

Análise comparativa da reserva de glicogênio do miocárdio isquêmico de coelhos submetidos a cardioplegia hipotérmica ou normotérmica

Clovis CARBONE Jr.*, José E. S. ROSELINO**, João J. CARNEIRO*, Albert A. SADER*

RBCCV 44205-156

CARBONE Jr., C.; ROSELINO, J.E.S.; CARNEIRO, J.J.; SADER, A.A. - Análise comparativa da reserva de glicogênio do miocárdio isquêmico de coelhos submetidos a cardioplegia hipotérmica ou normotérmica. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 7(1):9-13, 1992.

RESUMO: Neste trabalho, a comparação da reserva de glicogênio é utilizada para entender as modificações na sensibilidade mitocondrial ao íon cálcio. Basicamente porque alterações mitocondriais que envolvam perda da atividade de fosforilação oxidativa provocam rápida utilização dos estoques de glicogênio. Nossos resultados sugerem que as alterações mitocondriais fazem parte do mecanismo de lesão isquêmica.

DESCRITORES: proteção miocárdica, cardioplegia; miocárdio, reserva de glicogênio.

INTRODUÇÃO

O conceito da hipotermia sistêmica como meio de proteção celular foi introduzido por BIGELOW *et alii*², em 1950; logo depois, em 1953, a hipotermia sistêmica foi utilizada com sucesso na primeira cirurgia cardíaca a céu aberto, com a finalidade de fechar uma comunicação interatrial¹³.

Com o advento da cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea¹⁰, os cirurgiões logo sentiram as dificuldades e os riscos de operar o coração que se contrai normalmente.

Em 1955, MELROSE *et alii*¹⁶ introduziram os conhecimentos adquiridos nos laboratórios de fisiologia, empregando o citrato de potássio para induzir a parada cardíaca intra-operatória. No entanto, a alta concentração usada e a elevada osmolaridade da

solução condenaram o método ao insucesso, motivo pelo qual ficou abandonado por mais de uma década.

Só em 1972, o trabalho de KIRCH *et alii*¹² estimulou a retomada da discussão sobre a proteção miocárdica pelo uso de substâncias químicas que pudessem proporcionar a parada cardíaca e, por conseqüência, a proteção miocárdica. A partir de então, surgiram numerosos trabalhos relacionados a composição, temperatura e modo de administração das soluções denominadas cardioplégicas^{3,8,9,12,21}.

Os vários tipos de soluções propostas e empregadas tinham, em comum, o íon potássio como agente de rápida parada cardíaca e a hipotermia como elemento redutor do metabolismo miocárdico e de suas necessidades energéticas.

Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

Recebido para publicação em 18 de Janeiro de 1992.

* Do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

** Do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Endereço para separatas: Clovis Carbone Jr. Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Campus Universitário. 14049 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Pretendia-se, com isso, propiciar ao miocárdio condições de sobrevivência e manutenção de sua integridade estrutural durante os períodos de isquemia.

A integridade da estrutura do miocárdio diz respeito, sobretudo, aos múltiplos fenômenos de membrana que ocorrem na célula viva, os quais são dependentes da disponibilidade energética.

Todo o esforço tem sido direcionado no sentido de manter a reserva energética do miocárdio, em níveis mais elevados possíveis. BUCKBERG^{4,5} e ROSENKRANZ¹⁸ introduziram a prática de aplicação de solução cardioplégica normotérmica, imediatamente antes da reperfusão, com a finalidade de melhor restabelecer os níveis de reserva energética, enquanto o coração permanece parado por mais alguns minutos.

Trabalhos mais recentes^{14,15} têm argüido o real valor da baixa temperatura das soluções cardioplégicas na preservação do miocárdio isquêmico. Indicadores clínicos têm sugerido que as soluções cardioplégicas normotérmicas, em determinadas circunstâncias, podem oferecer vantagens na recuperação pós-isquêmica do miocárdio.

Entre as alterações de membrana observadas na cardioplegia, nossos estudos anteriores (SANTOS¹⁹ e BARONI¹) mostraram um aumento da respiração basal da mitocôndria Ca^{++} dependente. Transições de membrana mitocondrial Ca^{++} dependente têm sido descritas⁷. A interpretação destes resultados seguiram duas linhas de raciocínio:

- 1) GUNTER & PFEIFFER¹¹ propuseram que seja um mecanismo de eliminação do Ca^{++} mitocondrial-fisiológico.
- 2) CROMPTON & COSTI⁷ concluíram que pode estar relacionado com a lesão de reperfusão-patológico.

As alterações no metabolismo oxidativo, mesmo com um mecanismo fisiológico de liberação do Ca^{++} mitocondrial, quando implicam em desacoplamento do processo de fosforilação oxidativa, ativam rapidamente a quebra das reservas anaeróbicas da célula. Assim, estudamos o comportamento do glicogênio do miocárdio e o conteúdo de cálcio mitocondrial, para averiguar se essa reserva energética e a concentração total de cálcio mitocondrial (CARBONE⁶) foram afetadas pelo mecanismo que provocou o aumento da sensibilidade ao Ca^{++} na respiração basal da mitocôndria.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com coelhos da espécie Nova Zelândia, com peso variando entre 2 e 3 kg. Os animais eram anestesiados com pento-

barbital sódico na dose de 30 mg/kg de peso corpóreo e, após fixar o animal na calha cirúrgica, iniciava-se a traqueostomia para assistência respiratória controlada através de um respirador Takaoka modelo 600 de pressão positiva intermitente. Em seguida, procedia-se à esternotomia mediana e, com dissecação fina e cuidadosa, expunham-se os grandes vasos e a artéria carótida direita. Esta é caracterizada com a introdução de um tubo de Polietileno que avança até a raiz da aorta, com a finalidade de perfundir as coronárias com solução de cardioplegia. O pericárdio era aberto longitudinalmente e as veias cava e aorta, expostas de tal modo que a artéria aorta podia ser pinçada distalmente à emergência do tronco branquiocefálico.

Em seguida, procedia-se à infusão de solução de cardioplegia assangüínea (solução fisiológica a 0,9% + cloreto de potássio a 30 mEq/l) na proporção de 5 ml/kg de peso corpóreo. O miocárdio foi submetido a diferentes tempos de isquemia: com 30, 45, 60 e 90 minutos, e seu respectivo controle, mantendo-se hipotermia (17°C) ou normotermia (37°C). Terminado o tempo de isquemia, o tecido era colocado imediatamente em gelo picado e dissecávamos uma porção do músculo cardíaco de igual quantidade (500 mg) para cada grupo e, então, era processada a dosagem de glicogênio pelo método de SJOGREEN *et alii*²⁰. Os valores de glicogênio foram expressos em % de peso úmido.

O íon cálcio foi quantificado pelo método de MITTNACHT *et alii*¹⁷, desenvolvido em 1979, que utiliza o princípio da espectrofotometria de emissão atômica. A leitura de emissão do íon cálcio foi quantificada com comprimento de onda de 422,7 nm e os valores expressos em nano moles por mg de proteína mitocondrial.

Os resultados foram representados pela média e erro padrão da média para cada amostra, o método estatístico empregado para analisar as diferenças entre as amostras foi o teste T de Student com um nível de significância de $p < 0,01$.

RESULTADOS

A Figura 1 demonstra níveis de glicogênio em miocárdio controle e cardioplégico com 30, 45, 60 e 90 minutos de isquemia mantidos em hipotermia e normotermia. No grupo controle, o nível de glicogênio foi de 0,71% de peso úmido e de 0,57% de peso úmido em 30 minutos de hipotermia; nas condições de hipotermia, o nível de glicogênio cai lentamente, de maneira que, até bem próximo aos 60 minutos (0,44% de peso úmido) de parada, seus valores estão próximos ao do grupo de 30 minutos; entretanto, ao compararmos os tempos de 60 e 90 minutos de

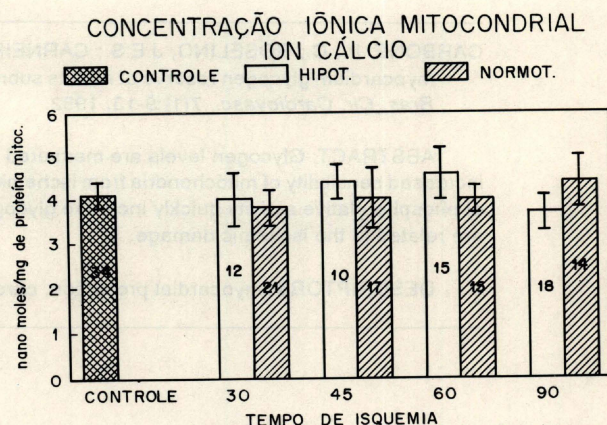
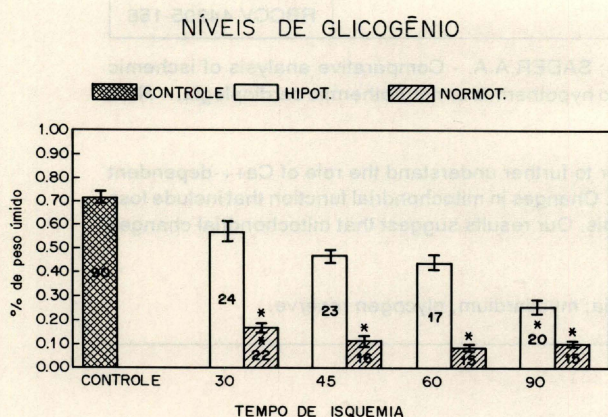


Fig. 1 — Análise do comportamento da reserva energética do miocárdio quando submetido a diferentes tempos de isquemia; mantidos em hipotermia (17°C) ou normotermia (37°C). O grupo controle foi processado imediatamente após a infusão da solução de cardioplegia assangüínea. A medida da concentração de glicogênio foi expressa em % de peso úmido, e o tempo de isquemia em minutos. Os resultados foram submetidos a análise estatística pelo teste T com nível de significância = *p<0,01.

Asteriscos dentro das colunas representam análise estatística de valores do mesmo grupo (hipotermia ou normotermia) e em relação ao grupo controle. Os asteriscos sobre as colunas representam nível de significância comparando-se grupos hipotermia e normotermia. As colunas representam a média dos valores e as barras verticais representam o erro padrão das médias. Os números dentro das barras representam o número de experimentos.

Fig. 2 — Concentração mitocondrial do íon cálcio em miocárdio de coelho submetido a diferentes tempos de isquemia hipotérmica (17°C) e normotérmica (37°C), e miocárdio controle que é processado imediatamente. Os valores foram expressos em nano moles/mg de proteína mitocondrial e o tempo de isquemia em minutos. As colunas representam a média dos valores e as barras verticais o erro padrão das médias.

Os resultados não mostram diferenças significativas pelo teste T a nível de p<0,01. Os números dentro das barras representam o número de experimentos.

(37°C). Não encontramos diferenças significativas entre as amostras (NS p<0,01).

parada hipotérmica, encontramos diferenças significativas (* p<0,01), demonstrando que, a longo prazo, o miocárdio terá suas reservas energéticas exauridas, mesmo que mantido em hipotermia. Por outro lado, ao analisarmos o miocárdio em condições de normotermia, observamos que já aos 30 minutos de isquemia ocorre uma diminuição de glicogênio para níveis quatro vezes menores em relação ao grupo controle (* p<0,01). No restante do tempo de isquemia, até os 90 minutos de parada, observamos que os níveis de glicogênio se mantêm constantes, porém com valores muito baixos e próximos a 0,10% de peso úmido. Ao compararmos a evolução da glicogenólise nos grupos hipotermia e normotermia, observamos diferenças importantes e significativas (* p<0,01).

A Figura 2 mostra o comportamento da concentração mitocondrial de cálcio do miocárdio de coelho, em relação ao tempo de isquemia para corações mantidos em hipotermia (17°C) ou em normotermia

COMENTÁRIOS

As diferenças observadas são compatíveis com aquelas devidas à diferença de temperatura nas duas condições. Isto é, a hipotermia desacelera a mobilização da reserva de glicogênio. Mas, em ambas as condições, os níveis de cálcio mitocondrial são idênticos, apesar de que apenas 30 minutos de isquemia normotérmica são suficientes para provocar a mesma transição Ca⁺⁺-dependente da membrana mitocondrial¹⁹. A não alteração do cálcio mitocondrial, mesmo em normotermia, indica que o mecanismo mais importante nessa organela é aquele que isola a mitocôndria com redução de sua permeabilidade aos íons em geral. Assim, nossos resultados indicam que essa transição diferencial a mitocôndria no momento da reperfusão, sendo, então, possivelmente responsável pelo mecanismo da lesão.

RBCCV 44205-156

CARBONE Jr., C.; ROSELINO, J.E.S.; CARNEIRO, J.J.; SADER, A.A. - Comparative analysis of ischemic myocardium glycogen reserve of rabbits submitted to hypothermic or normothermic cardioplegia. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 7(1):9-13, 1992.

ABSTRACT: Glycogen levels are measured in order to further understand the role of Ca⁺⁺-dependent increased sensibility of mitochondria from ischemic heart. Changes in mitochondrial function that include loss of phosphorylative activity quickly increase glycogenolysis. Our results suggest that mitochondrial changes are related to the ischemic damage.

DESCRIPTORS: myocardial protection, cardioplegia; myocardium, glycogen reserve.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BARONI, E.A. - *Alterações iniciais na competição do cálcio pelos sítios de ligação da safranina em mitocôndrias de miocárdio de coelho submetido a cardioplegia hipotérmica*. Ribeirão Preto, 1989. [Dissertação. Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo].
- 2 BIGELOW, W.G.; LINDSAY, W.K.; GREENWOOD, W.F. - Hypothermia. its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann. Surg.*, 132:849-860, 1950.
- 3 BRETSCHEIDER, H.J.; HÜBNER, G.; KNOLL, D.; LOHR, B.; NORDBECK, H.; SPIECKERMANN, P.G. - Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, 16:241-260, 1975.
- 4 BUCKBERG, G.D. - Recent advances in myocardial protection using antegrade/retrograde blood cardioplegia. *Eur. Heart J.*, 10 (Supl. H):43-48, 1989.
- 5 BUCKBERG, G. D. - Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid, and reverse ischemic and reperfusion damage. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 93:127-139, 1987.
- 6 CARBONE, C.J. - *Estudo das alterações metabólicas do miocárdio isquêmico de coelhos tratados por solução de cardioplegia*. Ribeirão Preto, 1991. [Dissertação. Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo].
- 7 CROMPTON, M. & COSTI, A. - Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca⁺⁺, inorganic phosphate and oxidative stress: a potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca⁺⁺ overload. *Eur. J. Biochem.*, 178:489-501, 1988.
- 8 FOLLETTE, D. M.; MULDER, D.G.; MALONEY Jr., J.V.; BUCKBERG, G.D. - Advantages of blood cardioplegia over continuous coronary perfusion or intermittent ischemia: experimental and clinical study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 76:604-619, 1978.
- 9 GAY Jr., W.A. & EBERT, P.A. - Functional, metabolic and morphologic effects of potassium - induced cardioplegia. *Surgery*, 74:284-290, 1973.
- 10 GIBBON Jr., J. H.; MILLER, B. J.; FINEBERG, C. - An improved mechanical heart and lung apparatus. *Med. Clin. N. Amer.*, 37:1603-1624, 1953.
- 11 GUNTER, T. E. & PFEIFFER, D. R. - Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.*, 258 (Cell Physiol. 27):C755-C786, 1990.
- 12 KIRSCH, U.; RODEWALD, G.; KALMAR, P. - Induced ischemia arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 63:121 - 130, 1972.
- 13 LEWIS, F.J. & TAUFIC, M. - Closure of atrial septal defects with the aid hypothermia: experimental accomplishments and the report of the one successful case. *Surgery*, 33:52-60, 1953.
- 14 LICHTENSTEIN, S.V.; ASHE, K.A.; DALATI, H.EL; CUSIMAND, R. J.; PASSOS, A.; SLUTSKEY, A. S. - Warm heart surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 101:269-274, 1991.
- 15 LICHTENSTEIN, S.V.; DALATI, H.EL; PANOS, A.; SLUTSKY, A. S. - Long cross-clamp time with warm heart surgery. *Lancet*, 1:24-26, 1989.
- 16 MELROSE, D. G.; DREYER, B.; BENTALL, H.H. & BAKER, J.B. - Eletive cardiac arrest. *Lancet*, 2:21-22, 1955.
- 17 MITTNACHT, S.; SHERMAN, S.C.; FARBER, J.L. - Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.*, 254:9871, 1979.
- 18 ROSENKRANZ, E.R.; OKAMOTO, F.; BUCKBERG, G.D.; JOHANSEN, J. V.; ALLEN, B. S.; LEAF, J.; BUGYI, H.; YOUNG, H.; BARNARD, R. J. - Studies of controlled reperfusion after ischemia. II. Biochemical studies: failure of tissue adenosine triphosphate levels to predict recovery of contractile function after controlled reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 92:488-501, 1986.

- 19 SANTOS, A. C. - *Alterações metabólicas do miocárdio isquêmico de coelhos submetidos a cardioplegia: função mitocondrial.* Ribeirão Preto, 1987. [Dissertação. Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo].
- 20 SJOGREEN, B.; NORDENSKJOLD, T.; HOLMGREN, H.; MULLERSTROM, J. - Beitrag zur Kentariss der Leberhythmik (glicogen, phosphos und calcium in der Kaninchendeber) *Arch. Ges. Physiol.*, 240:427, 1938.
- 21 TYERS, G.F.O.; HUGHES Jr., H.C.; TODD, G.J.; WILLIAMS, D. R.; ANDREWS, E. J.; PROPHET, G. S.; WALDHAUSEN, J. A. - Protection from ischemic cardiac arrest by coronary perfusion with cold Ringer's lactate solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 67:411-418, 1974.

REVISTA BRASILEIRA DE CIRURGIA CARDIOVASCULAR

SANTOS, A. C.; ROSELINO, J. E. S.; CARNEIRO, J. J.; SADER, A. A. - Análise comparativa da reserva de glicogênio do miocárdio isquêmico de coelhos submetidos a cardioplegia hipotérmica ou normotérmica. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 7(1):9-13, 1992.

RESUMO: A técnica de correção cirúrgica de estenose do canal arterial (PCA) com ligadura tripla por via extracavitária e espontânea. Após anestesia geral, a criança é posicionada em decúbito lateral direito, com o tórax inclinado para cima. É feita a incisão de acesso para o canal arterial, a partir da linha axilar anterior, com o paciente em posição de Trendelenburg. É feita a dissecação e ligado o ductus arteriosus com fio PDS nº 3/0 a um ponto vascularizado de 4,0 cm. É feita a ligadura tripla do canal arterial com fio PDS nº 3/0 a 1,0 cm de distância da primeira ligadura. De setembro de 1988 a agosto de 1989, foram operados 47 pacientes portadores de PCA. Destes, 46 foram submetidos à técnica. A idade variou de quatro meses a 11 anos com média de 2,1 ± 0,9 anos (Tabela I). Vinte e duas crianças eram sexo feminino e 16 do masculino. Vinte crianças (50%) tinham idade menor que um ano. Não foi relatada nenhuma intercorrência ou pós-operatória. Todas as crianças foram seguidas no pós-operatório com avaliação clínica, exames radiológicos de tórax e ecocardiográficos. Nenhum deles apresentou recidiva ou lesão do nervo torácico. A duração média da cirurgia foi de 103 minutos, com média de 19,3 meses. Em todas as crianças, a ligadura do canal arterial ocorreu ao nível e ao pós-operatório, não apresentando morbidade imediata ou tardia. Essa técnica deve ser utilizada como de escolha na correção da PCA, principalmente em crianças de baixa idade e peso.

DESCRITORES: correção de canal arterial, cirurgia

INTRODUÇÃO

O canal arterial, que patologicamente se abre após o parto, devido a alteração da produção de prostaglandina H₂ e a alteração da produção de prostaglandina I₂, pode ser a origem de várias doenças cardíacas. Sua etiologia é de natureza multifatorial, sendo a mais comum a presença de uma lesão congênita da parede do ductus arteriosus. Sua incidência é de 0,2% a 0,5% nos recém-nascidos, sendo mais frequente em crianças de baixo peso e em crianças com síndrome de Down. Seu fechamento espontâneo ocorre imediatamente após o nascimento, por contração muscular da

seu parede. Nos primeiros dias de vida, não é incomum um certo fluxo sanguíneo no canal, devido à produção de prostaglandina H₂ e à alteração da produção de prostaglandina I₂. A ausência de fechamento espontâneo do canal arterial leva a graves variações de hemodinâmica e hipertensão pulmonar. Essa patogenicidade é reconhecível por 12-24 das cardiopatias congênitas, com frequência pelo sexo feminino na proporção de 2:1. Apenas 2,0% dos casos estão relacionados a tubérculos congênitos.¹

Várias técnicas têm sido propostas, desde 1830,

Trabalho realizado no Instituto de Medicina de Moisés Gonçalves, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
Recebido para publicação em 30 de janeiro de 1992.
* Do Instituto de Medicina de Moisés Gonçalves.
Endereço para correspondência: José Luiz Verdes dos Santos, Instituto de Medicina de Moisés Gonçalves, Rua Duque Antônio, 341, 19013-000, Presidente Prudente, SP, Brasil.