

MELCHIOR LUIZ LIMA

**PROTEÇÃO MIOCÁRDICA COM INFUSÃO A 10°C E 20°C DAS
SOLUÇÕES KREBS-HENSELEIT, BRETSCHNEIDER-HTK, ST. THOMAS E
CELSIOR NA ISQUEMIA DE 2 HORAS A 20°C – ESTUDO COMPARATIVO
EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração em Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular (Parecer 576/91-CFE-MEC), Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis - ServCor.

Belo Horizonte

2011

MELCHIOR LUIZ LIMA

**PROTEÇÃO MIOCÁRDICA COM INFUSÃO A 10°C E 20°C DAS
SOLUÇÕES KREBS-HENSELEIT, BRETSCHNEIDER-HTK, ST. THOMAS E
CELSIOR NA ISQUEMIA DE 2 HORAS A 20°C – ESTUDO COMPARATIVO
EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Medicina, Área de
Concentração em Cardiologia e Cirurgia
Cardiovascular (Parecer 576/91-CFE-
MEC), Fundação Cardiovascular São
Francisco de Assis - ServCor.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Otoni Moreira Gomes

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Alfredo Inácio Fiorelli

Belo Horizonte

2011

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Maria da Penha Ramos Lima e Laercio Jorge Lima pelo amor sobejamente demonstrado, pelo esforço empreendido em toda minha formação com apoio incondicional.

À minha amada esposa Patricia Ribeiro do Val Lima, pelo companheirismo e constante incentivo em todas as fases de preparo deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Por tudo que tem feito e o que irá fazer, sou grato ao Deus Todo Poderoso, Criador dos Céus e da Terra, de onde emana a vida, o amor, a justiça, a misericórdia, o perdão, a benignidade e a Salvação por Cristo Jesus Nosso Senhor.

“Instrua o homem sábio, e ele será ainda mais sábio; ensine o homem justo, e ele aumentará o seu saber.”

Provérbios 9:9.

AGRADECIMENTOS

Aos meus dignos orientadores, Prof. Dr. Otoni Moreira Gomes e Prof. Dr. Alfredo Inácio Fiorelli, pelo apoio, amizade, atenção, motivação, cordialidade e pelas valiosas orientações oferecidas, sem as quais esta Tese não seria possível.

Aos distintos professores e colegas da pós-graduação, pelos constantes incentivos.

A Srta. Soraya Aparecida S. Ferreira, auxiliar de laboratório, e a todos os funcionários do ServCor que, de alguma forma, contribuíram para a realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Dalton Valentin Vassalo pelo apoio e orientação desde o início de minha formação acadêmica e orientação nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Henrique César de Almeida Maia a minha gratidão pelo auxílio na preparação da Tese, pelo apoio e pelas sugestões oferecidas.

Ao Dr. José Fernando Roberto Nunes por ter-me incentivado e caminhado junto nos estudos do curso de Pós-graduação, pelo apoio e pelas sugestões apresentadas durante a elaboração desta Tese.

A Dra. Hannelore Bucher pelo auxílio na revisão de conteúdo, pelas idéias e sugestões muito importantes para elaboração desta Tese.

Ao Prof. Clesito Fachine pelo apoio fundamental na elaboração do trabalho.

Aos meus queridos colegas do grupo cirúrgico Dr. Fábio José dos Reis, Dr. Fabrício Otávio Gaburro Teixeira, Dr. Sandro Aduino Martins, Dr. Flávio de Almeida Rosa, Dr. Heber Melo Souza Silva e Sra. Andrea Miozzi, pela amizade, companheirismo e suporte prestado.

RESUMO

Introdução: A disfunção ventricular após a parada cardíaca anóxica é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na cirurgia cardíaca. Os métodos de proteção miocárdica existentes ainda não são capazes de evitar os efeitos indesejáveis do fenômeno isquemia e reperfusão, e não apresentam resultados uniformes.

Objetivo: O presente trabalho tem como objetivo estudar comparativamente a eficiência da proteção miocárdica com o uso de soluções de Krebs-Henseleit, Bretschneider-HTK, St. Thomas e Celsior, infundidas a 10°C e 20°C, em preparações isoladas de coração de ratos quando submetidos a isquemia de 2 horas a 20°C.

Método: Foram isolados 64 corações de ratos albinos machos da raça Wistar e imediatamente submetidos à perfusão retrógrada pelo método de Langendorff modificado. Os corações foram distribuídos equitativamente de forma aleatória em oito grupos segundo a temperatura de infusão (A-10°C e B-20°C) e a solução cardioprotetora utilizada: Grupo A1 e B1 – Krebs-Henseleit (KHB); Grupo A2 e B2 – Bretschneider-HTK (HTK); Grupo A3 e B3 – St. Thomas (STH); Grupo A4 e B4 – Celsior (CEL). Após 15 minutos de perfusão com solução Krebs-Henseleit a 37°C para estabilização, foram coletados os valores considerados basais para os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), fluxo coronariano (FCo), e calculadas as velocidades máximas de elevação da pressão do ventrículo esquerdo positiva (+dP/dt) e negativa (-dP/dt). Os corações foram perfundidos com as respectivas soluções cardioprotetoras por 5 minutos, e mantidos por 2 h em isquemia estática a 20°C. Subsequentemente, os corações foram

reperfundidos a 37°C por 60 minutos e, a cada 5 minutos, as variáveis eleitas foram avaliadas. A análise estatística foi baseada na técnica de reamostragem *Bootstrap*, e submetida à análise de variância em blocos completamente casualizados (ANOVA *Two-Way*) e ao teste de *Tukey* de comparações múltiplas. O nível de significância eleito foi de $p < 0.05$.

Resultados: Em relação a FC, todas as soluções proveram preservação do sistema de condução cardíaca, porém tiveram resultados abaixo do valor basal desta variável, tanto a 10°C como a 20°C. Observou-se que, após 30 minutos de reperfusão, todas as soluções mantiveram-se estáveis, exceto a solução St. Thomas, na temperatura de 20°C, que apresentou frequência cardíaca acima do basal durante toda a reperfusão. A contratilidade miocárdica foi avaliada pelas variáveis: PSVE, +dP/dt e -dP/dt. Analisando-as de forma integrada, observa-se que os efeitos da isquemia e reperfusão sobre o miocárdio são extremamente deletérios, produzindo uma redução acentuada do desempenho ventricular. Observa-se que, aos 60 minutos de reperfusão, os menores índices de depressão foram com a solução Celsior como segue: 53% a 10°C e 38% a 20°C na PSVE; 52% a 10°C e 37% a 20°C da +dP/dt e 43% a 10°C e 28% a 20°C da -dP/dt. Quanto ao FCo, os resultados obtidos indicam que a solução Bretschneider-HTK a 10°C e a Celsior a 20°C foram as que produziram os valores de fluxo mais elevados, sendo aquelas que propiciaram melhores condições de proteção, contrárias ao desenvolvimento do edema tecidual, muito embora tenha mantido valores muito inferiores a aqueles encontrados na situação basal. O comportamento das demais soluções referentes ao quesito FCo resultou na seguinte ordem decrescente quanto à eficiência: a 10°C as soluções Celsior, Krebs-Henseleit e St. Thomas e a 20°C as

soluções Bretschneider-HTK, St. Thomas e Krebs-Henseleit, respectivamente.

Conclusão:

Considerando-se as limitações da presente investigação, os resultados aqui encontrados permitem concluir que: 1) As soluções de cardioplegia estudadas não foram capazes de coibir integralmente os efeitos deletérios da isquemia e reperfusão sobre o coração; 2) No presente estudo a temperatura de 20°C promoveu melhor proteção no coração isolado de rato comparado com 10°C e 3) A solução Celsior conferiu melhor resultado de proteção miocárdica para os corações isolados de ratos submetidos à isquemia com temperatura de 10°C, seguida das soluções Bretschneider-HTK, Krebs-Henseleit e St. Thomas. Na temperatura de 20°C, a solução Celsior continuou apresentando o melhor resultado, seguida das soluções Bretschneider-HTK, St. Thomas e Krebs-Henseleit.

Palavras-chave: Parada cardíaca induzida; isquemia miocárdica; lesão miocárdica de reperfusão; soluções cardioplégicas; hipotermia induzida; função ventricular esquerda; rato Wistar.

ABSTRACT

Background: Ventricular dysfunction in consequence of cardiac anoxic arrest is one of the main causes of disability and death in heart surgery procedures. Current methods of myocardial protection are still not able to avoid undesirable effects of ischemia-reperfusion phenomenon and do not present uniform results.

Objective: The purpose of this study is to study comparatively the efficacy of myocardial protection with the use of Krebs-Henseleit, Bretschneider-HTK, St. Thomas and Celsior solutions, administered at 10°C and 20°C, in prepared isolated rat hearts when submitted to 2 hours of prolonged anoxia at 20°C.

Method: Sixty-four Wistar breeding albinic male rat hearts were isolated and immediately submitted to retrograde infusion by modified Langendorff method. They were sorted out, in an equitable and aleatory process, into eight groups according to the perfusion temperature (A=10°C and B=20°C) and cardioplegic solution administered: groups A1 and B1 – Krebs-Henseleit solution (KHB) , groups A2 and B2 – Bretschneider-HTK solution, groups A3 and B3 – St. Thomas solution (STH) and groups A4 and B4 – Celsior solution (CEL). After a 15 minutes of stabilization with Krebs-Henseleit solution at 37°C, basal data of the following parameters were recorded: heart rate (HR), left ventricular systolic pressure (LVSP), coronary flow (CF), and positive and negative rate of pressure development $(+dP/dt)_{max}$ (or peak rate of left ventricular systolic pressure increase) and $(-dP/dt)_{max}$ (or peak rate of the left ventricular diastolic pressure decrease) were calculated. All of the hearts were infused with the respective cardioplegic solution during 5 minutes. Afterward they were submitted to two hours of cold static ischemia and stored at 20°C, and a subsequent

60-minute period of reperfusion at 37°C. At intervals of 5 minutes, the elected parameters were considered. Statistic analysis was based on Bootstrap technique and submitted to analysis of variance in completely randomized blocks (ANOVA Two-Way) and Tukey's multiple comparison tests. The elected significance level was $p < 0.05$.

Results: Concerning to HF all solutions resulted in cardiac conduction system preservation, but presented scores below basal values of this variable, at 10°C as much as 20°C. Thirty minutes after reperfusion all solutions kept stability, with the exception of St. Thomas solution at 20°C which presented heart rate above basal values during the whole reperfusion period. Myocardial contractility was evaluated by the following variables: LVSP, +dP/dt and -dP/dt. By analysing these parameters in an integrated focus causes us to conclude that reperfusion and ischemia effects on the myocardial are extremely deleterious resulting marked reduction of ventricular performance. At 60 minutes of reperfusion the lower rates of depression were presented by Celsior solution as follows: LVSP = 53% at 10°C and 38% at 20°C; +dP/dt = 52% at 10°C and 37% at 20°C; and -dP/dt = 43% at 10°C and 28% at 20°C. Regarding CF, the obtained results suggest that Bretschneider-HTK solution at 10°C and Celsior solution at 20°C resulted higher flow rates, being the ones that propitiated better conditions of protection, contrary to the development of tissue edema, even with the maintenance of much lower values than those found in basal situation. About all the others tested cardioplegic solutions in connection with CF parameter resulted the following decreasing order of efficiency: at 10°C, Celsior, Krebs-Henseleit and St. Thomas solutions, and at 20°C, Bretschneider-HTK, St. Thomas e Krebs-Henseleit,

respectively.

Conclusion: Considering the limitations of the current investigation, the results that were found allow us to conclude the following: 1) Cardioplegic solutions evaluated in this study are not able to avoid deleterious effects of ischemia-reperfusion phenomenon on the heart; 2) In the present study the perfusion temperature of 20°C provided better protection of the isolated heart rat when compared to 10°C; and 3) Celsior solution showed better myocardial protection response in isolated rat hearts submitted to cold static ischemia at 10°C, followed by the Bretschneider-HTK, Krebs-Henseleit and St. Thomas solutions. At perfusion temperature of 20°C, the Celsior solution still presented the best result, followed by Bretschneider-HTK, St. Thomas and Krebs-Henseleit solutions.

Keywords: induced heart arrest; myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; cardioplegic solutions; induced hypothermia; left ventricular function; rat, Wistar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo intracelular proposto da regulação do Ca^{++}	34
Figura 2 – Classificação das lesões anóxicas do miocárdio humano	60
Figura 3 – Desenho esquemático do preparo da aorta.	69
Figura 4 – Fotografia do preparo da aorta utilizando a técnica dos três fios.	69
Figura 5 – Fotografia do preparo da aorta.....	70
Figura 6 – Fotografia da descompressão das câmaras esquerdas.....	70
Figura 7 – Diagrama do sistema de estudo do coração isolado.	72
Figura 8 – Fotografia do coração isolado de rato.....	73
Figura 9 – Protocolo dos grupos estudados A e B para 10°C e 20°C	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Razão da frequência cardíaca, segundo a solução e a temperatura.....	82
Gráfico 2 – Razão da pressão sistólica, segundo a solução e a temperatura.....	84
Gráfico 3 – Razão da (+dP/dt), segundo a solução e a temperatura.....	85
Gráfico 4 – Razão da (-dP/dt), segundo a solução e a temperatura	86
Gráfico 5 – Razão do fluxo coronariano, segundo a solução e a temperatura	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação proposta de lesão celular miocárdica em função progressiva de intensidade	58
Tabela 2 – Grau de lesão miocárdica* em função do tempo de isquemia.	59
Tabela 3 – Estado do miocárdio com lesão isquêmica em relação à classificação proposta na Tabela 1.	59
Tabela 4 – Lesão miocárdica isquêmica em função da regeneração.....	60
Tabela 5 - Medidas descritivas do peso, tamanho do coração e diâmetro do ventrículo de acordo com a temperatura e a solução utilizada	80
Tabela 6 – Desempenho das soluções: variáveis correspondentes hemodinâmicas, segundo a temperatura (cálculos estatísticos na tabela 17 anexo I).....	81
Tabela 7– Desempenho das soluções: razão da frequência cardíaca (cálculos estatísticos na tabela 18 anexo I)	82
Tabela 8 – Desempenho das soluções: razão da pressão sistólica (cálculos estatísticos na tabela 19 anexo)	83
Tabela 9 – Desempenho das soluções: razão da (+dP/dt) (cálculos estatísticos na tabela 20 anexo 1).....	84
Tabela 10 – Desempenho das soluções: razão da (-dP/dt) (cálculos estatísticos na	

tabela 21 anexo 1).....	86
Tabela 11 – Desempenho das soluções: razão do fluxo coronariano (cálculos estatísticos na tabela 22 anexo 1).....	87
Tabela 13 – Composição da solução de Krebs-Henseleit*	132
Tabela 14 – Composição da solução Cardioplégica de Bretschneider-HTK (Custodiol®)*	132
Tabela 15 – Composição da Solução Cardioplégica St. Thomas*	133
Tabela 16– Composição da Solução Cardioplégica Celsior*	133
Tabela 17 – Teste Tukey: variáveis correspondentes hemodinâmicas, segundo a temperatura e a solução.....	134
Tabela 18 - Teste Tukey: razão da frequência cardíaca	134
Tabela 19 - Teste Tukey: razão da pressão sistólica	135
Tabela 20 - Teste Tukey: razão da (+dP/dt).....	135
Tabela 21 - Teste Tukey: razão da (-dP/dt).....	136
Tabela 22 - Teste Tukey: razão do fluxo coronariano	136

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ADP – difosfato de adenosina
- ANOVA – análise de variância entre grupos
- Apaf – fator de ativação da protease apoptótica
- ATP – trifosfato de adenosina
- ATPase – enzima que cataliza a hidrólise do ATP para originar ADP
- Bax – proteína pró-apoptose
- Bcl-2 – proteína antiapoptose
- bpm – batimentos por minuto
- CEL – solução Celsior
- CV – coeficiente de variação
- DAG – diacilglicerol
- DNA – *deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)*
- (-dP/dt) – primeira derivada temporal negativa da pressão ventricular esquerda
- (+dP/dt) – primeira derivada temporal positiva da pressão ventricular esquerda
- FC – frequência cardíaca
- FCo – fluxo coronariano
- FKBP – proteína estabilizadora citosólica
- G – proteína G
- HTK – solução Bretschneider-HTK (histidina-triptofano-cetogluturato)
- IP3 – trifosfato de inositol
- KHB – solução Krebs-Henseleit tamponada (*buffer*)

MVO₂ – consumo de oxigênio no miocárdio

ONS – óxido nítrico sintase

ONOO⁻ – peroxinitrito

Pd₂ – pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PKC – proteinaquinase C

PLC – fosfolipase C

PS – fosfatidil serina

PSVE – pressão sistólica do ventrículo esquerdo

R – receptor

RS – retículo sarcoplasmático

RyR – receptor rianodina

SERCA – bombas de Ca⁺⁺ do retículo sarcoendoplasmático

STH – solução St. Thomas (tipo I)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
1.1 Aspectos Históricos	22
1.2 Mecanismo fisiológico da isquemia e reperfusão	30
1.2.1 <i>Contratilidade</i>	35
1.2.2 <i>Hibernação</i>	35
1.2.3 <i>Atordoamento</i>	37
1.2.4 <i>Contratura</i>	39
1.2.5 <i>Hipercontratura</i>	40
1.2.6 <i>Morte celular</i>	42
1.3 Mecanismos de proteção miocárdica	44
1.3.1 <i>Soluções cardioplégicas cristaloides</i>	45
1.3.2 <i>Papel da temperatura na proteção miocárdica</i>	50
1.3.3 <i>Aspectos fisiológicas da hipotermia</i>	51
1.4 Considerações sobre as lesões ultraestruturais na isquemia miocárdica	57
1.5 Outras considerações sobre a hipotermia	61
OBJETIVO	64
MÉTODO	66
2.1 Animais estudados	67
2.2 Anestesia e técnica operatória	67
2.3 Grupos constituídos	73
2.4 Variáveis estudadas	74
2.4.1 <i>Frequência cardíaca</i>	74
2.4.2 <i>Pressão intraventricular e pressão arterial sistólica</i>	76
2.4.3 <i>Velocidade máxima de elevação da pressão ventricular esquerda (+dP/dt)</i>	76
2.4.4 <i>Velocidade máxima de queda da pressão ventricular esquerda (-dP/dt)</i>	76
2.4.5 <i>Fluxo coronariano</i>	77
2.5 Análise estatística	77
RESULTADOS	78
3.1 Análise Descritiva	79
3.2 Análise Inferencial	79

DISCUSSÃO.....	89
4.1 Considerações gerais.....	90
4.2 Análise do papel da hipotermia	92
4.3 Análise crítica da composição iônica das soluções cardioplégicas	93
4.4 Análise do desenho do modelo experimental	101
4.5 Análise do projeto piloto da pesquisa	105
4.6 Análise das variáveis hemodinâmicas eleitas na pesquisa.....	107
4.6.1 <i>Análise da frequência cardíaca</i>	107
4.6.2 <i>Análise da pressão sistólica do ventrículo esquerdo</i>	109
4.6.3 <i>Análise da +dP/dt</i>	112
4.6.4 <i>Análise da -dP/dt</i>	114
4.6.5 <i>Análise integrada das variáveis de contratilidade miocárdica</i>	116
4.6.6 <i>Análise crítica do fluxo coronariano</i>	117
4.7 Análise crítica do método estatístico	120
4.8 Considerações finais	122
4.9 Limitações do estudo	127
CONCLUSÕES.....	129
ANEXO	131
4.10 Composição das soluções	132
4.11 Tabelas de cálculo estatístico.....	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

INTRODUÇÃO

O termo proteção miocárdica refere-se às estratégias usadas para atenuar ou prevenir a disfunção miocárdica pós-isquêmica que pode ocorrer durante e após cirurgia cardíaca. Técnicas de preservação miocárdica tem revolucionado a cirurgia cardíaca, mas refinamentos continuados na prática clínica da proteção miocárdica são necessários para otimizar a função cardíaca pós-operatória.

A disfunção ventricular após cirurgia cardíaca, pelo comprometimento do músculo cardíaco (lesão) provocado pelo fenômeno da isquemia e reperfusão, é bem observada em pacientes que apresentam sintomas de insuficiência cardíaca aguda e arritmias malignas, mesmo quando ocorre rápida restauração da perfusão. A lesão miocárdica após isquemia e reperfusão pode ocorrer em diversas situações como: trombólise, angioplastia coronariana percutânea e após períodos de parada cardíaca isquêmica durante a cirurgia do coração. Atualmente a parada cardioplégica é utilizada na cirurgia cardíaca, especialmente no transplante do coração, objetivando proteger o miocárdio dos problemas consequentes da isquemia. A lesão do músculo cardíaco tanto pode ser reversível como irreversível. O dano reversível, sob perspectiva clínica, possibilita a recuperação de pacientes de alto risco, em choque cardiogênico, pela função cardíaca gravemente comprometida. O dano irreversível pode gerar a insuficiência cardíaca crônica, que geralmente evolui com alta mortalidade, a despeito

dos modernos tratamentos.

1.1 Aspectos Históricos

O surgimento do éter e do clorofórmio na metade do século XIX, para anestesia geral, possibilitou o desenvolvimento das grandes cirurgias. Em 1818, Heberden¹ estabeleceu o termo “angina pectoris”. Hammer², em 1876, diagnosticou o primeiro infarto do miocárdio. Billroth³, em 1882, e Paget³, em 1886, consideraram o coração como órgão impossível de ser submetido à cirurgia. Porém, Williams⁴, em 1893, realizou inspeção no coração ferido por arma branca que no momento não sangrava e realizou sutura de vaso pericárdico com sangramento. Del Vecchio⁵, em 1895, realizou sutura de ferimento cardíaco, reportado durante Congresso em Roma e Rehn⁶, em 1896, na cidade de Frankfurt – Alemanha, realizou com sucesso a primeira sutura de lesão no ventrículo direito, transpondo a barreira estabelecida sobre cirurgia do coração. Em 1902, Carrel⁷ publicou no *Lyons Medical* a técnica para anastomose término-terminal em vasos sanguíneos. Em 1910, este médico reportou uma série surpreendente de experimentos que constituíram as formas mais atuais da época para pontes e interposições de vasos na artéria coronária. Nestes experimentos foi anastomosada a artéria inominada de um cão para uma artéria coronária distal de outro

cão. Carrel realizou também experimentos de ponte coronariana, suturando um segmento livre de artéria carótida entre a aorta torácica descendente e a coronária esquerda no mesmo cão⁸. Estes procedimentos foram os antecessores das técnicas com artérias torácicas internas, como usado atualmente. Também realizou, experimentalmente, as primeiras interposições de segmentos de veias em aortas seccionadas⁹. Estes trabalhos foram precursores dos atuais procedimentos de revascularização com veia safena. Os trabalhos em transplante e enxertos vasculares de Carrel foram considerados tão importantes no mundo científico que lhe valeram a outorga do Premio Nobel de Medicina em 1912, além de ser o primeiro a ser homenageado por pesquisas médicas nos EUA. Em 1925, Souttar, cirurgião inglês, realizou com sucesso uma valvulotomia mitral usando seu dedo para abrir a comissura valvar mitral em um paciente jovem do sexo feminino¹⁰. Forssmann realizou o primeiro procedimento de cateterização do coração direito e publicou no *Klirische Wochenschrift*¹¹, em 1929. Em 1937, Gibbon¹² demonstrou experimentalmente a possibilidade de realização de cirurgia cardíaca com auxílio da circulação extracorpórea. Em 1938, Gross realizou a ligadura de um ducto arterioso patente¹³. Em 1943, Zerbini¹⁴ realizou com sucesso a primeira sutura da artéria descendente anterior em criança vítima de ferimento penetrante torácico. Em 1944, Crafoord, na cidade de Stockolmo, na Suécia, ressecou com sucesso uma coarctação da aorta¹⁵. Em 1944, o

cirurgião Blalock realizou com sucesso uma derivação sistêmico-pulmonar para tratamento de uma paciente de 15 meses com diagnóstico clínico de tetralogia de Fallot, com estenose pulmonar grave, feito pela Dra. Ellen Taussig¹⁶. Em 1948, Arthur Domingues Pinto¹⁷, realizou no Brasil a cirurgia de Blalock-Taussig, e, em 1950, a primeira coarctação da aorta da América do Sul. Em 1949, Bailey^{18, 19} publicou artigo sobre cirurgia para estenose mitral por valvulotomia. Trabalhando no mesmo objetivo, Harken e Smithy desenvolveram experiência clínica através da valvulotomia^{20, 21}.

Em 1951, Dogliotti e Constantini²², empregaram a circulação extracorpórea pela primeira vez em humanos durante a ressecção de um tumor de mediastino. Em 1951, Dennis et al.²³ utilizaram a circulação extracorpórea com hipotermia de superfície na correção de comunicação interatrial de uma criança de seis anos, porém a paciente não sobreviveu. Todavia, a circulação extracorpórea adquiriu seu real destaque quando em 06 de maio de 1953, Gibbon²⁴ empregou com êxito esse método corrigindo uma comunicação interatrial em uma paciente de 18 anos. Em 1956, o brasileiro Hugo Felipozzi²⁵ iniciou na América do Sul a era da cirurgia cardíaca sob visão direta com circulação e oxigenação extracorpóreas e com a utilização da bomba coração-pulmão equipada com oxigenador de discos modelo Kay-Cross adaptado e montado nas oficinas de uma fábrica de cigarros.

Historicamente, um dos maiores impactos para o desenvolvimento da cirurgia cardíaca foi a evolução dos métodos de proteção miocárdica. Inicialmente, as operações cardíacas estavam limitadas às correções mais simples e eram realizadas com o coração batendo. Bigelow et al., em 1950, em estudo animal, com resfriamento de superfície, estabeleceram a base conceitual da proteção miocárdica quando evidenciaram a redução da demanda de oxigênio pela hipotermia²⁶. Boerema et al., em 1951, publicaram estudos experimentais com hipotermia através de derivação fêmoro-femoral²⁷. Em 1953, Lewis e Taufic, reportaram sucesso na correção de defeito do septo atrial utilizando resfriamento de superfície²⁸. No mesmo ano, Swan et al. relataram uma série de pacientes tratados com sucesso pela mesma técnica²⁹. Em 1954, Lillehei realizou com sucesso a primeira circulação cruzada em ser humano³⁰. Em 1955, Melrose et al., descreveram a parada cardíaca eletromecânica induzida ao se infundir altas dosagens de citrato de K⁺ na aorta ascendente³¹. Logo se iniciou a utilização clínica dessas duas técnicas, mas, estudos subsequentes mostraram os efeitos deletérios da alta concentração de potássio. Houve então interesse de se pesquisar soluções cardioplégicas apropriadas. Em 1958, Lillehei realizou com sucesso valvuloplastia aórtica e mitral com circulação extracorpórea³². Sealy et al.³³, em 1958, utilizaram a hipotermia combinada com a circulação extracorpórea³³. Em 1959, Drew e col.³⁴, em estudos experimentais, utilizaram circulação extracorpórea com ventilação

assistida, com hipotermia e parada circulatória a 15°C³⁵. A seguir iniciou-se a utilização de hipotermia seletiva tópica por Urschel et al.³⁶, e Shammway e Lower, em 1959, adicionando solução salina fria ao saco pericárdico, estabeleceram as bases da proteção miocárdica durante 90 min de pinçamento³⁷. Guiot et al.³⁸, e Weiss et al.³⁹, em 1960, publicaram uso da hipotermia e parada circulatória na prática clínica. Em 1961, Kirklin et al.⁴⁰, na Mayo Clinic, relataram parada circulatória hipotérmica em 52 pacientes, utilizando a técnica de Drew em 23 pacientes e oxigenador em 29 pacientes. Em 1963, Horiuchi et al.⁴¹, da Univerdade de Tohoku, usaram hipotermia de superfície a 20°C e parada circulatória para correção de defeito septal ventricular em crianças. Barnard e Schrire⁴², em 1963, utilizaram parada circulatória hipotérmica com circulação extracorpórea em adultos. Jatene⁴³, em 1963, aperfeiçoou a técnica de hipotermia seletiva com bons resultados. Dillard et al.⁴⁴, em 1967, modificou esta técnica para permitir parada circulatória por 60 minutos utilizando hipotermia de superfície de 17°C e a 20°C. Os primeiros a descreverem os danos do miocárdio em pacientes que não sobreviveram ao procedimento cirúrgico por depressão miocárdica foram Morales et al.⁴⁵, em 1967, evidenciando 30% de áreas de necrose e cicatrizações. A hipótese de as lesões serem provocadas por desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio foi apresentada por Najafi et al.⁴⁶, em 1969, que mostraram infarto subendocárdico difuso em pacientes que não sobreviveram à

cirurgia. Moraes, em 1969 e Jaskik, em 1970, pioneiramente, propuseram e sistematizaram através de estudos clínicos e experimentais, o emprego da técnica de cardioplegia retrógrada atrial, também designada como cardioplegia retrógrada total.

Barratt-Boyes et al.⁴⁷, em 1971, na Nova Zelândia, reportaram reparos de malformação cardíaca em crianças pesando menos de 10kg, usando resfriamento de superfície de 22 a 27°C. Em 1973, Hamilton et al.⁴⁸, utilizaram parada circulatória hipotérmica em crianças usando somente circulação extracorpórea para o resfriamento. Cooley et al.^{49, 50}, em 1972, empregaram o pinçamento da raiz da aorta para induzir parada cardíaca anóxica em normotermia. Contudo, pesquisas evidenciaram que a isquemia cardíaca normotérmica estava associada à acidose metabólica, hipotensão e ao baixo débito cardíaco. A parada cardíaca química para proteção miocárdica sem a associação de necrose, como na solução de Melrose, foi alcançada por Gay e Ebert⁵¹, em 1973, com baixas concentrações de K⁺. Em 1975, Bretschneider et al.⁵² iniciaram a utilização de cardioplegia com baixa concentração de Na⁺ e ausência de Ca⁺⁺. Aprimorando estudos prévios com soluções cardioplégicas, Hearse et al.⁵³, em 1976, desenvolveram um modelo de solução que foi introduzida por Braimbridge et al.⁵⁴ no Saint Thomas Hospital, em 1977, onde ficou conhecida como solução St.Thomas. Follete et al.⁵⁵, em 1978, empregaram solução cardioplégica cristalóide enriquecida

com sangue, obtendo resultados consistentes. Nos anos 1980, Follete et al. e Buckberg aprimoram a cardioplegia sanguínea, destacando-se sua maior capacidade de tamponamento e transporte de oxigênio^{55, 56}.

Mudança de paradigma adveio do método proposto por Braile et al.⁵⁷, em 1989, pelo emprego de cardioplegia sanguínea normotérmica, e Salerno et al.⁵⁸, em 1991, com a técnica de cardioplegia retrógrada aquecida. A partir de 1982, com o trabalho de Menasché et al.⁵⁹, e subsequentemente, Buckberg et al.⁶⁰, Drinkwater et al.⁶¹, Salerno et al.⁵⁸, Partington et al.⁶² e Gomes et al.⁶³, as aplicações clínicas da cardioplegia retrógrada puderam ser feitas pelo seio coronariano. A eficácia clínica da cardioplegia retrógrada atrial foi confirmada tanto por Fabiani et al., em 1986, como também por Paes-Leme et al.⁶⁴, em 1997. Desde a sua aplicação clínica pioneira até seu uso mais recente, a técnica de cardioplegia retrógrada atrial pressupõe a dissecação do tronco da artéria pulmonar para sua adequada oclusão, ou, o pinçamento em bloco da aorta e pulmonar. Neste caso não é possível descomprimir as câmaras direitas isoladamente. Gomes e Gomes⁶⁵ consideraram que esse inconveniente pode ser evitado com a oclusão do tronco pulmonar de modo simples e menos traumático, pela passagem de fita cardíaca pelo seio transversal do pericárdio. As extremidades da fita, atravessando tubo de látex, formam um torniquete que permite a oclusão da artéria

pulmonar, sem necessidade de sua dissecação na contiguidade com a aorta ascendente.

Estudos experimentais de Gomes et al.⁶⁶, em 1976, mostraram perfusão plena e homogênea do miocárdio com técnica de perfusão retrógrada sequencial, realizando-se a perfusão do seio coronário e, em sequência, a do átrio direito, como na retrógrada atrial total. Isto se mostrou importante porque a perfusão apenas pelo seio coronário mostra padrão angiográfico heterogêneo na extensão da massa ventricular, não abrangendo a área correspondente ao fluxo coronariano escoado pelas veias mínimas atriais e ventriculares. Estudos avançados realizados por Bhayana et al.⁶⁷, em 1989, e Tian et al.⁶⁸, em 1998, demonstram a segurança e os benefícios da perfusão coronária.

Pouco ainda se conhece a respeito dos mecanismos intrínsecos envolvidos no fenômeno isquemia e reperfusão assim como as formas mais adequadas de sua proteção, apesar dos variados estudos sobre o tema, constantes da literatura médica mundial. Muitos aspectos e ideias a respeito dos mecanismos envolvidos têm sido testados, tanto em experimentos como em ensaios clínicos, com resultados conflitantes. A proteção miocárdica continua a representar um grande desafio.

Diferentes fatores determinam a extensão do dano ao cardiomiócito, a saber: tempo de isquemia, temperatura, concentração de substrato energético na solução

cardioprotetora, bem como a intensidade individual da resposta inflamatória. A reperfusão, necessária à sobrevivência do tecido, é seguida, inevitavelmente, de graus variáveis de lesão celular pós-isquêmica. A lesão de isquemia e reperfusão é um fenômeno complexo que pode culminar com a morte do cardiomiócito.

Objetivando melhorar o entendimento dos principais aspectos envolvidos nas lesões celulares devido ao fenômeno da isquemia e reperfusão no escopo do presente trabalho, tornaram-se necessárias algumas considerações básicas, expostas a seguir.

1.2 Mecanismo fisiológico da isquemia e reperfusão

Para ocorrer a contração, as células musculares cardíacas requerem tanto cálcio extracelular como íon sódio. Tal como no músculo esquelético, a iniciação e o término do potencial de ação no cardiomiócito é derivado da entrada do Na^+ através do sarcolema em circuito fechado de resposta positiva retroalimentado. Entretanto, o influxo do Ca^{++} extracelular através dos canais de Ca^{++} tipo L (LTCC), também conhecidos como receptores dihidropiridina (DHP), sustenta a despolarização do cardiomiócito para longa duração. A liberação de Ca^{++} induzida por cálcio do retículo sarcoplasmático ocorre sob acoplamento excitação-contração normal. Uma vez aumentada a concentração do Ca^{++} intracelular, ocorre ligação com a troponina, a qual

inicia a contração através das proteínas contráteis, actina e miosina, associada em formação de ponte cruzada. Os íons Ca^{++} são armazenados dentro do retículo sarcoendoplasmático. Seu efluxo é regulado via receptor de rianodina (RyR), principalmente a tipo 2 (RyR2), e sua função é dependente das proteínas estabilizadoras localizadas no citosol (FKBP12 e FKBP12.6). Este complexo permite o funcionamento correto dos canais iônicos^{69, 70}. A liberação de Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático é regulada, normalmente, pela absorção do Ca^{++} citosólico por meio das bombas de Ca^{++} do retículo sarcoendoplasmático (SERCA). Simultaneamente, inicia-se uma efusão de Ca^{++} do citosol pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX). A reabsorção das bombas SERCA é regulada pelo fosfolambano (PLB, também conhecido na literatura abreviadamente por PLN), o qual, em um estado desfosforilado, inibe a atividade da SERCA e, conseqüentemente, resulta em sobrecarga do Ca^{++} intracelular^{69, 71, 72}.

A diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo ao miocárdio implica na limitação ou cessação da oferta de oxigênio e substratos metabólicos aos cardiomiócitos, com conseqüentes alterações funcionais, estruturais e metabólicas. O desvio do metabolismo celular de aerobiose para anaerobiose leva ao acúmulo de íons e metabólitos intracelulares. A isquemia promove rápida depleção das reservas

celulares de adenosina trifosfato (ATP) e fosfato de creatina, levando à depressão da função contrátil e das bombas iônicas dependentes de ATP⁷³. O acúmulo de Ca^{++} e Na^+ no citosol, com concomitante perda do K^+ para o meio extracelular, afeta o potencial de membrana e o gradiente iônico transmembrana. Estas alterações levam ao acúmulo de metabólitos, à acidose celular, ao aumento da carga osmótica, à formação de espécies reativas de oxigênio e, finalmente, à ativação de enzimas sensíveis ao Ca^{++} . Em sequência, alterações morfológicas podem começar a ocorrer. As proteases ativadas, sobretudo pelo súbito aumento da concentração de Ca^{++} e dos radicais livres, degradam as proteínas miofibrilares do citoesqueleto celular, enquanto as lipases desestruturam as membranas, provocando sua ruptura e a morte celular⁷⁴. O retorno do oxigênio e nutrientes faz com que o Ca^{++} citosólico, já em valores elevados durante a isquemia, aumente ainda mais com a reperfusão, em virtude da entrada adicional desse íon pelos canais de Ca^{++} voltagem dependentes. Além desses canais, o Ca^{++} também aumenta no citosol, penetrando através do sarcolema pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ e também pela liberação do Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático^{75, 76}. Assim, com a perda do controle sobre a coordenação dos mecanismos intracelulares, surgem as arritmias de reperfusão, cujo mecanismo está relacionado com as oscilações transitórias do Ca^{++} intracelular e a estimulação do ciclo do ácido tricarbóxico^{77, 78}. Finalmente, em decorrência das lesões mitocondriais, com sobrecarga de Ca^{++} e bloqueio respiratório

celular, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio causadores da lipoperoxidação do sarcolema. Portanto, durante a isquemia seguida de reperfusão, os cardiomiócito são expostos a uma sequência de eventos deletérios e adaptativos que podem ser divididos, do ponto de vista didático, em dois componentes, assim denominados: lesão de isquemia e lesão de reperfusão.

Estudo experimental sugere que o dano causado pela reperfusão é proporcional a aquele causado pela isquemia⁷⁹. Sendo assim, os protocolos de tratamento que visam aliviar o componente isquêmico da lesão de reperfusão, representados pela adenosina, bloqueadores dos canais de Ca^{++} e agonistas dos canais de K^+ ATP dependentes, irão, indiretamente, reduzir o dano causado por esses componentes também durante a reperfusão. Além disso, o comprometimento do miocárdio não é homogêneo em toda a sua extensão, com áreas de maior ou menor acometimento, dependendo da duração e da intensidade da isquemia ou de ambos. Dessa forma, é possível encontrar cardiomiócitos com diferentes estados de danos reversíveis e irreversíveis⁷⁹.

A Figura 1 mostra esquematicamente os principais mecanismos intracelulares envolvidos na lesão que o cardiomiócito sofre sob isquemia e reperfusão.

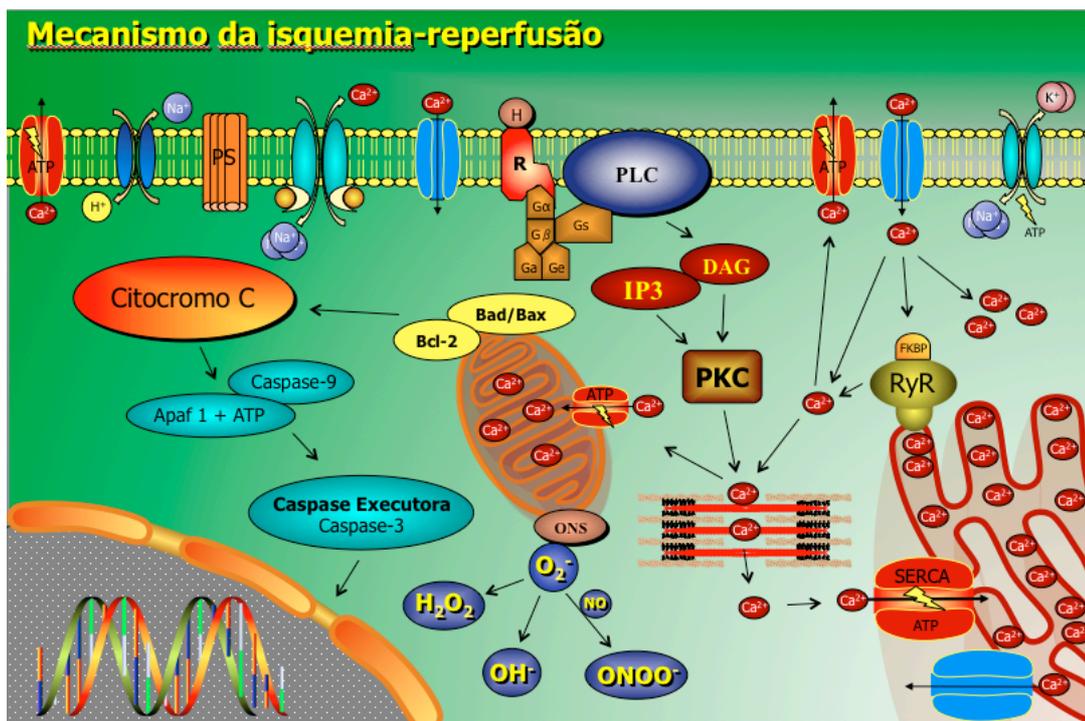


Figura 1 – Mecanismo intracelular proposto da regulação do Ca^{++} . Nota-se também a formação de espécies reativas de oxigênio e apoptose do cardiomiócito em isquemia e reperfusão. ATP – trifosfato de adenosina, Apaf – fator de ativação da protease apoptótica, Bcl-2 – proteína antiapoptose, Bax – proteína pró-apoptose, DAG – diacilglicerol, FKBP – proteína estabilizadora citosólica, G – proteína G, α , β e γ - receptores acopladores a proteína G, IP3 – trifosfato de inositol, ONS – óxido nítrico sintase, ONOO⁻ - peroxinitrito, PLC – fosfolipase C, PS – fosfatidil serina, PKC – proteínaquinase C, R – receptor, RS – retículo sarcoplasmático, RyR – receptor de rianodina e SERCA - bombas de Ca^{++} do retículo sarcoendoplasmático.

A lesão reversível caracteriza-se funcionalmente pela restauração completa da função miocárdica após normalização do fluxo sanguíneo. Esta disfunção miocárdica pode durar horas ou dias, apesar da restauração do fluxo de sangue. Este tipo de dano não implica em alteração ultraestrutural da célula. No cardiomiócito pós-isquemia devem-se ressaltar as seguintes características:

1.2.1 Contratilidade

Sob condições normais de oxigenação, a interação entre a actina e a miosina tem início quando o Ca^{++} intracelular aumenta e a ação inibidora da troponina I é removida. A cabeça da miosina é conectada à actina que se flexiona, à custa de energia produzida pela hidrólise do ATP, resultando na contração miocárdica. Com a redução dos níveis de Ca^{++} , a cabeça da miosina, que é dependente de ATP, promove a liberação do filamento de actina, resultando em relaxamento miocárdico⁸⁰.

1.2.2 Hibernação

Hibernação é uma adaptação causada por uma redução intermitente ou crônica do fluxo coronariano. É caracterizada pela redução regional da função contrátil que se recupera depois de restaurado o fluxo sanguíneo normal. Pode ocorrer auto-regulação subaguda da função contrátil em resposta à redução regional do fluxo sanguíneo miocárdico, o qual normaliza o substrato metabólico e a energia regional, mas não persiste por mais que 12 a 24h. A hibernação crônica desenvolve-se em resposta aos episódios de isquemia miocárdica e reperfusão, progredindo do atordoamento repetitivo, com fluxo sanguíneo normal, para a hibernação com fluxo sanguíneo

reduzido⁸¹. No miocárdio hibernado crônico, são observadas alterações morfológicas de caráter adaptativo e degenerativo. O número de miofibrilas é reduzido enquanto o número de mitocôndrias e depósitos de glicogênio é aumentado após 24h. Estes valores são revertidos após restabelecimento do fluxo sanguíneo normal. Outras mudanças morfológicas incluem fibrose de grau variável, expansão do interstício por aumento da infiltração de macrófagos e fibroblastos com deposição de colágeno. As proteínas da matriz extracelular aumentam pela desorganização do citoesqueleto. As mitocôndrias são pequenas e com formato discóide. Ocorre também depleção de sarcômeros e do retículo sarcoplasmático. O glicogênio preenche lugares anteriormente ocupados por filamentos, e a apoptose tem sido identificada em biópsias tomadas de miocárdio hibernado durante cirurgia de revascularização. A fisiopatologia do miocárdio hibernado permanece sob investigação. Em hibernação de curto período de tempo, o único mecanismo que tem sido identificado é a reduzida resposta ao Ca^{++82} . Em hibernação longa, as mudanças parecem corresponder a uma programação genética de sobrevivência celular, que é induzida provavelmente por episódios repetidos de isquemia e reperfusão.

1.2.3 Atordoamento

O miocárdio atordoado é definido como uma disfunção contrátil transitória que aparece após a reperfusão, a despeito da ausência de lesão irreversível e restauração do fluxo coronariano normal⁸³. O atordoamento tem sido induzido por isquemia global em preparações de coração isolado de rato⁸⁴. Contudo, a patogênese do atordoamento miocárdico não está totalmente estabelecida, tendo como hipóteses a geração de espécies reativas de oxigênio e a sobrecarga de Ca^{++} durante a reperfusão, as quais não são mutuamente exclusivas e, provavelmente, são diferentes facetas da mesma cascata fisiopatológica⁸⁵. A primeira hipótese foi testada em animais maiores e tem sido mostrada por evidências experimentais tais como o aumento da produção das espécies reativas de oxigênio no miocárdio atordoado⁸⁶, proteção por antioxidantes⁸⁷ e disfunção contrátil induzida pela exposição direta às espécies reativas de oxigênio⁸⁸. A sobrecarga de Ca^{++} é um mecanismo possível através do qual as espécies reativas de oxigênio podem induzir o atordoamento⁸⁹. A hipótese do Ca^{++} postula que o atordoamento é devido a sobrecarga de Ca^{++} que ocorre durante a fase precoce da reperfusão, conseqüente a sobrecarga de Na^+ intracelular, seguido da inibição metabólica da bomba de Na^+ , a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. De fato, medidas obtidas pela ressonância magnética nuclear mostram aumento do Na^+ intracelular durante a

isquemia e reperfusão⁹⁰. A reperfusão com soluções contendo baixa concentração de Ca^{++} resultam na atenuação do atordoamento⁹¹. Outro mecanismo possível pelo qual o Ca^{++} pode ser implicado no atordoamento é a ativação das proteases dependentes de Ca^{++} . Essas proteínas, conhecidas como calpaínas, são enzimas que fragmentam outras proteínas quando o Ca^{++} está elevado. Isto pode conduzir a proteólises da troponina I que, junto com a perda de outras proteínas contráteis, resulta em decréscimo da resposta ao Ca^{++92} . A exposição direta dos miofilamentos à calpaína-I ativada reproduz o fenômeno do miocárdio atordoado por diminuição da sensibilidade e depressão contrátil. Além disso, esses efeitos são prevenidos pela presença do calpastatina que é um inibidor endógeno da calpaína⁹³. A ausência de dano celular irreversível em miocárdio atordoado pode corresponder ao aumento da resistência do coração à isquemia. O miocárdio atordoado pode disparar a expressão de diferentes conjuntos de genes que agem protegendo o miocárdio contra lesão irreversível. De fato, isso tem sido mostrado em modelo suíno de isquemia regional reversível, áreas normais e atordoadas no mesmo coração, que corresponderam a diferentes expressões genéticas. Mais de 30% dos genes que se apresentam no miocárdio atordoado são reconhecidos como atuantes em diferentes mecanismos na sobrevivência da célula, incluindo resistência à apoptose, citoproteção e crescimento celular. Deduz-se que a resposta genética está relacionada com a redução de fluxo sanguíneo⁹⁴.

1.2.4 Contratura

Portanto, durante a isquemia grave e prolongada há forte interação entre a cabeça da miosina e a actina, devido à depleção de ATP. Assim, a contratura isquêmica é desenvolvida. O aumento da concentração de adenosina difosfato (ADP) parece ser o gatilho inicial para o desenvolvimento da contratura. O ADP estimula a atividade da ATPase da miosina, conduzindo à depleção da ATP⁹⁵. Pontes rígidas exercem um efeito cooperativo nos filamentos finos e a sensibilidade ao Ca⁺⁺ é aumentada. Entretanto, a sensibilidade ao Ca⁺⁺ pode ser reduzida quando os H⁺ e o SO₄⁺⁺ são acumulados. A contratura isquêmica é moderada em sua extensão e não causa maior dano estrutural, mas conduz a defeitos do citoesqueleto, e os cardiomiócito tornam-se mais frágeis e suscetíveis ao dano mecânico. No modelo de coração perfundido, o desenvolvimento da contratura tem sido correlacionado ao conteúdo de glicogênio miocárdico pré-isquêmico, particularmente durante a isquemia global sem fluxo sanguíneo. O aparecimento da contratura coincide com o decréscimo da disponibilidade de ATP que acompanha à depleção total de glicogênio. O perfil da contratura isquêmica não é, necessariamente, relacionado à recuperação pós-isquêmica da função. A dissociação entre a contratura isquêmica e cardioproteção tem sido observada. Intervenções tal como o pré-condicionamento isquêmico são capazes de

conservar o conteúdo de glicogênio pré-isquêmico e facilitar a recuperação pós-isquêmica^{96,97}.

1.2.5 Hipercontratura

A hipercontratura desenvolve-se imediatamente após reperfusão e está relacionada à sobrecarga de Ca^{++} , que é agravada pela reperfusão devido à persistência do modo reverso da ação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. Além disso, a reoxigenação causa reenergização do retículo sarcoplasmático, o qual reinicia o acúmulo de Ca^{++} . Completada sua carga de Ca^{++} , o retículo sarcoplasmático passa a liberar Ca^{++} para o citosol, porque o Ca^{++} citosólico ainda aumentado promove a liberação induzida de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático. Esta oscilação do Ca^{++} no meio intracelular provoca descontrole da ativação miofibrilar, alimentada pelo aumento de ATP⁹⁸. Os cardiomiócitos reoxigenados estão em perigo agudo pela contratura devido à sobrecarga de Ca^{++} e à rápida recuperação da produção de energia mitocondrial na reperfusão. Contudo, depois da isquemia prolongada, este mecanismo de desenvolvimento de contratura provavelmente ocorre menos. Com a progressão do dano celular isquêmico, a habilidade da mitocôndria para restaurar rapidamente o estado celular normal de energia na reoxigenação é reduzida. Os cardiomiócitos,

durante a fase inicial da reoxigenação, podem conter muito baixa concentração de ATP, o que provoca contratura rigorosa. Em casos onde a severidade da contratura prevalece, ações terapêuticas objetivando a sobrecarga de Ca^{++} intracelular não são efetivas, visto que a severidade contrátil é essencialmente Ca^{++} independente⁹⁸. Existem evidências sugerindo que a necrose pós-isquêmica e a hipercontratura são fenômenos casualmente relacionados. A lesão de reperfusão no miocárdio é um fenômeno complexo consistindo de muitas etiologias independentes. Durante a fase inicial da reperfusão, o desenvolvimento da hipercontratura parece ser a causa primária de necrose. A manutenção da isquemia por horas pode conduzir à morte celular por necrose, e a lesão vascular pode agravar o dano miocárdico. Na cirurgia cardíaca, quando o coração é reperfundido após isquemia prolongada ou cardioplegia insatisfatória, a reperfusão pode levar ao aparecimento do fenômeno do coração de pedra. No coração *in situ*, exposto à oclusão coronária transitória, a área de necrose se apresenta quase exclusivamente na forma de “necrose de banda de contração”^{99, 100}. A extensão dessa necrose está relacionada com a magnitude do encolhimento miocárdico macroscópico e com a quantidade de enzimas liberadas durante os primeiros minutos da reperfusão¹⁰¹.

1.2.6 Morte celular

Pode-se distinguir duas formas de lesão miocárdica, a apoptose e a necrose. Em estudo experimental, observa-se que a morte celular por necrose ocorre até 24h após a reperfusão. Por sua vez, a apoptose se instala até 72h após a reperfusão¹⁰². Inibidores farmacológicos da cascata sinalizadora de apoptose durante a fase de reperfusão são capazes de atenuar os componentes da morte celular^{103, 104}. Apoptose e necrose parecem compartilhar mecanismos comuns nos estágios precoces da morte celular.

1.2.6.1 Apoptose

Termo inicialmente proposto por Kerr et al.¹⁰⁵, em 1972, a apoptose é um processo programado de morte celular, dependente de energia, que resulta em condensação da cromatina, fragmentação do DNA (*Deoxyribonucleic Acid*), formação de corpos apoptóticos, perda da integridade da membrana celular e não envolvimento na resposta inflamatória^{102, 106-109}. A apoptose ocorre durante a fase isquêmica e pode ser acelerada ou ser deflagrada durante a reperfusão^{110, 111}. O caminho sinalizador da apoptose é mediado pela mitocôndria e é ativado pela hipóxia, isquemia, reperfusão e pelo estresse oxidativo¹¹². Esses sinais pró-apoptóticos induzem à alteração da

permeabilidade da membrana mitocondrial interna e externa, fazendo com que os poros se abram devido à sobrecarga de Ca^{++} . A abertura dos poros da membrana mitocondrial ocorre principalmente na reperfusão, mas existe crescente evidência de que pode ocorrer também durante a isquemia¹¹³. Esta abertura conduz à liberação do citocromo C, segundo ativador mitocondrial de caspase ou proteína de ligação direta com a proteína inibidora de apoptose, da endonuclease G e do fator indutor de apoptose, que facilitam a sinalização da apoptose^{114, 115}. O citocromo C é um removedor catalítico do superóxido mitocondrial e sua perda resulta na inativação da cadeia respiratória mitocondrial, na produção de espécies reativas de oxigênio e na iniciação da apoptose. O citocromo C se liga a uma proteína do citosol resultando na ativação da caspase-9 e da caspase-3¹¹⁶. Este processo somente pode ser executado quando existe ATP disponível. Entretanto, em isquemia grave, a liberação do citocromo C pode ter pequena ou nenhuma consequência na apoptose, devido a depleção de ATP limitar a ativação da caspase, causando necrose. A apoptose é modulada por fatores pró e antiapoptose específicos que, em geral, estão ligados aos poros das membranas celulares¹¹⁷.

1.2.6.2 Necrose celular

É caracterizada por ruptura da membrana, edema maciço, fragmentação

celular e disparo da resposta inflamatória. O local primário da lesão irreversível tem sido objeto de intensa investigação, e diferentes fatores estão relacionados: lisossomas, mitocôndrias, produtos metabólicos finais, sobrecarga de Ca^{++} , fosfolipase, peroxidação lipídica e lesões no citoesqueleto¹¹⁸. Este estágio final e irreversível é caracterizado, do ponto de vista clínico, pelo infarto agudo do miocárdio e estratificações têm sido propostas na descrição do grau de lesão miocárdica em função da isquemia.

1.3 Mecanismos de proteção miocárdica

Todos os esforços devem se voltar para a ampliação dos mecanismos de proteção miocárdica e o pronto restabelecimento do fluxo sanguíneo para se evitar a progressão da lesão isquêmica. Nos pacientes que desenvolvem infarto agudo do miocárdio, o evento ocorre de forma abrupta e imprevisível. Por outro lado, nas operações cardíacas, o momento e o tempo de isquemia são geralmente conhecidos. A proteção miocárdica surgiu com o objetivo de atenuar ou minimizar os efeitos deletérios resultantes da isquemia, tornando o miocárdio mais resistente à parada cardíaca anóxica. Para tal fim, objetiva-se reduzir o metabolismo celular para manutenção das reservas energéticas, na forma de ATP, e preservação da integridade

ultraestrutural no miocárdio. Desta forma, é possível garantir a manutenção da contratilidade ventricular e, conseqüentemente, da função cardíaca, garantindo assim os benefícios desejáveis da cirurgia cardíaca.

Dentre os métodos de proteção miocárdica, para condições com longos períodos de isquemia, destaca-se, pela maior eficiência, o uso de soluções cardioplégicas.

1.3.1 Soluções cardioplégicas cristaloides

A eficácia da preservação do órgão depende, principalmente, da solução cardioplégica utilizada e de sua temperatura.

A fórmula da solução cardioprotetora é baseada em três princípios: a) parada hipotérmica do metabolismo, b) provimento de ambiente físico e bioquímico que mantenha viável os componentes estruturais do tecido durante a parada metabólica hipotérmica e c) minimização dos efeitos da lesão de reperfusão¹¹⁹.

O principal propósito dos componentes iônicos das soluções de preservação é induzir rápida despolarização da membrana celular do cardiomiócito por redução do gradiente de K^+ transmembrana. Isto resulta em cessação das atividades elétrica e

mecânica do coração. Secundariamente, minimiza o fluxo dos íons intracelulares baixando o gradiente de concentração dentro do espaço extracelular. As soluções salinas de composição relativamente simples, semelhante ao líquido extracelular como o Ringer-lactato e o Hartmann, foram inicialmente empregadas na proteção do miocárdio, e se mostram incapazes de manter adequada viabilidade e garantir a função do enxerto¹²⁰.

O melhor conhecimento das alterações estruturais causadas por isquemia, resfriamento e reperfusão levou a modificações importantes na composição das soluções de preservação, com a inclusão de novos componentes como: 1) ânions impermeantes (manitol, sacarose ou raquinose)^{121, 122}, 2) fontes de energia (glicose, aminoácidos, ATP ou adenosina)^{122, 123}, 3) estabilizadores da membrana celular (bloqueadores de canais de Ca^{++} , esteroides)¹²², 4) antioxidantes e quelantes (alopurinol, lactobionato)^{122, 124}, e 5) tampões, atuando nos limites fisiológicos de pH (fosfato, citrato ou lactobionato)^{121, 125, 126}.

O primeiro grande avanço, que permitiu a evolução para as soluções hoje em uso, foi a introdução das soluções com composição intracelular que são pobres em Na^+ e ricas em K^+ . Seu emprego diminuiu o edema e a perda de K^+ pela célula^{121, 127}. Já as soluções de composição extracelular, pobres em K^+ e ricas em Na^{++} , são assim

classificadas porque simulam o ambiente iônico extracelular. O uso de soluções intracelulares e extracelulares com igual sucesso na preservação de órgãos sugere que este aspecto pode não ser relevante para a qualidade de preservação necessária à solução de perfusão¹²⁸. Soluções com composição extracelular apresentam excelentes resultados especialmente em transplante pulmonar¹²⁹. Aparentemente, estas soluções produzem os melhores resultados na preservação cardíaca¹²². Ao longo do tempo e para diferentes órgãos, outras soluções foram desenvolvidas, com composição e características diversas, contendo compostos isomolares ou hiperosmolares, compostas de cristalóides ou contendo colóides^{121, 125, 128, 130-133}.

As soluções Celsior, Krebs-Henseleit, St. Thomas 1 e 2, Universidade de Wisconsin-1 e a solução de preservação de Lyon são exemplos de soluções do tipo extracelular. As soluções da Universidade de Wisconsin, Bretschneider-HTK, Stanford e Euro-Collins são exemplos do tipo intracelular. Os benefícios das soluções intracelulares incluem rápida parada mecânica cardíaca e menor edema intracelular.

A solução Bretschneider-HTK, contendo histidina, triptofano e α -cetogluturato, foi utilizada inicialmente para induzir cardioplegia. Sua utilização em transplantes de órgãos (fígado e coração) mostrou bons resultados¹²⁵. Essa solução é um excelente tampão e contém removedores de radicais livres como o triptofano e a

histidina. A presença de α -cetogluturato e histidina parecem ter efeitos metabólicos benéficos.

A solução Celsior, que tem baixa viscosidade e baixo conteúdo em K^+ , foi desenvolvida, inicialmente, para proteção do coração. Tem sido usada experimental e clinicamente em transplantes hepáticos, renais e pancreáticos¹³⁴⁻¹³⁶. Foi testada com bons resultados em transplantes cardíacos, pulmonares, renais e do intestino delgado, bem como hepáticos¹³⁷.

A solução St. Thomas foi inicialmente elaborada como indutora de cardioplegia em cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea¹³⁸. Tem sido uma das soluções empregadas para preservação cardíaca desde o início dos programas de transplantes cardíacos¹³⁸.

Ainda permanece incerta a composição ideal das soluções de preservação do coração, usadas durante as sucessivas fases do transplante cardíaco, a saber: desde a parada do coração doado, preservação, reimplante e reperfusão. Isto é mostrado pela grande variedade de soluções identificadas por estudos^{139, 140}. Também, está descrito que o uso da solução cardioplégica como meio de preservação com armazenamento está associado com o aumento da mortalidade em até 2,5 vezes¹⁴⁰. Portanto, em alguns

centros de transplantes, os corações doados são armazenados em soluções desenvolvidas para preservação de órgãos não cardíacos. Este é o caso da solução Euro-Collins¹⁴¹ e também a solução da Universidade de Wisconsin^{142, 143}. Contudo, mesmo se a formulação dessas soluções atendesse adequadamente aos princípios gerais da preservação hipotérmica estática, isto não atenderia necessariamente aos requerimentos metabólicos específicos do tecido miocárdico armazenado. No caso da solução da Universidade de Wisconsin, em particular, preocupações tem sido expressadas sobre o alto conteúdo de K^+ que poderia aumentar o desenvolvimento da contratatura relacionada ao Ca^{++144} e a alta viscosidade relacionada ao *hidroxietilstarach*¹⁴⁵ o qual poderia prejudicar a resposta endotelial coronariana¹⁴⁶. Além disso, o protocolo de preservação usado durante o armazenamento não pode ser dissociado das fases anteriores e posteriores deste procedimento. A formulação, que é efetiva para preservação, pode não ser adequada para a perfusão^{147, 148} durante a fase inicial da parada cardíaca, ou cardioplegias subsequentes infundidas durante o reimplante¹⁴⁹, ou ainda na fase da reperfusão¹⁵⁰. Este assunto é ilustrado no estudo de Kohno et al.¹⁴⁷ mostrando a eficácia da solução Euro-Collins (tipo intracelular), usada como meio de preservação, que apresentou melhor desempenho quando o coração foi inicialmente parado com solução cardioplégica do tipo extracelular. Esta observação foi estendida por Toshima et al.¹⁴⁸, que mostrou benefício adicional desse

procedimento quando se realiza infusão de solução extracelular antes da reperfusão. A parada do coração doado com a solução da Universidade de Wisconsin pode desenvolver contratura induzida por K^+ devido aos íons Ca^{++} contidos no sangue ainda presente dentro da vasculatura¹⁵¹. Portanto, a reinfusão da solução da Universidade de Wisconsin durante a fase de implantação após preservação poderia ser danosa¹⁵², possivelmente por causa do efeito prejudicial quanto ao aumento da temperatura^{153, 154}, condição esta que ocorre neste estágio do procedimento.

Tais considerações levaram ao desenvolvimento de uma solução de preservação cardíaca específica denominada Celsior, cuja formulação buscava atender a dois requisitos básicos: a) combinar os princípios gerais de preservação fria com os específicos para preservação do miocárdico isquêmico reperfundido e b) permitir que uma simples solução fosse utilizada em todas as fases do transplante cardíaco.

1.3.2 Papel da temperatura na proteção miocárdica

A hipotermia, em sua simplicidade e eficiência, é a técnica preferencial na preservação de órgãos. É benéfica porque torna o metabolismo mais lento¹⁵⁵, a saber, reduz a velocidade de reação bioquímica e diminui a atividade das enzimas intracelulares que degradam os componentes celulares essenciais para a viabilidade do

órgão¹⁵⁶. A hipotermia também retarda a lise de organelas como lisossomas que, por sua vez, libera enzimas proteolíticas que causam a morte celular. Por outro lado, corações expostos à isquemia normotérmica permanecem viáveis por períodos relativamente curtos, geralmente menos de uma hora. Na isquemia normotérmica, a ausência de oxigênio conduz ao rápido declínio dos valores de ATP nas células, à redistribuição de eletrólitos através da membrana celular e à diminuição de reações de biossíntese. No entanto, as reações biodegradáveis continuam a ocorrer e incluem: acumulação de ácido láctico, diminuição do pH intracelular, proteólise, lipólise e peroxidação lipídica. Com a hipotermia, as reações de degradação são consideravelmente diminuídas, mas não interrompidas.

1.3.3 Aspectos fisiológicas da hipotermia

A hipotermia melhora a resistência à isquemia em parada cardíaca cardioplégica¹⁵⁷. Ocorre um processo adaptativo que produz mudanças nos caminhos sinalizadores específicos de proteínas mitocondriais e na resposta *heat-shock*. Ning et al.¹⁵⁷, em 2002, relataram a preservação da adenina translocase, da expressão do RNA mensageiro de proteínas mitocondriais e da subunidade β F1-ATPase com o uso da hipotermia. A estrutura ordenada do DNA complemento revelou que a isquemia

alterou a expressão do gene 13. A hipotermia modificou a resposta à isquemia para oito genes, sendo seis deles relacionados com a apoptose. Também aumentou a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e diminuiu a proteína proapoptótica Bak. Estas observações indicam que a hipotermia modifica os caminhos sinalizadores para apoptose, e sugere possíveis mecanismos para proteção miocárdica. A hipotermia moderada melhora a resistência à lesão oxidativa no coração. Em adição, o estresse pelo frio aplicado antes da isquemia aquecida inicia uma resposta adaptativa e promove preservação da função contrátil do coração¹⁵⁸. A adaptação hipotérmica promove redução na depleção dos estoques de ATP durante a isquemia e reperfusão^{159, 160}, e, além disso, aumenta a expressão gênica de proteínas específicas relacionadas ao estresse e proteínas da membrana mitocondrial^{160, 161}.

A hipotermia oferece proteção atuando no metabolismo energético celular. A elucidação dos diversos mecanismos podem conduzir à identificação de moléculas específicas que provêm proteção durante e após a lesão isquêmica. Recentes experimentos em tecidos não cardíacos indicam que o frio modifica vários caminhos sinalizadores. Especificamente, as investigações realizadas com tecidos neuronais ou em tecido cerebral *in vivo*, indicaram que a hipotermia leve ou moderada atenua a apoptose, que é a morte celular programada devido a hipóxia ou isquemia¹⁶²⁻¹⁶⁴.

Adicionalmente, muitos estudos mostram que a apoptose do cardiomiócitos é um contribuinte da lesão de isquemia e reperfusão¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Processos adaptativos, tal como o pré-condicionamento isquêmico, protegem parcialmente contra a lesão de reperfusão através das modificações nos caminhos sinalizadores específicos de morte celular¹⁶⁸. Estes achados formaram as bases para as afirmações hipotéticas que a hipotermia induz proteção miocárdica interferindo na sinalização da apoptose e/ou outros caminhos após isquemia e reperfusão¹⁵⁷.

A hipotermia melhora a lesão oxidativa induzida durante isquemia e reperfusão miocárdica¹⁵⁷. Ning et al., obtiveram melhoria da função cardíaca durante a reperfusão por aplicarem a hipotermia iniciada e mantida durante o período isquêmico¹⁵⁷. O aumento da relação entre oferta e demanda de energia durante a isquemia é geralmente atribuído à proteção hipotérmica. Isto tem sido previamente sustentado em parada cardíaca isquêmica cardioplégica em coelhos por superior preservação de ATP induzido pela hipotermia aplicada antes¹⁶⁰ e durante a isquemia¹⁶¹. A preservação dos estoques de fosfato de alta energia é sujeito a um limiar crítico de 30°C, acima do qual tal vantagem é dissipada rapidamente¹⁵⁹. Ning et al., detectaram uma acelerada indução na expressão do gene das proteínas *heat shock* 70^{160, 161, 169} e emula a indução desses genes pelo frio em tecidos adaptados¹⁷⁰.

Investigações prévias caracterizam expressões para esses genes específicos, e não avaliam outros caminhos que podem ser alterados pela hipotermia. Subsequentemente, muitos investigadores notaram a participação do ANT (adenina nucleotídeo translocadora) na formação do complexo do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPC) na membrana interna. Este complexo, presumidamente, promove quebra de prótons e íons da matriz mitocondrial, e conduz à perda da integridade da mitocôndria, iniciando uma sequência de ativação de caminhos apoptóticos¹⁵⁷. A expressão da proteína coordena firmemente com os níveis estáveis do mRNA em muitos modelos animais. Então, pode-se presumir que a expressão do gene ANT, elevada no coração hipotérmico após reperfusão, anuncia a síntese acelerada do ANT e seu acúmulo na membrana mitocondrial. Este processo conduzirá à estabilidade da membrana mitocondrial e impedirá os mecanismos que conduzem a apoptose, agora reconhecidos na morte do cardiomiócitos após lesão oxidativa¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Essas especulações conduzem a consideração que a hipotermia pode alterar outros caminhos relacionados à integridade e estabilidade da membrana mitocondrial.

Ning et al., relataram ainda que um relativo leve grau de hipotermia modificou a expressão gênica, após isquemia, de muitas proteínas que contribuem na regulação da apoptose¹⁵⁷. A hipotermia atuou na expressão isquêmica para transformação relativa

do p53 (tumor supressor p53) assim como para vários genes que são considerados seus alvos. Estudos prévios tem ligado a expressão da proteína p53 com as mudanças morfológicas e genômicas da fragmentação do DNA, características da apoptose após estresse oxidativo em cardiomiócitos¹⁷¹. A proteína p53 serve como um ativador de transcrição de um número de genes alvo, incluindo Gadd45^{172, 173}, p21, caspase-3 e outros¹⁷⁴. As modificações induzidas pela temperatura na resposta p53 para a isquemia em corações não têm sido previamente notadas e representadas na área sob pesquisa.

Mudanças na expressão de dois membros da família Gadd45 durante a isquemia representa o tipo de resultado positivo e inesperado, frequentemente oferecido pela análise do micro conjunto cDNA. A modificação hipotérmica do Gadd45 e Gadd45 β em resposta à isquemia representa um novo e adicional achado gerado pela técnica do cDNA¹⁵⁷.

O aumento da expressão do gene p21 após isquemia é consistente com a resposta hipóxica em cardiomiócitos, conforme previamente demonstrado por Long et al.¹⁷¹. Contudo, o p21 é um gene alvo do p53¹⁷³, e esta expressão pode também ser induzida, independentemente, por espécies de oxigênio reativo¹⁷⁵. Portanto, a falta de supressão na resposta do p21 pela hipotermia pode refletir a indução por um caminho alternativo, não regulado pelo p53, ou sujeito a termorregulação. Em adição, a falha da

hipotermia em modificar a resposta da expressão do p21 para isquemia, assim como do egr-1, demonstra que a modificação hipotérmica não é onipresente, e pode indicar a presença de cofatores específicos ativados termicamente¹⁵⁷.

A integridade da membrana mitocondrial depende da expressão da família Bcl-2. Os genes dessa família regulam a apoptose tanto positiva quanto negativamente. O Bcl-2 localiza-se na face citoplasmática da membrana externa mitocondrial, retículo endoplasmático e membrana nuclear^{176, 177}. A proteína Bcl-2 previne a cascata que conduz a abertura do complexo PTPC, a liberação do citocromo C, a ativação da caspase e a morte celular. A regulação da apoptose é altamente dependente dos níveis das proteínas anti- e pró-apoptóticas. O membro pró-apoptótico Bak da família Bcl-2, altera a estabilidade mitocondrial e intensifica a morte celular apoptótica¹⁷⁸, enquanto que o Bcl-x1 forma heterodímeros anti-apoptóticos com o Bcl-2. Ning et al. confirmaram os achados dos estudos prévios onde as proteínas Bak e Bcl-x são altamente expressadas no tecido cardíaco normal^{179, 180}. Entretanto, a hipotermia acentua marcadamente a indução isquêmica do Bcl-x e anula a expressão da proteína Bak. Então, a aplicação da hipotermia modifica a expressão da família Bcl-2 em direções que seriam esperadas para estabilizar a membrana mitocondrial e prevenir a apoptose.

Em resumo, através do uso dos conjuntos cDNA, os experimentos identificam a indução de vários genes pela isquemia do miocárdio. A modificação hipotérmica da proteína p53 e a indução isquêmica do Gadd45 e Gadd45 β são novos achados no tecido cardíaco¹⁵⁷. Além disso, a modificação hipotérmica de diversos caminhos sinalizadores, em direções presumidas para promover fatores anti-apoptóticos, foi documentada. Tais achados, juntos com a expressão gênica preservada pelas proteínas mitocondriais, indicam que a hipotermia promove sinalização para estabilidade da membrana mitocondrial após a lesão de isquemia e reperfusão.

1.4 Considerações sobre as lesões ultraestruturais na isquemia miocárdica

Deve-se ressaltar o estudo impar realizado por Gomes et al.¹⁸¹, em 1973, sobre as alterações ultraestruturais desenvolvidas no cardiomiócito humano, quando submetido à parada anóxica prolongada, durante circulação extracorpórea, considerando a temperatura¹⁸². Nesse estudo, foi proposta uma classificação para o grau da lesão ultraestrutural do cardiomiócito, conforme apresentado na Tabela 1.

A Tabela 2 correlaciona os graus de lesões apresentados na Tabela 1, em função do tempo de isquemia, para cada técnica de proteção miocárdica. As fotografias de microscopia eletrônica nesse estudo das lesões encontram-se

apresentadas na Figura 2.

A Tabela 3 mostra a condição do miocárdio lesado em relação à classificação proposta.

Tabela 1 – Classificação proposta de lesão celular miocárdica em função progressiva de intensidade

Grau	Tipo de lesão
I	Rarefação do glicogênio Edema citoplasmático
II	Bandas de contração Vacuolização de mitocôndrias
III	Rotura de mitocôndrias
IV	Alterações da cromatina nuclear
V	Rotura de miofibrilas
VI	Rotura de membranas nuclear e celular

A recuperação do coração lesado tem sido objeto frequente de discussão quanto ao valor de cada técnica empregada, sendo compreensível que, para cada tipo de agressão, torna-se necessário o emprego de recurso de diferente espectro e complexidade.

A Tabela 4, pela classificação proposta acima, resume um

conjunto de critérios cabíveis nessas diferentes circunstâncias^{63, 182}.

Tabela 2 – Grau de lesão miocárdica* em função do tempo de isquemia.

Isquemia	Tempo (minutos)						
	10	20	40	60	90	120	150
Normotermia	I-II	II-III	III-IV	IV-V	V	VI	-
Hipotermia 30°C	-	I-II	III	IV	IV-V	V-VI	VI
Hipotermia 20°C	-	I	II-III	III	III-IV	IV	IV-V
Cardioplegia	-	-	-	-	-	I-II	II

* Grau de lesão miocárdica conforme Tabela 1

Tabela 3 – Estado do miocárdio com lesão isquêmica em relação à classificação proposta na Tabela 1.

Estado do miocárdio	Classificação conforme Tabela 1	Achados Anatomopatológicos
Hibernado	I	Normal (pré-condicionado) Fluxo coronariano mínimo otimizado
Atordoado	I-II	Edema citoplasmático Vacuolização mitocondrial Rotura de mitocôndrias
Com infarto	III-IV-V-VI	Alteração da cromatina nuclear Citólise Cariólise Rotura de miofibrilas

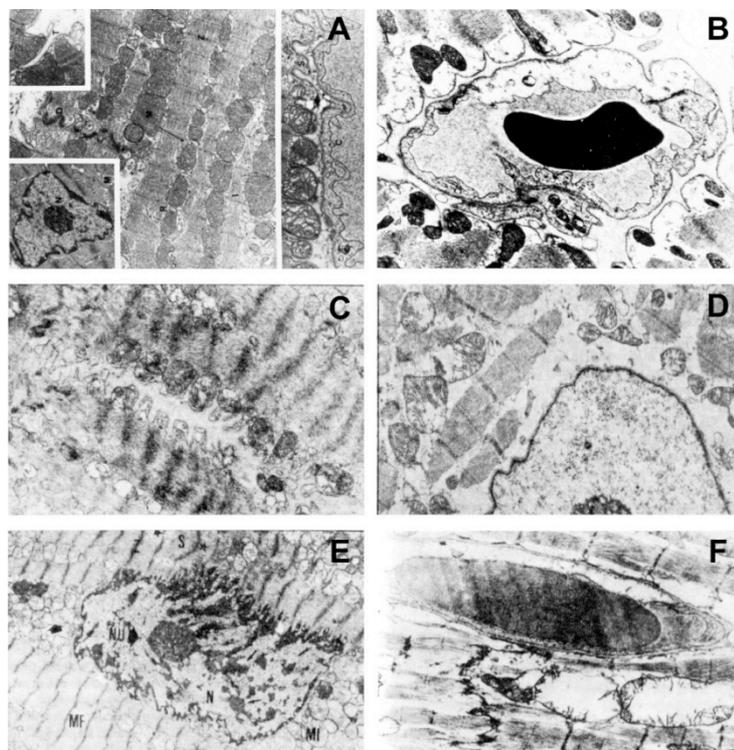


Figura 2 – Classificação das lesões anóxicas do miocárdio humano. A - Miocárdio normal, B – Rarefação do glicogênio/edema citoplasmático, C – Bandas de contração/vacuolização de mitocôndrias, D – Rotura de mitocôndrias, E – Alteração da cromatina nuclear, F – Rotura de miofibrilas

Tabela 4 – Lesão miocárdica isquêmica em função da regeneração

Grau da Lesão	Conduta
I	Reperusão
II	↓ MVO ₂ + ↓ Pd ₂ VE
III-IV	↓ MVO ₂ + ↓ Pd ₂ VE*
V-VI	Assistência circulatória mecânica prolongada

MVO₂ – Consumo de O₂; Pd₂VE – Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo.

* Associar removedores de radicais livres, inibidores de Ca⁺⁺ e nutrientes específicos.

1.5 Outras considerações sobre a hipotermia

A hipotermia reduz os requerimentos energéticos deprimindo os determinantes de consumo de oxigênio pelo miocárdio¹⁸³, tais como: tensão intramiocárdica, pressão ventricular, volume ventricular, massa miocárdica, frequência cardíaca, estado contrátil, relação força-velocidade, velocidade máxima de contração, metabolismo basal, energia associada com o encurtamento contra a carga, trabalho externo (carga e encurtamento da fibra) e trabalho interno (encurtamento de componente elástico).

Diminuindo os três modos dominantes de utilização do oxigênio miocelular (desenvolvimento de tensão, frequência cardíaca e contratilidade), a utilização do oxigênio miocárdico cai rapidamente ao nível basal¹⁸³. Na ausência de contração miocelular, o miócito ainda requer oxigênio para funções básicas, mas este custo basal pode ser então reduzido pela hipotermia. Como mostrado por Buckberg et al.¹⁸⁴, a parada normotérmica (37°C) diminui a demanda de oxigênio do coração em 90% para 1mL O₂ 100g⁻¹ min⁻¹. A 22°C, a necessidade de oxigênio cai para 0,3 mL 100 g⁻¹ min⁻¹ em um coração parado. Ocorre redução do consumo de oxigênio em temperatura abaixo de 22°C, porém, os efeitos na redução do consumo de oxigênio pelo miocárdio abaixo desse nível de temperatura, ainda que alcance benefícios, são pouco

expressivos. Inferiu-se que a hipotermia era um eficiente protetor miocárdico contra a isquemia.

Circunstancias que diminuem a taxa de utilização de ATP (ou seu substituto, consumidor do oxigênio miocárdico) prolongam o intervalo isquêmico seguro. Essas circunstancias incluem cessação imediata da atividade eletromecânica e hipotermia¹⁸⁵. Rosenfeld¹⁸⁶ encontrou um aumento na proteção com resfriamento feito gradualmente de 20°C a 4°C. Contudo, ainda persistem dúvidas exigindo investigações para estabelecimento de evidência que mostre desempenho ventricular menos satisfatório em temperaturas inferiores a 17°C com períodos de parada cardíaca de 2 ou mais horas de duração. Hearse, em 1976, mostrou grande vantagem obtida reduzindo a temperatura miocárdica de 37°C para 27°C, menor vantagem na redução de 27°C para 17°C, e ainda menor vantagem quando se reduz abaixo de 17°C⁵³. Balderman et al.¹⁸⁷ encontraram desempenho ventricular menos satisfatório após 120 min de isquemia à temperatura de 6°C a 10°C graus, comparado com 14°C a 18°C. Neste sentido, persiste a importância das lesões miocárdicas relacionadas com resfriamento rápido e intenso do miocárdico, constatadas nos resultados clínicos de Williams et al.¹⁸⁸, em 1990. Outro marco fundamental, constitui a eficiente proteção miocárdica obtida com cardioplegia aquecida estudada por Salerno et al.⁵⁸.

Tendo em vista as considerações acima relatadas, observa-se que a proteção contra a isquemia miocárdica ainda é repleta de dúvidas, necessitando investigações adicionais visando melhorar os métodos de preservação do coração e, desta forma, melhorar os resultados das operações cardíacas, reduzindo a morbimortalidade e ampliando suas indicações e benefícios.

OBJETIVO

Constitui objetivo desta investigação estudar comparativamente a proteção miocárdica em corações isolados de ratos perfundidos com as soluções Krebs-Henseleit, Bretschneider-HTK, St. Thomas e Celsior nas temperaturas de 10°C e 20°C, no período isquêmico de 2 horas a 20°C.

MÉTODO

2.1 Animais estudados

Foram utilizados corações isolados de 64 ratos albinos da raça Wistar, machos, com peso compreendido entre 277 e 315g, com média de 299g. Os animais foram obtidos no biotério da Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis – ServCor, e receberam tratamento seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)¹⁸⁹ e pelos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América¹⁹⁰. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética do Curso de Pós-Graduação em Medicina da Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis – ServCor¹⁹¹.

2.2 Anestesia e técnica operatória

A anestesia consistiu em colocar o animal em uma campânula fechada e transparente para observação, junto com chumaço de algodão embebido em éter sulfúrico P.A. (para análise) com o objetivo de sedação para posterior administração intraperitoneal de cloridrato de quetamina na dose 50 a 75mg/kg de peso corpóreo. Na mesma seringa adicionou-se cloridrato de xilazina na dose de 10 a 15mg/kg de peso corpóreo. Considerou-se o momento ideal para o início do procedimento cirúrgico

quando cessavam os movimentos voluntários dos animais, mesmo sob estímulo.

Após toracotomia ampla, com exposição do coração e vasos da base, administrou-se 500 UI de heparina sódica no átrio esquerdo do animal.

Para segurança e agilidade na preparação do coração, a aorta ascendente foi isolada com a técnica de três fios¹⁹², onde o primeiro fio serviu para tracionar e elevar a aorta, permitindo a proteção das válvulas do conjunto valvar aórtico e evitar a introdução da cânula de perfusão no ventrículo esquerdo. O segundo fio serviu para tracionar e elevar a extremidade cefálica da aorta ascendente. O terceiro foi posicionado entre os dois primeiros e serviu para fixar a aorta sobre cânula metálica em formato de agulha de calibre 20G. Teve-se o cuidado de manter a extremidade distal da cânula metálica acima dos óstios coronários. A seguir, o átrio esquerdo foi aberto e um cateter fenestrado calibre 18G foi introduzido e exteriorizado através do ápex do ventrículo esquerdo com o objetivo de descompressão. Os ramos das artérias pulmonares foram mantidos intactos, e praticou-se uma pequena abertura no tronco pulmonar para evitar a distensão das câmaras direitas (Figuras 3A e 3B, 4, 5 e 6).

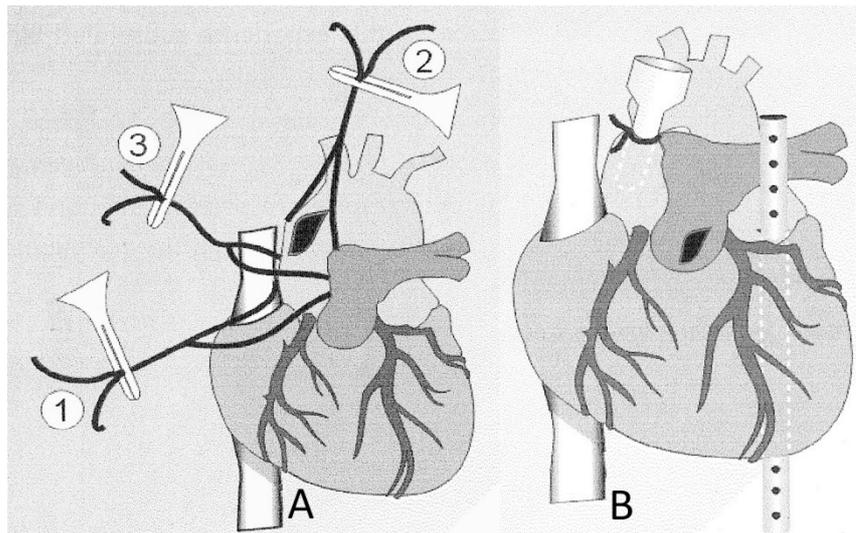


Figura 3 – Desenho esquemático do preparo da aorta. **A** – Isolamento da aorta para introdução da cânula de perfusão. **B** – Arteriotomia pulmonar com as cânulas introduzidas na aorta e através do ventrículo esquerdo

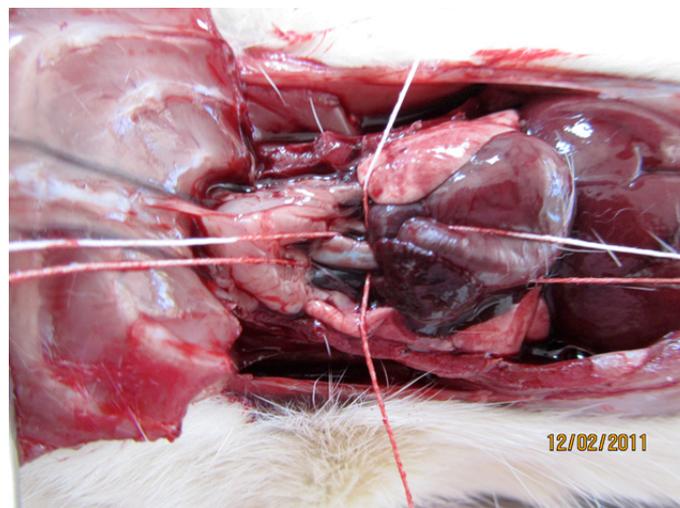


Figura 4 – Fotografia do preparo da aorta utilizando a técnica dos três fios.

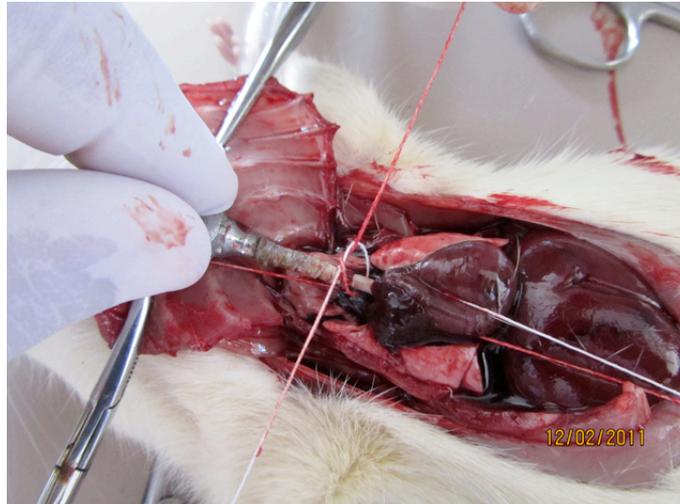


Figura 5 – Fotografia do preparo da aorta – Introdução da extremidade distal da cânula metálica acima dos óstios coronários.

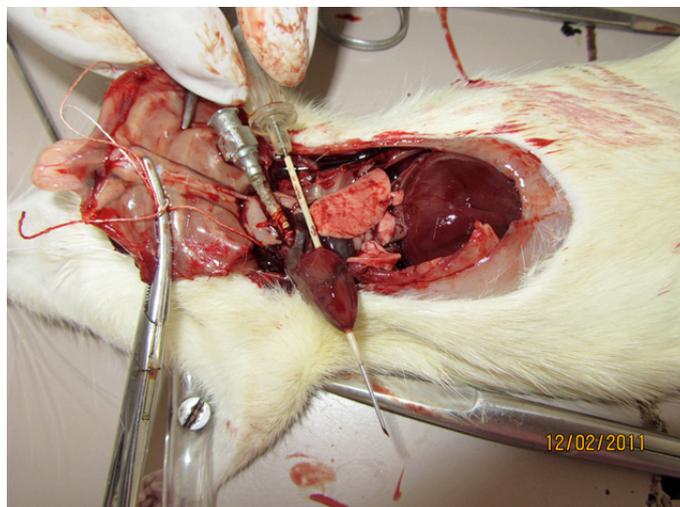


Figura 6 – Fotografia da decompressão das câmaras esquerdas - cateter fenestrado calibre 18G foi introduzido e exteriorizado através do ápex do ventrículo esquerdo.

Os corações foram removidos pela secção dos seus vasos em tempo médio de 1 minuto e imediatamente foram perfundidos retrogradamente no sistema Langendorff sem recirculação, com solução nutritora Krebs-Henseleit⁴⁹, para recuperação funcional. A composição da solução de Krebs-Henseleit empregada é a que se segue: NaCl 126mmol/L, NaHCO₃ 25mmol/L, KH₂PO₄ 1,2mmol/L, KCl 4,8mmol/L, MgSO₄ 1,2mmol/L, CaCl₂ 2,5mmol/L e C₆H₁₂O₆ 11,5mmol/L, gaseificada com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, resultando em pH final médio de 7,40±0,5 e osmolaridade de 330mOsm.

A pressão de perfusão na aorta foi mantida entre 100 e 110cm de H₂O¹⁹³, empregando-se o sistema de Langendorff, modificado por Gomes et al¹⁹⁴, do tipo descartável, modelo FCSFA-ServCor - Comex Ind. & Com. Ltda. (Figura 7), com sistema de circulação e aquecimento de água e teletermômetro modelos Braile Biomédica Ltda, biomonitor BESE[®] e impressora matricial Epson[®].

Após 15min de reperfusão coronária, o cateter transventricular foi removido e um cateter com balão distal pré-calibrado foi introduzido no ventrículo esquerdo, mantendo-se a pressão diastólica entre 9 e 10cmH₂O (Figura 8).

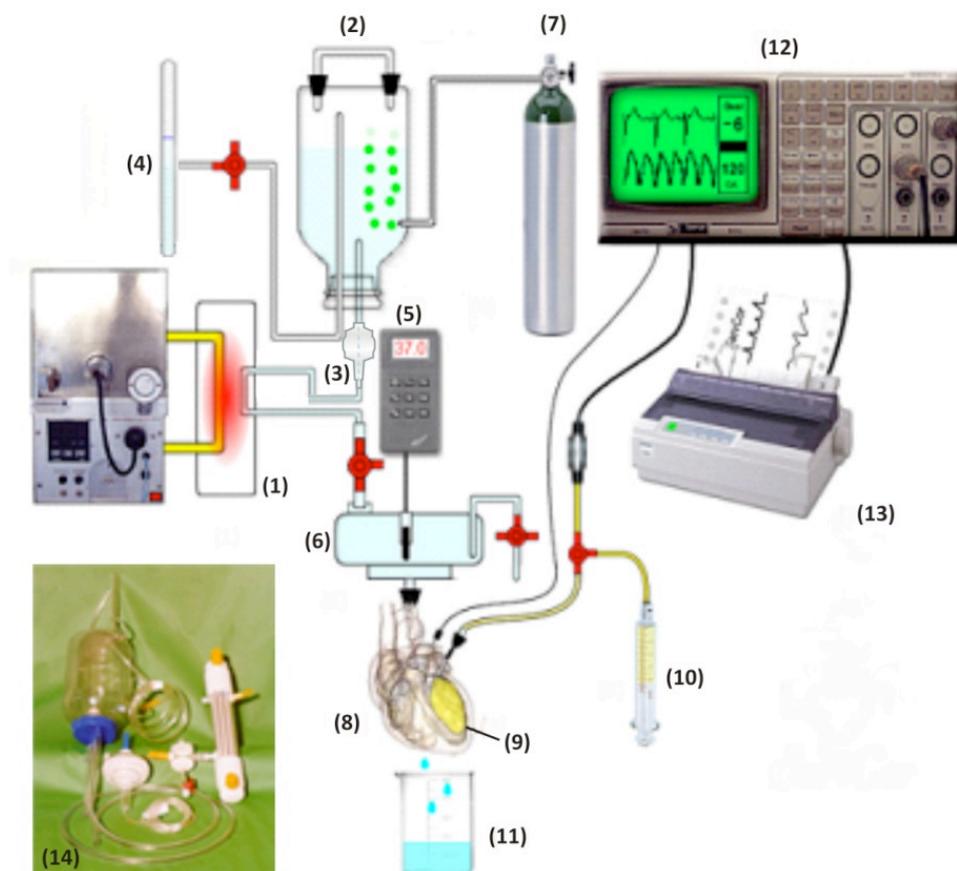


Figura 7 – Diagrama do sistema de estudo do coração isolado. 1- termostator, 2- reservatório de perfusato. 3- microfiltro (20 μ), 4- manômetro, 5- teletermômetro, 6- câmara, 7- carbogênio (95% O₂+5% CO₂), 8- coração, 9- balão intraventricular, 10- controle da pressão do balão, 11- coletor de fluxo, 12- monitor de ECG e pressão ventricular, 13- impressora, 14- conjunto descartável.

Para a infusão das diferentes soluções cardioplégicas interrompeu-se a infusão da solução de manutenção de Krebs-Henseleit a 37°C, e efetuou-se o esvaziamento do balão ventricular esquerdo, com o objetivo de promover a queda da pressão diastólica final e facilitar a perfusão coronária.

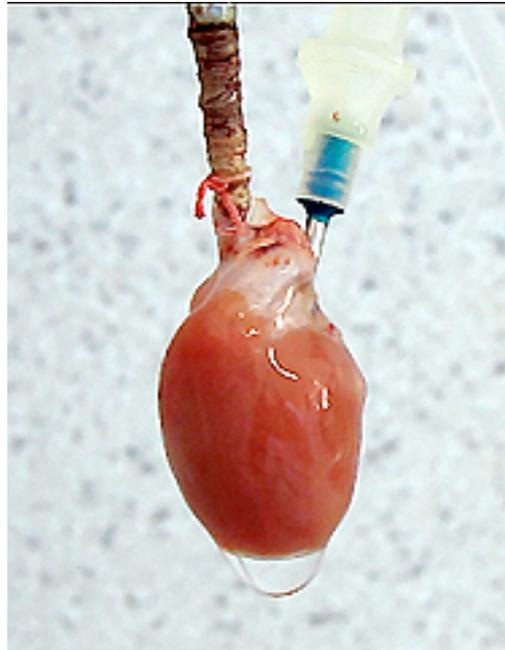


Figura 8 – Fotografia do coração isolado de rato Wistar montado no aparelho Langendorff. Cateter com balão distal insuflado dentro do ventrículo esquerdo conectado ao transdutor de pressão.

2.3 Grupos constituídos

Foram considerados para o estudo os corações que mantiveram pressão arterial sistólica superior a 100mmHg no final do período de estabilização para recuperação funcional, sendo constituídos oito grupos de estudo em função da temperatura empregada (A - 10°C e B - 20°C) e das soluções perfundidas: Grupos A1 e B1 –

Krebs-Henseleit (KHB); Grupos A2 e B2 - Bretschneider-HTK (HTK); Grupos A3 e B3 – St. Thomas (STH); Grupos A4 e B4 – Celsior (CEL) para preservação miocárdica, cujas respectivas composições encontram-se descritas nas Tabelas 13 a 16 (Anexo).

As diferentes soluções foram infundidas durante 5 minutos a 10°C e a 20°C, com pressão de infusão de 100cmH₂O. Posteriormente, os corações foram imersos na mesma solução de infusão a 20°C durante 120 minutos de isquemia.

As variáveis hemodinâmicas correspondentes eleitas na presente investigação foram determinadas, inicialmente, após o período de estabilização, sendo o tempo controle (t₀), com valores basais. Após período de 120min de preservação a 20°C, os corações foram novamente perfundidos durante 60min com solução de Krebs-Henseleit a 37°C, e as variáveis foram obtidas após 5min (t₅), 10min (t₁₀), 15min (t₁₅), 20min (t₂₀), 25min (t₂₅), 30min (t₃₀), 35min (t₃₅), 40min (t₄₀), 45min (t₄₅), 50min (t₅₀), 55min (t₅₅) e 60min (t₆₀) de reperfusão, respectivamente (Figura 9).

2.4 Variáveis estudadas

2.4.1 Frequência cardíaca

A frequência cardíaca foi determinada medindo-se o número de picos de pressão sistólica da curva de pressão durante o período de 30 segundos, repetido em 3 segmentos diferentes, e se considerou o valor médio obtido. A unidade considerada foi batimentos por minuto (bpm). Não foi utilizado estimulação cardíaca artificial (marcapasso).

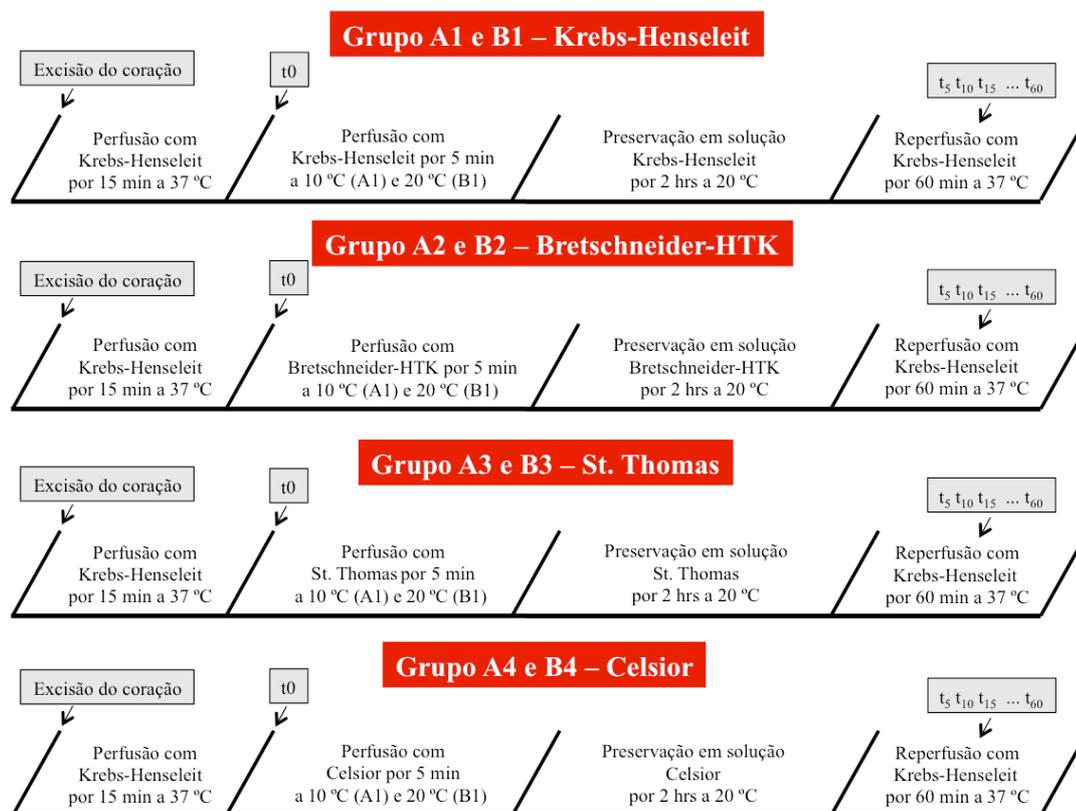


Figura 9 – Protocolo dos grupos estudados A e B para 10°C e 20°C, respectivamente. Grupo A1 e B1 - solução Krebs-Henseleit (KHB); Grupo A2 e B2 - Solução Bretschneider-HTK (HTK); Grupo A3 e B3 - Solução St. Thomas (STH); Grupo A4 e B4 - Solução Celsior. t0, tempo imediatamente antes do período de infusão da solução hipotérmica com valores basais; t5, t10, t15... a t60 correspondem à medições nos tempos de 5min em 5min de reperfusão, respectivamente.

2.4.2 *Pressão intraventricular e pressão arterial sistólica*

A pressão arterial sistólica foi medida em mmHg por cânula intra-aórtica, e a pressão diastólica por meio de cateter balão na cavidade ventricular esquerda.

2.4.3 *Velocidade máxima de elevação da pressão ventricular esquerda (+dP/dt)*

Para avaliação da contratilidade miocárdica, elegeu-se a primeira derivada temporal positiva da pressão ventricular esquerda, $+dP/dt^{195, 196}$, calculada a partir da curva de pressão intraventricular, conforme descrições de Gottschall¹⁹⁷, e medida em mmHg/seg.

2.4.4 *Velocidade máxima de queda da pressão ventricular esquerda (-dP/dt)*

Para avaliação do relaxamento do ventrículo esquerdo, elegeu-se a primeira derivada temporal negativa da pressão ventricular esquerda, $-dP/dt^{198, 199}$, determinada a partir de medidas obtidas nas curvas de pressão ventricular, de acordo com as descrições de Gottschall¹⁹⁷, e medida em mmHg/seg.

2.4.5 *Fluxo coronariano*

O FCo foi determinado por meio da coleta da drenagem venosa coronária em recipiente graduado, registrado em mL/min.

2.5 Análise estatística

Empregaram-se a técnica de reamostragem *Bootstrap*²⁰⁰, a análise de variância em blocos completamente casualizados e o teste *Tukey* de comparações múltiplas²⁰¹. Considerou-se como nível de significância o valor de $p < 0,05\%$.

RESULTADOS

3.1 Análise Descritiva

Os resultados descritivos mostraram que as variáveis biométricas apresentaram baixa variabilidade, caracterizando assim a homogeneidade da amostra.

Os ratos que receberam soluções a 10°C apresentaram peso médio variando no intervalo 313,1g±0,35; tamanho médio entre 23,4cm±0,06; peso médio do coração variando entre 1,36g±0,005; e diâmetro ventricular médio compreendido no intervalo 10,02mm±0,07.

Os animais submetidos às referidas soluções a 20°C tiveram peso médio entre 286,3g±1,69; tamanho médio no intervalo 22,7cm±0,12; peso médio do coração variando entre 1,25g±0,018; e diâmetro ventricular médio compreendido no intervalo 9,31mm±0,08. A Tabela 5 detalha esses e os demais resultados observados em relação a cada temperatura e solução utilizada.

3.2 Análise Inferencial

A análise de variância em blocos completamente casualizados evidenciou, ao nível de 5% de significância, que o comportamento das variáveis correspondentes hemodinâmicas mediante aplicação das diferentes soluções muda em função da

temperatura utilizada.

Tabela 5 - Medidas descritivas do peso, tamanho, tamanho do coração e diâmetro do ventrículo de acordo com a temperatura e a solução utilizada

Temperatura Utilizada	Solução Utilizada	Peso (g)		Tamanho (cm)		Peso do Coração (g)		Diâmetro do Ventrículo (mm)	
		Intervalo	CV	Intervalo	CV	Intervalo	CV	Intervalo	CV
10 Graus	Krebs-Henseleit	315,3 ± 0,27	0,4%	23,2 ± 0,02	0,5%	1,33 ± 0,002	0,6%	9,82 ± 0,05	2,8%
	Bretschneider-HTK	312,2 ± 0,21	0,3%	23,8 ± 0,03	0,6%	1,36 ± 0,002	0,6%	9,78 ± 0,02	1,1%
	St. Thomas	312,0 ± 0,21	0,3%	23,1 ± 0,03	0,6%	1,37 ± 0,003	1,0%	10,35 ± 0,04	2,0%
	Celsior	313,0 ± 0,25	0,4%	23,5 ± 0,03	0,6%	1,39 ± 0,003	1,0%	10,12 ± 0,07	3,5%
Total		313,1 ± 0,35	0,6%	23,4 ± 0,06	1,2%	1,36 ± 0,005	1,8%	10,02 ± 0,07	3,4%
20 Graus	Krebs-Henseleit	295,0 ± 0,51	0,9%	23,4 ± 0,06	1,3%	1,22 ± 0,007	2,7%	8,92 ± 0,04	2,5%
	Bretschneider-HTK	277,5 ± 1,43	2,6%	22,1 ± 0,05	1,1%	1,20 ± 0,007	2,8%	9,14 ± 0,05	2,8%
	St. Thomas	284,0 ± 1,27	2,3%	22,5 ± 0,07	1,6%	1,39 ± 0,016	5,7%	9,87 ± 0,04	2,2%
	Celsior	288,6 ± 1,16	2,0%	23,0 ± 0,09	1,9%	1,19 ± 0,006	2,5%	9,31 ± 0,04	2,3%
Total		286,3 ± 1,69	3,0%	22,7 ± 0,12	2,6%	1,25 ± 0,018	7,4%	9,31 ± 0,08	4,5%

CV – coeficiente de variação

Os melhores resultados a 10°C foram obtidos pelas soluções Celsior (frequência cardíaca, pressão sistólica, +dp/dt e -dp/dt) e Bretschneider-HTK (fluxo coronariano). A 20°C, os melhores desempenhos foram das soluções Krebs-Henseleit (frequência cardíaca) e Celsior (pressão sistólica, +dp/dt, -dp/dt e fluxo coronariano). Ver Tabela 6.

A solução St. Thomas foi responsável pelos piores resultados a 10°C em todas as variáveis correspondentes hemodinâmicas. A 20°C as piores soluções foram Celsior (frequência cardíaca), St. Thomas (pressão sistólica, +dp/dt e -dp/dt) e Krebs-Henseleit (fluxo coronariano).

Tabela 6 – Desempenho das soluções: variáveis correspondentes hemodinâmicas, segundo a temperatura (cálculos estatísticos na tabela 17 – anexo)

Temperatura	Diferença	Frequência	Pressão	(+dP/dt)	(-dP/dt)	Fluxo Coronariano
	Média	Cardíaca	Sistólica			
10 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior	Bretschneider-HTK
	Pior	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas
20 Graus	Melhor	Krebs-Henseleit	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior
	Pior	Celsior	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	Krebs-Henseleit

Por meio da análise de variância em blocos completamente casualizados, nesse caso em relação à razão das variáveis correspondentes hemodinâmicas e levando-se em conta a variável tempo, percebeu-se ao nível de 5% de significância que de modo geral as infusões a 20°C apresentaram os melhores resultados (Tabela 7).

Os melhores desempenhos da frequência cardíaca a 10°C foram das soluções Krebs-Henseleit (5 e 15 minutos), Celsior (5 e 30 minutos) e St. Thomas (60 minutos). A 20°C, a solução St. Thomas forneceu aos melhores resultados em todos os tempos.

Tabela 7– Desempenho das soluções: razão da frequência cardíaca (cálculos estatísticos na tabela 18 - anexo)

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60	
10 Graus	Melhor	Krebs-Henseleit e Celsius		Krebs-Henseleit	Celsius	St. Thomas
	Pior	Bretschneider-HTK e St. Thomas		St. Thomas	St. Thomas	Krebs-Henseleit e Bretschneider-HTK
20 Graus	Melhor	St. Thomas		St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas
	Pior	Celsius		Celsius	Celsius	Bretschneider-HTK

O gráfico 1, a seguir, mostra o comportamento das soluções em relação a variável correspondente hemodinâmica frequência cardíaca.

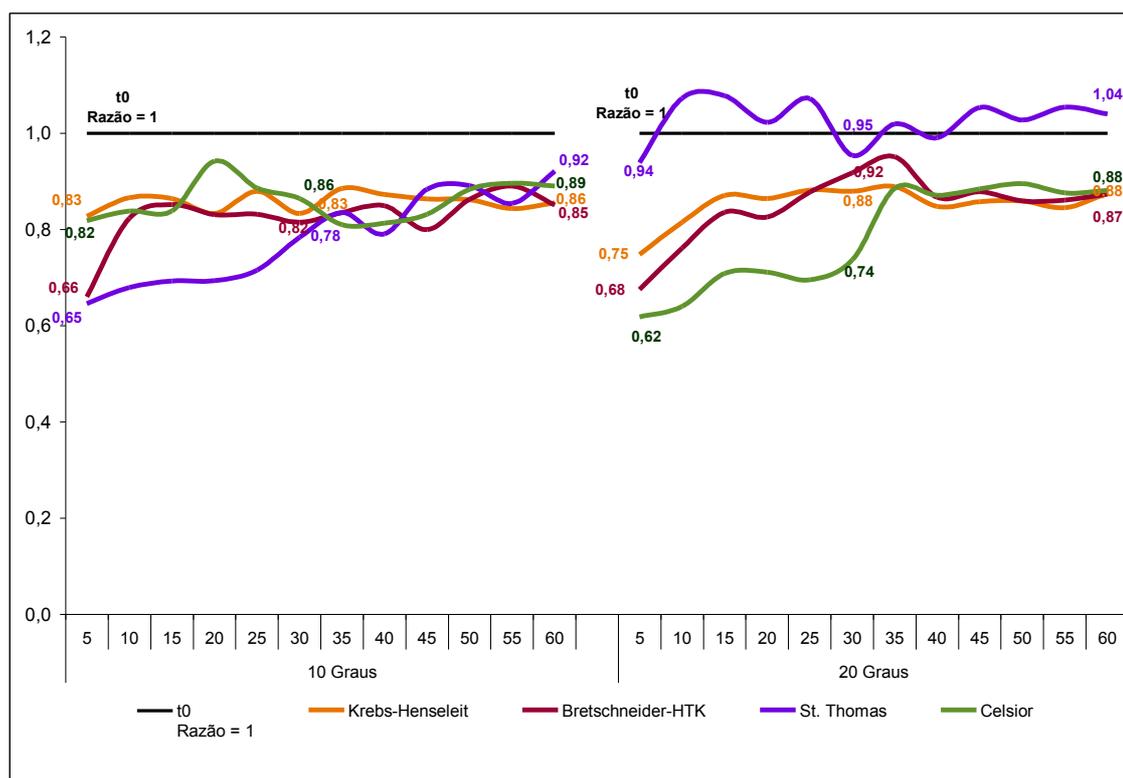


Gráfico 1 – Razão da frequência cardíaca, segundo a solução e a temperatura

Na variável pressão sistólica, a solução Celsior foi a melhor a 10°C e 20°C (5, 15, 30 e 60 minutos – Tabela 8).

Tabela 8 – Desempenho das soluções: razão da pressão sistólica (cálculos estatísticos na tabela 19 - anexo)

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior
	Pior	Krebs-Henseleit e St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas
20 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior
	Pior	Krebs-Henseleit e St. Thomas	Krebs-Henseleit e St. Thomas	St. Thomas	Krebs-Henseleit

O gráfico 2 mostra o comportamento das soluções em relação a variável correspondente hemodinâmica pressão sistólica.

Na $+dp/dt$, a 10°C, as soluções Celsior (5, 15 e 30 minutos) e Krebs-Henseleit (60 minutos) responderam pelos melhores resultados. A 20°C, a solução Celsior apresentou os melhores resultados (5, 15, 30 e 60 minutos). Ver Tabela 9.

O Gráfico 3 mostra o comportamento das soluções em relação a variável correspondente hemodinâmica ($+dP/dt$).

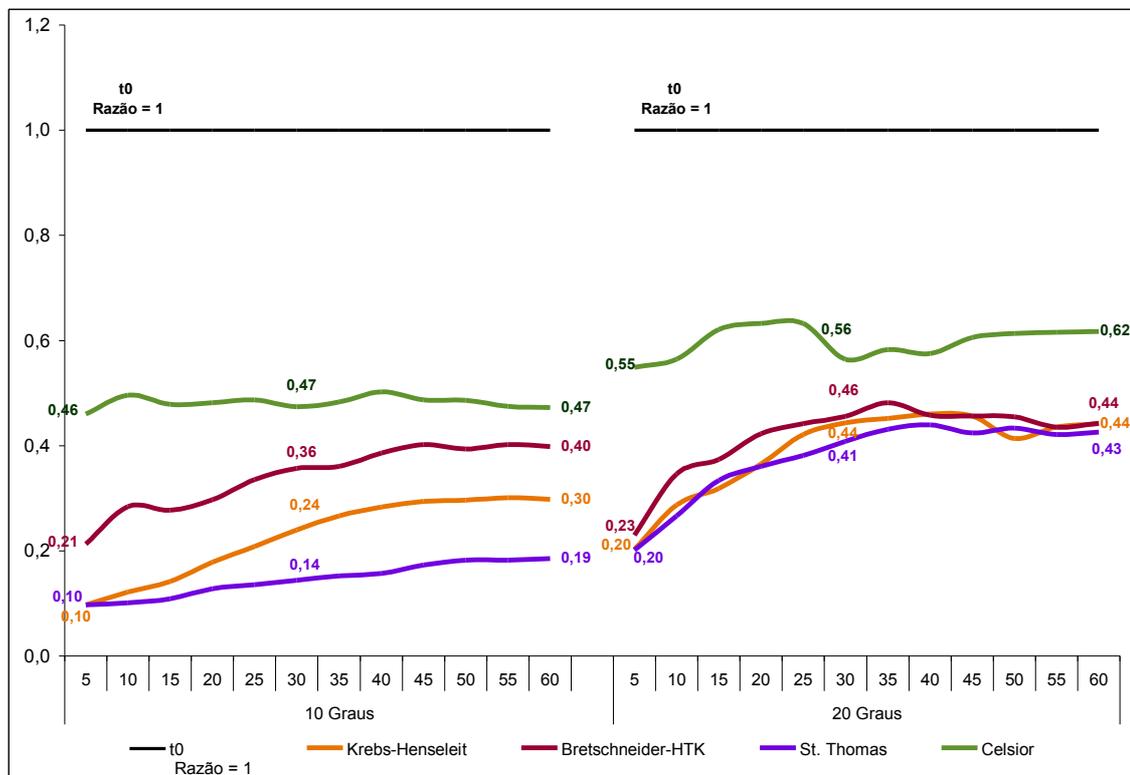


Gráfico 2 – Razão da pressão sistólica, segundo a solução e a temperatura

Tabela 9 – Desempenho das soluções: razão da (+dP/dt) (cálculos estatísticos na tabela 20 – anexo)

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Krebs-Henseleit
	Pior	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas
20 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior
	Pior	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	Krebs-Henseleit e St. Thomas

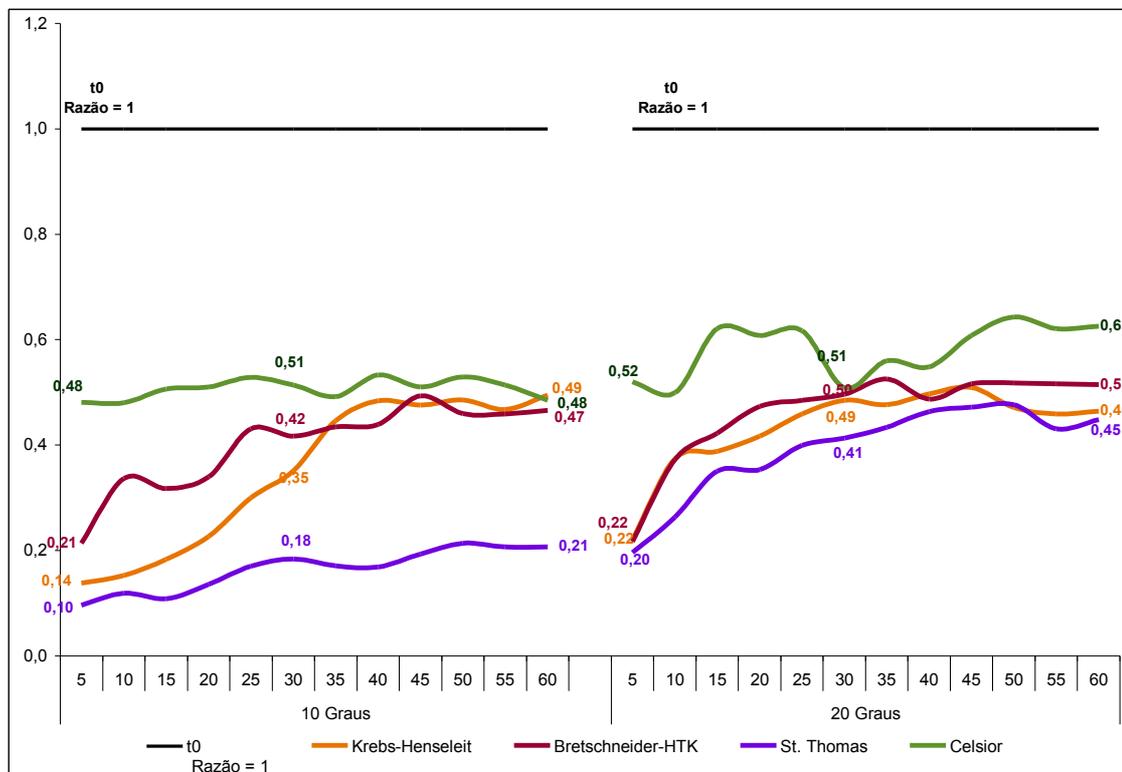


Gráfico 3 – Razão da (+dP/dt), segundo a solução e a temperatura

Na variável (-dp/dt), a solução Celsior foi a melhor a 10°C e 20°C (5, 15, 30 e 60 minutos, mostrado na Tabela 10). O Gráfico 4, mostra o comportamento das soluções em relação à variável correspondente hemodinâmica (-dP/dt).

O Gráfico 5, a seguir, mostra o comportamento das soluções em relação à variável correspondente hemodinâmica fluxo coronariano.

Tabela 10 – Desempenho das soluções: razão da $(-dP/dt)$ (cálculos estatísticos na tabela 21 - anexo)

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior
	Pior	Krebs-Henseleit e St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas
20 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior
	Pior	Krebs-Henseleit	Krebs-Henseleit	Krebs-Henseleit	Krebs-Henseleit

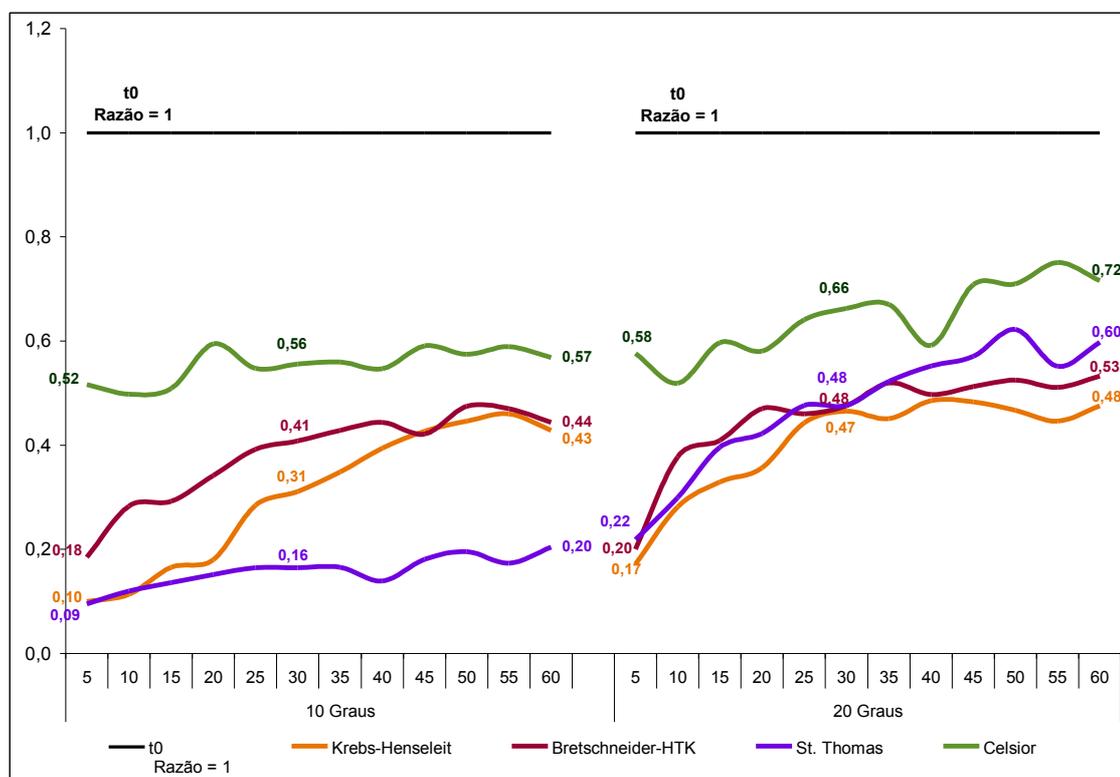


Gráfico 4 – Razão da $(-dP/dt)$, segundo a solução e a temperatura

Tabela 11 – Desempenho das soluções: razão do fluxo coronariano (cálculos estatísticos na tabela 22 - anexo)

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Melhor	Celsior	Bretschneider-HTK	Bretschneider-HTK	Bretschneider-HTK
	Pior	Krebs-Henseleit e St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas	St. Thomas
20 Graus	Melhor	Celsior	Celsior	Celsior	Celsior
	Pior	Krebs-Henseleit	Krebs-Henseleit	Krebs-Henseleit	Krebs-Henseleit

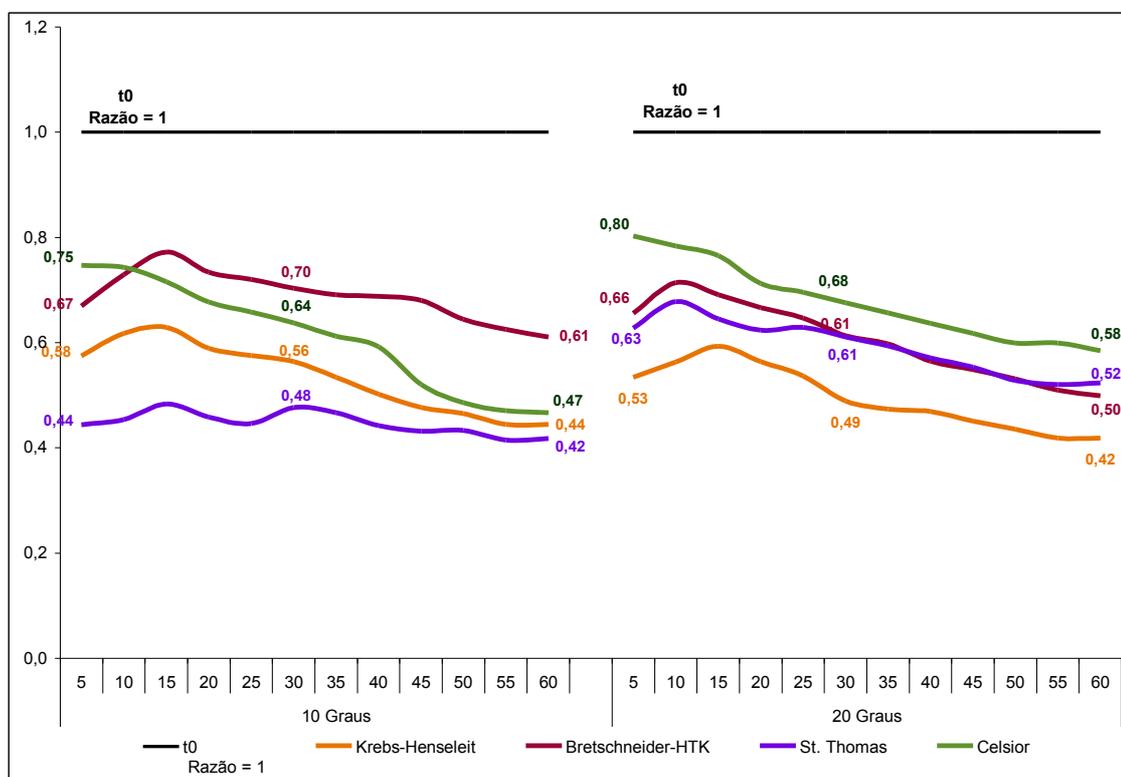


Gráfico 5 – Razão do fluxo coronariano, segundo a solução e a temperatura

Por fim, no fluxo coronariano, a 10°C, as soluções Celsior (5 minutos) e Bretschneider-HTK (15, 30 e 60 minutos) responderam pelos melhores desempenhos. A 20°C, a solução Celsior apresentou os melhores resultados (5, 15, 30 e 60 minutos).

DISCUSSÃO

4.1 Considerações gerais

A disfunção ventricular é uma das principais complicações após cardiectomia e representa também importante causa de morte. As injúrias sofridas pelo miocárdio durante as intervenções foram sempre motivo de grandes preocupações e pesquisas desde os primórdios das operações cardiovasculares. O controle e o emprego de métodos que visam atenuar e aumentar a resistência do coração têm sido motivo de diferentes pesquisas ao longo dos últimos anos.

Os efeitos deletérios da isquemia sobre os tecidos são conhecidos há muitos anos e alvos de inúmeras investigações, todavia, o tema passou a ter maior interesse com a expansão da cirurgia cardiovascular e a introdução dos métodos intervencionistas percutâneos de revascularização do miocárdio.

Novos ensinamentos surgiram com a possibilidade de restaurar precocemente o fluxo coronariano. A isquemia então deixou de ser analisada como um fenômeno isolado e passou a ser entendida com um fenômeno mais complexo, pois, descobriu-se que os efeitos produzidos pela reperfusão são tão ou mais nocivos ao miocárdio do que aqueles produzidos pelo período de anóxia. Atualmente, os eventos isquêmicos sofridos são denominados de lesão de isquemia e reperfusão, pois, ambos ocorrem

acoplados e de forma sequencial. Apesar de cada um deles atuar de forma independente e com intensidade diferente, o resultado final depende da somatória de ambos os eventos. Seguindo este princípio, os eventos isquêmicos que cada coração sofreu isoladamente foram analisados de forma integrada com os respectivos períodos de reperfusão.

Os estudos sobre os efeitos da isquemia e reperfusão sobre o miocárdio assumem especial destaque na prática clínica em diferentes situações tais como: trombólise coronária, angioplastia coronariana percutânea e após períodos prolongados de parada cardíaca isquêmica durante a cirurgia do coração com circulação extracorpórea. Com a expansão da cirurgia cardíaca operando pacientes cada vez mais graves e ampliando-se a atuação sobre afecções mais complexas, tornou-se obrigatório a melhora dos métodos de proteção miocárdica, em especial o transplante cardíaco, na procura de órgãos à distância²⁰². Esta mesma preocupação tem ocorrido nas equipes que realizam transplantes dos demais órgãos sólidos, bem como, aquelas interessadas na expansão dos transplantes multiviscerais.

Tendo em vista o número de grupos como os corações foram divididos para o estudo e o número de variáveis eleitas para avaliação do desempenho hemodinâmico diante das duas temperaturas, associados a fatores inerentes ao desenho da pesquisa

optou-se, por questões de facilidade prática, subdividir a discussão em tópicos, respeitando-se as interações existentes entre eles.

4.2 Análise do papel da hipotermia

A hipotermia, por si só, é capaz de reduzir a atividade das enzimas e, por conseguinte, as próprias reações metabólicas inerentes à vitalidade celular. Os componentes iônicos que, direta ou indiretamente dependem de bombas ativas, têm as suas concentrações alteradas com a redução da atividade metabólica. A redução global controlada do metabolismo celular apresenta benefícios desejáveis diante de eventos isquêmicos prolongados pela maior conservação dos radicais fosfatos ricos em energia sob a forma de ATP (adenosina trifosfato) e ADP (adenosina difosfato), os quais serão extremamente úteis no período de reperfusão. Esses princípios são universais e se aplicam aos diferentes órgãos e tecidos submetidos ao estresse da isquemia.

Deve-se ressaltar que a hipotermia não induz à paralisação do metabolismo celular, mas é capaz de reduzi-lo a taxas muito pequenas. Estudos experimentais^{156, 184} têm demonstrado que o miocárdio, em condições de normotermia, consome cerca de 9mL de O₂/100mg de miocárdio/minuto e quando a temperatura passa de 37°C para 22°C ocorre redução do consumo para 0,9mL de O₂/100mg de miocárdio/minuto.

Observa-se que a redução de cerca de 40% da temperatura produziu redução de aproximadamente 90% do consumo de oxigênio. Estes valores são elevados e devem sempre ser considerados na elaboração dos protocolos de proteção miocárdica.

Dessa forma, a hipotermia é capaz de retardar as reações enzimáticas intracelulares que degradam os componentes essenciais para a viabilidade do órgão, inibindo a lise das organelas como lisossomos que liberam enzimas autolíticas responsáveis pela morte celular. Atualmente a hipotermia é um item presente nos diferentes métodos de proteção miocárdica e de outros órgãos também.

4.3 Análise crítica da composição iônica das soluções cardioplégicas

A atividade elétrica do miocárdio responsável pela contração do coração se traduz pelo potencial da ação que, em última análise, representa a movimentação ordenada e sequencial de íons através da membrana do cardiomiócito. Portanto, é possível se obter a cessação dessa atividade elétrica fisiológica e, por conseguinte, dos movimentos mecânicos por intermédio de modificação abrupta do meio extracelular impedindo a despolarização da membrana. Este artifício farmacológico pode ser obtido pela infusão de solução cardioplégica através das artérias coronárias. Estas soluções apresentam a capacidade de modificar rapidamente o extracelular, impedindo

a contração das fibras cardíacas, mantendo-as relaxadas e, desta forma, preservando os radiais energéticos.

Na intimidade celular, observa-se redução instantânea do gradiente de K^+ transmembrana, anulando o potencial de ação pela paralisação dos movimentos iônicos e assistolia cardíaca. A despolarização inativa os canais rápidos de Na^+ resultando em cessação das atividades elétrica e mecânica do coração. O K^+ em concentração elevada, acima de 25 a 30mmol/L, promove a despolarização da membrana, e o potencial ultrapassa o valor de -40 mV. Acima disso, os canais lentos de Ca^{++} se abrem, tanto no cardiomiócito como no músculo liso vascular, promovendo a contração cardíaca e das artérias coronárias, tendo como resultado final nesta última o aumento da resistência coronariana ao fluxo.

Quando a concentração de K^+ é menor, por volta de 15 a 17mmol/L, a fibra muscular lisa ou cardíaca se despolariza, porém, como o potencial de membrana permanece abaixo de -40mV, entre -60 a -50mV, então, os canais de Na^+ são inativados e as fibras ficam inexcitáveis, mas relaxadas, porque o cálcio não entra na célula.

As soluções que não apresentam Ca^{++} na sua composição alteram o

comportamento da membrana do cardiomiócito, e os canais iônicos também se desestabilizam, de tal forma que a permeabilidade iônica fica comprometida. Pois o cálcio é um elemento que promove a estabilidade dos canais iônicos nas membranas e, na sua ausência, a membrana se altera, podendo se transformar em fonte geradora de arritmias ou de falta de excitabilidade ao cardiomiócito.

As soluções cardioplégicas em uso atualmente podem ser divididas em função do padrão da sua composição iônica quanto à semelhança ao meio intra ou extracelular. As soluções com composição semelhante ao meio intracelular tendem a apresentar concentração reduzida de Na^+ e elevada em K^+ . Desta forma, têm por objetivo reduzir o edema celular pela perda de K^+ para o extracelular^{121, 127}. Os benefícios das soluções intracelulares incluem rápida parada mecânica cardíaca e menor edema intracelular. As soluções da Universidade de Wisconsin, Bretschneider-HTK, Stanford e Euro-Collins são exemplos do tipo intracelular.

As soluções com composição iônica semelhante ao meio extracelular são pobres em K^+ e ricas em Na^+ , e também apresentam bom desempenho com excelentes resultados especialmente em transplante pulmonar¹²⁹. Essas informações sugerem que, ao lado da composição desde que respeitados os critérios peculiares de administração de cada uma delas, é possível se obter resultados semelhantes na preservação de

órgãos¹²⁸. Todavia, aparentemente as soluções que contém maiores concentrações de Na^+ e menores de K^+ parecem produzir melhores resultados na preservação cardíaca¹²². As soluções cardioplégicas do tipo Celsior, St. Thomas 1 e 2, Universidade de Wisconsin-1 e a solução de preservação de Lyon são exemplos de soluções com composição semelhante ao meio extracelular. Tanto para soluções tipo intracelular como extracelular as pesquisas têm sugerido a inclusão de novos elementos com o objetivo de melhorar o desempenho das soluções disponíveis no mercado^{121, 125, 128, 130-133}.

Em estudo anteriormente publicado,^{203, 204} observou-se que preparações de coração isolado de ratos, perfundidos por 5 min com as soluções cardioprotetoras a 10°C do tipo extracelular (Krebs-Henseleit, St. Thomas e Celsior) e do tipo intracelular (Bretschneider-HTK), com isquemia estática de 120 min a 20°C, após a reperfusão por 60 min, a solução do tipo extracelular (Celsior) apresentou melhores resultados em relação ao tipo intracelular (Bretschneider-HTK). Porém, em relação ao edema miocárdico, a solução do tipo intracelular (Bretschneider-HTK) apresentou melhor resultado em relação às do tipo extracelular (Krebs-Henseleit, St. Thomas e Celsior). No presente experimento, com infusão das soluções cardioprotetoras por 5 min a 10°C e a 20°C, observou-se diferenças nos resultados dependentes da temperatura de

infusão. Porém, a solução extracelular (Celsior) apresentou melhor desempenho ventricular em relação a do tipo intracelular (Bretschneider-HTK) em ambas temperaturas.

As soluções do tipo intracelular tendem a produzir assistolia de forma mais rápida e completa e, desta forma, parecem reduzir as trocas iônicas deletérias através da membrana celular durante a indução da cardioplegia e mesmo na manutenção do coração em hipotermia. Estas observações têm sido discutidas de forma controversa. Todavia, uma análise retrospectiva que incluiu 9.401 pacientes submetidos a transplante cardíaco, entre 1987 e 1992, concluiu que o *odds ratio* (razão das chances) ajustado foi menor para pacientes cujos corações doados haviam sido preservados em soluções intracelulares¹³⁹. Porém, evidências relatam a superioridade das soluções do tipo extracelular na preservação de órgãos²⁰⁵. Os benefícios das soluções do tipo intracelular podem ser devido à sua habilidade em induzir mais rapidamente a completa parada cardíaca e prevenir as trocas deletérias do fluxo iônico na membrana durante a hipotermia.

A solução inicialmente proposta por Bretschneider sofreu modificações com a adição fundamentalmente de histidina, triptofano e α -cetogluturato, passando a ser denominada de solução Bretschneider-HTK. A incorporação destes visou melhorar o

sistema tampão, com neutralização de radicais livres pelo triptofano e pela histidina. O α -cetoglutarato e a histidina apresentaram participação ativa no metabolismo celular produzindo efeitos metabólicos benéficos. A solução Bretschneider-HTK tem sido utilizada em cirurgia cardíaca convencional, e no transplante cardíaco mostrou bons resultados¹²⁵. Pelo seu tipo de atuação prolongada, a solução Bretschneider-HTK tem mostrado vantagens adicionais nas operações minimamente invasivas pela maior dificuldade na repetição sistemática da cardioplegia.

A solução Celsior, que tem baixa viscosidade e baixo conteúdo em K^+ , foi desenvolvida, inicialmente, para proteção do coração, porém tem sido empregada com bons resultados também nos transplantes de outros órgãos sólidos¹³⁴. A solução St. Thomas, talvez seja a solução cardioplégica mais difundida mundialmente pela simplicidade e pelos bons resultados apresentados¹³⁸. Porém, o período de eficácia é menor, havendo a necessidade de se repetir a infusão por períodos não superiores a cada 15 ou 20 min.

Paradoxalmente, em estudo prévio,²⁰³ a solução Saint Thomas, quando infundida a 10°C, foi a que apresentou o pior desempenho contrátil em relação as demais estudadas. Possivelmente, o tempo de isquemia de 60 minutos, a temperatura e o tipo de modelo animal podem ter influência direta nas observações encontradas.

Como foi dito anteriormente, a solução St. Thomas oferece os melhores resultados em humanos quando repetida a cada 15-20 minutos. Todavia, mesmos nos transplantes clínicos, muitos centros utilizam a solução St. Thomas para cardioproteção e transportam o órgão imerso na mesma solução a 4°C, com bons resultados. No presente estudo, com os corações perfundidos a 20°C, pode-se observar que o comportamento da solução St. Thomas permaneceu com o pior resultado em relação ao desempenho contrátil do ventrículo esquerdo.

Ainda não se conhece a fórmula ideal da solução preservativa para o coração. A busca do ideal é responsável pelas diferentes propostas existentes e os múltiplos estudos sobre o tema^{139, 140}.

Algumas soluções de preservação desenvolvidas para outros órgãos muitas vezes são utilizadas como solução cardioplégica. Apesar de empregarem os mesmos princípios, podem apresentar diferenças, tendo em vista as peculiaridades de cada tecido¹⁴⁰. Este é o caso da solução Euro-Collins¹⁴¹ e da solução da Universidade de Wisconsin^{142, 143} que, atendendo adequadamente aos princípios gerais da preservação hipotérmica estática, podem não se adequar às necessidades metabólicas específicas do miocárdio. No caso da solução da Universidade de Wisconsin, existem preocupações particulares em relação à concentração elevada de K^+ , a qual poderia aumentar o

surgimento de contratatura relacionada ao Ca^{++144} , e à alta viscosidade devido ao *hidroxietilstarch*¹⁴⁵ que poderia prejudicar a resposta endotelial coronariana¹⁴⁶.

Desconhece-se também a formulação ideal para cada etapa da parada anóxica do miocárdio, uma vez que em cada uma delas o miocárdio sofre interferências diferentes. Possivelmente, a formulação para a indução da parada cardíaca anóxica seja idealmente diferente da solução responsável pela proteção durante a operação e daquela no momento da reperfusão inicial^{147, 148, 149}. Este tema foi muito bem levantado nos estudos de Kohno et al.¹⁴⁷ que mostraram a eficácia da solução Euro-Collins (tipo intracelular) usada como meio de preservação e que apresentou melhor desempenho quando o coração foi inicialmente parado com solução cardioplégica do tipo extracelular. Esta observação foi discutida por Toshima et al.¹⁴⁸ que mostrou benefício adicional desse tipo de procedimento quando se realiza infusão de solução extracelular antes da reperfusão. Essas controvérsias são frutos dos desconhecimentos dos mecanismos intrínsecos do metabolismo celular e da melhor forma de aumentar a sua resistência à anóxia.

Tem-se aventado a hipótese de que a solução da Universidade de Wisconsin, após a infusão, pode levar à contratatura induzida por K^+ em função dos íons Ca^{++} contido no sangue residual ainda presente no interior das artérias coronárias¹⁵¹. Desta

forma, a reinfusão com a solução da Universidade de Wisconsin durante a fase de implantação do coração poderia ser danosa, principalmente com o aumento da temperatura¹⁵².

Tais considerações mais as citações anteriores levaram ao desenvolvimento de uma solução de preservação cardíaca específica denominada Celsior, cuja formulação visava atender a dois requisitos básicos:

- i. combinar os princípios gerais de preservação fria com aqueles específicos para preservação do miocárdio isquêmico reperfundido e,
- ii. permitir que uma simples solução fosse utilizada em todas as fases do transplante cardíaco.

Cuidados especiais foram tomados para que essa solução fosse formulada de maneira a permitir que, durante as duas últimas fases do transplante, implante e reperfusão, oferecesse flexibilidade de uso como cardioplegia cristalóide ou adicionada em meio sanguíneo.

4.4 Análise do desenho do modelo experimental

Os estudos dos efeitos da isquemia e reperfusão sobre o miocárdio oferecem

grandes desafios, pois, o fenômeno não ocorre de forma isolada, havendo sempre comprometimento sistêmico associado. Em certos eventos clínicos, torna-se muito difícil diferenciar o componente cardíaco das alterações sistêmicas. Mesmos em estudos clínicos controlados, o fenômeno não é uniforme, sofrendo interferência multifatorial. Por outro lado, estudos experimentais com diferentes espécies de mamíferos têm mostrado resultados concordantes que, tanto o dano reversível como irreversível do miocárdio, ocorrem mesmo com intensidade e formas diversas.

O tema tem assumido importância tal nos últimos anos que as pesquisas têm-se multiplicado e, por questões de facilidade, os ensaios experimentais se sobressaem sobre os estudos clínicos²⁰⁶. A possibilidade de ter melhor controle das diferentes etapas que envolvem o evento isquêmico e a própria reperfusão coloca os ensaios experimentais em posição de destaque nas pesquisas. Associa-se a este fato a possibilidade de analisar o miocárdio em várias espécimes e estudar certas etapas fisiológicas e bioquímicas, o que não é considerado ser uma opção viável clinicamente. No modelo animal também é possível se avaliar os efeitos presumidos das intervenções terapêuticas. Essas intervenções podem ser administradas exatamente em momento pré-determinado e com o tempo de oclusão e reperfusão estritamente controlado.

Todavia, o modelo animal apresenta, como principal desvantagem, a impossibilidade de transladar os resultados obtidos da pesquisa para a prática clínica, tendo em vista que, em ambas as situações, as respostas são muito diferentes. As doenças em humanos se manifestam de forma imprevisível, com tempo de latência variável, o que permite que mecanismos compensatórios possam ser acionados e as morbidades associadas desempenham papel relevante na modulação do evento. Por outro lado, o infarto agudo do miocárdio em humanos ocorre com elevação do segmento ST no eletrocardiograma que representa graficamente a oclusão trombótica por ruptura de placa aterosclerótica vulnerável. No modelo animal esta condição inexistente pela ausência de doença aterosclerótica, permitindo durante o experimento o controle do fluxo coronariano.

Diante dos fatos acima mencionados, na presente pesquisa objetivou-se analisar o papel da temperatura na preservação do miocárdio frente a diferentes soluções cardioplégicas e, para tanto, optou-se pelo emprego do modelo experimental para maior controle do evento. Com o intuito ainda de excluir a possibilidade de interferência das alterações sistêmicas sobre o coração, optou-se então pela análise do comportamento de corações isolados de ratos machos Wistar perfundidos pela técnica de Langendorff, sem recirculação do líquido de preservação.

No modelo animal é possível reproduzir grande parte das alterações fisiopatológicas da contratilidade miocárdica observadas após parada cardíaca anóxica em cirurgia cardíaca de humanos. A escolha de ratos machos visou excluir a possibilidade de qualquer interferência hormonal sobre o comportamento dos corações.

O modelo idealizado por Oscar Langendorff, em 1895, tornou-se mundialmente conhecido pela praticidade e possibilidade de estudar o comportamento do coração de diferentes animais^{207, 208}. Este modelo centenário vem sofrendo aperfeiçoamentos ao longo dos anos em função dos objetivos e do desenho das pesquisas desenvolvidas, todavia, os princípios originais permanecem. Na presente investigação decidiu-se pelo emprego do modelo já padronizado na instituição Fundação São Francisco de Assis e apresentados em outras publicações, sem recirculação, para evitar a contaminação metabólica do líquido de perfusão^{203, 209-211}.

Deve-se ressaltar que, no presente modelo adotado, a ausência da perfusão coronária com sangue excluiu a possibilidade da interferência de fatores não controlados que pudessem interferir no desempenho do coração. Desta forma, as alterações encontradas nas variáveis eleitas são oriundas, fundamentalmente, da intervenção isquêmica seguida de reperfusão.

4.5 Análise do projeto piloto da pesquisa

A hipotermia tem efeitos de proteção sobre os tecidos em geral e igualmente ocorre no coração pela maior conservação de radicais energéticos durante os eventos isquêmicos. Por outro lado, também é conhecido que o intervalo de cardioproteção oferecido pela hipotermia não deve chegar a valores muito baixos pois compromete a viabilidade celular pela desnaturação de proteínas. No entanto, é extremamente difundido que as soluções cardioplégicas devem ser infundidas a 4°C, o mesmo ocorrendo quanto as soluções onde o coração é imerso durante o transporte à distância. Este mesmo conceito também é muito difundido nos relatos dos diferentes experimentos que estudam proteção miocárdica com modelos similares com longos períodos de isquemia.

Em função de pesquisa inicial apoiada na literatura e seguindo os passos descritos nos diferentes métodos no desenho inicial do projeto de pesquisa estabeleceu-se que os corações seriam mantidos a temperatura de 4°C, controlada durante todo o período de isquemia fria. Surpreendentemente, o que se encontrou, independente da solução de preservação, foi um enrijecimento dos corações, com áreas esbranquiçadas sugerindo ausência de perfusão miocárdica local e mais de 50% deles

não recuperaram os batimentos. Os poucos corações que recuperaram os batimentos fizeram-no com extrema depressão das variáveis hemodinâmicas eleitas na pesquisa, tornando impossível qualquer conclusão em função da extensa dispersão dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos com o projeto piloto levaram à condução da pesquisa com temperatura de infusão da solução cardioprotetora a 10°C e 20°C em armazenamento durante a fase de isquemia fria a 20°C. Na prática clínica, analisando-se corações doados infundidos e mantidos imersos na solução cristalóide a 4°C, durante o transporte a distância para transplante, pode-se constatar que a temperatura monitorada do septo interventricular mantém-se entre 18 e 22°C, em função do tempo de imersão na solução cristalóide.

Essas informações confirmam que a hipotermia apresenta comportamento de proteção às células dentro de intervalos de temperatura relativamente bem estabelecidos. As diferenças entre as massas dos corações de ratos e humanos seguramente tem importante papel nessa análise, pois, os primeiros devem sofrer mais precocemente a agressão imposta pela hipotermia excessiva. Os corações de humanos apresentam maior resistência à redução da temperatura por sua maior massa, enquanto que os corações dos ratos rapidamente ultrapassam os limites inferiores de segurança.

Todavia, cumpre salientar que, na literatura alcançada, nenhum trabalho mostra esses detalhes técnicos devidamente detalhados.

4.6 Análise das variáveis hemodinâmicas eleitas na pesquisa

4.6.1 Análise da frequência cardíaca

No presente estudo a frequência cardíaca poderia ser analisada, fundamentalmente, sob dois enfoques diferentes, com ou sem a estimulação cardíaca artificial. Na primeira situação, a estimulação é feita no plano ventricular, e o ritmo natural do coração não seria levado em consideração. Neste caso, o que estaria em foco seria o comportamento hemodinâmico do coração frente a diferentes frequências cardíacas controladas. O ritmo natural do coração estaria automaticamente abolido pela estimulação artificial e pouca ou nenhuma informação seria obtida sobre o desempenho do nó sinusal.

Na segunda situação, que foi a adotada na presente investigação, não há estimulação cardíaca artificial objetivando-se valorizar o ritmo próprio do coração. Deve-se enfatizar que o tecido de condução apresenta maior sensibilidade à isquemia. Portanto, a manutenção das suas funções representa um forte marcador da sua

integridade e da capacidade de preservação oferecida ao tecido durante o período de isquemia^{202, 212}. Dessa forma, a frequência cardíaca, em última análise, é uma variável capaz de fornecer informações indiretas sobre a intensidade da lesão decorrente da isquemia e reperfusão. Entende-se que um sistema de condução com edema e sofrimento celular apresenta menor capacidade de despolarização e, conseqüentemente, apresentará alteração da frequência cardíaca.

Todas as soluções proveram preservação do sistema de condução cardíaca, porém tiveram resultados abaixo do valor basal desta variável tanto a 10°C como a 20°C. Observou-se que, após 30 min de reperfusão, todas as soluções mantiveram-se estáveis, exceto a solução St. Thomas na temperatura de 20°C, que apresentou arritmia durante toda a reperfusão. Infere-se que, nesta temperatura, houve melhor proteção dos trocadores iônicos nas membranas celulares que permitiu o aparecimento da arritmia devido à sobrecarga de cálcio¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Nota-se que a composição química da solução St. Thomas é a que apresenta maior concentração de Ca^{++} e K^+ . Na temperatura de 10°C, infere-se que os trocadores iônicos de membrana tornam-se muito deprimidos, não permitindo o aparecimento de arritmias durante a reperfusão¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

4.6.2 Análise da pressão sistólica do ventrículo esquerdo

A pressão sistólica do ventrículo esquerdo representa a pressão máxima gerada pelo ventrículo esquerdo no seu interior ao término da sístole que, em condições fisiológicas normais, é semelhante à pressão máxima sistólica encontrada na aorta ascendente, considerando a valva aórtica normal. Esta pressão está intimamente relacionada com a energia dispendida pelo ventrículo durante a sístole e que será transferida ao sangue sob a forma de energia cinética responsável pelo seu percurso ao longo de toda a grande circulação.

O trabalho gerado pelo ventrículo em elevar a pressão na cavidade ventricular esquerda contendo o volume de sangue no seu interior na fase diastólica final até a pressão sistólica provém da energia transferida pela massa miocárdica durante a contração. Esta energia potencial será transformada em energia cinética, responsável pela circulação sanguínea sistêmica. Este mesmo raciocínio é válido para o ventrículo direito em relação à pequena circulação ou pulmonar que, nesta investigação, não foi priorizada, entendendo-se que o ventrículo esquerdo é a câmara responsável mais importante do trabalho cardíaco.

É bem verdade que a pressão sistólica em condições fisiológicas está

condicionada aos fatores reguladores sistêmicos ligados à reatividade vascular que, no modelo de perfusão isolada, não exercem qualquer interferência. Logo, o único fator que entra em jogo na geração da pressão sistólica do ventrículo esquerdo é a capacidade contrátil do ventrículo. Portanto, situações que levam à depressão da contratilidade ventricular automaticamente irão interferir de forma direta na sua capacidade geradora de pressão. Foi com esse intuito que esta variável foi eleita como um marcador indireto do estado contrátil do ventrículo esquerdo.

No coração submetido à isquemia e reperfusão, seu estado contrátil estará automaticamente deprimido em função dos efeitos lesivos sobre o miocárdio, porém, atenuados diretamente pela capacidade de cardioproteção que foram a ele dispensados. O grau de recuperação da pressão sistólica do ventrículo esquerdo reflete, de forma indireta, o poder de preservação que a solução cardioplégica e a temperatura exercem nesse processo, sendo este um dos principais motivos de eleição desta variável hemodinâmica.

Dessa forma, nessa investigação, os resultados obtidos da pressão sistólica do ventrículo esquerdo em todos os eventos aqui analisados exibiram valores muito abaixo daqueles observados em condições basais, ou seja, antes de serem submetidos ao processo isquêmico seguido de reperfusão. Mostram, em última análise, como a

isquemia lesa o miocárdio e quanto é importante se trabalhar com métodos de preservação que possam atenuar ao máximo essas injúrias. A análise dos resultados permite mostrar nesse experimento que a composição eletrolítica de cada solução confere efeito protetor diferente a cada temperatura aplicada.

O comportamento da pressão sistólica do ventrículo esquerdo a 10°C mostra que a solução Celsior apresentou melhor resultado em relação às soluções Bretschneider-HTK, Krebs-Henseleit e St. Thomas, respectivamente. Ressalta-se o pior desempenho da solução St. Thomas em todo o período de reperfusão a 10°C.

Todavia, quando os corações foram mantidos a 20°C, pode-se notar que a capacidade de cardioproteção das diferentes soluções apresentou a seguinte distribuição, quanto à análise da pressão sistólica do ventrículo esquerdo: a solução Celsior apresentou melhora substancial em relação ao comportamento em 10°C e permaneceu superior às demais soluções. A solução Bretschneider-HTK em 20°C manteve comportamento semelhante ao da temperatura de 10°C. A solução Krebs-Henseleit teve melhoria no comportamento a 20°C em relação a 10°C. Ressalta-se a expressiva mudança de comportamento da solução St. Thomas com melhor desempenho a 20°C em relação a 10°C. Ao longo do período de reperfusão, seu comportamento a 20°C foi similar às soluções Bretschneider-HTK e Krebs-Henseleit.

Quando se analisa isoladamente o fator temperatura, observa-se que este exerceu influência significativa na recuperação do miocárdio visto sob a ótica da pressão sistólica do ventrículo esquerdo, com melhores resultados a 20°C do que a 10°C. Possivelmente, a 10°C, mesmo exercendo um efeito cardioprotetor, paralelamente, apresenta efeito lesivo semelhante a aquele observado no projeto piloto com a temperatura de 4°C.

As observações acima demonstram que a melhor combinação obtida pela análise da pressão sistólica do ventrículo esquerdo foi com a solução Celsior a 20°C. Todavia, a despeito dos efeitos cardioprotetores com as soluções cardioplégicas ajustadas à temperatura, as injúrias do fenômeno de isquemia e reperfusão ainda não são totalmente inevitáveis, exigindo-se que etapas íntimas do processo isquêmico tenham que ser melhor esclarecidas.

4.6.3 *Análise da $+dP/dt$*

Tão importante quanto analisar o valor absoluto da pressão sistólica gerada pelo ventrículo esquerdo é conhecer em que velocidade esses valores são atingidos. Do ponto de vista matemático, essa velocidade de transferência de energia é facilmente obtida pela determinação da primeira derivada de variação da pressão em função do

tempo, aqui representada pelo componente positivo da dP/dt ($+dP/dt$). Ventriculos que tenham a sua função deprimida por qualquer motivo exigirão maior tempo para completar a fase sistólica do ciclo cardíaco ventricular e, portanto, exibirão depressão na $+dP/dt$.

Sabe-se que a fase sistólica é relativamente curta em relação à diástole e cuja representação gráfica da curva de ascensão da pressão gerada pelo ventrículo é praticamente uma reta, ocupando quase que a integridade do tempo sistólico. Portanto, a determinação da $+dP/dt$ pode ser facilmente obtida pelo cálculo da tangente do ângulo formado entre a inclinação da curva de ascensão da pressão e o eixo das abscissas, que, do ponto de vista trigonométrico, representa a razão entre o cateto oposto e o adjacente. Deve-se ressaltar que a fase sistólica depende, fundamentalmente, do estado contrátil do ventrículo esquerdo, não sofrendo praticamente interferência da frequência cardíaca, uma vez que obedece a “Lei do Tudo ou Nada” da contração muscular.

Pelo acima exposto depreende-se que a conservação dos valores basais da $+dP/dt$ após a isquemia e reperfusão reflete a capacidade de preservação funcional do ventrículo esquerdo fornecida pela solução cardioplégica em função da temperatura empregada. Nesta investigação, a solução Celsior teve o melhor desempenho em

relação as soluções Bretschneider-HTK, Krebs-Henseleit e St. Thomas, respectivamente, tanto em 10°C como em 20°C, prevalecendo o melhor resultado a 20°C. Entretanto, mesmo assim, o limite mínimo obtido inicialmente (basal), não foi alcançado. A solução Bretschneider-HTK e Krebs-Henseleit comportaram-se similarmente nas temperaturas de 10°C e 20°C. A solução St. Thomas, no entanto, mostrou uma melhora significativa a 20°C, pareando com as soluções Bretschneider-HTK e Krebs-Henseleit. Portanto, a melhor combinação obtida pela análise da $+dP/dt$ foi obtida com a solução Celsior a 20°C.

4.6.4 *Análise da $-dP/dt$*

A fase diastólica representa o período de relaxamento do ventrículo, sendo responsável pela perfusão coronária, onde a tensão nas paredes encontra-se totalmente deprimida. Pode-se entender, do ponto de vista fisiológico, que enquanto a fase sistólica é caracterizada pelo consumo de energia que será transformado em trabalho, a diástole representa o período que o ventrículo utiliza para reposição dos estoques energéticos. A análise gráfica da curva pressórica nesta fase exhibe depressão mais lenta em relação à sístole, pois o tempo diastólico também é maior. Do ponto de vista matemático, a interpretação é similar, porém, como o ângulo agora se encontra

compreendido entre 90° e 180° e, portanto, o valor da tangente é negativo. Para fins de análise, aqui também se adota o seu valor máximo por questões de facilidade de interpretação.

A $-dP/dt$ sofre influência, fundamentalmente, de dois fatores: da frequência cardíaca que aumenta ou diminui o tempo diastólico, uma vez que o sistólico é praticamente constante, e da capacidade de relaxamento do ventrículo esquerdo. Neste último componente, as injúrias sofridas pelo ventrículo durante o período de isquemia-reperfusão e a capacidade de cardioproteção merece especial destaque. Desta forma, a fase diastólica depende do edema tecidual produzido e da capacidade de relaxamento do miocárdio. A determinação da variável hemodinâmica $-dP/dt$ foi calculada na presente investigação com esta finalidade, e se entende que a sua conservação, após o coração sofrer às injúrias da isquemia e reperfusão, indica a maior capacidade de cardioproteção do binômio solução cardioplégica e temperatura.

A solução Celsior foi a que apresentou o melhor resultado referente ao relaxamento ventricular, tanto a 10°C como a 20°C , com superioridade para 20°C . As soluções Bretschneider-HTK e Krebs-Henseleit tiveram comportamentos similares em ambas temperaturas. Destaca-se a solução St. Thomas que havia mostrado pior resultado a 10°C , mas a 20°C apresentou melhora significativa, ficando pareada aos 30

min e ultrapassando as soluções Bretschneider-HTK e Krebs-Henseleit após os 30 min. Infere-se que na temperatura de 20°C houve melhor preservação dos trocadores iônicos de membrana permitindo atenuação da sobrecarga de Ca^{++} e assim um melhor relaxamento muscular¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

4.6.5 Análise integrada das variáveis de contratilidade miocárdica

Na presente investigação a contratilidade miocárdica foi avaliada pelas variáveis: pressão sistólica do ventrículo esquerdo, +dP/dt e -dP/dt. Analisando-as de forma integrada, observa-se que os efeitos da isquemia e reperfusão sobre o miocárdio são extremamente deletérios produzindo redução acentuada do desempenho ventricular. Observa-se que, aos 60 minutos de reperfusão, os menores índices de depressão foi com a solução Celsior, com 53% a 10°C e 38% a 20°C na pressão sistólica do ventrículo esquerdo; 52% a 10°C e 37% a 20°C da +dP/dt e 43% a 10°C e 28% a 20°C da -dP/dt. Essas informações demonstram que nenhum dos métodos de preservação miocárdica aqui estudados e que são usados também na prática clínica ainda se mostram eficazes para coibir integralmente a ação lesiva da isquemia e reperfusão, ou seja, novos avanços precisam ser alcançados.

Esses dados sugerem, com bases em informações de fisiologia celular

classicamente conhecidas e citada anteriormente, que a perda da capacidade contrátil do miocárdio se deve ao declínio acentuado do ATP celular¹⁵⁹⁻¹⁶¹ por mudança da respiração celular de aeróbica para anaeróbica. A mudança no perfil metabólico normal deve ter levado à acidose intracelular pelo acúmulo de ácido láctico, acarretando depressão na atividade das bombas de membrana responsáveis pelas trocas iônicas.

Sabe-se que a concentração de K^+ na solução St. Thomas é de 20 mmol/L, enquanto que na Celsior o valor é de 15 mmol/L, e provavelmente valores acima de 15 mmol/L de K^+ podem ocasionar contratura miocárdica e das artérias coronárias. Esses efeitos seguramente são manifestados pelo aumento da resistência coronariana ao fluxo de perfusão e com comprometimento da microcirculação responsável pela nutrição tecidual. Por outro lado, acredita-se que a diferença na concentração de K^+ pode contribuir com o melhor desempenho da solução Celsior. Pesquisas futuras que visem a análise íntima do metabolismo celular devem ser estimuladas para o melhor entendimento do comportamento das variáveis hemodinâmicas e do próprio desempenho do coração frente aos efeitos nocivos da isquemia e reperfusão em contraposição aos métodos de cardioproteção vigentes.

4.6.6 Análise crítica d o fluxo coronariano

Em última análise, o fluxo coronário depende do gradiente de pressão entre a aorta ascendente e o átrio, e da resistência vascular oferecida à passagem do sangue. A resistência vascular coronária sofre influência direta da reatividade vascular, da obstrução vascular regional determinada em geral por embolia aérea e da pressão hidrostática do interstício. Este último componente está intimamente ligado ao grau de edema sofrido pelo tecido durante a isquemia e reperfusão. O edema acarretará a obstrução de caráter variável dos vasos coronários aumentando desta forma a resistência à passagem do sangue através da circulação coronária.

Considerando-se que na presente investigação trabalhou-se com o coração isolado, com gradiente pressórico fixo, o único fator fundamentalmente responsável pela oposição ao fluxo sanguíneo foi o edema intersticial, uma vez que os demais não exercem qualquer participação. Portanto, na análise do comportamento do fluxo coronário objetivou-se relacioná-lo diretamente com o edema miocárdico.

Os resultados obtidos indicam que a solução Bretschneider-HTK a 10°C e a Celsior a 20°C foram as que produziram os valores de fluxo mais elevados, ou seja, foram as que propiciaram melhores condições de proteção, contrárias ao desenvolvimento do edema tecidual, muito embora, tenha mantido valores muito inferiores a aqueles encontrados na situação basal. O comportamento das demais

soluções referentes ao quesito fluxo coronário obedeceu à seguinte ordem decrescente quanto à eficiência: a 10°C as soluções Celsior, Krebs-Henseleit e St. Thomas e a 20°C as soluções Bretschneider-HTK, St. Thomas e Krebs-Henseleit, respectivamente.

Infere-se que o fator temperatura interferiu diretamente nesses achados, indicando que a hipotermia mais acentuada facilita ou impede o edema tecidual, possivelmente por interferência direta no comportamento de membrana¹⁵⁹⁻¹⁶¹, não somente das células miocárdica mas também do endotélio, aumentando a sua permeabilidade.

Infere-se também que outro fator antagônico ao desenvolvimento do edema foi o teor osmótico de cada solução cardioplégica utilizada. Quanto à osmolaridade obedecem à seguinte ordem decrescente Celsior, Krebs-Henseleit, St. Thomas e Bretschneider-HTK, respectivamente. Todavia o desempenho comparativo entre elas não obedeceu a esta ordem, indicando que, entre outros fatores, a temperatura interferiu nesse processo.

Em relação à concentração de Na⁺, infere-se que as soluções cardioplégicas analisadas obedecem à seguinte ordem decrescente: St. Thomas, Krebs-Henseleit, Celsior e Bretschneider-HTK, respectivamente. Todavia o desempenho comparativo

entre elas não obedeceu a esta ordem, indicando que, entre outros fatores, o Na^+ por si só não interferiu nesse evento.

4.7 Análise crítica do método estatístico

No projeto piloto, considerou-se o teste estatístico aplicado para amostras pequenas na avaliação inicial dos resultados frente ao desenho da pesquisa. Posteriormente, no projeto definitivo, inicialmente procurou-se analisar a estabilidade dos resultados obtidos e a presença de flutuações por meio do coeficiente de variação da amostra. O estudo dos resultados confirmou a pequena dispersão dos dados que se mantiveram sempre com valores inferiores a 20%. As informações indicam maior confiabilidade nos resultados encontrados, os quais convergem para os valores das médias com pequenos desvios padrão. A pequena variação dos resultados indica homogeneidade da amostra.

Para análise dos resultados obtidos, empregou-se o teste de análise de variância ANOVA *One-Way* e o teste de *Tukey*, respeitando-se as possíveis críticas pertinentes pelo reduzido tamanho da amostra. Todavia, essas dificuldades são frequentes nos ensaios experimentais e não se justifica o sacrifício desnecessário de animais quando os resultados são convergentes e com baixa dispersão. Realizar

estudos experimentais com grandes amostras em situações cujos resultados são confluentes é passível de críticas consistentes do ponto de vista ético, e põem em risco a competência na condução da pesquisa.

Todavia, para vencer os desafios de trabalhar com pequenas amostras no que tange à análise estatística existe um método matemático válido de reamostragem denominado *Bootstrap*. Na presente investigação, respeitando-se os limites críticos de cada uma delas, ambas as formas de análise (com e sem *Bootstrap*) foram aplicadas de forma que os resultados obtidos foram interpretados de forma totalmente independente. Na análise sem *Bootstrap* houve situações onde não foi possível estabelecer estatisticamente se houve ou não diferença significativa. As conclusões foram similares reforçando a estabilidade e a consistência das conclusões obtidas.

Os valores dos resultados obtidos foram testados de forma absoluta e percentual em relação aos valores basais e, após a aplicação dos testes supracitados, houve concordância nas conclusões. A análise inferencial por meio do teste de variância *One-Way* mostrou diferenças significativas entre as soluções e os parâmetros correspondentes hemodinâmicos. Para se determinar quais soluções diferiam entre si em relação aos parâmetros correspondentes hemodinâmicos foi aplicado o teste de *Tukey*. Utilizando-se a razão dos parâmetros correspondentes hemodinâmicos pode-se

observar que a análise de variância *One-Way* mostrou quais soluções ofereciam valores mais próximos dos considerados basais. Por meio deste método foi possível demonstrar onde havia diferença estatística ou não durante o período de reperfusão. Para a comparação e identificação das diferenças estatísticas entre os grupos 10°C e 20°C realizou-se o teste de variância *Two-Way*.

4.8 Considerações finais

Os estudo de Menasché et al.²¹³, com corações preservados em solução Celsior não apresentaram diferença no grau de edema em relação a aqueles preservados em solução St. Thomas. Este fato sugere que, dentro do estreito limite de tempo usado no estudo, é pouco provável que a preservação da função diastólica foi unicamente devido à redução do grau de edema miocárdico. Sabe-se que corações submetidos à isquemia e reperfusão, mesmo com o emprego de soluções cardioprotetoras, são susceptíveis de apresentarem comprometimento da função diastólica pelo desenvolvimento de edema miocárdico, por contratura muscular excessiva ou ambos²¹⁴.

A solução St. Thomas, que é isenta de solutos impermeantes, mostrou na presente pesquisa, na temperatura de 10°C, a maior redução do fluxo coronário, sugerindo maior edema tecidual. Porém, em 20°C, seu comportamento é similar à

solução Bretschneider-HTK. Estas constatações não estão de acordo com outras observações que atribuem somente ao alto teor de cloreto existente nessa solução como um dos principais responsáveis pelo edema miocárdico^{154, 215}. A solução Celsior apresenta dois impermeantes, manitol e lactobionato, sendo que este último está entre os poucos elementos cuja omissão drasticamente reduz as propriedades protetoras reconhecidas da solução da Universidade de Wisconsin^{216, 217}. Além disso, a concentração total dos impermeantes tem sido elevada para 140mmol/L a fim de contrabalançar a molécula intracelular osmoticamente ativa, responsável pela entrada de água na célula sob condições anaeróbica e hipotérmica, inibindo as bombas de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ¹⁵⁵.

A histidina foi adicionada à solução Celsior com a finalidade de auxiliar no tamponamento do H^+ a baixas temperaturas^{218, 219}, e pela capacidade efetiva de remover o O_2^- ²²⁰. O radical livre de oxigênio pode contribuir para aumentar a concentração de Ca^{++} pela inativação da bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e da bomba $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ do retículo sarcoplasmático^{220, 221}. A histidina pode também contribuir para limitar a sobrecarga de Ca^{++} e, conseqüentemente, o componente Ca^{++} mediador responsável pela contratura miocárdica²²². O manitol tem sido eleito também por auxiliar na modulação dos radicais livres e pelo seu efeito osmótico, tendo aqui o

efeito de auxiliar na redução do edema²²³.

Na presente investigação, tanto em 10°C como em 20°C, as soluções Celsior e Bretschneider-HTK apresentaram melhor proteção cardíaca em relação às soluções St. Thomas e Krebs-Henseleit. Tanto Celsior como Bretschneider-HTK contém menor concentração de Ca^{++} , comparadas com as demais. Muitos estudos têm mostrado que o decréscimo da sobrecarga de Ca^{++} intracelular durante a isquemia e reperfusão melhora a recuperação miocárdica após preservação a frio^{224, 225}.

Ainda com relação à contratatura miocárdica, observa-se que as soluções extracelulares compartilham comumente concentração de Na^+ semelhante ao meio extracelular e uma alta concentração de K^+ para prevenir o desenvolvimento da sobrecarga de Ca^{++} e promover a redução do grau de depleção do ATP requerido para o início da contratatura¹⁵¹. Por outro lado, a solução Celsior contém baixa concentração de Ca^{++} e pH de 7,3 a 20°C, e cumpre com o princípio de bloquear a sobrecarga de Ca^{++} por meio de moderado grau de acidose²²⁶.

Estudos experimentais empregaram as soluções Celsior, Bretschneider-HTK e a solução da Universidade de Lyon (Lyps) com sucesso^{138, 227}. Michel et al.²²⁸, sugerem que, em ratos, as soluções Lyps e Celsior produzem enxertos com melhor

função ventricular esquerda após transplante. Em trabalho experimental, no qual foram comparadas inúmeras soluções, a sugestão foi que as soluções com característica extracelular oferecem melhor preservação, entre elas, Celsior e Lyps, associadas a melhores funções ventriculares²²⁸.

A análise comparativa entre o desempenho das soluções com formulação intracelular e extracelular tem apontado melhores resultados para a primeira¹³⁹. Todavia, as soluções Lyps e Celsior não foram testadas. Em estudo que comparou as soluções da Universidade de Wisconsin e Bretschneider-HTK em ratos, a resposta coronariana a estímulos farmacológicos, o débito cardíaco e a função ventricular esquerda foram melhores nos órgãos preservados em Bretschneider-HTK²²⁹. Esses dados controversos mostram a necessidade de se intensificar pesquisas que ajudem a definir soluções ideais, sendo que as divergências encontradas correm por conta da não uniformidade dos desenhos de pesquisa, diferenças individuais das soluções de cardiopreservação e o tipo de animal eleito para a pesquisa.

Pereda et al.²³⁰, em 2007, em estudo randomizado em pacientes, compararam o desempenho da solução Celsior versus St. Thomas 2 em cardioplegia sanguínea, não tendo achado diferenças significativas.

Puehler et al.²³¹, em 2010, consideraram que as mudanças induzidas pela hipotermia na função e morfologia da célula endotelial em órgãos preservados a frio para transplante cardíaco, podem conduzir à doença arterial coronariana. A hipotermia também causa efeitos celulares deletérios diretos e injúrias através de vários caminhos que ocorrem durante a reperfusão e que aumentam a medida que o tempo de armazenagem aumenta^{232, 233}. O componente celular mais sensível aos danos de preservação é o endotélio^{234, 235}, com dano adicional no início da reperfusão. Como consequências desses danos, surgem os edemas, a acumulação de plaquetas, desaparecimento das propriedades pró e anticoagulante e aderência de leucócitos²³³ que podem gerar consequências danosas no resultado pós-transplante²³⁶. Neste contexto, a busca de aperfeiçoamento nas fórmulas das soluções preservativas é de especial importância, objetivando minimizar as mudanças na homeostase celular, melhorar a função de barreira das membranas e conservar o volume celular, durante a armazenagem à frio^{232, 237-240}.

No presente estudo, as soluções St. Thomas e Krebs-Henseleit apresentaram pior proteção miocárdica em relação à Celsior e Bretschneider. Contudo, a solução Krebs-Henseleit apresentou melhora progressiva do desempenho contrátil em relação a St. Thomas a 10°C. Deduz-se que a adição de glicose como energético na Krebs-

Henseleit atribuiu melhor efeito protetor ao miocárdio em baixas temperaturas. Talvez seja devido à ação direta da glicose na membrana do cardiomiócito ou por causa do aumento da viscosidade da solução. De fato, as soluções Celsior, Bretschneider-HTK e Krebs-Henseleit contêm aditivos energéticos. Em contraste, a inexistência de energético na solução St. Thomas pode ter contribuído para seu pior resultado.

Deve ser lembrado que a solução Celsior compartilha algumas importantes características de sua formulação, em particular a alta concentração de Mg^{++} , a presença de glutamato e a histidina como tampão, com soluções cardioplégicas de uso rotineiro nas operações cardíacas, enquanto que outros componentes críticos da formulação Celsior, em particular manitol, lactobionato e glutathione reduzido, são parte integrante da solução de preservação usada clinicamente para órgãos doados. Essas considerações têm conduzido a estudos clínicos com o propósito de avaliar os efeitos das soluções preservativas no contexto do transplante cardíaco.

4.9 Limitações do estudo

Esse estudo faz parte de uma linha de pesquisa que compreende o estudo da disfunção endotelial e apoptose com as diferentes soluções cardioprotetoras, e possui limitações inerentes às pesquisas experimentais.

Os estudos em modelo animal permitem o ajuste do protocolo de acordo com os objetivos a serem alcançados. Entretanto, deve-se ressaltar que a perfusão de corações isolados com soluções sem sangue produz por si só distúrbios no desempenho do coração. Logo, os dados obtidos não pode ser transladado diretamente para aplicação clínica.

Deve-se considerar, entretanto, que os estudos comparativos com modelo animal têm-se mostrado efetivos nas pesquisas relacionadas à preservação miocárdica.

CONCLUSÕES

Considerando-se as limitações da presente investigação, os resultados aqui encontrados permitem concluir que:

1. As soluções de cardioplegia estudadas não foram capazes de coibir integralmente os efeitos deletérios da isquemia e reperfusão sobre o coração;

2. No presente estudo, a temperatura de 20°C promoveu melhor proteção no coração isolado de rato comparado com 10°C;

3. A solução Celsior conferiu melhor resultado para os corações isolados de ratos, submetidos à isquemia de 10°C, seguida da solução Bretschneider-HTK, Krebs-Henseleit e St. Thomas. Na temperatura de 20°C, a Celsior continuou apresentando o melhor resultado, seguida da Bretschneider-HTK, St. Thomas e Krebs-Henseleit.

ANEXO

4.10 Composição das soluções

Tabela 13 – Composição da solução de Krebs-Henseleit*

Componente	Concentração
Cloreto de sódio	126 mmol/L
Cloreto de potássio	4,8 mmol/L
Fosfato de potássio	1,2 mmol/L
Bicarbonato de sódio	25 mmol/L
Cloreto de cálcio	2,5 mmol/L
Sulfato de magnésio	1,2 mmol/L
Glicose	11,5 mmol/L
Osmolaridade	330 mOsm
pH	7,4±0,5

* - *Elaborada no Laboratório de Investigação Experimental da Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis – ServCor.*

Tabela 14 – Composição da solução Cardioplégica de Bretschneider-HTK (Custodiol®)*

Componente	Concentração
Cloreto de sódio	15 mmol/L
Cloreto de potássio	9 mmol/L
Cloreto de magnésio, 6 H ₂ O	4 mmol/L
Hidrocloreto de histidina, H ₂ O	18 mmol/L
Histidina	180 mmol/L
Triptofano	2 mmol/L
Manitol	30 mmol/L
Cloreto de cálcio, 2 H ₂ O	0,015 mmol/L
Alfa 2-cetogluturato (hidrogenato de potássio)	1 mmol/L
Osmolaridade	310 mOsm
pH	entre 7,4 e 7,45

* - Produzida por Pharmaceutical Company and Manufacturer - Germany.

Tabela 15 – Composição da Solução Cardioplégica St. Thomas*

Componente	Concentração
Na+	144 mmol/L
K+	20 mmol/L
Mg ⁺⁺	16 mmol/L
Ca ⁺⁺	2,2 mmol/L
Procaína	1,0 mmol/L
Osmolaridade	324 mOsm
pH	7,4

* - Produzida por Braile Biomédica Indústria, Comércio e Representação.

Tabela 16– Composição da Solução Cardioplégica Celsior*

Componente	Concentração
Manitol	60 mmol/L
Glutathione	3 mmol/L
Hidróxido de sódio	100 mmol/L
Cloreto de cálcio, 2H ₂ O	0,25 mmol/L
Cloreto de potássio	15 mmol/L
Cloreto de magnésio, 6H ₂ O	13 mmol/L
Histidina	30 mmol/L
Ácido glutâmico	20 mmol/L
Ácido lactobiônico	80 mmol/L
Osmolaridade	320 mOsm
pH	7,4

* - Produzida por Genzyme Polyclonals S.A.S. França.

4.11 Tabelas de cálculo estatístico

Tabela 17 – Teste Tukey: variáveis correspondentes hemodinâmicas, segundo a temperatura e a solução

Temperatura	Diferença Média	Frequência Cardíaca	Pressão Sistólica	(+dP/dt)	(-dP/dt)	Fluxo
10 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-18,79(*)	-18,09(*)	-179,14(*)	-150,07(*)	-2,72(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	9,91(*)	7,99(*)	252,86(*)	186,66(*)	1,93(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	-20,22(*)	-43,85(*)	-518,21(*)	-684,57(*)	-0,6(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	28,7(*)	26,08(*)	431,99(*)	336,72(*)	4,65(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-1,4341	-25,75(*)	-339,07(*)	-534,5(*)	2,12(*)
	St. Thomas - Celsior	-30,13(*)	-51,84(*)	-771,07(*)	-871,23(*)	-2,53(*)
20 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	21,64(*)	-4,37(*)	15,0815	-14,4589	-2,62(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	20,02(*)	2,58(*)	198,73(*)	162,67(*)	-1,58(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	32,23(*)	-33,55(*)	-292,73(*)	-458,92(*)	-4,4(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	-1,6221	6,95(*)	183,65(*)	177,13(*)	1,04(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	10,59(*)	-29,18(*)	-307,81(*)	-444,46(*)	-1,78(*)
	St. Thomas - Celsior	12,22(*)	-36,13(*)	-491,46(*)	-621,59(*)	-2,82(*)

(*)A diferença é significativa ao nível de 5% (p-valor < 0,05).

Tabela 18 - Teste Tukey: razão da frequência cardíaca

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	0,168(*)	0,0118	0,0182	0,0046
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	0,1818(*)	0,1711(*)	0,0492(*)	-0,0659(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	0,0095	0,0253	-0,0307(*)	-0,0351(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,0138	0,1594(*)	0,0309(*)	-0,0705(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-,1585(*)	0,0136	-0,049(*)	-0,0397(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,1723(*)	-0,1458(*)	-0,0799(*)	0,0308(*)
20 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	0,0725(*)	0,0351(*)	-0,0386(*)	0,002
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	-0,1912(*)	-0,207(*)	-0,075(*)	-0,1649(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	0,1296(*)	0,1621(*)	0,1421(*)	-0,0056
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	-0,2637(*)	-0,2421(*)	-0,0364(*)	-0,1669(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	0,057(*)	0,127(*)	0,1807(*)	-0,0076
	St. Thomas - Celsior	0,3207(*)	0,3691(*)	0,2171(*)	0,1593(*)

(*)A diferença é significativa ao nível de 5% (p-valor < 0,05).

Tabela 19 - Teste Tukey: razão da pressão sistólica

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-0,1154(*)	-0,1357(*)	-0,1174(*)	-0,1003(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	0,00040	0,0327(*)	0,0951(*)	0,112(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,3629(*)	-0,3372(*)	-0,2344(*)	-0,1751(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,1158(*)	0,1684(*)	0,2125(*)	0,2123(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,2475(*)	-0,2015(*)	-0,117(*)	-0,0748(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,3633(*)	-0,3699(*)	-0,3295(*)	-0,2871(*)
20 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-0,0268(*)	-0,0552(*)	-0,0125	-0,0007
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	0,0015	-0,0149	0,0352(*)	0,0156
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,3458(*)	-0,3021(*)	-0,1212(*)	-0,1754(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,0283(*)	0,0403(*)	0,0476(*)	0,0163
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,319(*)	-0,2469(*)	-0,1087(*)	-0,1747(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,3473(*)	-0,2872(*)	-0,1564(*)	-0,191(*)

(*)A diferença é significativa ao nível de 5% (p-valor < 0,05).

Tabela 20 - Teste Tukey: razão da (+dP/dt)

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-0,0762(*)	-0,1343(*)	-0,0656(*)	0,0288(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	0,0415(*)	0,0749(*)	0,1676(*)	0,2879(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,3432(*)	-0,323(*)	-0,1627(*)	0,0099
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,1176(*)	0,2092(*)	0,2332(*)	0,2591(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,2671(*)	-0,1887(*)	-0,0971(*)	-0,0188
	St. Thomas - Celsior	-0,3847(*)	-0,3979(*)	-0,3302(*)	-0,2779(*)
20 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	0,0032	-0,0341(*)	-0,0115	-0,0501(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	0,024(*)	0,0376(*)	0,0718(*)	0,016
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,3004(*)	-0,2324(*)	-0,0237	-0,1608(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,0208(*)	0,0717(*)	0,0833(*)	0,0661(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,3035(*)	-0,1983(*)	-0,0122	-0,1107(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,3244(*)	-0,27(*)	-0,0955(*)	-0,1768(*)

(*)A diferença é significativa ao nível de 5% (p-valor < 0,05).

Tabela 21 - Teste Tukey: razão da (-dP/dt)

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-0,0852 ^(*)	-0,1272 ^(*)	-0,097 ^(*)	-0,015
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	0,0049	0,0291 ^(*)	0,1465 ^(*)	0,2245 ^(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,4168 ^(*)	-0,3431 ^(*)	-0,245 ^(*)	-0,1396 ^(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,0901 ^(*)	0,1562 ^(*)	0,2434 ^(*)	0,2396 ^(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,3317 ^(*)	-0,2159 ^(*)	-0,148 ^(*)	-0,1245 ^(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,4217 ^(*)	-0,3721 ^(*)	-0,3914 ^(*)	-0,3641 ^(*)
20 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-0,0289 ^(*)	-0,0802 ^(*)	-0,0104	-0,0569 ^(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	-0,0473 ^(*)	-0,0666 ^(*)	-0,011	-0,122 ^(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,4045 ^(*)	-0,2679 ^(*)	-0,197 ^(*)	-0,2403 ^(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	-0,0184	0,0135	-0,0007	-0,065 ^(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,3756 ^(*)	-0,1878 ^(*)	-0,1866 ^(*)	-0,1834 ^(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,3572 ^(*)	-0,2013 ^(*)	-0,1859 ^(*)	-0,1184 ^(*)

(*)A diferença é significativa ao nível de 5% (p-valor < 0,05).

Tabela 22 - Teste Tukey: razão do fluxo coronariano

Temperatura	Diferença Média	5	15	30	60
10 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-0,0944 ^(*)	-0,1432 ^(*)	-0,1399 ^(*)	-0,1665 ^(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	0,1309 ^(*)	0,1449 ^(*)	0,0866 ^(*)	0,0262 ^(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,1717 ^(*)	-0,0863 ^(*)	-0,0739 ^(*)	-0,0226 ^(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,2253 ^(*)	0,2881 ^(*)	0,2265 ^(*)	0,1927 ^(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,0773 ^(*)	0,0569 ^(*)	0,0661 ^(*)	0,1438 ^(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,3027 ^(*)	-0,2312 ^(*)	-0,1605 ^(*)	-0,0488 ^(*)
20 Graus	Krebs-Henseleit - Bretschneider-HTK	-0,1212 ^(*)	-0,0984 ^(*)	-0,1246 ^(*)	-0,0803 ^(*)
	Krebs-Henseleit - St. Thomas	-0,0934 ^(*)	-0,0522 ^(*)	-0,1216 ^(*)	-0,1046 ^(*)
	Krebs-Henseleit - Celsior	-0,2686 ^(*)	-0,1723 ^(*)	-0,1869 ^(*)	-0,1656 ^(*)
	Bretschneider-HTK - St. Thomas	0,0278 ^(*)	0,0463 ^(*)	0,0029	-0,0244 ^(*)
	Bretschneider-HTK - Celsior	-0,1474 ^(*)	-0,0738 ^(*)	-0,0624 ^(*)	-0,0854 ^(*)
	St. Thomas - Celsior	-0,1752 ^(*)	-0,1201 ^(*)	-0,0653 ^(*)	-0,061 ^(*)

(*)A diferença é significativa ao nível de 5% (p-valor < 0,05).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heberden E. William Heberden the elder (1710-1801): aspects of his London practice. *Med Hist.* [Biography Historical Article]. 1986 Jul;30(3):303-21.
 2. Westaby S. *Landmarks in Cardiac Surgery*. Isis Medical Media, Oxford. 1997:187.
 3. Miller GW. *King of Hearts: The true story of maverick who pioneered open heart surgery*. New York: Crown Publishers; 2000.
 4. Williams DH. Stab wound of the heart, pericardium - Suture of the pericardium - Recovery - Patient alive three years afterward. *Med Rec.* 1897;1.
 5. Del Vecchio S. Sutura del Cuore. *Riforma Med* 1895; 11:38; quoted from Beck CS: Wounds of the heart: The technic of suture *Arch Surg* 1926; 13: 210. 1895.
 6. Rehn L. On penetrating cardiac injuries and cardiac suturing. *Arch Klin Chir.* 1897;55:315.
 7. Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med.* 1902;98:859-64.
 8. Carrel A. VIII. On the Experimental Surgery of the Thoracic Aorta and Heart. *Ann Surg.* 1910 Jul;52(1):83-95.
 9. Carrel A. Ultimate Results of Aortic Transplantations. *J Exp Med.* 1912 Apr 1;15(4):389-92.
 10. Souttar HS. The Surgical Treatment of Mitral Stenosis. *Br Med J.* 1925 Oct 3;2(3379):603-6.
 11. Forssmann W. Catheterization of the right heart *Klin Wochenshr.* 1929;8:2085.
 12. Gibbon JH, Jr. Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of pulmonary artery. *Arch Surg.* 1937(34):1105.
 13. Gross RE. Surgical Management of the Patent Ductus Arteriosus: With Summary of Four Surgically Treated Cases. *Ann Surg.* 1939 Sep;110(3):321-56.
 14. Zerbini EJ. Coronary ligation in wounds of the heart: report of a case in which ligation of the anterior descending branch of the left coronary artery was followed by complete recovery. *J Thorac Surg* 12. 1943;12:642-7.
-

15. Crafoord C, Nylin G. Crafoord C, Nylin G: Congenital coarctation of the aorta and its surgical treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1945;14:347.
 16. Blalock A. Physiopathology and surgical treatment of congenital cardiovascular defects. *Harvey Lect.* 1945;41:90-116.
 17. Gomes OM. *Técnicas de Cirurgia Cardiovascular.* Belo Horizonte - MG: Edicor; 2007.
 18. Bailey CP, Bolton HE, Jamison WL, Nichols HT. Commissurotomy for rheumatic aortic stenosis. I. *Surgery. Circulation.* 1954 Jan;9(1):22-31.
 19. Bailey CP. The surgical treatment of mitral stenosis (mitral commissurotomy). *Dis Chest.* 1949 Apr;15(4):377-97.
 20. Smithy HG, Pratt-Thomas HR, Deyerle HP. Aortic valvulotomy; experimental methods and early results. *Surg Gynecol Obstet.* 1948 May;86(5):513-23.
 21. Smithy HG. Aortic valvulotomy. *South Med Surg.* 1949 Jan;111(1):7.
 22. Dogliotti AM, Costantini A. [First case of the human use of an apparatus for extracorporeal blood circulation]. *Minerva chirurgica.* 1951 Nov 15;6(22):657-9.
 23. Dennis C, Spreng DS, Jr., Nelson GE, Karlson KE, Nelson RM, Thomas JV, et al. Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs; an apparatus applicable to human patients, and application to one case. *Ann Surg.* 1951 Oct;134(4):709-21.
 24. Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med.* 1954 Mar;37(3):171-85; passim.
 25. Felipozzi HJ, D'Oliveira LG, Paladino S, Lima AB, Nicolai A, De Santos RG, et al. [Surgical correction of auricular septal defects under visual control with the use of a new artificial heart-lung apparatus; 6 surgical cases]. *Rev Paul Med.* 1958 Mar;52(3):157-68.
 26. Bigelow WG, Lindsay WK, Greenwood WF. Hypothermia: Its possible role in cardiac surgery - An investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg.* 1950;132:849.
 27. Boerema I, Wildschut A, Schmidt WJ, Broekhuysen L. Experimental researches into hypothermia as an aid in the surgery of the heart. *Arch Chir Neerl.* 1951;3(1):25-34.
 28. Lewis FJ, Taufic M. Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery.* 1953 Jan;33(1):52-9.
-

29. Swan H, Zeavin I, Blount SG, Jr., Virtue RW. Surgery by direct vision in the open heart during hypothermia. *J Am Med Assoc.* 1953 Nov 21;153(12):1081-5.
 30. Lillehei CW, Cohen M, Warden HE, Ziegler NR, Varco RL. The results of direct vision closure of ventricular septal defects in eight patients by means of controlled cross circulation. *Surg Gynecol Obstet.* 1955 Oct;101(4):446-66.
 31. Melrose DG, Dreyer B, Bentall HH, Baker JB. Elective cardiac arrest. *Lancet.* 1955 Jul 2;269(6879):21-2.
 32. Lillehei CW, Gott VL, Dewall RA, Varco RL. The surgical treatment of stenotic or regurgitant lesions of the mitral and aortic valves by direct vision utilizing a pump-oxygenator. *J Thorac Surg.* 1958 Feb;35(2):154-91.
 33. Sealy WC, Brown IW, Jr., Young WG, Jr. A report on the use of both extracorporeal circulation and hypothermia for open heart surgery. *Ann Surg.* 1958 May;147(5):603-13.
 34. Drew CE, Keen G, Benazon DB. Profound hypothermia. *Lancet.* 1959 Apr 11;1(7076):745-7.
 35. Drew CE, Anderson IM. Profound hypothermia in cardiac surgery: report of three cases. *Lancet.* 1959 Apr 11;1(7076):748-50.
 36. Urschel HC, Jr., Greenberg JJ, Hufnagel CA. Elective cardioplegia by local cardiac hypothermia. *The New England journal of medicine.* 1959 Dec 24;261:1330-2.
 37. Shumway NE, Lower RR, Stofer RC. Selective hypothermia of the heart in anoxic cardiac arrest. *Surg Gynecol Obstet.* 1959 Dec;109:750-4.
 38. Guiot G, Rougerie J, Arfel G, Dubost C, Blondeau P. ["Extreme cold" in neurosurgery. Possibilities and future perspectives. Reflections apropos of the Ist case of vascular malformation operated on with success under prolonged circulatory arrest and hypothermia at 10degrees]. *Neurochirurgie.* 1960 Oct-Dec;6:332-46.
 39. Weiss M, Piwnica A, Lenfant C, Sprovieri L, Laurent D, Blondeau P, et al. Deep hypothermia with total circulatory arrest. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1960 Apr 10-11;6:227-39.
 40. Kirklin JW, Dawson B, Devloo RA, Theye RA. Open intracardiac operations: use of circulatory arrest during hypothermia induced by blood cooling. *Ann Surg.* 1961 Nov;154:769-76.
 41. Horiuchi T. Radical Operation for Ventricular Septal Defect in Infancy. *The Journal of*
-

- thoracic and cardiovascular surgery. 1963 Aug;46:180-90.
42. Barnard CN, Schrire V. The surgical treatment of acquired aneurysm of the thoracic aorta. *Thorax*. 1963 Jun;18:101-15.
43. Jatene AD. [Selective Hypothermia of the Myocardium]. *Rev Assoc Med Bras*. 1963 Apr;9:114-6.
44. Dillard DH, Mohri H, Hessel EA, 2nd, Anderson HN, Nelson RJ, Crawford EW, et al. Correction of total anomalous pulmonary venous drainage in infancy utilizing deep hypothermia with total circulatory arrest. *Circulation*. 1967 Apr;35(4 Suppl):I105-10.
45. Morales AR, Fine G, Taber RE. Cardiac surgery and myocardial necrosis. *Archives of pathology*. 1967 Jan;83(1):71-9.
46. Najafi H, Henson D, Dye WS, Javid H, Hunter JA, Callaghan R, et al. Left ventricular hemorrhagic necrosis. *Ann Thorac Surg*. 1969 Jun;7(6):550-61.
47. Barratt-Boyes BG, Simpson M, Neutze JM. Intracardiac surgery in neonates and infants using deep hypothermia with surface cooling and limited cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 1971 May;43(5 Suppl):I25-30.
48. Hamilton DI, Shackleton J, Rees GJ, Abbott T. Experience with deep hypothermia in infancy using core cooling. In Barratt-Boyes BG, Neutze JN, Harris EA, eds. *Heart disease in infancy*. Baltimore: Williams & Wilkins 1973:52.
49. Cooley DA, Bloodwell RD, Beall AC, Gill SS, Hallman GL. Total cardiac valve replacement using Scokcutter prosthesis. Experience with 250 consecutive patients. *Ann Surg*. 1966;164:429.
50. Cooley DA, Beall ACJ, Grondin P. Open-heart operations with disposable oxygenators, 5 percent dextrose priming and normothermia. *Surgery*. 1962;52:713.
51. Gay WA, Jr., Ebert PA. Functional, metabolic, and morphologic effects of potassium-induced cardioplegia. *Surgery*. 1973 Aug;74(2):284-90.
52. Bretschneider HJ, Hubner G, Knoll D, Lohr B, Nordbeck H, Spieckermann PG. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1975 May-Jun;16(3):241-60.
53. Hearse DJ, Stewart DA, Braimbridge MV. Cellular protection during myocardial ischemia: the development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest. *Circulation*. 1976 Aug;54(2):193-202.
-

54. Braimbridge MV, Chayen J, Bitensky L, Hearse DJ, Jynge P, Cankovic-Darracott S. Cold cardioplegia or continuous coronary perfusion? Report on preliminary clinical experience as assessed cytochemically. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1977 Dec;74(6):900-6.
55. Follette DM, Mulder DG, Maloney JV, Buckberg GD. Advantages of blood cardioplegia over continuous coronary perfusion or intermittent ischemia. Experimental and clinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1978 Nov;76(5):604-19.
56. Buckberg GD. A proposed "solution" to the cardioplegic controversy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1979 Jun;77(6):803-15.
57. Braile DM, Ardito RV, Zaiantchick M, Santos JLV, Soares MJF. Cardioplegia sanguínea contínua normotérmica. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1989;4(2):109-38.
58. Salerno TA, Houck JP, Barrozo CA, Panos A, Christakis GT, Abel JG, et al. Retrograde continuous warm blood cardioplegia: a new concept in myocardial protection. *Ann Thorac Surg.* 1991 Feb;51(2):245-7.
59. Menasche P, Kural S, Fauchet M, Lavergne A, Commin P, Bercot M, et al. Retrograde coronary sinus perfusion: a safe alternative for ensuring cardioplegic delivery in aortic valve surgery. *Ann Thorac Surg.* 1982 Dec;34(6):647-58.
60. Buckberg GD. Antegrade cardioplegia, retrograde cardioplegia, or both? *Ann Thorac Surg.* 1988 Jun;45(6):589-90.
61. Drinkwater DC, Laks H, Buckberg GD. A new simplified method of optimizing cardioplegic delivery without right heart isolation. Antegrade/retrograde blood cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990 Jul;100(1):56-63; discussion -4.
62. Partington MT, Acar C, Buckberg GD, Julia PL. Studies of retrograde cardioplegia. II. Advantages of antegrade/retrograde cardioplegia to optimize distribution in jeopardized myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989 Apr;97(4):613-22.
63. Gomes OM, Pitchon M, Caetano MC, Oliveira AN, Freitas REDA, Tito MG, et al. Cardioplegia Retrógrada Seletiva, Retrógrada Total e Anterógrada: Estudo Experimental e Sistematização Clínica. *Coração.* 1992;4(2):6-15.
64. Paes-Leme M, Jazbik AP, Murad H, Bastos ES, et al. Cardioplegia Retrógrada atrial: estudo clínico. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1997;12(2):169-75.
65. Gomes OM, Gomes ES. Cardioplegia retrógrada atrial com técnica aperfeiçoada. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1998;13(2):158-61.
-

66. Gomes OM, Pitchon M, Brum JMG, Gomes ES, et al. Cardioplegia Retr6grada Sequencial. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1996;11(3):208-15.
67. Bhayana JN, Kalmbach T, Booth FV, Mentzer RM, Jr., Schimert G. Combined antegrade/retrograde cardioplegia for myocardial protection: a clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989 Nov;98(5 Pt 2):956-60.
68. Tian G, Shen J, Sun J, Xiang B, Oriaku GI, Zhezong L, et al. Does simultaneous antegrade/retrograde cardioplegia improve myocardial perfusion in the areas at risk? A magnetic resonance perfusion imaging study in isolated pig hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998 Apr;115(4):913-24.
69. Olson EN. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med*. [Historical Article - Review]. 2004 May;10(5):467-74.
70. Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol*. [Review]. 2005;67:69-98.
71. Yano M, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Abnormal ryanodine receptor function in heart failure. *Pharmacol Ther*. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S., Review]. 2005 Sep;107(3):377-91.
72. Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart failure reviews*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. 2009 Dec;14(4):213-24.
73. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 1991;42:225-46.
74. Sommerschild HT, Kirkeboen KA. Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2002 Feb;46(2):123-37.
75. du Toit EF, Opie LH. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ Res*. 1992 May;70(5):960-7.
76. Kusuoka H, Camilion de Hurtado MC, Marban E. Role of sodium/calcium exchange in the mechanism of myocardial stunning: protective effect of reperfusion with high sodium solution. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Jan;21(1):240-8.
77. Du XJ, Anderson KE, Jacobsen A, Woodcock EA, Dart AM. Suppression of ventricular arrhythmias during ischemia-reperfusion by agents inhibiting Ins(1,4,5)P3 release. *Circulation*. 1995 Jun 1;91(11):2712-6.
-

78. McCormack JG. Characterization of the effects of Ca^{2+} on the intramitochondrial Ca^{2+} -sensitive enzymes from rat liver and within intact rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1985 Nov 1;231(3):581-95.
79. Zaugg M, Schaub MC. Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning. *J Muscle Res Cell Motil.* 2003;24(2-3):219-49.
80. Solaro RJ. Integration of myofilament response to Ca^{2+} with cardiac pump regulation and pump dynamics. *Am J Physiol.* 1999 Dec;277(6 Pt 2):S155-63.
81. Depre C, Vanoverschelde JL, Melin JA, Borgers M, Bol A, Ausma J, et al. Structural and metabolic correlates of the reversibility of chronic left ventricular ischemic dysfunction in humans. *Am J Physiol.* 1995 Mar;268(3 Pt 2):H1265-75.
82. Heusch G, Rose J, Skyschally A, Post H, Schulz R. Calcium responsiveness in regional myocardial short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. Inotropic responses to postextrasystolic potentiation and intracoronary calcium. *Circulation.* 1996 Apr 15;93(8):1556-66.
83. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest.* 1985 Nov;76(5):1713-9.
84. Kim SJ, Depre C, Vatner SF. Novel mechanisms mediating stunned myocardium. *Heart Fail Rev.* 2003 Apr;8(2):143-53.
85. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999 Apr;79(2):609-34.
86. Bolli R, Zughuib M, Li XY, Tang XL, Sun JZ, Triana JF, et al. Recurrent ischemia in the canine heart causes recurrent bursts of free radical production that have a cumulative effect on contractile function. A pathophysiological basis for chronic myocardial "stunning". *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):1066-84.
87. Sekili S, McCay PB, Li XY, Zughuib M, Sun JZ, Tang L, et al. Direct evidence that the hydroxyl radical plays a pathogenetic role in myocardial "stunning" in the conscious dog and demonstration that stunning can be markedly attenuated without subsequent adverse effects. *Circ Res.* 1993 Oct;73(4):705-23.
88. Przyklenk K, Whittaker P, Kloner RA. In vivo infusion of oxygen free radical substrates causes myocardial systolic, but not diastolic dysfunction. *Am Heart J.* 1990 Apr;119(4):807-15.
-

89. Corretti MC, Koretsune Y, Kusuoka H, Chacko VP, Zweier JL, Marban E. Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences of exogenously generated free radicals in rabbit hearts. *J Clin Invest*. 1991 Sep;88(3):1014-25.
90. Grinwald PM. Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium. *J Mol Cell Cardiol*. 1982 Jun;14(6):359-65.
91. Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca^{2+} activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest*. 1987 Mar;79(3):950-61.
92. Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res*. 1997 Mar;80(3):393-9.
93. Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E. Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca^{2+} -dependent proteolysis? *Circ Res*. 1996 Mar;78(3):455-65.
94. Depre C, Tomlinson JE, Kudej RK, Gaussin V, Thompson E, Kim SJ, et al. Gene program for cardiac cell survival induced by transient ischemia in conscious pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9336-41.
95. Stapleton MT, Allshire AP. Modulation of rigor and myosin ATPase activity in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Jul;30(7):1349-58.
96. Pantos C, Malliopoulou V, Varonos DD, Cokkinos DV. Thyroid hormone and phenotypes of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2004 Mar;99(2):101-20.
97. Kolocassides KG, Galinanes M, Hearse DJ. Dichotomy of ischemic preconditioning: improved postischemic contractile function despite intensification of ischemic contracture. *Circulation*. 1996 May 1;93(9):1725-33.
98. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):365-71.
99. Fujiwara H, Onodera T, Tanaka M, Miyazaki S, Wu DJ, Matsuda M, et al. Acceleration of cell necrosis following reperfusion after ischemia in the pig heart without collateral circulation. *Am J Cardiol*. 1989 Mar 7;63(10):14E-8E.
100. Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and
-

- reperfusion. *Circulation*. 1992 Mar;85(3):1160-74.
101. Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, Gonzalez MA, et al. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch*. 1996 Feb;431(4):519-26.
102. Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis*. 2001 Aug;6(4):279-90.
103. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*. 1998 Jan 27;97(3):276-81.
104. Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, Wang NP, Muraki S, Sun HY, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2003 Jul 1;59(1):132-42.
105. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
106. Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 1998;93 Suppl 3:8-12.
107. Gill C, Mestrlil R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *FASEB J*. 2002 Feb;16(2):135-46.
108. Abbate A, De Falco M, Morales C, Gelpi RJ, Prisco M, De Luca A, et al. Electron microscopy characterization of cardiomyocyte apoptosis in ischemic heart disease. *Int J Cardiol*. 2007 Jan 2;114(1):118-20.
109. Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Schaper J. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol*. 2001 May-Jun;96(3):219-26.
110. Borutaite V, Budriunaite A, Morkuniene R, Brown GC. Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Sep 28;1537(2):101-9.
111. Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994 Oct;94(4):1621-8.
112. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997 Feb 21;275(5303):1129-32.
-

- 113.Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):372-85.
 - 114.Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis.* 2002 Apr;7(2):163-6.
 - 115.Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.* 2002 Feb-Mar;84(2-3):215-22.
 - 116.Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci.* 2001 Jun;26(6):390-7.
 - 117.Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999 Aug 1;13(15):1899-911.
 - 118.Ganote C, Armstrong S. Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovasc Res.* 1993 Aug;27(8):1387-403.
 - 119.Jahania MS, Sanchez JA, Narayan P, Lasley RD, Mentzer RM, Jr. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann Thorac Surg.* 1999 Nov;68(5):1983-7.
 - 120.Kumar MS, Samhan M, al Sabawi N, al Abdullah IH, Silva OS, White AG, et al. Preservation of cadaveric kidneys longer than 48 hours: comparison between Euro-Collins solution, UW solution, and machine perfusion. *Transplant Proc.* 1991 Oct;23(5):2392-3.
 - 121.Marshall VC. Renal preservation. in: Morris PJ. *Kidney transplantation. Principles and practice.* . Philadelphia WB Saunders. 2001;5:113-34.
 - 122.Southard JH, Belzer FO. The University of Wisconsin organ preservation solution: components, comparisons, and modifications *Transplant Rev.* 1993;7:176-90.
 - 123.Ametani MS, Southard JH, Belzer FO. Importance of glutathione and adenosine in cold storage of the kidney. *Transplant Proc.* 1990 Apr;22(2):469-71.
 - 124.Cejalvo D, Lloris-Carsi JM, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA. Effect of adenosine and allopurinol on liver ischemia-reperfusion. *Transplant Proc.* 1993 Dec;25(6):3023-4.
 - 125.Groenewoud AF, Thorogood J. Current status of the Eurotransplant randomized multicenter study comparing kidney graft preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate, University of Wisconsin, and Euro-Collins solutions. The HTK Study Group. *Transplant Proc.* 1993 Feb;25(1 Pt 2):1582-5.
-

126. Sumimoto R, Lindell S, Gambiez L, Southard JH, Belzer FO. Effect of pretransplant flushout of the liver with a solution containing albumin on survival and organ function. *Transplant Proc.* 1993 Dec;25(6):3001-3.
127. Kuss R, Burger P. An illustrated history of organ transplantation. The greater adventure of the century Rueil-Malmaison, Laboratoires Sandoz. 1992.
128. Muhlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc.* 1999 Aug;31(5):2069-70.
129. Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Elki S, Haverich A. Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemic lung function. *J Heart Lung Transplant.* 1999 Dec;18(12):1198-201.
130. Griffin AD, Hawthorne WJ, Allen RD, Grierson JM, Jablonski P, Howden BO, et al. Twenty-four-hour preservation of canine pancreas allografts using low-cost, low-viscosity, modified University of Wisconsin cold storage solution. *Transplant Proc.* 1993 Feb;25(1 Pt 2):1595-6.
131. Lindell SL, Gandolph D, Southard JH, Belzer FO. Comparison of PBS, HTK, and UW solutions for kidney preservation. *Transplant Proc.* 1991 Oct;23(5):2399-401.
132. Lodge JP, Perry SL, Skinner C, Potts DJ, Giles GR. Improved porcine renal preservation with a simple extracellular solution--PBS140. *Transplantation.* 1991 Mar;51(3):574-9.
133. Holscher M, Groenewoud AF. Current status of the HTK solution of Bretschneider in organ preservation. *Transplant Proc.* 1991 Oct;23(5):2334-7.
134. Cavallari G, Catena F, Santoni B, Montalti R, Turi P, Beltempo P, et al. Kidney preservation in pigs with University of Wisconsin and Celsior solution. *Minerva Chir.* 2002 Jun;57(3):295-300.
135. Faenza A, Catena F, Nardo B, Montalti R, Capocasale E, Busi N, et al. Kidney preservation with university of Wisconsin and Celsior solution: a prospective multicenter randomized study. *Transplantation.* 2001 Oct 15;72(7):1274-7.
136. Warnecke G, Struber M, Hohlfeld JM, Niedermeyer J, Sommer SP, Haverich A. Pulmonary preservation with Bretschneider's HTK and Celsior solution in minipigs. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Jun;21(6):1073-9.
137. Tolba RH, Akbar S, Muller A, Glatzel U, Minor T. Experimental liver preservation with Celsior: a novel alternative to University of Wisconsin and histidine-tryptophan-alpha-ketoglutarate solutions? *Eur Surg Res.* 2000;32(3):142-7.
-

138. Michel P, Vial R, Rodriguez C, Ferrera R. A comparative study of the most widely used solutions for cardiac graft preservation during hypothermia. *J Heart Lung Transplant*. 2002 Sep;21(9):1030-9.
139. Demmy TL, Biddle JS, Bennett LE, Walls JT, Schmaltz RA, Curtis JJ. Organ preservation solutions in heart transplantation--patterns of usage and related survival. *Transplantation*. 1997 Jan 27;63(2):262-9.
140. Wheeldon D, Sharples L, Wallwork J, English T. Donor heart preservation survey. *J Heart Lung Transplant*. 1992 Sep-Oct;11(5):986-93.
141. Konertz WF, Saka B, Bernhard A. Euro-Collins solution for heart preservation: experimental and clinical experience *Transplant Proc* 1988;20 (II):984-6
142. Jeevanandam V, Barr ML, Auteri JS, Sanchez JA, Fong J, Schenkel FA, et al. University of Wisconsin solution versus crystalloid cardioplegia for human donor heart preservation. A randomized blinded prospective clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992 Feb;103(2):194-8; discussion 8-9.
143. Stein DG, Drinkwater DC, Jr., Laks H, Permut LC, Sangwan S, Chait HI, et al. Cardiac preservation in patients undergoing transplantation. A clinical trial comparing University of Wisconsin solution and Stanford solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991 Nov;102(5):657-65.
144. Stringham JC, Paulsen KL, Southard JH, Fields BL, Belzer FO. Improved myocardial ischemic tolerance by contractile inhibition with 2,3-butanedione monoxime. *Ann Thorac Surg*. 1992 Nov;54(5):852-9; discussion 9-60.
145. Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, Fukuda Y, Dohi K. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation*. 1991 Mar;51(3):589-93.
146. Cartier R, Hollmann C, Dagenais F, Buluran J, Pellerin M, Leclerc Y. Effects of University of Wisconsin solution on endothelium-dependent coronary artery relaxation in the rat. *Ann Thorac Surg*. 1993 Jan;55(1):50-5; discussion 6.
147. Kohno H, Shiki K, Ueno Y, Tokunaga K. Cold storage of the rat heart for transplantation. Two types of solution required for optimal preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987 Jan;93(1):86-94.
148. Toshima Y, Kohno H, Matsuzaki K, Mitani A, Mayumi H, Yasui H, et al. Collins' solution for cold storage of the heart for transplantation must be reversed with cardioplegic solution before reperfusion. A functional and metabolic study in the rat heart. *J Thorac*
-

- Cardiovasc Surg. 1992 Dec;104(6):1572-81.
- 149.Swanson DK, Myerowitz D, Watson KM, Hegge JO, Fields BL. A comparison of blood and crystalloid cardioplegia during heart transplantation after 5 hours of cold storage. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987 May;93(5):687-94.
- 150.Kirklin JK, Neves J, Naftel DC, Digerness SB, Kirklin JW, Blackstone EH. Controlled initial hyperkalemic reperfusion after cardiac transplantation: coronary vascular resistance and blood flow. *Ann Thorac Surg.* 1990 Apr;49(4):625-31.
- 151.Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res.* 1990 Jan;66(1):135-46.
- 152.Karck M, Frantzen V, Schwalb H, Haverich A, Uretzky G. Prolonged myocardial protection with St. Thomas' Hospital solution and University of Wisconsin solution. The importance of preservation techniques. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1992;6(5):261-6.
- 153.Ledingham SJ, Katayama O, Lachno DR, Yacoub M. Prolonged cardiac preservation. Evaluation of the University of Wisconsin preservation solution by comparison with the St. Thomas' Hospital cardioplegic solutions in the rat. *Circulation.* 1990 Nov;82(5 Suppl):IV351-8.
- 154.von Oppell UO, Pfeiffer S, Preiss P, Dunne T, Zilla P, Reichart B. Endothelial cell toxicity of solid-organ preservation solutions. *Ann Thorac Surg.* 1990 Dec;50(6):902-10.
- 155.Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988 Apr;45(4):673-6.
- 156.Buckberg GD. Myocardial temperature management during aortic clamping for cardiac surgery. Protection, preoccupation, and perspective. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991 Dec;102(6):895-903.
- 157.Ning XH, Chen SH, Xu CS, Li L, Yao LY, Qian K, et al. Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J Appl Physiol.* [In Vitro Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2002 May;92(5):2200-7.
- 158.Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Portman MA. Hypothermia preconditioning in isolated rabbit heart (Abstract). *FASEB J.* 1996;10:A36.
- 159.Ning XH, Xu CS, Song YC, Childs KF, Xiao Y, Bolling SF, et al. Temperature threshold and modulation of energy metabolism in the cardioplegic arrested rabbit heart. *In Vitro*
-

- Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. *Cryobiology*. 1998 Feb;36(1):2-11.
160. Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Hu YJ, Lupinetti FM, et al. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *The American journal of physiology*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1998 Mar;274(3 Pt 2):H786-93.
161. Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Hu YJ, Lupinetti FM, et al. Temperature threshold and preservation of signaling for mitochondrial membrane proteins during ischemia in rabbit heart. *In Vitro - Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Cryobiology*. 1998 Jun;36(4):321-9.
162. Bossenmeyer-Pourie C, Koziel V, Daval JL. Effects of hypothermia on hypoxia-induced apoptosis in cultured neurons from developing rat forebrain: comparison with preconditioning. *Pediatr Res*. [Comparative Study]. 2000 Mar;47(3):385-91.
163. Mizuno T, Miura-Suzuki T, Yamashita H, Mori N. Distinct regulation of brain mitochondrial carrier protein-1 and uncoupling protein-2 genes in the rat brain during cold exposure and aging. *Biochemical and biophysical research communications*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Nov 30;278(3):691-7.
164. Phanithi PB, Yoshida Y, Santana A, Su M, Kawamura S, Yasui N. Mild hypothermia mitigates post-ischemic neuronal death following focal cerebral ischemia in rat brain: immunohistochemical study of Fas, caspase-3 and TUNEL. *Neuropathology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Dec;20(4):273-82.
165. Bartling B, Holtz J, Darmer D. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction? *Basic research in cardiology*. [Review]. 1998 Apr;93(2):71-84.
166. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, et al. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *Research Support, Non-U.S. Gov't - Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. The Journal of clinical investigation*. 1997 Sep 15;100(6):1363-72.
167. Fliss H. Accelerated apoptosis in reperfused myocardium: friend of foe? *Basic research in cardiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. 1998 Apr;93(2):90-3.
168. Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE, 3rd, Deaton D, Das DK. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II369-75.
169. Ning XH, Xu CS, Portman MA. Mitochondrial protein and HSP70 signaling after
-

- ischemia in hypothermic-adapted hearts augmented with glucose. *The American journal of physiology*. [In Vitro, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1999 Jul;277(1 Pt 2):R11-7.
- 170.Klingenspor M, Ivemeyer M, Wiesinger H, Haas K, Heldmaier G, Wiesner RJ. Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochem J*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1996 Jun 1;316 (Pt 2):607-13.
- 171.Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, Lundberg MS, Zheng JS, O'Neill L, et al. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Jun 1;99(11):2635-43.
- 172.Velasco-Miguel S, Buckbinder L, Jean P, Gelbert L, Talbott R, Laidlaw J, et al. PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes. *Oncogene*. 1999 Jan 7;18(1):127-37.
- 173.el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. 1998;8(5):345-57.
- 174.Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 Sep 18;389(6648):300-5.
- 175.Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, et al. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S., Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Dec 8;270(49):29386-91.
- 176.Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1994 May 1;54(9):2468-71.
- 177.Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1993 Oct 1;53(19):4701-14.
- 178.Latif N, Khan MA, Birks E, O'Farrell A, Westbrook J, Dunn MJ, et al. Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure. *Journal of the American College of*
-

- Cardiology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Jun;35(7):1769-77.
- 179.Chen F, Lu Y, Zhang Z, Vallyathan V, Ding M, Castranova V, et al. Opposite effect of NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase on p53-independent GADD45 induction by arsenite. *The Journal of biological chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Apr 6;276(14):11414-9.
- 180.Lyn D, Liu X, Bennett NA, Emmett NL. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2000 Apr 27;2(3):93-100.
- 181.Gomes OM, Pedroso FI, Pereira SN, Ayoub AH, Kwang WT, Weigl DR, et al. Alterações ultramicroscópicas e enzimáticas mitocondriais produzidas no miocárdio pela parada cardíaca anóxica. *Arq Bras Cardiol*. 1973;26:383.
- 182.Gomes OM, Weigl DR, Pedroso FI, Pitchon M, Caetano MC, Oliveira NA, et al. Classificação das Lesões Anóxicas Ultramicroscópicas do Miocárdio. *Coração*. 1991;3(2):5-9.
- 183.Sonnenblick EH, Ross J, Jr., Braunwald E. Oxygen consumption of the heart. Newer concepts of its multifactoral determination. *The American journal of cardiology*. [Review]. 1968 Sep;22(3):328-36.
- 184.Buckberg GD, Brazier JR, Nelson RL, Goldstein SM, McConnell DH, Cooper N. Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. I. The adequately perfused beating, fibrillating, and arrested heart. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 1977 Jan;73(1):87-94.
- 185.Freedman BM, Pasque MK, Pellom GL, Deaton DW, Frame JR, Wechsler AS. Effects of delay in administration of potassium cardioplegia to the isolated rat heart. *The Annals of thoracic surgery*. [In Vitro, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1984 Apr;37(4):309-13.
- 186.Rosenfeldt FL. The relationship between myocardial temperature and recovery after experimental cardioplegic arrest. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1982 Nov;84(5):656-66.
- 187.Balderman SC, Binette JP, Chan AW, Gage AA. The optimal temperature for preservation of the myocardium during global ischemia. *The Annals of thoracic surgery*. [Comparative Study]. 1983 Jun;35(6):605-14.
- 188.Williams WG, Rebeyka IM, Tibshirani RJ, Coles JG, Lightfoot NE, Mehra A, et al. Warm induction blood cardioplegia in the infant. A technique to avoid rapid cooling
-

- myocardial contracture. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990 Dec;100(6):896-901.
189. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm> - 3 2006.
190. Guiding Principles in the Use and Care of Animals. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23). US Government Printing office. 1996.
191. Parecer da Comissão de Ética do Curso de Pós-Graduação em Medicina da Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis – ServCor - Protocolo NPG-FCSFA 1/07.
192. Gomes OM, Gomes ES, Carvalho JI, Faraj M ea. Adaptações técnicas na preparação de Langendorff para estudo de corações isolados de pequenos animais. *Coração.* 1999;9:36-8.
193. Aguiar CA, Gomes OM, Petit FA. Parâmetros fisiológicos de alguns animais usados em cirurgia experimental. In Gomes OM, Ed. *Cirurgia Experimental.* São Paulo. Sarvier. 1978.
194. Gomes OM, Gomes ES, Neves HJ, Guimarães MAC, Pitchon M. Modificação da Técnica de Langendorff para Estudo de Coração Isolado com Utilização de Sistema Descartável. VIII Congresso da Sociedade Mineira de Cardiologia, Belo Horizonte, 3 a 5 de Julho de 1997. 1997.
195. Gleason WL, Braunwald E. Studies on the first derivative of the ventricular pressure pulse in man. *J Clin Invest.* 1962 Jan;41:80-91.
196. Okoshi K, Tucci PJF. Mecanismo de Frank-Starling e a Primeira Derivada Temporal de Pressão Ventricular (dP/dt). *Arq Bras Cardiol.* 1996;66(4):233-7.
197. Gottschall C. Determinantes do desempenho cardíaco. IN GOTTSCHALL, C. (Ed). *Função Cardíaca, da normalidade à insuficiência.* São Paulo, Fundo Editorial BYK. 1995:61-72.
198. Weisfeldt ML, Scully HE, Frederiksen J, Rubenstein JJ, Pohost GM, Beierholm E, et al. Hemodynamic determinants of maximum negative dP-dt and periods of diastole. *Am J Physiol.* 1974 Sep;227(3):613-21.
199. Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest.* 1976 Sep;58(3):751-60.
200. Hesterberg T, Moore DS, Monaghan S, Clipson A, Epstein R. Bootstrap methods and permutation tests, In: *The practice of business statistics.* New York: W. H. Freeman 2003.
201. Vieira S. *Introdução à Bioestatística – 3 ed. revista e ampliada.* Rio de Janeiro, Campus.
-

- 1980.
202. Ebel D, Preckel B, You A, Mullenheim J, Schlack W, Thamer V. Cardioprotection by sevoflurane against reperfusion injury after cardioplegic arrest in the rat is independent of three types of cardioplegia. *Br J Anaesth*. 2002 Jun;88(6):828-35.
203. Lima ML, Fiorelli AI, Gomes OM, Pinheiro BB, Da Silva MA, Porto LA, et al. Comparative analysis of the performance of various crystalloid cardioplegic solutions on myocardial protection after prolonged cold ischemia. *Transplantation proceedings*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jan-Feb;43(1):80-3.
204. Lima ML. Proteção miocárdica em isquemia hipotérmica prolongada com soluções Krebs-Henseleit, Bretschneider-HTK, St. Thomas e Celsior - Estudo comparativo em corações isolados de ratos - Tese de Mestrado. Belo Horizonte - MG - Brasil. 2010.
205. Binns OA, DeLima NF, Buchanan SA, Cope JT, King RC, Marek CA, et al. Both blood and crystalloid-based extracellular solutions are superior to intracellular solutions for lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Dec;112(6):1515-21.
206. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007 Sep 13;357(11):1121-35.
207. Stefanon I, Vassallo DV, Mill JG. Left ventricular length dependent activation in the isovolumetric rat heart. *Cardiovascular research*. 1990 Mar;24(3):254-6.
208. Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1990 Sep;24(9):748-53.
209. Pinheiro BB, Fiorelli AI, Gomes OM. Effects of ischemic postconditioning on left ventricular function of isolated rat hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009 Mar;24(1):31-7.
210. Gomes OM. Análise comparativa das alterações ultraestruturais e bioquímicas determinadas no miocárdio, pelas paradas cardíacas anóxicas normotérmicas e hipotérmicas (20°C) - Estudo experimental. São Paulo, 1975. (Tese, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). 1975.
211. Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Faria AN, Mill JG. Mechanisms underlying the genesis of post-extrasystolic potentiation in rat cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1995 Mar;28(3):377-83.
212. Fischer JH, Jeschkeit S. Effectivity of freshly prepared or refreshed solutions for heart preservation versus commercial EuroCollins, Bretschneider's HTK or University of
-

- Wisconsin solution. Transplantation. 1995 May 15;59(9):1259-62.
- 213.Menasche P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, et al. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994;8(4):207-13.
- 214.Weng ZC, Nicolosi AC, Detwiler PW, Hsu DT, Schierman SW, Goldstein AH, et al. Effects of crystalloid, blood, and University of Wisconsin perfusates on weight, water content, and left ventricular compliance in an edema-prone, isolated porcine heart model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Mar;103(3):504-13.
- 215.Drewnowska K, Clemo HF, Baumgarten CM. Prevention of myocardial intracellular edema induced by St. Thomas' Hospital cardioplegic solution. *J Mol Cell Cardiol.* 1991 Nov;23(11):1215-21.
- 216.Sumimoto R, Jamieson NV, Kamada N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplantation.* 1990 Oct;50(4):573-6.
- 217.Yu WM, Coddington D, Bitter-Suermann H. Rat liver preservation. I. The components of UW solution that are essential to its success. *Transplantation.* 1990 Jun;49(6):1060-6.
- 218.Bernard M, Menasche P, Canioni P, Fontanarava E, Grousset C, Piwnica A, et al. Influence of the pH of cardioplegic solutions on intracellular pH, high-energy phosphates, and postarrest performance. Protective effects of acidotic, glutamate-containing cardioplegic perfusates. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 Aug;90(2):235-42.
- 219.Rahn H, Reeves RB, Howell BJ. Hydrogen ion regulation, temperature, and evolution. *Am Rev Respir Dis.* 1975 Aug;112(2):165-72.
- 220.Vinnikova AK, Kukreja RC, Hess ML. Singlet oxygen-induced inhibition of cardiac sarcolemmal Na⁺K⁺-ATPase. *J Mol Cell Cardiol.* 1992 May;24(5):465-70.
- 221.Kukreja RC, Kearns AA, Zweier JL, Kuppusamy P, Hess ML. Singlet oxygen interaction with Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res.* 1991 Oct;69(4):1003-14.
- 222.Jarmakani JM, Nagatomo T, Langer GA. The effect of calcium and high-energy phosphate compounds on myocardial contracture in the newborn and adult rabbit. *J Mol Cell Cardiol.* 1978 Nov;10(11):1017-29.
- 223.Ferreira R, Burgos M, Llesuy S, Molteni L, Milei J, Flecha BG, et al. Reduction of reperfusion injury with mannitol cardioplegia. *Ann Thorac Surg.* 1989 Jul;48(1):77-83; discussion -4.
-

224. Stowe DF, Varadarajan SG, An J, Smart SC. Reduced cytosolic Ca²⁺ loading and improved cardiac function after cardioplegic cold storage of guinea pig isolated hearts. *Circulation*. 2000 Sep 5;102(10):1172-7.
225. Chen RH. The scientific basis for hypocalcemic cardioplegia and reperfusion in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 1996 Sep;62(3):910-4.
226. Poole-Wilson PA, Langer GA. Effects of acidosis on mechanical function and Ca²⁺ exchange in rabbit myocardium. *Am J Physiol*. 1979 Apr;236(4):H525-33.
227. Vega JD, Ochsner JL, Jeevanandam V, McGiffin DC, McCurry KR, Mentzer RM, Jr., et al. A multicenter, randomized, controlled trial of Celsior for flush and hypothermic storage of cardiac allografts. *Ann Thorac Surg*. 2001 May;71(5):1442-7.
228. Michel P, Hadour G, Rodriguez C, Chiari P, Ferrera R. Evaluation of a new preservative solution for cardiac graft during hypothermia. *J Heart Lung Transplant*. 2000 Nov;19(11):1089-97.
229. Saitoh Y, Hashimoto M, Ku K, Kin S, Nosaka S, Masumura S, et al. Heart preservation in HTK solution: role of coronary vasculature in recovery of cardiac function. *Ann Thorac Surg*. 2000 Jan;69(1):107-12.
230. Pereda D, Castella M, Pomar JL, Cartana R, Josa M, Barriuso C, et al. Elective cardiac surgery using Celsior or St. Thomas No. 2 solution: a prospective, single-center, randomized pilot study. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007 Sep;32(3):501-6.
231. Puehler T, Gleich O, Schopka S, Rupperecht L, Hirt S, Schmid C, et al. Impact of normothermic perfusion and protein supplementation on human endothelial cell function during organ preservation. *The Annals of thoracic surgery*. [Comparative Study In Vitro]. 2010 Feb;89(2):512-20.
232. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med*. [In Vitro Review]. 2004 Jul;52(5):299-309.
233. Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. *Front Biosci*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008;13:221-35.
234. Hansen TN, Dawson PE, Brockbank KG. Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance. *Cryobiology*. [In Vitro Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. 1994 Feb;31(1):101-6.
235. Neil DA, Lynch SV, Hardie IR, Effeney DJ. Cold storage preservation and warm ischaemic injury to isolated arterial segments: endothelial cell injury. *American journal of*
-

- transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 May;2(5):400-9.
236. Wildhirt SM, Weis M, Schulze C, Conrad N, Rieder G, Enders G, et al. Effects of Celsior and University of Wisconsin preservation solutions on hemodynamics and endothelial function after cardiac transplantation in humans: a single-center, prospective, randomized trial. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. [Clinical Trial Randomized Controlled Trial]. 2000;13 Suppl 1:S203-11.
237. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med*. 1995;46:235-47.
238. Redondo J, Pacheco ME, Manso AM, Salaices M, Marin J. Cell volume and ionic transport systems after cold preservation of coronary endothelial cells. *The Annals of thoracic surgery*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Apr;71(4):1290-5.
239. Wille T, de Groot H, Rauen U. Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J Vasc Surg*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Feb;47(2):422-31.
240. Radovits T, Lin LN, Zotkina J, Koch A, Rauen U, Kohler G, et al. Endothelial dysfunction after long-term cold storage in HTK organ preservation solutions: effects of iron chelators and N-alpha-acetyl-L-histidine. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Feb;27(2):208-16.
-