial, liberação de ON com diminuição do limiar do PC e estímulo de enzimas antioxidantes.

REFERÊNCIAS

1. Ko W, Krieger KH, Isom OW. A historical perspective to current review of myocardial protection in cardiac operation. *Surg Gynecol Obstet.* 1993;177(5):529-43.
2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-36.
3. Vaage J, Valen G. Preconditioning and cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(2):S709-14.
4. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Corvera JS, Morris CD, Budde JM, Thourani VH, et al. Adenosine in myocardial protection in on-pump and off-pump cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(2):S691-9.
5. Julier K, Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, et al. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology.* 2003;98(6):1315-27.
6. Morris SD, Yellon DM. Angiotensin-converting enzyme inhibitors potentiate preconditioning through bradykinin B2 receptor activation in human heart. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(7):1599-606.
7. Nakano A, Baines CP, Kim SO, Pelech SL, Downey JM, Cohen MV, et al. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res.* 2000;86(2):144-51.
8. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 1997; 81(6):1072-82.
9. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 2000;87(6):460-6.
10. Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res.* 2001;88(8):802-9.
11. Sochman J. Regional ischaemic and reperfusion injury, free oxygen radicals and the possible role of N-acetylcysteine in acute myocardial infarction. *Cor Vasa* 1994;36(6):269-79.
12. Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy E. A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ Res.* 1995; 77(2):424-9.
13. Oliveira DM, Abrantes R, Gomes ES, Gomes OM. Efeitos da N-acetilcisteína sobre o pré-condicionamento isquêmico do miocárdio: estudo comparativo da frequência cardíaca, fluxo coronariano e contratilidade miocárdica em corações isolados de ratos. *Revista da SOCERJ.* 2006;19(supl. A):7.
14. Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R. Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *Am J Cardiol.* 1994;73(6):2B-7B.
15. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(1):207-16.
16. Hsu BG, Yang FL, Lee RP, Peng TC, Harn HJ, Chen HI. N-acetylcysteine ameliorates lipopolysaccharide-induced organ damage in conscious rats. *J Biomed Sci.* 2004;11(2):152-62.
17. Delgado JL, Landeras J, Carbonell LF, Parilla JJ, Abad L, Quesada T, et al. Effect of N-acetylcysteine on vascular endothelium function in aorta from oophorectomized rats. *Gen Pharmacol.* 1999;32(1):23-7.
18. Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem.* 1996;271(31):18596-603.
19. Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV.

-
- Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(7):1159-67.
20. Bell RM, Yellon DM. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2001;52(2):274-80.
21. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res.* 1993;72(6):1293-9.
22. Hoshida S, Kuzuya T, Fuji H, Yamashita N, Oe H, Hori M, et al. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol.* 1993;264(1 Pt 2): H33-9.
23. Baxter GF, Yellon DM. ATP-sensitive K⁺ channels mediate the delayed cardioprotective effect of adenosine A1 receptor activation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(5):981-9.
24. Burckhardt B, Yang XM, Tsuchida A, Mullane KM, Downey JM, Cohen MV. Adenosine extends the window of protection afforded by ischaemic preconditioning in conscious rabbits. *Cardiovasc Res.* 1995;29(5):653-7.
25. Takano H, Tang XL, Qiu Y, Guo Y, French BA, Bolli R. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ Res.* 1998;83(1):73-84.