

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Efeito Protetor de Nova Solução Cardioplégica
com Histidina-triptofano-glutamato em
Coração Isolado de Ratos

São José do Rio Preto

2014

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Efeito Protetor de Nova Solução Cardioplégica
com Histidina-triptofano-glutamato em
Coração Isolado de Ratos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile

São José do Rio Preto

2014

Ficha Catalográfica

Oliveira, Marcos Aurélio Barboza de

Efeito protetor de nova solução cardioplégica com histidina-triptofano-glutamato em coração isolado de ratos / Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

São José do Rio Preto, 2014

44 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile

1. Parada cardíaca induzida; 2. Isquemia miocárdica; 3. Coração;
4. Entropia de Shannon; 5. Dimensão fractal

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Efeito Protetor de Nova Solução Cardioplégica
com Histidina-triptofano-glutamato em
Coração Isolado de Ratos

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile

2º Examinador: Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy

3º Examinador: Prof. Dr. Lindemberg da Mota Silveira Filho

4º Examinador: Prof. Dr. Diego Felipe Gaia dos Santos

5º Examinador: Prof. Dr. Gustavo Calado de Aguiar Ribeiro

Suplentes: Prof. Dr. Maurício de Nassau Machado

Prof. Dr. Karlos Alexandre de Souza Vilarinho

São José do Rio Preto, 09/12/2014

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas e Quadros.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução	01
1.1. Objetivo.....	11
2. Artigos Científicos	12
3. Discussão.....	17
4. Conclusões.....	28
5. Referências Bibliográficas.....	30
6. Anexos.....	41

Dedicatória

A Deus, meu eterno pai criador, meus pais e a meu irmão Bevilar Júnior, que sempre estiveram ao meu lado para incentivar, acreditar e apoiar!

À minha esposa que incansavelmente permaneceu ao meu lado trocando plantões e passando horas me ajudando em todos os momentos deste trabalho.

Agradecimentos

A tese recebe meu nome como autor, porém não é o trabalho de um só. Assim, gostaria de agradecer textualmente a cada um que tornou esse trabalho possível.

À minha esposa, mulher virtuosa, incansável companheira de todos os tempos, incentivadora, motivadora. Sempre esteve ao meu lado não só como expectadora, mas acrescentando um gostinho pessoal em tudo o que faz. Abriu mão de muito tempo para estar ao meu lado em tudo.

À minha mãe, Jeanet de Oliveira Oliveira, e meu pai, Bevilar Barbosa de Oliveira, que me tornaram o que sou hoje. Tudo o que sei sobre ser um homem íntegro, idôneo, temente a Deus aprendi com eles. Mesmo nas dificuldades investiram em mim e me tornaram o que sou hoje.

Ao meu irmão, Bevilar Barbosa de Oliveira Júnior, meu padrinho. Sem ele também não seria médico. Trancou a matrícula da faculdade para que eu pudesse continuar estudando. Trabalhou dobrado para ajudar em casa enquanto eu estudava. Sou eternamente grato a você querido irmão!

À minha sogra Maria de Betanha, um exemplo de mulher lutadora, que apesar das dificuldades formou e educou maravilhosamente suas quatro filhas.

Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braille, por confiar em mim, por colocar a Braille Biomédica inteiramente à minha disposição, e custear todo o material que foi necessário para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy, companheiro de sempre, professor, inspirador e muitas vezes conselheiro. Desde a sua primeira aula que assisti vi o médico que queria ser.

Ao Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior, sábio pesquisador e amigo. Simples e humilde em seu jeito de ser e muito solícito para acrescentar ideias maravilhosas ao projeto. Não se incomodou em me conceder seu escasso tempo e o fez sempre com um sorriso. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Gilberto Goissis, guru intelectual, visionário, mas ao mesmo tempo simples e acessível. Agradeço a sua boa vontade de sempre em estar comigo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto dos Santos, Dr. Antônio Carlos Brandi, Dr. Paulo Henrique Husseni Botelho e Dr. José Luís Lasso Cortez, que acreditaram no meu potencial, investindo em mim e me liberando de várias cirurgias para que pudesse avançar na tese.

Ao casal Prof. Dr. Reinaldo Azoubel e Profa. Lina Azoubel, amigos, companheiros e modelos de conduta e respeito. Abriram a porta de sua casa diversas vezes para me acolher. Que horas maravilhosas!

À Patrícia Braile Verdi, sempre sorridente, mas não me engano, com o mundo nas costas. Também fez de tudo para que esse trabalho pudesse ser feito.

Às Profas. Dras. Ana Paula Marques de Lima Oliveira e Rosa Sayoko Kawasaki Oyama, pesquisadoras de primeira linha. Tive muita sorte de ter vocês ao meu lado corrigindo, questionando e me capacitando como crítico da ciência.

Ao Vladimir e à Jane, incansáveis parceiros. Sem a dedicação de vocês as soluções cardioplégicas não se tornariam reais.

Ao Marcus Vinícius e ao Vinícius, que dedicaram bem mais tempo que podiam para me ajudar nas atividades experimentais. Foram dias de trabalho árduo, porém maravilhosos porque sabia que podia contar com vocês.

Ao Jorge, que mesmo aposentado, foi muito solícito em estar comigo no experimento em todos os dias. Muito habilidoso tanto no cuidado com os animais como no manuseio dos instrumentais cirúrgicos. Primeiro a chegar, último a sair e sempre com o mesmo bom humor.

À Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, em especial na pessoa do Ricardo Brandau, que me apoiou todos esses anos, me incentivando a produzir ciência.

Ao Prof. Dr. Ulisses Alexandre Croti, que me ensinou organização do tempo e das ideias e planejamento das ações necessárias para que o projeto pudesse sair do papel e se tornar realidade.

Ao Sebastião Policarpo, Sandra, Rafael e Renata que acreditaram em mim e me impulsionaram para lutar sempre apesar de todas as dificuldades.

À Profa. Dra. Débora Zuccari, que não mediu esforços para que o projeto fosse avaliado rapidamente.

Ao Sr. Pedro, que tem me acolhido no biotério desde o meu segundo ano de medicina (lembra?). Tenho grande admiração e gratidão por você.

Aos Srs. Bizutti e Júlio, que muito prontamente abriram as portas dos laboratórios e me orientaram no manuseio de pequenos animais.

À Lívia Carvalho, que deixou os seus afazeres (que não são poucos) e me ajudou na confecção das lâminas histológicas e me ensinou o processo de imunohistoquímica.

Ao Helison, Fany e Anali da UNICAMP, que por sua descontração aprendi que laboratório só é frio na temperatura, mas é aquecido por nossos corações e pela personalidade de cada um. Foi muito agradável passar diversas horas com vocês.

À Zélia, que me ajudou muito mais do que com levantamento bibliográfico, mas, sobretudo por acreditar em mim e no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Renato Braz de Araujo, que me ajudou muito na organização de todo o material escrito. Nada teria a forma atual sem a sua participação.

Ao José Antônio, Fabiana e funcionários da pós-graduação, que sempre acreditaram em mim e me deram o combustível que faltava para terminar a tese.

À Profa. Adília Sciarra, que acompanhou minha carreira desde o início, me capacitando e me preparando para o porvir.

A Deus, que me formou, capacitou e permitiu que encontrasse todas essas pessoas maravilhosas que citei, ou, que por lapso de memória, deixei de mencionar. Ele é perfeito em lembrar e abençoar cada um deles.

Epígrafe

Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda brilha

Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis, 14-2-1933

Lista de Figuras

Modalidades de parada cardíaca induzida: hipercalemia e hipocalcemia –
revisão de literatura

- Figura 1.....433

Paradoxo do cálcio – o que temos a temer?

- Figura 1.....250
- Figura 2.....252

Comparação da solução de histidina-triptofano-alfacetoglutarato com
histidina-triptofano-glutamato como agentes cardioplégicos em corações
isolados de ratos: estudo imuno-histoquímico

- Figura 1.....86

Comparação da dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de ratos
submetidos à cardioplegia utilizando solução histidina-triptofano-
cetoglutarato e histidina-triptofano com glutamato

- Figura 1.....160

Lista de Tabelas e Quadros

Introdução

- Tabela 1.....7

Comparação da solução de histidina-triptofano-alfacetoglutarato com histidina-triptofano-glutamato como agentes cardioplégicos em corações isolados de ratos: estudo imuno-histoquímico

- Tabela 1.....85
- Tabela 2.....85

Comparação da dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de ratos submetidos à cardioplegia utilizando solução histidina-triptofano-cetoglutarato e histidina-triptofano com glutamato

- Tabela 1.....158
- Tabela 2.....158

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADP- difosfato de adenosina

ATP- trifosfato de adenosina

Ca- cálcio

Cl- cloro

CPK- creatinofosfoquinase

DF- dimensão fractal

DNF- dinitrofenol

DOM- densidade óptica média

FA- *fascia adherens*

GIK- glicose-insulina-potássio

H- hidrogênio

HTG- histidina-triptofano-glutamato

HTK- histidina-triptofano-cetoglutarato

IL- interleucina

IP- intra-peritoneal

K- potássio

L- litro

LDH- desidrogenase láctica

mEq- miliequivalente

Mg- magnésio

mL- mililitro

mmol- milimol

MMP- metaloproteinase de matriz

mV- milivolt

Na- sódio

°C- graus Celsius

ST- Saint Thomas

UA- unidade arbitrária

UW- Universidade de Wisconsin

VE- ventrículo esquerdo

Resumo

Introdução: As soluções que provocam parada cardíaca eletiva estão em constante evolução, porém o composto ideal ainda não foi encontrado. Os autores comparam uma nova solução cardioplégica com histidina-triptofano-glutamato (HTG) com histidina-triptofano-acetoglutarato (HTK) em modelo de coração isolado de rato. **Objetivo:** Avaliar comparativamente as soluções HTK e HTG no que se refere à atividade de caspase, KI-67, IL-8, entropia de Shannon e dimensão fractal. **Materiais e Métodos:** Vinte ratos machos de raça Wistar foram anestesiados e heparinizados. O tórax foi aberto, realizada cardiectomia e infundido 40 mL/Kg de solução cardioplégica apropriada. Os corações foram mantidos por 2 horas na mesma solução a 4°C e, após esse período, colocados em aparato de Langendorff por 30 minutos com solução de Ringer Locke. Foram feitas análises imuno-histoquímicas para caspase, IL-8, KI-67, entropia de Shannon e dimensão fractal. **Resultados:** A concentração de caspase estava menor no grupo 2, e da KI-67 estava mais elevada no grupo 2, ambos com $P < 0,05$. Não houve diferença estatística entre os valores de IL-8 entre os grupos. Tanto a entropia de Shannon quanto a dimensão fractal não foram diferentes nos dois grupos. **Conclusões:** A solução com HTG foi mais eficaz que a com HTK, pois reduziu a caspase (apoptose), aumentou o KI-67 (proliferação celular); não apresentou valores diferentes de IL-8 (inflamação e necrose) que no grupo 1 e não apresentou alteração da quantidade ou distribuição das informações (observadas pela entropia de Shannon e dimensão fractal) nas lâminas histológicas.

Abstract

Introduction: Solutions that cause elective cardiac arrest are often evolving, but the ideal compound has not yet been found. The authors compare a new cardioplegic solution with histidine-tryptophan-glutamate (HTG) with histidine-tryptophan-acetoglutarato (HTK) in a model of isolated rat heart. **Objective:** Benchmarking HTK and HTG solutions regarding the activity of caspase, KI -67, IL - 8, Shannon entropy and fractal dimension. **Materials and Methods:** Twenty male rats, Wistar race, were analyzed and heparinized. The chest was opened, held and cardiectomy infused 40 mL/kg of appropriate cardioplegia. The hearts were kept for 2 hours at 4°C in the same solution, and afterwards placed in the Langendorff apparatus for 30 min with Ringer-Locke solution. The immunohistochemical analyses were performed for caspase, IL-8, KI-67, Shannon entropy and fractal dimension. **Results:** The concentration of caspase was lower in group 2, and KI-67 was higher in group 2, both $P < 0.05$. There was no statistical difference between the values of IL-8 between the groups. Both the Shannon entropy and the fractal dimension were not different in the two groups. **Conclusions:** The HTG solution was better than with HTK because they had reduced caspase (apoptosis) increased KI-67 (cell proliferation), they did not show different values of IL-8 (inflammation, necrosis). Additionally they did not show change in amount or distribution of the information (observed by the Shannon entropy and fractal dimension) in histological slices.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Durante a cirurgia cardíaca é usual a parada temporária do coração, permitindo ao cirurgião realizar a operação tanto no íntimo das cavidades cardíacas quanto em sua superfície em um ambiente isento de sangue e movimento, típicos do músculo cardíaco. Essa parada cardíaca eletiva foi primeiro induzida com clampeamento da aorta, quando associado com hipotermia, permitiu períodos breves de isquemia, tornando possível a realização da primeira cirurgia cardíaca a céu aberto, em 1953.^(1,2)

O desenvolvimento da circulação extracorpórea, em 1953, possibilitou aos cirurgiões paradas cardíacas por períodos mais longos sem malefícios ao cérebro, mas com o risco da lesão de reperfusão, como resultado do período prolongado de isquemia, necessário para reparar doenças mais complicadas. O fenômeno “stone heart”, resultado de contratatura irreversível, foi o exemplo extremo desse problema em 2 a 10% dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, sendo invariavelmente letal. Assim, há a necessidade de proteger o coração durante essa isquemia eletiva para reduzir a lesão de reperfusão.^(1,3,4)

Em 1955, Melrose introduziu o conceito de parada química usando solução contendo 2,5% de citrato de potássio⁽⁵⁾ que despolariza a membrana celular e pára a condução do potencial de ação. Entretanto, a elevada concentração de potássio causou necrose miocárdica focal e morte em muitos pacientes, resultando em abandono da cardioplegia hipercalêmica como solução protetora por quase 20 anos. No meio dos anos 70, cardioplegias alternativas contendo menos potássio do que a de Melrose foram introduzidas

na prática clínica com sucesso, como a solução de St. Thomas (ST),⁽¹⁾ cardioplegia sanguínea de baixo volume^(6,7) e solução de histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK).⁽⁸⁾

Mecanismo de ação das soluções cardioplégicas

O valor do potencial transmembrana da célula muscular cardíaca é de -96,4 mV quando as concentrações extracelular e intracelular de potássio são 4 mEq/l e 150mEq/l, respectivamente.⁽⁶⁾

Essas soluções cardioplégicas praticamente aboliram o problema do “stone heart” e a cardioplegia por hipercalemia foi estabelecida como padrão ouro^(1,4,9) para proteção do miocárdio a partir de então. A elevada concentração extracelular de potássio (10-30mM) altera o potencial de membrana dos miócitos de cerca de -85 mV para algo entre -65 e -40 mV, o que inativa os canais rápidos de sódio e bloqueia a condução do potencial de ação, levando a uma parada cardíaca despolarizada.⁽¹⁾

Entretanto, a parada cardíaca despolarizada pode causar dano ao miócito. Com seu estado despolarizado descrito no parágrafo anterior, os canais rápidos de sódio são inativados (com limiar de -65 a -70 mV), resultando em parada diastólica. O potencial de ativação da bomba Na-Ca ocorre somente em -50 mV, portanto não é esperado nenhum movimento de sódio ou cálcio por essa via. Entretanto, como mesmo assim o sódio continua entrando na célula, o cálcio aumentará concomitantemente, causando contratura miocárdica mesmo em parada cardíaca.⁽¹⁰⁾

Concentrações maiores de potássio, que despolarizam a membrana para cerca de -40mV , tenderiam ativar os canais lentos de cálcio (cujo limiar é de -40 mV), aumentando o influxo de cálcio intracelular. Nesse potencial, a bomba de Na-Ca pode ser revertida, fazendo com que o cálcio adentre a mesma, particularmente se a concentração de sódio intracelular é elevada como resultado da inibição da bomba de sódio, hipotermia e isquemia. Todo esse mecanismo vai resultar na contratura muscular, sobrecarga de cálcio e lesão miocárdica subsequente, particularmente durante a reperfusão. Outros mecanismos iônicos durante a isquemia e pela hipotermia podem levar ao mecanismo de sobrecarga de cálcio durante a reperfusão.⁽¹⁰⁾

Uma alternativa para os métodos utilizando potássio em altas concentrações é induzir a dissociação eletromecânica pela cardioplegia “polarizada”, tornando o potencial de repouso transmembrana mais negativo do que seu valor habitual. Esse mecanismo tem várias vantagens teóricas. Os gradientes iônicos transmembrana são os mesmos de seu estado em repouso, prevenindo desbalanço durante a isquemia. Como consequência, poucas bombas ou canais estão ativados e a demanda metabólica é mínima, mantendo as reservas energéticas celulares (ATP's). É de suma importância, entretanto, que o influxo de sódio e cálcio sejam abolidos ou minimizados, sabendo-se que tanto os canais de sódio como os de cálcio estão ligados a esse potencial de repouso.⁽¹⁰⁻¹³⁾

É possível produzir a parada cardíaca polarizada com várias substâncias. Esmolol, lidocaína, tetradotoxina, butanediona monoxima, antagonistas do cálcio, hipermagnesemia, hipocalcemia são exemplos de

agentes que produzem a parada cardíaca polarizada. Cada uma delas age de maneira diferente; discorreremos apenas sobre a solução pobre em cálcio (a solução HTK, ou comercialmente conhecida como Custodiol®), que é o objetivo deste trabalho.⁽¹⁰⁻¹³⁾

Como exemplo de uma solução que produz a parada cardíaca por hiperpolarização de membrana pela hipocalcemia temos a solução de HTK.⁽¹⁰⁾ Ela foi inicialmente desenvolvida por Bretschneider⁽⁸⁾, na Alemanha, nos anos 60. Consistia em uma solução sem cálcio e com pouco sódio. Foi uma das primeiras soluções cardioplégicas sem a necessidade de sangue utilizadas na prática clínica e atualmente ainda é muito requisitada. Seu mecanismo de ação vem da ausência de cálcio, que impossibilita seu influxo para o interior das células pelos canais de cálcio tipo “L” na fase de platô do potencial de ação. Dessa forma, inibe a liberação de mais cálcio do retículo sarcoplasmático e tem como consequência final ausência da ativação dos miofilamentos. Apesar das soluções livres de cálcio serem eficazes na indução da parada cardíaca, elas são limitadas pelo paradoxo do cálcio, o qual discutiremos adiante. Porém, especificamente na solução de HTK, o paradoxo é evitado pela baixa concentração de sódio da solução, fazendo com que pouco cálcio adentre na célula utilizando a bomba antiporte Na-Ca.^(1,10)

Definição de cardioplegia ideal

A solução de cardioplegia ideal ainda não foi estabelecida.^(14,15) Os itens que devem ser considerados para definição da cardioplegia ideal são:⁽¹⁾

1. Rapidez: indução de parada cardíaca rápida e efetiva no período diastólico para manter o miocárdio relaxado e minimizar a depleção do ATP.
2. Proteção miocárdica: efeitos protetores para retardar o início da lesão irreversível causada pela isquemia global e limitar a extensão da lesão de reperfusão.
3. Reversibilidade: efeitos cardioplégicos prontamente reversíveis assim que a solução é descontinuada, permitindo o retorno rápido ao ritmo sinusal.
4. Baixa toxicidade: um produto com meia-vida curta e sem efeitos tóxicos em outros órgãos após a descontinuação da circulação extracorpórea. A toxicidade do agente cardioplégico é especialmente importante se altas concentrações do fármaco são necessárias para alcançar parada cardíaca.

Soluções utilizadas

Utilizamos a solução de HTK comercialmente disponível com o nome de Custodiol® e a solução de histidina-triptofano-glutamato (HTG). Seus constituintes estão relacionados na tabela 1 e, abaixo, descrevemos os mais relevantes.

Tabela 1 - Composição das soluções utilizadas.

Substância	HTK (g/L)	HTG (g/L)
Cloreto de sódio	0,8766	0,8766
Cloreto de potássio	0,671	0,671
Cloreto de magnésio	0,8132	0,8132
Cloreto de cálcio	0,0022	0,0022
Potássio-hidrogênio-2-cetoglutarato	0,1842	---
Glutamato	---	0,1842
Histidina	27,9289	27,9289
Cloreto de histidina, H ₂ O	3,7733	3,7733
Triptofano	0,4085	0,4085
Manitol	5,4651	5,4651
Água para injeção	a 1000 ml	a 1000 ml

Todas as quantidades estão representadas em gramas. HTK: histidina-triptofano-cetoglutarato; HTG: histidina-triptofano-glutamato

Histidina

A histidina atua como um sistema tampão na solução de modo dependente da temperatura. Isso significa que necessita da temperatura "trabalho" (0-4 °C) para estabelecer e manter o valor de pH fisiológico necessário de solução (pH = 7,40), enquanto que à temperatura ambiente (22 °C) na faixa de 7,02-7,20.⁽¹⁶⁾

Os efeitos secundários de histidina na solução são importantes. Assim, a histidina atua como um inibidor das metaloproteinases de matriz (MMP), que são responsáveis pelo desenvolvimento da lesão tecidual durante a preservação a frio. Além disso, ela age impermeabilizando a membrana celular, aumentando ainda mais o efeito osmótico do manitol.⁽¹⁶⁾

Triptofano

Triptofano impacta positivamente na manutenção da integridade das membranas celulares.⁽¹⁶⁾ Hachida *et al.* relataram que ausência do triptofano na solução provocou decréscimo significativo na pressão máxima desenvolvida e do fluxo sanguíneo coronariano.⁽¹⁷⁾

Cetogluturato

Hachida *et al.* também avaliaram ausência do cetogluturato na solução, o que resultou em decréscimo da pressão máxima desenvolvida e a fração MB da creatina fosfoquinase encontrava-se aumentada, ambas de maneira significativa.⁽¹⁷⁾

Manitol

O manitol na solução HTK impermeabiliza a membrana celular do miócito e também neutraliza radicais reativos de oxigênio.⁽¹⁶⁾

Outros componentes

Os outros componentes que constituem a solução de HTK são os íons Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ e Cl⁻. Todos esses íons estão normalmente presentes na composição de fluidos fisiológicos (exceto manitol) e até o momento não provocaram toxicidade. As outras vantagens da solução HTK incluem: líquidos de baixa viscosidade, que resultam em fácil difusão nos órgãos e, conseqüentemente, o seu resfriamento mais rápido, bem como o baixo teor de potássio, que permite a aplicação *in situ* dessa solução. Seu uso não exige pré-

lavagem do órgão antes do transplante e permite o uso imediato, sem a adição de aditivos e pré-filtragem.⁽¹⁶⁾

Glutamato

O alfacetoglutarato não consegue adentrar a mitocôndria quando administrado por via exógena. Tem que ser convertido em glutamato e, uma vez no interior da mitocôndria, volta para alfacetoglutarato novamente.⁽¹⁸⁾

Já o glutamato administrado exogenamente entra inalterado na mitocôndria, estando disponível de maneira mais rápida para sua única conversão para alfacetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase para poder participar do ciclo de Krebs. Dessa maneira, o glutamato torna-se rapidamente disponível para o ciclo de Krebs.⁽¹⁸⁾

Segundo Pisarenko *et al.* o glutamato auxilia na redução da contratatura do miócito enquanto parado (levando a menos acidose e menos gasto energético), redução da queda do ATP, restaura conteúdo de glutamato e aspartato, aumenta formação de succinato e fumarato (dois participantes do ciclo de Krebs) e reduz de lactato e piruvato mesmo em ambiente anaeróbico, evitando a acidose celular.⁽¹⁸⁾

Adjuvantes

Vários componentes já foram testados para incluir a solução de HTK. A seguir, relacionamos os principais:

Uretano melhora o padrão de recuperação cardíaca e reduz a apoptose. A reserva energética (ATP), níveis de LDH e a ultraestrutura também foram melhores no grupo teste.⁽¹⁹⁾

Custodiol-N (solução pobre em íons cloreto e histidina, enriquecida por LK614 e deferoxamina) melhora a pressão ventricular esquerda, primeira derivada da pressão ventricular esquerda, contratilidade, fluxo coronariano em presença de bradicinina e conteúdo intracelular de ATP.⁽²⁰⁾

Deferoxamina, LK616 ou Trolox melhora o padrão de reatividade vascular, analisado pela vasodilatação induzida pela bradicinina e ATP mediada.⁽²¹⁾

Oxigenação da solução é benéfico para fígados coletados de doadores com parada cardíaca prévia, mantendo-os viáveis até o momento do transplante hepático em humanos.⁽²²⁾

Posologia

Foi descrito por Holper *et al.* 1000 mL da solução HTK a 2 °C na velocidade de infusão de 80 a 120 mL/min de 8 a 10 minutos em adultos, e 40 mL/kg para crianças.⁽¹⁵⁾ A aspiração do seio coronário é recomendável. A altura da garrafa de infusão deve estar inicialmente de 140 a 150 cm acima do coração (100 a 110 mmHg) ou com uma bomba com volume constante de infusão nas artérias coronárias. Após a parada cardíaca (dentro do primeiro minuto após iniciada a perfusão) o frasco deve ser disposto 50 a 70 cm acima do nível do coração (40 - 50 mmHg).⁽¹⁵⁾

Utilização em território nacional

Em território nacional, a solução de HTK foi utilizada principalmente em cirurgias vídeo-assistidas^(23,24) e transplante cardíaco em crianças.⁽²⁵⁾ Essa cardioplegia ainda não foi difundida no Brasil devido ao seu alto custo, ainda não estando liberada para uso no SUS e também pela própria preferência pessoal dos cirurgiões cardíacos, que já têm suas rotinas estabelecidas.

1.1. Objetivo

O presente estudo tem como objetivo avaliar apoptose, inflamação, entropia de Shannon e dimensão fractal da nova solução cardioplégica com histidina-triptofano-glutamato (HTG) em modelo de coração isolado de ratos.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

2.1. Modalidades de parada cardíaca:
hipercalemia e hipocalcemia – revisão de
literatura

Modes of induced cardiac arrest: hyperkalemia and hypocalcemia - Literature review

Modalidades de parada cardíaca induzida: hipercalemia e hipocalcemia - revisão de literatura

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira¹, MD, MsC; Antônio Carlos Brandi², MD; Carlos Alberto dos Santos², MD; Paulo Henrique Hussein Botelho², MD; José Luis Lasso Cortez³, MD; Domingo Marcolino Braile⁴, MsC, PhD

DOI: 10.5935/1678-9741.20140074

RBCCV 44205-1572

Abstract

The entry of sodium and calcium play a key effect on myocyte subjected to cardiac arrest by hyperkalemia. They cause cell swelling, acidosis, consumption of adenosine triphosphate and trigger programmed cell death. Cardiac arrest caused by hypocalcemia maintains intracellular adenosine triphosphate levels, improves diastolic performance and reduces oxygen consumption, which can be translated into better protection to myocyte injury induced by cardiac arrest.

Descriptors: Heart Arrest, Induced. Myocardial Ischemia. Hyperkalemia. Hypocalcemia.

Resumo

A entrada de sódio e cálcio desempenham efeito chave no miócito submetido à parada cardíaca por hiperpotassemia. Eles provocam edema celular, acidose, consumo de trifosfato de adenosina e desencadeiam processo de morte celular programada. A parada cardíaca provocada por hipocalcemia mantém os níveis intracelulares de trifosfato de adenosina, melhora o rendimento diastólico e reduz o consumo de oxigênio, o que pode ser traduzido em melhor proteção do miócito às lesões provocadas pela parada cardíaca induzida.

Descritores: Parada Cardíaca Induzida. Isquemia Miocárdica. Hiperpotassemia. Hipocalcemia.

INTRODUÇÃO

As primeiras operações cardíacas eram realizadas com o coração batendo, limitando-se a correção de enfermidades mais simples como sutura de ferimentos cardíacos, drenagem pericárdica e fechamento de canal arterial. Nessa época, as complicações eram relacionadas à depressão miocárdica^[1,2]. Em 1953, John Gibbon realizou a primeira cirurgia cardíaca a céu aberto, tornando possível a abordagem de doenças intracardíacas^[3] com a utilização de substâncias que produziam parada cardíaca controlada, chamadas genericamente agentes cardioplégicos^[4].

Diversos métodos de proteção miocárdica apresentam resultados satisfatórios, mas, apesar disso, nenhum deles pode ser considerado ideal. O agente cardioplégico ideal necessita cumprir os seguintes requisitos^[5]:

1. Parada cardíaca: indução rápida e eficaz da parada cardíaca com o miocárdio relaxado e com o mínimo de consumo de ATP;
2. Proteção miocárdica: efeitos protetores para retardar a lesão celular irreversível causada pela isquemia global e limitar a extensão da lesão de reperfusão;
3. Reversibilidade: reversão imediata da parada cardíaca

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil; Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

²Hospital de Base São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

⁴Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Não houve suporte financeiro.

Endereço para correspondência:
Marcos Aurélio Barboza de Oliveira
Avenida República do Líbano, 2700, casa 80 - São José do Rio Preto, SP, Brasil - CEP: 15092-440
E-mail: m_aurelio@sbccv.org.br

Abreviaturas, acrônimos & símbolos	
ATP	Trifosfato de adenosina
CEC	Circulação extracorpórea
HTK	Histidina-triptofano-cetoglutarato
Em	Potencial de repouso
CPK	Creatinofosquinase

com frequência cardíaca e força de contração, possibilitando “desmame” precoce da circulação extracorpórea (CEC);

4. Baixa toxicidade: meia-vida curta sem efeitos tóxicos em outros sistemas ou aparelhos após a descontinuidade da CEC;

5. Permitir boa visualização do campo operatório.

Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho é tecer algumas considerações bioquímicas e fisiológicas a respeito das modalidades de cardioplegia hipercalemêmica e hipocalcêmica.

Cardioplegia hipercalemêmica

Em 1955, Melrose et al.^[6] introduziram a perfusão miocárdica com solução cardioplégica cristalóide hipotérmica com citrato de potássio a 2,5%, mas logo abandonaram essa técnica devido à necrose miocárdica e morte de diversos pacientes. Gay & Ebert^[7], reintroduzindo essa mesma técnica, porém com concentrações menores de potássio, conseguiram benefícios metabólicos e funcionais para o miocárdio, sem qualquer alteração estrutural aparente. A partir desses resultados, começou o uso generalizado da solução rica em potássio, cristalóide e hipotérmica para proteção miocárdica. Em 1975, a solução St. Thomas foi introduzida por Hearse et al.^[8], usando cloreto de potássio com concentrações de 10-30 mM. Essas soluções aboliram o problema do “stone heart” e soluções com potássio em concentração adequada para parada cardíaca foram consideradas o *gold standard* na proteção miocárdica^[9,10].

Entretanto, posteriormente o seu uso foi correlacionado por Cohen et al.^[11] com disfunção miocárdica pós-operatória devido à falha em proteger completamente o miocárdio da isquemia e lesão de reperfusão, levando diversos autores a pesquisar soluções alternativas mais seguras para os pacientes.

Vias metabólicas da cardioplegia hipercalemêmica

O potássio extracelular elevado (10-40mM) altera o potencial de repouso (Em) dos miócitos de -85mV para uma faixa entre -65mV e -40mV, inativando os canais rápidos de sódio. Esse novo “Em” bloqueia a condução do potencial de ação miocárdico, induzindo assim a parada cardíaca despolarizada. Entretanto, ela não inativa completamente os canais lentos de sódio (janela do sódio), aumentando sua concentração intracelular de maneira lenta (Figura 1)^[5,10,12].

Associado a isso, o canal de cálcio tipo L (dihidropiridínico), que é ativado com “Em” entre -20mV a -30mV, faz com

que o cálcio adentre o citosol^[13], fenômeno esse chamado de janela do cálcio^[5]. A seguir, a bomba antiporte Na⁺/Ca₂⁺ é ativada ao contrário, retirando sódio do intracelular e internalizando o íon cálcio. Íons H⁺ (decorrentes de isquemia) saíram da célula pela bomba antiporte Na⁺/H⁺, contribuindo para a entrada de ainda mais íons sódio (Figura 1)^[5,10].

A bomba Na⁺/K⁺ será inibida pela concentração elevada do potássio extracelular, acidose e hipotermia, permitindo com que o nível de Na intracelular permaneça elevado, perpetuando a ação da bomba antiporte Na⁺/Ca₂⁺ funcionando ao contrário. Esse panorama intracelular de cálcio elevado leva a contratura do miócito mesmo sem deflagrar potencial de ação, com gasto energético. O sódio elevado produz edema celular e citólise no momento da reperfusão^[5]. Assim, a cardioplegia hipercalemêmica não consegue inibir a entrada de cálcio na célula miocárdica e nem evitar seus efeitos negativos (Figura 1)^[12,13].

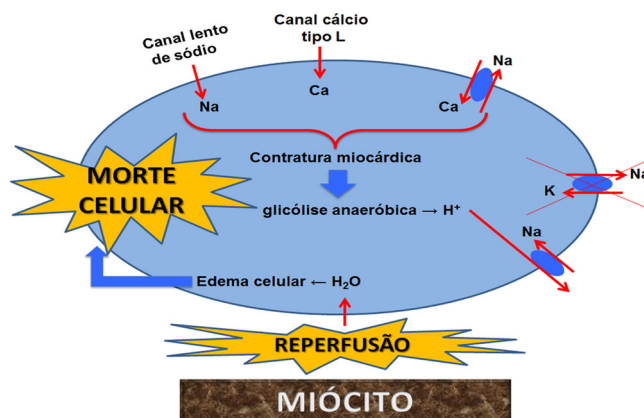


Fig. 1 - Desenho esquemático das vias metabólicas da cardioplegia hipercalemêmica lesiva ao miócito.

Fisiologia do cálcio na fibra cardíaca

O cálcio age como efetor na fibra cardíaca, conectando a fase de contração ventricular com a de excitação pelo potencial de ação. Tal mecanismo é chamado de acoplamento excitação-contração^[14]. A célula muscular estriada esquelética também possui esse mecanismo, porém na fibra cardíaca há algumas diferenças que têm efeitos importantes sobre as características de sua contração^[15].

Como no músculo esquelético, quando um potencial de ação passa sobre a membrana do miocárdio, também se espalha para o interior da fibra muscular cardíaca ao longo das membranas dos túbulos T. Os potenciais dos túbulos T, por sua vez, causam a liberação instantânea de íons cálcio das cisternas do retículo sarcoplasmático para o interior do sarcoplasma muscular. Os íons cálcio então se difundem, em alguns milésimos de segundo, para as miofibrilas, onde catalisam as reações químicas que promovem o deslizamento

dos filamentos de actina e miosina entre si; isso, por sua vez, produz a contração muscular. Até aqui, esse mecanismo de acoplamento excitação-contração é o mesmo que o do músculo esquelético, mas nesse momento começa a surgir uma diferença fundamental. Além dos íons cálcio liberados no sarcoplasma a partir das cisternas do retículo sarcoplasmático, grandes quantidades de cálcio também se difundem durante o potencial de ação dos túbulos T para o sarcoplasma^[15].

De fato, sem esse cálcio extra dos túbulos T, é provável que a força de contração do músculo cardíaco fosse consideravelmente reduzida, uma vez que as cisternas do músculo cardíaco são menos desenvolvidas que as do músculo esquelético e não armazenam cálcio suficiente para produzir contração efetiva. Por outro lado, os túbulos T do músculo cardíaco têm diâmetro cinco vezes maior que os do esquelético; no interior do túbulo T há quantidade grande de mucopolissacarídeos carregados eletronegativamente e que fixam depósito abundante de íons cálcio, mantendo-o sempre disponível para difusão no interior da fibra muscular cardíaca quando ocorre potencial de ação no túbulo T. Esse suprimento extra de cálcio a partir dos túbulos é pelo menos um dos fatores que prolongam o potencial de ação do músculo cardíaco e mantem sua contração durante 1/3 de segundo, em vez de 1/10 desse tempo, como ocorre no músculo esquelético^[15].

No final do platô do potencial de ação, o suprimento de novos íons cálcio para o interior da fibra muscular é subitamente interrompida e os íons no sarcoplasma são rapidamente bombeados de volta para o retículo sarcoplasmático e túbulos T, finalizando assim a contração até que ocorra novo potencial de ação^[15].

É de especial interesse o fato de que a força de contração do músculo cardíaco dependa da concentração de íons cálcio nos líquidos extracelulares, o que normalmente não é o que ocorre com o músculo estriado. A provável razão disso é que a quantidade de íons cálcio nos túbulos T é diretamente proporcional à sua concentração no líquido extracelular. Consequentemente, a disponibilidade de íons cálcio para causar contração do músculo cardíaco depende diretamente da presença desses íons no líquido extracelular^[15].

Cardioplegia hipocalcêmica

O meio extracelular sem cálcio impede a sua internalização tanto por via membrana celular como via retículo sarcoplasmático, evitando que haja contração dos miofilamentos. Mesmo havendo potencial de ação, não há contração do miocárdio^[5].

Investigando o efeito da solução de cardioplegia hipocalcêmica em corações imaturos de ovelhas submetidos à isquemia e hipotermia, Aoki et al.^[16] verificaram que com concentração fisiológica de cálcio houve piora da função ventricular esquerda e da função diastólica, aumento do consumo de oxigênio e da resistência vascular coronariana quando comparado com hipocalcemia, indicando que níveis baixos de cálcio protegeram o coração dos efeitos deletérios da hipotermia e isquemia.

Baker et al.^[17], comparando efeitos de diversas concentrações de cálcio na solução de St. Thomas em corações imaturos de coelho, constataram que quanto menor a concentração de cálcio menor foi a concentração de creatinafosfoquinase (CPK), mas a recuperação do fluxo aórtico não teve a mesma distribuição. Seu comportamento foi parabólico com zênite em 0,3 mmol/L, quando o coração obteve seus maiores valores de fluxo aórtico.

Na comparação entre soluções hipocalcêmica e normocalcêmica na cardioplegia sanguínea em corações imaturos isquêmicos ou não de porcos em CEC, Bolling et al.^[18] observaram que o grupo sem isquemia foi beneficiado independentemente do tipo de cardioplegia; no grupo isquêmico houve piora da função miocárdica, dos níveis de ATP e aumento da resistência vascular coronariana naqueles tratados com cardioplegia normocalcêmica, enquanto na hipocalcêmica foram obtidos os mesmos valores do grupo sem isquemia, indicando que a hipocalcemia protegeu o coração da isquemia.

Avaliando o consumo de oxigênio em corações de ratos submetidos à cardioplegia hipocalcêmica ou hipercalemica, Burkhoff et al.^[19] averiguaram que o grupo hipocalcêmico apresentou consumo menor de oxigênio quando comparado ao que utilizou solução rica em potássio.

Kronon et al.^[20] concluíram que solução cardioplégica com concentração fisiológica de cálcio é deletéria para corações imaturos de porcos, exceto quando magnésio foi incluído na solução (10 mEq/L), sendo o miocárdio protegido dos efeitos deletérios do cálcio. Em outro trabalho, os mesmos autores verificaram que quando o magnésio (tanto 5-6 mEq/L quanto 10-12 mEq/L) foi adicionado à solução hipocalcêmica houve melhora significativa na contração miocárdica e redução da rigidez diastólica^[21].

Mori et al.^[22] relataram melhor recuperação da primeira derivada da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (dP/dt), fluxo coronário, valores menores de CPK e menor edema celular em corações de coelho submetidos à cardioplegia com baixo teor de cálcio (0,5 mmol/L) quando comparado com solução sem cálcio.

Robinson et al.^[23], utilizando concentração de cálcio da solução de St. Thomas (0,6 mmol/L), constataram melhora da recuperação do fluxo aórtico em 64%, CPK reduzida em 84% e arritmias de reperfusão pós-isquêmica também reduzidas, com retorno ao ritmo sinusal mais rápido que no grupo com a solução habitual.

Em corações imaturos de coelhos com concentrações de cálcio entre 0,6 e 1,2 mmol/L submetidos a 1h de isquemia normotérmica, Zweng et al.^[24] relataram melhor recuperação do fluxo aórtico, pressão desenvolvida e dP/dt.

Diversos autores apontam que a cardioplegia sem cálcio está associada à recuperação pior da função cardíaca^[22,24-26] e dos fluxos coronário^[22] e aórtico^[24], ao aumento da creatinafosfoquinase^[22,25] e edema celular^[22]. Tais alterações ocorrem devido ao fenômeno denominado “paradoxo do cálcio”, o

que não ocorre quando adicionamos quantidade pequena de cálcio à solução^[14,27].

Um exemplo de solução hipocalcêmica é a solução de Bretschneider. Além de adicionar traços de cálcio, também incorpora benefícios da histidina, triptofano, cetogluturato e manitol.

A histidina (aminoácido) atua como sistema tampão na solução de modo dependente da temperatura. Quando colocada à temperatura de 22°C, a histidina mantém o pH entre 7,02-7,20, ao passo que quando a temperatura é de 4°C, o pH fica em torno de 7,40. Isso significa que a temperatura ideal da solução é de 4°C, pois mantém o pH em nível fisiológico. Esse aminoácido também inibe as metaloproteinases de matriz, responsáveis pelo desenvolvimento da lesão tecidual durante a preservação a frio. Além disso, a histidina também age como impermeante de membrana celular, potencializando o efeito osmótico do manitol^[28].

O triptofano contribui para manutenção da integridade das membranas celulares^[28]. Hachida et al.^[29] relataram que a ausência do triptofano na solução provocou decréscimo significativo na pressão máxima desenvolvida e do fluxo sanguíneo coronariano.

Hachida et al.^[29] também avaliaram a ausência do cetogluturato na solução, o que resultou em decréscimo da pressão máxima desenvolvida e aumento da fração MB da creatinofosfoquinase, ambos de maneira significativa.

CONCLUSÃO

A cardioplegia hipocalcêmica é segura na proteção ao miócito tanto em corações imaturos como em mais velhos, pois evita depleção do ATP e acidose, e está associada a boa recuperação da função ventricular. Soluções cardioplégicas hipocalcêmicas como a histidina-triptofano-cetogluturato têm sido utilizadas rotineiramente em cirurgias cardíacas ao redor do mundo, mas ainda não é a solução ideal. Novas pesquisas ainda são necessárias para obtermos uma cardioplegia que seja ao mesmo tempo de ação rápida, atóxica, de rápida metabolização, que promova boa visualização do campo operatório e proteja adequadamente o miócito.

Papéis & responsabilidades dos autores	
MABO	Análise e/ou interpretação dos dados; Análise estatística; Aprovação final do manuscrito; Concepção e desenho do estudo; Realização das operações e/ou experimentos
ACB	Redação do manuscrito ou revisão crítica de seu conteúdo
CAS	Redação do manuscrito ou revisão crítica de seu conteúdo
PHHB	Redação do manuscrito ou revisão crítica de seu conteúdo
JLLC	Redação do manuscrito ou revisão crítica de seu conteúdo
DMB	Aprovação final do manuscrito; Concepção e desenho do estudo

REFERÊNCIAS

1. Rosky LP, Rodman T. Medical aspects of open-heart surgery. *N Engl J Med*. 1966;274(16):886-93.
2. Prates PR. Pequena história da cirurgia cardíaca: e tudo aconteceu diante de nossos olhos... *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1999;14(3):177-84.
3. Miller BJ, Gibbon JH, Jr., Greco VF, Smith BA, Cohn CH, Allbritten FF Jr. The production and repair of interatrial septal defects under direct vision with the assistance of an extracorporeal pump-oxygenator circuit. *J Thorac Surg*. 1953;26(6):598-616.
4. Godoy MF, Braile DM. Cardioplegia: exegesis. *Arq Bras Cardiol*. 1994;62(4):277-8.
5. Fallouh HB, Kentish JC, Chambers DJ. Targeting for cardioplegia: arresting agents and their safety. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(2):220-6.
6. Melrose D, Dreyer B, Bentall H, Baker JB. Elective cardiac arrest. *Lancet*. 1955;266(6879):21-2.
7. Gay WA Jr, Ebert PA. Functional, metabolic, and morphologic effects of potassium-induced cardioplegia. *Surgery*. 1973;74(2):284-90.
8. Hearse DJ, Stewart DA, Braimbridge MV. Hypothermic arrest and potassium arrest: metabolic and myocardial protection during elective cardiac arrest. *Circ Res*. 1975;36(4):481-9.
9. Shiroishi MS. Myocardial protection: the rebirth of potassium-based cardioplegia. *Tex Heart Inst J*. 1999;26(1):71-86.
10. Chambers DJ, Hearse DJ. Developments in cardioprotection: "polarized" arrest as an alternative to "depolarized" arrest. *Ann Thorac Surg*. 1999;68(5):1960-6.
11. Cohen NM, Damiano RJ Jr, Wechsler AS. Is there an alternative to potassium arrest? *Ann Thorac Surg*. 1995;60(3):858-63.
12. Silveira Filho LM, Petrucci O Jr, Carmo MR, Oliveira PP, Vilarinho KA, Vieira RW, et al. Padronização de modelo de coração isolado "working heart" com circulação parabiótica. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(1):14-22.
13. Chen RH. The scientific basis for hypocalcemic cardioplegia and reperfusion in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 1996;62(3):910-4.
14. Oliveira MAB, Godoy MF, Braile DM, Lima-Oliveira APM. Solução cardioplégica polarizante: estado da arte. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2005;20(1):69-74.
15. Guyton AC. Músculo cardíaco; o coração como bomba. In: Guyton AC, ed. *Fisiologia humana e mecanismos das doenças*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p.130.
16. Aoki M, Nomura F, Kawata H, Mayer JE Jr. Effect of calcium and preischemic hypothermia on recovery of myocardial

- function after cardioplegic ischemia in neonatal lambs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;105(2):207-12.
17. Baker EJ 5th, Olinger GN, Baker JE. Calcium content of St. Thomas' II cardioplegic solution damages ischemic immature myocardium. *Ann Thorac Surg.* 1991;52(4):993-9.
18. Bolling K, Kronon M, Allen BS, Ramon S, Wang T, Hartz RS, et al. Myocardial protection in normal and hypoxically stressed neonatal hearts: the superiority of hypocalcemic versus normocalcemic blood cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112(5):1193-200.
19. Burkhoff D, Kalil-Filho R, Gerstenblith G. Oxygen consumption is less in rat hearts arrested by low calcium than by high potassium at fixed flow. *Am J Physiol.* 1990;259(4 Pt 2):H1142-7.
20. Kronon M, Bolling KS, Allen BS, Rahman S, Wang T, Halldorsson A, et al. The relationship between calcium and magnesium in pediatric myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;114(6):1010-9.
21. Kronon MT, Allen BS, Hernan J, Halldorsson AO, Rahman S, Buckberg GD, et al. Superiority of magnesium cardioplegia in neonatal myocardial protection. *Ann Thorac Surg.* 1999;68(6):2285-91.
22. Mori F, Suzuki K, Noda H, Kato T, Tsuboi H, Miyamoto M, et al. Evaluation of a new calcium containing cardioplegic solution in the isolated rabbit heart in comparison to a calcium-free, low sodium solution. *Jpn J Surg.* 1991;21(2):192-200.
23. Robinson LA. Calcium in neonatal cardioplegia. *Ann Thorac Surg.* 1991;51(6):1043-4.
24. Zweng TN, Iannetoni MD, Bove EL, Pridjian AK, Fox MH, Bolling SF, et al. The concentration of calcium in neonatal cardioplegia. *Ann Thorac Surg.* 1990;50(2):262-7.
25. Hendriks FF, Jonas J, van der Laarse A, Huysmans HA, van Rijk-Zwikker GL, Schipperheyn JJ. Cold ischemic arrest: comparison of calcium-free and calcium-containing solutions. *Ann Thorac Surg.* 1985;39(4):312-7.
26. Pearl JM, Laks H, Drinkwater DC, Meneshian A, Sun B, Gates RN, et al. Normocalcemic blood or crystalloid cardioplegia provides better neonatal myocardial protection than does low-calcium cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;105(2):201-6.
27. Rebeyka IM, Axford-Gatley RA, Bush BG, del Nido PJ, Mickle DA, Romaschin AD, et al. Calcium paradox in an in vivo model of multidose cardioplegia and moderate hypothermia. Prevention with diltiazem or trace calcium levels. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(3):475-83.
28. Antunović M, Aleksić D. Preparation and testing of solutions for organ perfusion and preservation in transplantation. *Vojnosanit Pregl.* 2008;65:596-600.
29. Hachida M, Ookado A, Nonoyama M, Koyanagi H. Effect of HTK solution for myocardial preservation. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1996;37(3):269-74.

2.2. O paradoxo do cálcio – O que temos a
temer?

The calcium paradox - What should we have to fear?

Paradoxo do cálcio - o que temos a temer?

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira¹, MD; Antônio Carlos Brandi², MD; Carlos Alberto dos Santos², MD; Paulo Henrique Husseni Botelho², MD; José Luís Lasso Cortez³, MD; Gilberto Goissis⁴, PhD; Domingo Marcolino Braile⁵, MD, PhD

DOI: 10.5935/1678-9741.20140054

RBCCV 44205-1547

Abstract

The calcium paradox was first mentioned in 1966 by Zimmerman et al. Thereafter gained great interest from the scientific community due to the fact of the absence of calcium ions in heart muscle cells produce damage similar to ischemia-reperfusion. Although not all known mechanisms involved in cellular injury in the calcium paradox intercellular connection maintained only by *nexus* seems to have a key role in cellular fragmentation. The addition of small concentrations of calcium, calcium channel blockers, and hyponatraemia hypothermia are important to prevent any cellular damage during reperfusion solutions with physiological concentration of calcium.

Descriptors: Heart Arrest, induced. Myocardial Ischemia. Calcium.

Resumo

O paradoxo do cálcio foi pela primeira vez citado em 1966 por Zimmerman et al. A partir daí, ganhou grande interesse por parte da comunidade científica internacional devido ao fato da ausência do íon cálcio produzir na célula muscular cardíaca dano semelhante à lesão de isquemia-reperusão. Apesar de não serem conhecidos todos os mecanismos envolvidos no processo da lesão celular no paradoxo do cálcio, a conexão intercelular mantida somente pelo *nexus* parece ter papel chave na fragmentação celular. A adição de pequenas concentrações de cálcio, bloqueadores de canal de cálcio, hiponatremia ou hipotermia são importantes para evitar que haja lesão celular no momento da reperusão com soluções com concentração fisiológica de cálcio.

Descritores: Parada Cardíaca Induzida. Isquemia Miocárdica. Cálcio.

INTRODUÇÃO

Na década de 1960 Zimmerman et al.^[1,2] descreveram lise maciça de cardiomiócitos após administração de cardioplegia com solução sem cálcio seguido por reperusão com solução com concentração fisiológica de cálcio em coração isolado de ratos. A esse evento foi chamado “paradoxo do cálcio”.

Diferentemente do que seria esperado, a ausência completa do cálcio não provocou somente a parada cardíaca, mas

também alterou as membranas celulares dos miócitos cardíacos, culminando na fase de reperusão com necrose dos mesmos, explicando o termo “paradoxo”^[1].

Nos anos seguintes diversos pesquisadores estudaram possíveis mecanismos fisiológicos do paradoxo, culminando com expressiva quantidade de trabalhos sobre o assunto, sendo muitos apresentados em 1983, no IX Congresso Mundial da Sociedade de Pesquisa do Coração, realizado em Londres^[3].

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil; Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

²Hospital de Base São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

⁴Braile Biomédica, Indústria Comércio e Representações, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Av. República do Líbano, 2700, casa 80, São José do Rio Preto, SP, Brasil - CEP: 15092-440

E-mail: m_aurelio@sbccv.org.br

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Não houve suporte financeiro.

Abreviaturas, acrônimos & símbolos

DNP	Dinitrofenol
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
VE	Ventrículo esquerdo

Nesse evento foi compilado muito do que se sabia na época a respeito da ausência do cálcio na solução cardioplégica, da lesão miocárdica extensa a que essa solução provoca e formas alternativas para a elaboração de uma cardioplegia hipocalcêmica segura^[4-6].

Após quase 50 anos da descoberta desse paradoxo, este trabalho objetiva discutir alguns efeitos lesivos do paradoxo do cálcio no coração, considerando-se sua importância, mecanismos moleculares, alterações celulares ultraestruturais, ação lesiva aditiva ou protetora quando colocado em associação com outras soluções e algumas formas de evitá-lo.

Importância do paradoxo do cálcio

Na década de 1980, o metabolismo do cálcio no coração foi bastante estudado. Nessa época, havia consenso sobre as consequências da sucessão de um meio sem cálcio seguido por outro repleto dele para a célula muscular cardíaca, que internaliza rapidamente esse íon, levando a mesma à citólise e o coração à insuficiência cardíaca. Esse fenômeno é semelhante à lesão de reperfusão^[7].

Outro aspecto fundamental é o conhecimento sobre mecanismos envolvidos, pois soluções cardioplégicas não devem causar dano celular. Soluções cardioplégicas hipocalcêmicas são efetivas para induzir parada cardíaca^[8]. Entretanto, substâncias que interrompem ou amenizam efeitos colaterais indesejáveis devem estar presentes para evitar disfunção ventricular após circulação extracorpórea^[7].

Estudos sobre vias metabólicas que promovem ou interrompem o seu processo^[9,10], assim como suas relações com insuficiência cardíaca^[11,12] têm sido publicados, aos quais recorreremos brevemente a seguir.

Mecanismo causal

Diversas hipóteses foram formuladas para explicar o paradoxo do cálcio como aumento da permeabilidade do cálcio no sarcolema^[13], no glicocálix^[14] e separação dos discos intercalares^[15,16], porém nenhuma ainda esclareceu todo o mecanismo do paradoxo do cálcio.

É possível também que a hipercalemia intracelular não seja causa primária do paradoxo do cálcio. Seu aumento pode ocorrer como consequência de dano no sarcolema acompanhado da entrada de quantidade moderada de cálcio para células estruturalmente alteradas^[17].

A ausência isolada de cálcio pode provocar lesão celular, mas seu efeito deletério é potencializado em meios com anóxia, cafeína, 2,4-dinitrofenol (DNF), balão ventricular (dis-

tensão mecânica), etc. Todas essas condições causam lesões ao miocárdio mesmo na ausência de cálcio extracelular^[18-22]. Outro mecanismo aceito é que o cálcio adentre a célula de maneira massiva, provocando lesão e morte celular^[23].

Alterações celulares estruturais

A primeira descrição de mudanças estruturais no miócito perfundido em meio livre de cálcio foi realizada por Muir et al.^[16], que verificaram alterações em discos intercalares e glicocálix de miócitos em corações isolados de ratos. Discos intercalares são estruturas complexas divididas em várias regiões, sendo a maior delas ocupada pela fascia adherens. Esses são os locais de maior tensão entre as células no momento da contração miocárdica. Junções desmossômicas, chamadas de macula adherens, estão presentes e servem para unir as células. Nexus ou gap junctions são pontos focais de contato celular íntimo, sendo locais de sinalização elétrica entre as células^[24].

Muir et al.^[16] notaram que miócitos cardíacos submetidos à perfusão sem cálcio apresentaram a partir de 30 minutos nítida separação nas regiões da fascia adherens e macula adherens, enquanto o nexus se mantinha intacto (Figura 1). Ashraf^[13] e Yates & Dhalla^[25] observaram mudanças similares em 10 a 15 minutos de exposição ao mesmo meio. Períodos mais curtos, como 3 a 5 minutos, geralmente não provocam separação física na ultraestrutura dos discos intercalares^[23].

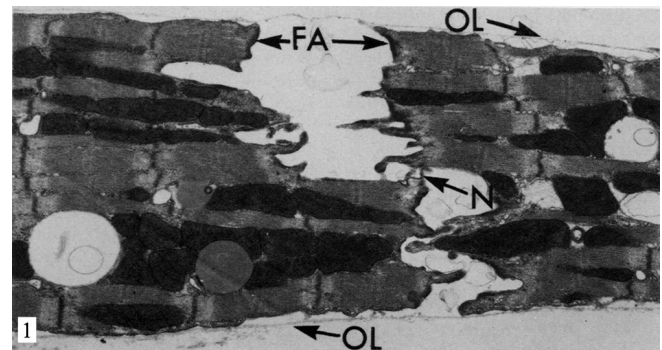


Fig. 1 - Eletromicrografia de coração de rato após 12 minutos em perfusão sem cálcio em 37°C. Os discos intercalares estão separados nas regiões da fascia adherens (FA) mas ainda estão interligadas pelas junções nexus (N). A lâmina externa do sarcolema (OL) ou glicocálix está destacado da membrana plasmática dos miócitos. Reproduzido de Ganote & Nayler, 1985^[23]

O meio sem cálcio aumenta a quantidade de sódio intracelular tanto em cultura de miócitos como no coração isolado. Passando para um meio rico em cálcio, esse íon adentra rapidamente as células via bomba antiporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, funcionando ao contrário. As semelhanças terminam aí, pois há contração do miócito em cultura, mas não citólise, enquanto que no coração isolado encontramos lise maciça das células. Esse fenômeno foi descrito como intolerância ao cálcio^[26-28].

A citólise no momento que o miócito entra em contato com solução de reperfusão rica em cálcio após sensibilização em meio sem esse íon ocorre porque essas células têm somente discos intercalares conectando umas às outras, sendo que durante a contração há avulsão dos mesmos com exposição do meio intracelular de cada uma delas, explicando a morte celular maciça das mesmas^[16].

Outra mudança que ocorre durante a perfusão sem cálcio é o destacamento do glicocálix, que geralmente é uma mudança focal que não é vista até 10 a 15 minutos após a infusão da solução sem cálcio. Frank et al.^[29,30] mostraram que apesar da lâmina externa do glicocálix se destacar, há uma membrana mais interna que fica aderida na membrana celular.

Ashaf et al.^[13] e Frank et al.^[29] observaram agregação e rearranjo anômalo das moléculas constituintes da membrana celular quando colocadas em meio sem cálcio, fazendo com que haja dano celular irreversível devido à permeabilidade alterada de membrana. Os mecanismos moleculares dessas alterações ainda não são conhecidos.

Fase de reentrada de cálcio na célula

Após 10-15 minutos em meio desprovido de cálcio, o miócito está sensibilizado, sendo estabelecida a separação dos discos intercalares entre as células^[23]. Os sarcômeros de cada célula condensam em uma única banda de contração. As fascias adherens permanecem conectadas aos sarcômeros, mas estão completamente separadas das membranas das células adjacentes. Regiões de discos intercalares, localizadas entre as zonas de fascias adherens se tornam fragmentadas, permitem que mitocôndrias adentrem o espaço intercelular^[31]. Ganote et al.^[19] mencionam que a hipotermia evita a lise da fascias adherens e, por conseguinte, a citólise.

A contração do sarcômero e a necrose celular são idênticas àquelas observadas em outros tipos de lesão como necrose por catecolamina e lesão isquemia/reperfusão. Entretanto, deve ser enfatizado que a ultraestrutura celular quando em meio sem cálcio difere de todas as anteriores pela separação dos discos intercalares e presença de uma única banda central de contração^[23].

Traços de cálcio

Rebeyka et al.^[32] constataram em modelo de circulação extracorpórea que corações de cães perfundidos com solução cardioplégica gelada sem cálcio apresentaram pior recuperação da função ventricular e maior área de necrose do que aqueles em que a solução tinha apenas 70µmol/L de cálcio, mostrando que mesmo concentrações pequenas de cálcio são suficientes para proteger o coração do paradoxo do cálcio.

Glicocálix

A separação da lâmina externa do glicocálix da membrana celular do miócito ocorre após exposição da célula ao meio pobre em cálcio^[23]. Frank et al.^[14] cogitaram que essa

separação seria responsável pelo aumento da permeabilidade do cálcio na membrana. Entretanto, Nayler et al.^[17] utilizando 2 mM de cálcio no lugar do magnésio no período privado de cálcio demonstrou que apesar de ainda haver destacamento do glicocálix, não havia aumento da permeabilidade de membrana ao cálcio e Slade et al.^[33] também já observaram que miócitos colocados em meio tampão sem cálcio também perdem o glicocálix, sem, contudo, haver alteração do influxo do íon cálcio.

Com a utilização da neuramidase há separação completa do glicocálix dos miócitos com aumento da permeabilidade celular ao cálcio. Para explicar esse fenômeno, Ganote et al.^[23] postulam que nesse caso as glicoproteínas de membrana também seriam danificadas, perdendo o controle do fluxo de cálcio.

ATP

Ruigrok et al.^[34] demonstraram que a liberação maciça de enzimas que ocorre na fase de reperfusão com cálcio é dependente de energia. Essa conclusão é baseada em experimentos que consumiam o ATP intracelular do miócito com perfusão anóxica ou na inclusão dessa célula em meio sem glicose. As células cardíacas não liberavam enzimas na fase de cálcio normal após 5 minutos de perfusão sem cálcio devido à depleção do ATP^[34].

Bloqueadores dos canais de cálcio

Baker & Hearse^[35] observaram que o efeito dos bloqueadores dos canais de cálcio são melhor demonstrados quando há baixa concentração de cálcio no extracelular na reperfusão. Nessas condições, a entrada do cálcio acontece preferencialmente pelos canais lentos da membrana. A limitação dessa entrada permite a recuperação da lesão dos discos intercalares e do sarcolema. Em soluções com concentração fisiológica de cálcio na solução de reperfusão, os bloqueadores dos canais de cálcio oferecem pouca proteção para o paradoxo, sugerindo que mais de uma via seja importante para a entrada do cálcio na célula^[36].

Sódio

Dhalla et al.^[37] mostraram que quando a concentração de sódio é reduzida para 35mM na fase sem cálcio, a magnitude da injúria tecidual é reduzida na fase de reperfusão com cálcio. Isso ocorre devido à baixa concentração do sódio, que lentifica a entrada do cálcio na membrana pela bomba antiporte Na⁺/Ca²⁺, facilitando o reequilíbrio iônico intracelular e prevenindo a contração que levaria à morte celular^[37].

Durante o período sem cálcio, a baixa concentração de sódio reduz o gradiente transmembrana e retarda o efluxo de cálcio e o influxo de sódio. Isso retardaria tanto a retirada do cálcio intracelular quanto a lesão celular provocada pela falta desse íon. No período com cálcio normal o sódio baixo também seria benéfico, pois reduz o influxo de cálcio via bomba antiporte Na⁺/Ca²⁺,

funcionando ao contrário. A eliminação lenta de cálcio quando a célula está sem ele e a internalização mais lenta no período de reperfusão dá à célula condições de reestabelecer seu equilíbrio iônico antes de qualquer lesão estrutural^[37].

Hipotermia

Hipotermia protege o miócito do paradoxo do cálcio^[38,39]. Ela previne a separação do disco intercalar e o destacamento do glicocálix^[40]. Além disso, reduz a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, podendo diminuir a perda do íon Ca^{+2} no momento da perfusão sem cálcio^[41]. A temperatura ideal encontrada para proteção miocárdica do paradoxo do cálcio foi 22°C ^[42-44].

Lesão mecânica

Ganote et al.^[20] afirmam que quando corações isolados de ratos são colocados em anóxia em meio com concentração fisiológica de cálcio, a distensão do balão volumétrico em ventrículo esquerdo (VE) ocorre com pequeno aumento enzimático decorrente da lise celular, mas a distensão de VE é difícil. Quando o meio é livre de cálcio e normóxia, a distensão é fácil e também a liberação enzimática é pequena. Entretanto, quando temos anóxia e meio livre de cálcio, há liberação maciça de enzimas celulares.

Isso ocorre porque corações anóxicos conseguem suportar a tensão de parede que o balão imprime devido aos discos intercalares estarem íntegros. A distensão da cavidade ocorre por meio de alongação dos sarcômeros, com lesão dos mesmos. Em meio livre de cálcio e normóxia, as fibras musculares já estão relaxadas e a tensão produzida pelo balão não é suficiente para ocasionar avulsão de disco intercalar fragilizado. Mas, quando a anóxia e meio sem cálcio estão superpostos, a célula mantém a rigidez dos sarcômeros com a fragilidade dos discos intercalares. A pressão do balão insuflado lesa diretamente essa região, acarretando liberação de enzimas intracelulares^[20].

Dinitrofenol

O dinitrofenol (DNP) é um ácido lipossolúvel fraco que age como protonóforo (translocador de prótons), entra na mitocôndria com carga positiva e sai com carga negativa, criando transporte de elétrons para fora da mitocôndria, evitando a conversão do ADP em ATP^[45]. Também provoca contração ventricular rápida tanto em corações submetidos a meio livre de cálcio como naqueles com concentração normal desse íon. No entanto, naqueles em meio sem cálcio provoca lise celular maciça^[22](Figura 2).

Essa observação é consistente com a hipótese que contração separa fisicamente as células, causando a lise celular naquelas em meio sem cálcio. O DNP por si só causa a contração das células, não sendo necessário adicionar cálcio ao meio. O cálcio intracelular presente nas mitocôndrias e sarcolema não seriam suficientes para gerar ambiente que simule meio com cálcio normal^[22].

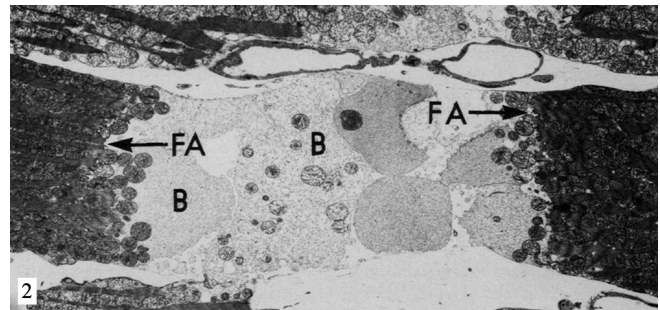


Fig. 2 - Eletromicrografia de coração de rato após 5 minutos em perfusão sem cálcio, seguido de 15 minutos com adição de DNP ao primeiro perfusato. Os sarcômeros aqui estão contraídos, tracionando a fascia adherens (FA) e provocando lesão na membrana celular do miócito na região do nexus. O citosol está exteriorizado na forma de blebs (B) na região intercelular. Reproduzido de Ganote & Nayler, 1985^[23]

Cafeína

A cafeína provoca liberação do cálcio do sarcolema, mas não na mitocôndria^[46]. Assim, o cálcio aumenta discretamente no intracelular, porém, sem sobrecarga do mesmo^[31]. A contração persistente produzida pela cafeína é dependente do cálcio, sendo que em sua ausência há sustentação por apenas 20 a 30 segundos, seguida por relaxamento^[18].

Corações perfundidos com solução com cafeína, mas sem cálcio a 22°C não manifestam aumento de enzimas, mas aqueles que são mantidos a 37°C apresentam lesão semelhante a do paradoxo do cálcio^[18].

Considerando que o aumento da concentração de cálcio no intracelular não é expressivo, porque não houve reperfusão com cálcio, é improvável que a lesão seja originária de intoxicação por cálcio, mas sim por ação direta da contração ventricular no sarcolema^[18].

CONCLUSÃO

Devemos temer o fenômeno conhecido como “paradoxo do cálcio”, pois lesa irreversivelmente a membrana do miócito, provocando extrusão do conteúdo celular. Entretanto, apesar de seus mecanismos biomoleculares ainda não serem completamente conhecidos, medidas como hipotermia, hiponatremia e presença de traços de cálcio na solução de perfusão diminuem o risco dessa lesão, possibilitando a recuperação da função ventricular após parada cardíaca induzida.

Papéis & responsabilidades dos autores

MABO	Autor principal
ACB	Ajuda no levantamento bibliográfico e tradução artigos
CAS	Ajuda no levantamento bibliográfico e tradução dos artigos
PHHB	Ajuda na correção do manuscrito
JLLC	Ajuda na correção do manuscrito
GG	Co-orientador
DMB	Orientador

REFERÊNCIAS

1. Zimmerman AN, Hulsman WC. Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature*. 1966;211(5049):646-7.
2. Zimmerman ANE, Daems W, Hülsmann WC, Snijder J, Wisse E, Durrer D. Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc Res*. 1967;1(3):201-9.
3. Poole-Wilson PA, Nayler WG. Preface. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(2):111.
4. Poole-Wilson PA, Harding DP, Bourdillon PD, Tones MA. Calcium out of control. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16 (2):175-87
5. Nayler WG, Dresel PE. Ca²⁺ and the sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(2):165-74.
6. Langer GA. Calcium at the sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(2):147-53.
7. Piper HM. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res*. 2000;45 (1):123-7.
8. Gebhard MM, Bretschneider HJ, Gersing E, Preusse CJ, Schnabel PA, Ulbricht LJ. Calcium-free cardioplegia--pro. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H 151-60.
9. Bi SH, Jin ZX, Zhang JY, Chen T, Zhang SL, Yang Y, et al. Calpain inhibitor MDL 28170 protects against the Ca²⁺ paradox in rat hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(4):385-92.
10. Zhang JY, Tong W, Wu F, Bi SH, Xu M, Jin ZX, et al. Different roles for contracture and calpain in calcium paradox-induced heart injury. *PLoS One*. 2012;7(12):e52270.
11. Wenzel S, Tastan I, Abdallah Y, Schreckenberger R, Schluter KD. Aldosterone improves contractile function of adult rat ventricular cardiomyocytes in a non-acute way: potential relationship to the calcium paradox of aldosteronism. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(2):247-56.
12. Kass RS, Lindegger N, Hagen B, Lederer WJ. Another calcium paradox in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(1):28-31.
13. Ashraf M. Correlative studies on sarcolemmal ultrastructure, permeability, and loss of intracellular enzymes in the isolated heart perfused with calcium-free medium. *Am J Pathol*. 1979;97(2):411-32.
14. Frank JS, Rich TL, Beydler S, Kreman M. Calcium depletion in rabbit myocardium. Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox. *Circ Res*. 1982;51(2):117-30.
15. Vander Heide RS, Ganote CE. Caffeine-induced myocardial injury in calcium-free perfused rat hearts. *Am J Pathol*. 1985;118(1):55-65.
16. Muir AR. The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J Anat*. 1967;101(Pt 2):239-61.
17. Nayler WG, Elz JS, Perry SE, Daly MJ. The biochemistry of uncontrolled calcium entry. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H:29-41.
18. Ganote CE, Sims MA, VanderHeide RS. Mechanism of enzyme release in the calcium paradox. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H:63-71.
19. Ganote CE, Sims MA. Parallel temperature dependence of contracture-associated enzyme release due to anoxia, 2,4-dinitrophenol (DNP), or caffeine and the calcium paradox. *Am J Pathol*. 1984;116(1):94-106.
20. Ganote CE, Sims MA. Physical stress-mediated enzyme release from calcium-deficient hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1983;15(7):421-9.
21. Ganote CE, Liu SY, Safavi S, Kaltenbach JP. Anoxia, calcium and contracture as mediators of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*. 1981;13(1):93-106.
22. Ganote CE, Grinwald PM, Nayler WG. 2,4-Dinitrophenol (DNP)-induced injury in calcium-free hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(6):547-57.
23. Ganote CE, Nayler WG. Contracture and the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol*. 1985;17 (8):733-45.
24. De Mello WC. Intercellular communication in cardiac muscle. *Circ Res*. 1982;51(1):1-9.
25. Yates JC, Dhalla NS. Structural and functional changes associated with failure and recovery of hearts after perfusion with Ca²⁺-free medium. *J Mol Cell Cardiol*. 1975;7(2):91-103.
26. Altschuld R, Gibb L, Ansel A, Hohl C, Kruger FA, Brierley GP. Calcium tolerance of isolated rat heart cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1980;12(12):1383-95.
27. Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. The isolation of Ca²⁺-resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1980;12(7):715-23.
28. Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. Mechanism of Ca²⁺-resistance in adult heart cells isolated with trypsin plus Ca²⁺. *J Mol Cell Cardiol*. 1982;14(9):523-30.
29. Frank JS. Ca depletion of the sarcolemma--ultrastructural changes. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H:23-7.
30. Frank JS, Langer GA, Nudd LM, Seraydarian K. The myocardial cell surface, its histochemistry, and the effect of sialic acid and calcium removal on its structure and cellular ionic exchange. *Circ Res*. 1977;41(5):702-14.
31. Hunter DR, Haworth RA, Berkoff HA. Cellular calcium turnover in the perfused rat heart: modulation by caffeine and procaine. *Circ Res*. 1982;51(3):363-70.

-
32. Rebeyka IM, Axford-Gatley RA, Bush BG, del Nido PJ, Mickle DA, Romaschin AD, et al. Calcium paradox in an in vivo model of multidose cardioplegia and moderate hypothermia. Prevention with diltiazem or trace calcium levels. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99 (3):475-83.
 33. Slade AM, Severs NJ, Powell T, Twist VW. Isolated calcium-tolerant myocytes and the calcium paradox: an ultrastructural comparison. *Eur Heart J.* 1983;4 Suppl H:113-22.
 34. Ruigrok TJ, Boink AB, Spies F, Blok FJ, Maas AH, Zimmerman AN. Energy dependence of the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10(11):991-1002.
 35. Baker JE, Hearse DJ. Slow calcium channel blockers and the calcium paradox: comparative studies in the rat with seven drugs. *J Mol Cell Cardiol.* 1983;15(7):475-85.
 36. Nayler WG, Perry SE, Elz JS, Daly MJ. Calcium, sodium, and the calcium paradox. *Circ Res.* 1984;55(2):227-37.
 37. Dhalla NS, Alto LE, Singal PK. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchange in the development of cardiac abnormalities due to calcium paradox. *Eur Heart J.* 1983;4 Suppl H:51-6.
 38. Baker JE, Bullock GR, Hearse DJ. The temperature dependence of the calcium paradox: enzymatic, functional and morphological correlates of cellular injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1983;15(6):393-411.
 39. Holland CE, Jr., Olson RE. Prevention by hypothermia of paradoxical calcium necrosis in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1975;7(12):917-28.
 40. Rich TL, Langer GA. Calcium depletion in rabbit myocardium. Calcium paradox protection by hypothermia and cation substitution. *Circ Res.* 1982;51(2):131-41.
 41. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol.* 1968;195(2):451-70.
 42. Boink AB, Ruigrok TJ, de Moes D, Maas AH, Zimmerman AN. The effect of hypothermia on the occurrence of the calcium paradox. *Pflugers Arch.* 1980;385(2):105-9.
 43. Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10(7):641-68.
 44. Bulkley BH, Nunnally RL, Hollis DP. "Calcium paradox" and the effect of varied temperature on its development: a phosphorus nuclear magnetic resonance and morphologic study. *Lab Invest.* 1978;39:133-40.
 45. Harper JA, Dickinson K, Brand MD. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev.* 2001;2(4):255-65.
 46. Blayney L, Thomas H, Muir J, Henderson A. Action of caffeine on calcium transport by isolated fractions of myofibrils, mitochondria, and sarcoplasmic reticulum from rabbit heart. *Circ Res.* 1978;43(4):520-6.

2.3. Comparação da solução histidina-triptofano-cetoglutarato com histidina triptofano-glutamato como agentes cardioplégicos em corações isolados de ratos: estudo imunohistoquímico

Comparison of the solution of histidine-tryptophan-alfacetoglutarate with histidine-tryptophan-glutamate as cardioplegic agents in isolated rat hearts: an immunohistochemical study

Comparação da solução de histidina-triptofano-alfacetoglutarato com histidina-triptofano-glutamato como agentes cardioplégicos em corações isolados de ratos: estudo imuno-histoquímico

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira¹, MD; Livia Carvalho Ferreira¹; Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari¹; Antônio Carlos Brandi², MD; Carlos Alberto dos Santos², MD; Paulo Henrique Husseni Botelho², MD; Orlando Petrucci³, MD, PhD; Domingo Marcolino Braile¹, MD, PhD

DOI: 10.5935/1678-9741.20140015

RBCCV 44205-1525

Abstract

Introduction: Cardiac arrest during heart surgery is a common procedure and allows the surgeon to perform surgical procedures in an environment free of blood and movement. Using a model of isolated rat heart, the authors compare a new cardioplegic solution containing histidine-tryptophan-glutamate (group 2) with the histidine-tryptophan-alfacetoglutarate (group 1) routinely used by some cardiac surgeons.

Objective: To assess caspase, IL-8 and KI-67 in isolated rat hearts using immunohistochemistry.

Methods: 20 Wistar male rats were anesthetized and heparinized. The chest was opened, cardiectomy was performed and 40 ml/kg of the appropriate cardioplegic solution was infused. The hearts were kept for 2 hours at 4°C in the same solution, and thereafter, placed in the Langendorff apparatus for 30 minutes with Ringer-Locke solution. Immunohistochemistry analysis of caspase, IL-8, and KI-67 were performed.

Results: The concentration of caspase was lower in group 2 and Ki-67 was higher in group 2, both $P < 0.05$. There was no statistical difference between the values of IL-8 between the groups.

Conclusion: Histidine-tryptophan-glutamate solution was better than histidine-tryptophan-alfacetoglutarate solution because it reduced caspase (apoptosis), increased KI-67 (cell proliferation), and showed no difference in IL-8 levels compared to group 1. This suggests that the histidine-tryptophan-glutamate solution was more efficient than the histidine-tryptophan-alfacetoglutarate for the preservation of hearts of rat cardiomyocytes.

Descriptors: Heart Arrest, Induced. Myocardial Ischemia. Heart.

Resumo

Introdução: A parada do coração durante a cirurgia

1. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

2. Hospital de Base (HB), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

3. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Av. República do Líbano, 2700 – casa 80 – Jardim Tarraf II – São José do Rio Preto, SP, Brasil – CEP: 15092-500

E-mail: m_aurelio@sbccv.org.br

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Não houve suporte financeiro.

Artigo recebido em 17 de outubro de 2013
Artigo aprovado em 21 de novembro de 2013

Abreviaturas, acrônimos & símbolos	
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Soro fetal bovino
DOM	Densidade óptica média
HTG	Histidina-triptofano-glutamato
HTK	Histidina-triptofano-cetoglutarato
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
UA	Unidades arbitrárias

cardíaca é procedimento comum e permite que o cirurgião realize os procedimentos cirúrgicos em ambiente isento de sangue e movimento. Os autores comparam, em modelo de coração isolado de rato, uma nova solução cardioplégica com histidina-triptofano-glutamato (grupo 2) com a histidina-triptofano-alfacetoglutarato (grupo 1) já utilizada de rotina por alguns cirurgiões cardíacos.

Objetivo: Avaliar por análise imuno-histoquímica a caspase, a IL-8 e KI-67 em corações isolados de ratos.

Métodos: 20 ratos machos de raça Wistar foram anestesiados

e heparinizados. O tórax foi aberto, realizado cardiectomia e infundido 40 ml/kg de solução cardioplégica apropriada. Os corações foram mantidos por 2 horas na mesma solução a 4°C e, após esse período, colocados em aparato de Langendorff por 30 minutos com solução de Ringer Locke. Foram feitas análises imuno-histoquímicas para caspase, IL-8 e KI-67.

Resultados: A concentração de caspase estava menor no grupo 2 e da KI-67 estava mais elevada no grupo 2, ambos com $P < 0,05$. Não houve diferença estatística entre os valores de IL-8 entre os grupos.

Conclusão: A solução com histidina-triptofano-glutamato foi melhor que a com histidina-triptofano-cetoglutarato, pois reduziu a caspase (apoptose), aumentou o KI-67 (proliferação celular) e não apresentou valores diferentes de IL-8 (inflamação e necrose) que no grupo 1. Isso sugere que a solução histidina-triptofano-glutamato foi mais eficiente que a histidina-triptofano-cetoglutarato na preservação dos cardiomiócitos dos corações de ratos.

Descritores: Parada Cardíaca Induzida. Isquemia Miocárdica. Coração.

INTRODUÇÃO

A indução da parada temporária do coração durante a cirurgia cardíaca é um procedimento relativamente comum que permite ao cirurgião realizar procedimentos em ambiente isento de sangue e movimento [1-3]. Um dos agentes cardioplégicos utilizados é a solução histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK).

O HTK foi testado por Bretschneider et al. [4], na Alemanha, em 1975. Seu mecanismo de ação vem da ausência do cálcio, que evita seu influxo para o interior da célula pelos canais de cálcio tipo "L" na fase de platô do potencial de ação, inibindo a liberação de mais cálcio do retículo sarcoplasmático do miócito, resultando na inativação dos miofilamentos [5,6].

Esse mecanismo é complementado pela proteção celular dada pelos constituintes dessa solução, cujas funções principais incluem: 1- histidina: sistema tampão dependente de temperatura, inibidor de metaloproteinases de matriz e impermeante celular [7]; 2- triptofano: atua na manutenção da integridade da membrana celular [8] e, 3- cetoglutarato: melhora pressão máxima desenvolvida e evita aumento da fração MB da creatinofosfoquinase [8].

Segundo Pisarenko et al. [9], a substituição do alface-

toglutarato pelo glutamato traria algumas vantagens para o miócito: a diminuição do lactato e a elevação do pH na matriz mitocondrial, mesmo em isquemia, evitando a acidose intracelular e o edema, contribuindo para a manutenção do trifosfato de adenosina (ATP) intracelular, protegendo o miócito da lesão de isquemia-reperusão.

Por sua vez, a redução da lesão de reperusão provocaria diminuição da caspase [10-12] e da IL-8, devido à redução da apoptose e da necrose celular, respectivamente [13,14]. Entretanto, a diminuição da lesão de reperusão pode não estar atuando sozinha em benefício ao miócito. Proteínas proliferativas, como o KI-67, poderiam voltar a serem codificadas, contribuindo para a redução da morte celular e mesmo formação de novas fibras miocárdicas [15,16].

Este trabalho objetiva avaliar solução de HTG como agente cardioplégico em coração isolado de ratos, considerando análise imuno-histoquímica dos marcadores caspase, IL-8 e KI-67.

MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (autorização número 015/2012), foram utilizados 20 ratos

(10 para cada grupo), machos, raça Wistar, com peso médio de 280 ± 29 gramas.

Todos os animais receberam cuidados conforme recomendações do *Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) - National Research Council*, Estados Unidos [17].

Protocolo Experimental

Os animais foram anestesiados com injeção de 65 mg/kg intraperitoneal de pentobarbital sódico e receberam heparinização sistêmica IP (500 UI/kg). Após a abertura do tórax, foi realizada cardiectomia. Os corações receberam solução de Ringer lactato para “lavar” a árvore coronariana e, em seguida, solução cardioplégica conforme seu grupo.

Os corações nessa fase do experimento foram divididos em 2 grupos. No grupo 1, foi utilizada solução de HTK a 4°C e, no grupo 2, solução de histidina-triptofano-glutamato (HTG) a 4°C. A Tabela 1 apresenta a composição de cada uma das soluções. Em todos os casos, a infusão da cardioplegia foi feita em dose única de 40 ml/kg na raiz da aorta, seguida por imersão do órgão na mesma solução por 2 horas a 4°C.

Após esse tempo, os corações foram colocados em sistema de Langendorff e perfundidos com solução tampão de Ringer Locke oxigenado, em normotermia e pressão constante de 100 cm H₂O, por método gravitacional durante 30 minutos. A drenagem do ventrículo direito foi realizada pela abertura da artéria pulmonar, sendo mantido intacto o átrio direito no intuito de preservar o nó sinusal [18].

Foram inseridos três fios de marca-passo epicárdico em pontos equidistantes dos ventrículos para documentação eletrocardiográfica dos eventos cardíacos. Foi anotado o tempo de início da fibrilação ventricular e o primeiro batimento cardíaco contado a partir do início da infusão da solução de Ringer Locke.

Tabela 1. Composição das soluções utilizadas.

Substância	HTK (g/L)	HTG (g/L)
Cloreto de sódio	0,8766	0,8766
Cloreto de potássio	0,671	0,671
Cloreto de magnésio	0,8132	0,8132
Cloreto de cálcio	0,0022	0,0022
Potássio-hidrogênio-2-cetoglutarato	0,1842	---
Glutamato	---	0,1842
Histidina	27,9289	27,9289
Cloreto de histidina, H ₂ O	3,7733	3,7733
Triptofano	0,4085	0,4085
Manitol	5,4651	5,4651
Água para injeção	a 1000 ml	a 1000 ml

HTK: histidina-triptofano-cetoglutarato; HTG: histidina-triptofano-glutamato

Tabela 2. Relação dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Tampão	Laboratório
anti-KI-67	Monoclonal	1:200	Citrato pH6	Biocare Medical
anti-Caspase 3	Policlonal	1:1000	Citrato pH6	Abcam
anti-IL-8	Monoclonal	1:50	Citrato pH6	Santa Cruz

Após 30 minutos de infusão de Ringer Locke, o experimento foi descontinuado. Os corações foram retirados do sistema de Langendorff, sendo coletados fragmentos de ápice cardíaco, que foram armazenados em tubos estéril tipo Falcon contendo formol 10%, para posterior preparação histológica e imuno-histoquímica.

Preparação histológica e técnica imuno-histoquímica

Inicialmente, o material foi incluído em parafina, procedimento que oferece resistência permitindo seu corte em espessura de 3 µm e colocados em lâminas silanizadas. A silanização das lâminas consistiu na preparação destas com um adesivo que fixa o fragmento às lâminas, impedindo seu descolamento durante o procedimento imuno-histoquímico. Para tanto, estas foram imersas em acetona PA (2 minutos), solução de silano 4% diluído com acetona (2 minutos) e novamente em acetona PA (4 a 5 mergulhos). A secagem das lâminas foi realizada na estufa a 60°C.

O bloco foi preso ao micrótomo, a espessura do corte foi regulada para 3 µm e os cortes colocados em lâmina silanizada identificada e deixados na estufa a 60°C por 24 horas. As lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol, seguida por hidratação em álcool absoluto I, II e III, finalizando com seis mergulhos em água corrente, incubados com 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor com tampão específico para cada anticorpo por 30 minutos (Tabela 2). Em seguida, as lâminas foram encobertas com solução contendo soro fetal bovino (BSA) e incubadas com o anticorpo primário.

Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em solução PBS por 15 minutos e incubadas com kit Starr Trek Universal HRP Detection (Biocare Medical®), que consistiu no anticorpo secundário biotinizado por 1 hora e no complexo estreptavidina-peroxidase por 30 minutos, seguidas de lavagem com PBS por 15 minutos. A revelação foi feita com substrato cromógeno (Betazoidchromogen DAB) do kit Starr Trek Universal HRP Detection (Biocare Medical®) de 2 a 5 minutos e a contracoloração com hematoxilina de Harrys por 40 segundos. Os tecidos foram desidratados em álcool em grau crescente e banhados no xilol antes da montagem das lâminas em meio ERV-MOUNT (Erviagas®).

Os controles negativos das reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. Foram utilizados tecido de

tonsila para reações de KI-67 e caspase 3 e como controle positivo tecido de mama para reação de IL-8.

Quantificação da marcação imuno-histoquímica

As lâminas foram fotografadas e as enzimas quantificadas pelo *software* AxioVision no aumento de 40X do microscópio Axioskop 2 Zeiss. Para cada amostra, foram selecionadas três regiões do tecido cardíaco e 20 pontos das células miocárdicas foram marcados em cada região. Assim, foram analisados 60 pontos diferentes de cada amostra, obtendo a média da intensidade relativa de imunorreatividade. Os valores foram obtidos em unidades arbitrárias (UA). A densidade óptica média (DOM) foi obtida com a ajuda da fórmula:

$$\text{DOM} = 255 - \text{UA}$$

Essa fórmula demonstrou a intensidade da imunocoloração especificamente nas áreas imunorreativas.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e, subsequentemente, a análise paramétrica pelo teste t de Student não pareado ou não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney, quando adequado, e teste exato de Fisher para dados categóricos. Os resultados foram expressos somente em média \pm desvio padrão devido ao fato de todas as variáveis se comportarem como quantitativas contínuas com distribuição Gaussiana. Os valores de *P* foram apresentados, sendo que aqueles que foram menores que 0,05 foram considerados significantes. Utilizou-se o programa de cálculos estatísticos GraphPad InStat e Prism 6.0, ambos para Windows®.

RESULTADOS

O peso médio dos animais foi 277,4 \pm 24,6 g (grupo 1) e 288 \pm 34,5 g (grupo 2), respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos (*P*=0,4396). Com relação ao volume médio de Ringer Locke coletado de seio coronário ao final de 30 minutos (363,1 \pm 177,3 ml e 277,4 \pm 33,7 ml, respectivamente), não houve diferença significativa entre os grupos (*P*=0,1923).

Achados durante perfusão com solução cardioplégica e Ringer Locke

Todos os corações apresentaram perfusão adequada de cardioplegia e Ringer Locke, evidenciada pela coloração clara na parede ventricular. A frequência cardíaca média, após 5 minutos de perfusão (233 \pm 36 e 188 \pm 53,4 batimentos por minuto, respectivamente), apresentou diferença significativa (*P*=0,0086). O tempo de início de fibrilação ventricular (49 \pm 28,2 e 45 \pm 17 segundos, respectivamente) e o tempo de primeiro batimento (153 \pm 78 e 117 \pm 96,8 segundos, respectivamente) não demonstraram diferença significativa (*P*=0,5869 e *P*=0,187, respectivamente).

Achados imuno-histoquímicos

Após 2 horas de isquemia e 30 minutos de reperfusão, a atividade da caspase foi significativamente menor no grupo 2 (*P*<0,0001), a atividade de KI-67 foi maior no grupo 2 (*P*<0,0001) e a da IL-8 não foi diferente entre os grupos (Figura 1).

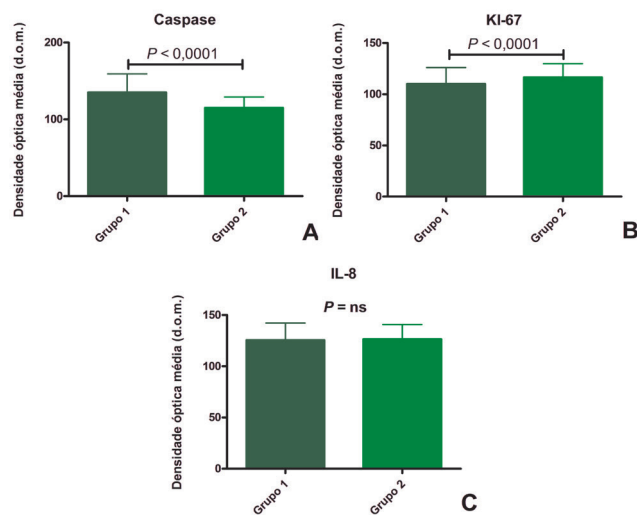


Fig. 1 - Histogramas demonstrando densidades ópticas médias de: (A) caspase, (B) KI-67 e (C) IL-8. Grupo 1: solução com histidina-triptofano-acetoglutarato, Grupo 2: solução com histidina-triptofano-glutamato

DISCUSSÃO

Isquemia miocárdica causa diversos efeitos cardíacos, tais como: diminui força de contração; aumenta pressão diastólica, indicando contratura das miofibrilas em condições isovolumétricas; provoca queda na fosfocreatina e ATP; diminui a contratura, glutamato e aspartato e; aumenta lactato, piruvato, alanina e succinato [9]. Segundo Pisarenko et al. [9], a adição de glutamato no perfusado mantém o ATP intracelular e diminui tanto o lactato quanto o piruvato, que contribuiriam para acidose. Esses efeitos contribuem para melhorar a função cardíaca na recuperação após isquemia. Nossos resultados demonstram comportamento semelhante nas duas soluções estudadas referentes ao tempo de fibrilação ventricular e tempo de primeiro batimento, entretanto foi melhor para grupo 2 para frequência cardíaca, que se encontrava mais baixa, o que pode ser correlacionado provavelmente com menor acidose do miócito.

Outro processo que está intrinsecamente relacionado com lesão isquemia-reperfusão é a apoptose [10,11], caracterizada por alterações morfológicas, como condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de “corpos

apoptóticos”. Essas mudanças são feitas por uma família de proteases denominadas caspases [12]. O grau de ativação das caspases é diretamente relacionado ao grau de apoptose, que desempenha fator crítico na recuperação da função cardíaca [13]. Nossos resultados demonstram atividade de caspase menor no grupo 2, sugerindo um potencial protetor para função miocárdica.

Em contraste com a apoptose, a necrose é um processo irreversível de morte celular em consequência à quebra na homeostase celular. Há ruptura da membrana celular, com extravasamento do citosol ao meio extracelular, marginação leucocitária e ativação da cascata inflamatória [13,14]. Anselmi et al. [14] descreveram pico da IL-8 em 35 minutos de reperfusão e da IL-6 em 75 minutos. Lee et al. [13] afirmaram que a solução de HTK inibe aumento das interleucinas. Assim, como nesta pesquisa não houve diferença significativa da IL-8 entre os grupos 1 e 2, podemos inferir que a proteção anti-inflamatória dada pela solução HTG não foi diferente daquela dada pela solução HTK.

Corações de mamíferos apresentam pequena capacidade proliferativa após o nascimento. Um dos marcadores utilizados para avaliar proliferação celular é o KI-67 [15]. Com esse marcador, Walsh et al. [16] demonstraram que 12% a 23% dos cardiomiócitos fetais de ratos apresentam atividade proliferativa, passando a 1% a 8% até o 7º dia e praticamente indetectável a partir do 14º dia. Em nosso estudo, houve aumento significativo do KI-67 no grupo 2, demonstrando atividade proliferativa precoce da solução HTG garantida já com 2 horas de isquemia. Associado a isso, Walsh et al. [16] também chamam a atenção da atividade do KI-67 também ser inversamente proporcional à apoptose, o que também é confirmado em nosso estudo, no qual a caspase é menor no grupo 2 que no 1. Entretanto, o aumento da atividade desse marcador é preocupante, pois já foi associado a mixomas [19,20] e sarcomas cardíacos [21].

Apesar dos resultados aqui obtidos serem concordantes com os da literatura, ainda não são definitivos em relação à substituição do alfaceogluturato pelo glutamato. Análises quantitativas com ATP e outros marcadores nucleares para proliferação celular devem ser utilizados visando a uma conclusão mais abrangente e segura. Outro aspecto relevante é a concentração do glutamato. Teria o mesmo efeito protetor no coração se alterarmos sua concentração? Novos estudos ainda são necessários para responder essas questões.

CONCLUSÃO

A análise imuno-histoquímica da substituição do alfaceogluturato pelo glutamato na cardioplegia com histidina e triptofano demonstrou que as células musculares cardíacas não apresentaram maior ocorrência de necrose, visto pela mensuração da IL-8, apresentaram menor ocorrência de apoptose, confirmado pelos valores mais baixos da caspa-

se no grupo 1 e melhor atividade proliferativa, com valores maiores da KI-67 em relação ao grupo 1. Isso sugere que a solução HTG foi mais eficiente que a HTK na preservação dos cardiomiócitos dos corações de ratos.

Papéis & responsabilidades dos autores

MABO	Desenho do estudo, realização dos experimentos, análise dos resultados e redação do manuscrito
LCF	Auxílio nas técnicas imuno-histoquímicas
DAPCZ	Auxílio nas técnicas imuno-histoquímicas
ACB	Participação na elaboração do texto final
CAS	Participação na elaboração do texto final
PHHB	Participação na elaboração texto final
OP	Revisão versão final
DMB	Desenho do estudo, análise dos resultados e redação do manuscrito

REFERÊNCIAS

1. Chambers DJ. Mechanisms and alternative methods of achieving cardiac arrest. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(2):S661-6.
2. Fannelop T, Dahle GO, Matre K, Moen CA, Mongstad A, Eliassen F, et al. Esmolol before 80 min of cardiac arrest with oxygenated cold blood cardioplegia alleviates systolic dysfunction. An experimental study in pigs. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;33(1):9-17.
3. Braile DM, Ardito RV, Zaiantchick M, Santos JLV, Soares MJF. Cardioplegia sanguínea contínua normotérmica. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1989;4(2):109-38.
4. Bretschneider HJ, Hübner G, Knoll D, Lohr B, Nordbeck H, Spieckermann PG. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1975;16(3):241-60.
5. Fallouh HB, Kentish JC, Chambers DJ. Targeting for cardioplegia: arresting agents and their safety. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(2):220-6.
6. Chambers DJ, Hearse DJ. Developments in cardioprotection: “polarized” arrest as an alternative to “depolarized” arrest. *Ann Thorac Surg.* 1999;68(5):1960-6.
7. Antunovic M, Aleksic D. Preparation and testing of solutions for organ perfusion and preservation in transplantation. *Vojnosanit Pregl.* 2008;65(8):596-600.
8. Hachida M, Ookado A, Nonoyama M, Koyanagi H. Effect of HTK solution for myocardial preservation. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1996;37(3):269-74.
9. Pisarenko OI, Solomatina ES, Ivanov VE, Studneva IM, Kapelko VI, Smirnov VN. On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res Cardiol.* 1985;80(2):126-34.

10. Xu YJ, Saini HK, Zhang M, Elimban V, Dhalla NS. MAPK activation and apoptotic alterations in hearts subjected to calcium paradox are attenuated by taurine. *Cardiovasc Res.* 2006;72(1):163-74.
11. Fischer UM, Cox CS Jr, Laine GA, Mehlhorn U, Bloch W, Allen SJ. Induction of cardioplegic arrest immediately activates the myocardial apoptosis signal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1630-3.
12. Pirnia F, Schneider E, Betticher DC, Borner MM. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ.* 2002;9(9):905-14.
13. Lee S, Huang CS, Kawamura T, Shigemura N, Stolz DB, Billiar TR, et al. Superior myocardial preservation with HTK solution over Celsior in rat hearts with prolonged cold ischemia. *Surgery.* 2010;148(2):463-73.
14. Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GG, Possati G, et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;25(3):304-11.
15. Lee Y. To proliferate or not to proliferate. *Cardiovasc Res.* 2010;86(3):347-8.
16. Walsh S, Pontén A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo: an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res.* 2010;86(3):365-73.
17. Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources - Commission on Life Sciences - National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: National Academies Press; 2010. 211p.
18. Lahaye Sle D, Gratas-Delamarche A, Malardé L, Vincent S, Zguira MS, Morel SL, et al. Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β -adrenoceptors in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:72.
19. Kusumi T, Minakawa M, Fukui K, Saito S, Ohashi M, Sato F, et al. Cardiac tumor comprising two components including typical myxoma and atypical hypercellularity suggesting a malignant change. *Cardiovasc Pathol.* 2009;18(6):369-74.
20. Suvarna SK, Royds JA. The nature of the cardiac myxoma. *Int J Cardiol.* 1996;57(3):211-6.
21. Brunner-La Rocca HP, Vogt PR, Burke AP, Schneider J, Jenni R, Turina MI. A primary cardiac sarcoma with unusual histology and clinical course. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(5):1675-7.

2.4. Comparação da dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de ratos submetidos à cardioplegia utilizando solução histidina-triptofano-cetoglutarato e histidina-triptofano-glutamato

Comparison of fractal dimension and Shannon entropy in myocytes from rats treated with histidine-tryptophan-glutamate and histidine-tryptophan cetoglutarate

Comparação da dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de ratos submetidos à cardioplegia utilizando solução histidina-triptofano-cetoglutarato e histidina-triptofano com glutamato

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira¹, MD; Antônio Carlos Brandi², MD; Carlos Alberto dos Santos², MD; Paulo Henrique Husseni Botelho², MD; José Luís Lasso Cortez³, MD; Moacir Fernandes de Godoy⁴, PhD; Domingo Marcolino Braile⁵, MsC, PhD

DOI: 10.5935/1678-9741.20140052

RBCCV 44205-1535

Abstract

Introduction: Solutions that cause elective cardiac arrest are constantly evolving, but the ideal compound has not yet been found. The authors compare a new cardioplegic solution with histidine-tryptophan-glutamate (Group 2) and other one with histidine-tryptophan-cetoglutarate (Group 1) in a model of isolated rat heart.

Objective: To quantify the fractal dimension and Shannon entropy in rat myocytes subjected to cardioplegia solution using histidine-tryptophan with glutamate in an experimental model, considering the caspase markers, IL-8 and KI-67.

Methods: Twenty male Wistar rats were anesthetized and heparinized. The chest was opened, the heart was withdrawn and 40 ml/kg of cardioplegia (with histidine-tryptophan-cetoglutarate or histidine-tryptophan-glutamate solution) was infused. The hearts were kept for 2 hours at 4°C in the same solution, and

thereafter placed in the Langendorff apparatus for 30 min with Ringer-Locke solution. Analyzes were performed for immunohistochemical caspase, IL-8 and KI-67.

Results: The fractal dimension and Shannon entropy were not different between groups histidine-tryptophan-glutamate and histidine-tryptophan-cetoglutarate.

Conclusion: The amount of information measured by Shannon entropy and the distribution thereof (given by fractal dimension) of the slices treated with histidine-tryptophan-cetoglutarate and histidine-tryptophan-glutamate were not different, showing that the histidine-tryptophan-glutamate solution is as good as histidine-tryptophan-cetoglutarate to preserve myocytes in isolated rat heart.

Descriptors: Heart Arrest, induced. Apoptosis. Myocardial Ischemia.

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil; Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

²Hospital de Base São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

⁴Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, Brasil. Núcleo Transdisciplinar para Estudo do Caos e da Complexidade (NUTECC-CNPq), São José do Rio Preto, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Avenida República do Líbano, 2700, casa 80 - São José do Rio Preto, SP, Brasil. CEP: 15092-440

E-mail: m_aurelio@sbccv.org.br

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Não houve suporte financeiro.

Abreviaturas, acrônimos & símbolos	
HTG	Histidina-triptofano-glutamato
HTK	Histidina-triptofano-cetoglutarato
IP	Intraperitoneal

Resumo

Introdução: As soluções que provocam parada cardíaca eletiva estão em constante evolução, porém, o composto ideal ainda não foi encontrado. Os autores comparam uma nova solução cardioplégica com histidina-triptofano-glutamato (Grupo 2) com histidina-triptofano-cetoglutarato (Grupo 1) em modelo de coração isolado de rato.

Objetivo: Quantificar a dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de rato submetidos à cardioplegia utilizando solução histidina-triptofano com glutamato em modelo experimental, considerando-se os marcadores caspase, IL-8 e Ki-67.

Métodos: Vinte ratos machos de raça Wistar foram anestesiados e heparinizados. O tórax foi aberto, realizado cardiectomia

e infundido 40 ml/Kg de solução cardioplégica apropriada. Os corações foram mantidos por 2 horas na mesma solução a 4°C e, após esse período, colocados em aparato de Langendorff por 30 minutos com solução de Ringer Locke. Foram feitas análises imunohistoquímicas para caspase, IL-8 e KI-67.

Resultados: A dimensão fractal e a entropia de Shannon dos corações submetidos à parada cardíaca eletiva nos grupos 1 e 2 não foram diferentes.

Conclusão: A quantidade de informações avaliada pela entropia de Shannon e a distribuição das mesmas (dada pela dimensão fractal) nas lâminas de coração de rato submetidas à cardioplegia com solução histidina-triptofano-acetoglutarato ou histidina-triptofano-glutamato não foram diferentes, o que mostra que a solução de histidina-triptofano-glutamato é tão boa quanto a histidina-triptofano-cetoglutarato na preservação dos miócitos em modelo de coração isolado de rato.

Descritores: Parada Cardíaca Induzida. Apoptose. Isquemia Miocárdica.

INTRODUÇÃO

Durante a cirurgia cardíaca é usual a parada temporária do coração, permitindo ao cirurgião realizar a operação no interior das cavidades cardíacas em ambiente isento de sangue e movimento. Antes que houvesse qualquer solução que produzisse parada cardíaca segura, foi de Gibbon em 1953 o mérito de utilizar uma técnica descrita por Senning em fechamento de comunicação interatrial experimental em cães utilizando fibrilação ventricular^[1].

Em 1955, Melrose et al.^[2] introduziram o conceito de parada química usando solução contendo 2,5% de citrato de potássio, que despolariza a membrana celular e para a condução do potencial de ação. Entretanto, a concentração elevada de potássio causou necrose miocárdica focal e morte em muitos pacientes, resultando em abandono da cardioplegia hipercalemica como solução protetora por quase 20 anos. Em meados dos anos 70, cardioplegias alternativas contendo menos potássio que a de Melrose foram introduzidas com sucesso, como a solução de St. Thomas^[3], cardioplegia sanguínea de baixo volume^[4,5] e solução de histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK)^[6]. Apesar desses avanços, a solução de cardioplegia ideal ainda não foi desenvolvida^[7,8].

A substituição do cetoglutarato por glutamato tem consequências ainda incertas no comportamento do músculo miocárdico, porém será um meio eficaz de avaliar indiretamente sua incorporação ao Ciclo de Krebs, retirando o piruvato da mitocôndria, evitando assim a acidose que é conhecidamente danoso tanto à célula quanto a seus mecanismos enzimáticos^[9].

Soluções cardioplégicas com baixa concentração de cálcio como o HTK podem provocar o chamado “paradoxo do

cálcio”, desestabilizando a membrana celular, o que culmina com necrose, marginação leucocitária e apoptose^[10]. Modificações histológicas provocadas por soluções cardioplégicas poderiam gerar alteração na quantidade e distribuição de informação contida na lâmina. Já é fato conhecido que alterações estruturais teciduais podem ser quantificadas por meio da dimensão fractal e entropia de Shannon^[11,12].

A análise da dimensão fractal e entropia de Shannon foram recentemente usadas em várias áreas da medicina como cardiologia, neurologia, oftalmologia e radiologia^[11,13], sendo úteis na caracterização de estruturas irregulares e complexas^[11,13,14]. Utilizando análise fractal, Arruda et al.^[11] e Douglas et al.^[12] correlacionaram grau de desdiferenciação e invasividade tumoral em câncer de próstata e grau de rejeição em tumores cardíacos, respectivamente.

O presente trabalho objetiva avaliar se a solução de estido histidina-triptofano-glutamato (HTG) é melhor que a HTK (solução padrão) por meio da dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de rato submetidos, considerando-se os marcadores caspase, IL-8 e KI-67.

MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (autorização número 015/2012), foram utilizados 20 ratos (10 para cada grupo), machos, raça Wistar, com peso médio de 280±29 gramas.

Todos os animais receberam cuidados conforme recomendações do Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) - National Research Council, Estados Unidos^[15].

Protocolo Experimental

Os animais foram anestesiados com injeção de 65 mg/Kg intraperitoneal (IP) de pentobarbital sódico e receberam heparinização sistêmica IP (500 UI/kg). Após a abertura do tórax, foi realizada cardiectomia. Os corações receberam solução de Ringer lactato para “lavar” a árvore coronariana e, em seguida, solução cardioplégica conforme seu grupo.

Os corações nessa fase do experimento foram divididos em dois grupos. No Grupo 1 foi utilizada solução de HTK a 4°C e, no Grupo 2, solução de histidina-triptofano-glutamato (HTG) a 4°C. A Tabela 1 mostra a composição de cada uma das soluções. Em todos os casos a infusão da cardioplegia foi feita em dose única de 40 ml/Kg na raiz da aorta, seguida por imersão do órgão na mesma solução por 2 horas a 4°C.

Após esse tempo, os corações foram colocados em sistema de Langendorff e perfundidos com solução tampão de Ringer Locke oxigenado, em normotermia e pressão constante de 100 cm H₂O, por método gravitacional durante 30 minutos. A drenagem do ventrículo direito foi realizada pela abertura da artéria pulmonar, sendo mantido intacto o átrio direito no intuito de preservar o nó sinusal^[16].

Foram inseridos três fios de marca-passo epicárdico em pontos equidistantes dos ventrículos para documentação eletrocardiográfica dos eventos cardíacos. Foi anotado o tempo de início da fibrilação ventricular e o primeiro batimento cardíaco contado a partir do início da infusão da solução de Ringer Locke.

Tabela 1. Composição das soluções utilizadas.

Substância	HTK (g/L)	HTG (g/L)
Cloreto de sódio	0,8766	0,8766
Cloreto de potássio	0,671	0,671
Cloreto de magnésio	0,8132	0,8132
Cloreto de cálcio	0,0022	0,0022
Potássio-hidrogênio-2-cetoglutarato	0,1842	---
Glutamato	---	0,1842
Histidina	27,9289	27,9289
Cloreto de histidina, H ₂ O	3,7733	3,7733
Triptofano	0,4085	0,4085
Manitol	5,4651	5,4651
Água para injeção	a 1000 ml	a 1000 ml

HTK: histidina-triptofano-cetoglutarato; HTG: histidina-triptofano-glutamato

Após 30 minutos de infusão de Ringer Locke, o experimento foi descontinuado. Os corações foram retirados do sistema de Langendorff, sendo coletados fragmentos de ápice cardíaco, que foram armazenados em tubos estéreis como Falcon contendo formol 10%, para posterior preparação histológica e imunohistoquímica.

Preparação histológica e técnica imunohistoquímica

Inicialmente, o material foi incluído em parafina, procedimento que oferece resistência permitindo seu corte em espessura de 3 µm e colocados em lâminas silanizadas. A silanização das lâminas consistiu na preparação destas com um adesivo que fixa o fragmento às lâminas impedindo seu descolamento durante o procedimento imunohistoquímico. Para tanto, estas foram imersas em acetona PA (2 minutos), solução de silano 4% diluído com acetona (2 minutos) e novamente em acetona PA (4 a 5 mergulhos). A secagem das lâminas foi realizada na estufa a 60°C.

O bloco foi preso ao micrótomo, a espessura do corte foi regulada para 3 µm e os cortes colocados em lâmina silanizada identificada e deixados na estufa a 60°C por 24 horas. As lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol, seguida por hidratação em álcool absoluto I, II e III, finalizando com seis mergulhos em água corrente, incubados com 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor com tampão específico para cada anticorpo por 30 minutos (Tabela 2). Em seguida, as lâminas foram encobertas com solução contendo soro fetal bovino (BSA) e incubadas com o anticorpo primário.

Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em solução PBS por 15 minutos e incubadas com kit Starr Trek Universal HRP Detection (Biocare Medical®), que consistiu no anticorpo secundário biotilado por 1 hora e no complexo estreptavidina-peroxidase por 30 minutos, seguidas de lavagem com PBS por 15 minutos. A revelação foi feita com substrato cromógeno (Betazoidchromogen DAB) do kit Starr Trek Universal HRP Detection (Biocare Medical®) de 2 a 5 minutos e a contra-coloração com hematoxilina de Harrys por 40 segundos. Os tecidos foram desidratados em álcool em grau crescente e banhados no xilol antes da montagem das lâminas em meio ERV-MOUNT (Erviagas®).

Tabela 2. Relação dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Tampão	Laboratório
anti-KI-67	Monoclonal	1:200	Citrato pH6	Biocare Medical
anti-Caspase 3	Policlonal	1:1000	Citrato pH6	Abcam
anti-IL-8	Monoclonal	1:50	Citrato pH6	Santa Cruz

Os controles negativos das reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. Foram utilizados tecido de tonsila para reações de KI-67 e caspase 3 e como controle positivo tecido de mama para reação de IL-8.

As lâminas foram fotografadas e as enzimas quantificadas pelo software AxioVision no aumento de 40X do microscópio Axioskop 2 Zeiss. Para cada amostra, foram selecionadas três regiões do tecido cardíaco.

Dimensão fractal e entropia de Shannon

As lâminas fotografadas foram então binarizadas para leitura da dimensão fractal e entropia de Shannon. Elas foram estimada pelo método Box-counting, com auxílio do programa computacional ImageJ do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), amplamente utilizado na literatura e disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Esse programa considera o Box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma DF. Com isso, a DF calculada com o ImageJ ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e, subsequentemente, a análises paramétrica pelo teste t de Student não pareado ou não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney e exato de Fisher para dados categóricos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, ou mediana (percentil 25,75), quando necessário. Valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Utilizou-se o programa de cálculos estatísticos GraphPad InStat e Prism 6.0, ambos para Windows®.

RESULTADOS

O peso médio dos animais foi 277,4 \pm 24,6 (Grupo 1) e 288 \pm 34,5 g (Grupo 2), respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P=0,4396$). Com relação ao volume médio de Ringer Locke coletado de seio coronário ao final de 30 minutos (363,1 \pm 177,3 e 277,4 \pm 33,7 ml, respectivamente), não houve diferença significativa entre os grupos ($P=0,1923$).

Achados durante perfusão com solução cardioplégica e Ringer Locke

Todos os corações apresentaram perfusão adequada de cardioplegia e Ringer Locke, demonstrada pela coloração clara na parede ventricular. A frequência cardíaca média após 5 minutos de perfusão (233 \pm 36 e 188 \pm 53,4 batimentos por

minuto, respectivamente) apresentou diferença significativa ($P=0,0086$). O tempo de início de fibrilação ventricular, (49 \pm 28,2 e 45 \pm 17 segundos, respectivamente) e o tempo de primeiro batimento (153 \pm 78 e 117 \pm 96,8 segundos, respectivamente) não mostraram diferença significativa ($P=0,5869$ e $P=0,187$, respectivamente).

Análise da dimensão fractal e entropia de Shannon

A dimensão fractal com a utilização do marcador caspase foi 1,59 \pm 0,09 (sem unidade) para o grupo 1 e 1,55 \pm 0,13 para o grupo 2, respectivamente ($P=0,4400$), do KI-67 1,53 \pm 0,13 e 1,54 \pm 0,18, respectivamente ($P=0,9595$) e da IL-8 de 1,52 \pm 0,15 e 1,51 \pm 0,12, respectivamente ($P=0,9164$) (Figura 1).

A entropia de Shannon com a caspase foi 0,4 \pm 0,07 bits para o grupo 1 e 0,38 \pm 0,08 bits para o grupo 2 ($P=0,5487$), do KI-67 0,36 \pm 0,1 bits e 0,37 \pm 0,13 bits, respectivamente ($P=0,9149$), e da IL-8 0,35 \pm 0,11 bits e 0,35 \pm 0,08 bits, respectivamente ($P=0,9678$) (Figura 2).

DISCUSSÃO

Apesar de ainda não ser conhecido o efeito da substituição do cetoglutarato por glutamato na solução com histidina e triptofano, o glutamato possui papel bem documentado quando colocado como constituinte de solução cardioplégica. A adição de glutamato no perfusato mantém o ATP intracelular e diminui tanto o lactato quanto o piruvato, que contribuiriam para acidose. O glutamato exógeno e seus produtos de transaminação restauram seus conteúdos normalmente diminuídos no miocárdio hipóxico, aumentam a concentração de succinato, que leva a também aumento da formação de ATP por via anaeróbica na mitocôndria, aumentando assim a resistência do miócito à isquemia^[9].

Outro processo que está intrinsecamente relacionado com lesão isquemia-reperusão é a apoptose^[17,18]. Essas mudanças são feitas por uma família de proteases denominadas caspases^[19]. O grau de ativação das caspases é diretamente relacionado ao grau de apoptose^[20]. Em contraste com a apoptose, a necrose é um processo irreversível de morte celular em que há ruptura da membrana celular, com extravasamento do citosol ao meio extracelular, marginação leucocitária e ativação da cascata inflamatória^[20,21]. Em contraste com a morte celular os corações de mamíferos apresentam pequena capacidade proliferativa após o nascimento. Um dos marcadores utilizados para avaliar proliferação celular é o KI-67^[22]. Com esse marcador, Walsh et al.^[23] mostram que 12-23% dos cardiomiócitos fetais de ratos apresentam atividade proliferativa, passando a 1-8% até o 7º dia e praticamente indetectável a partir do 14º dia. Assim, selecionamos a análise da caspase, IL-8 e KI-67 para avaliação da apoptose, necrose proliferação celular, respectivamente.

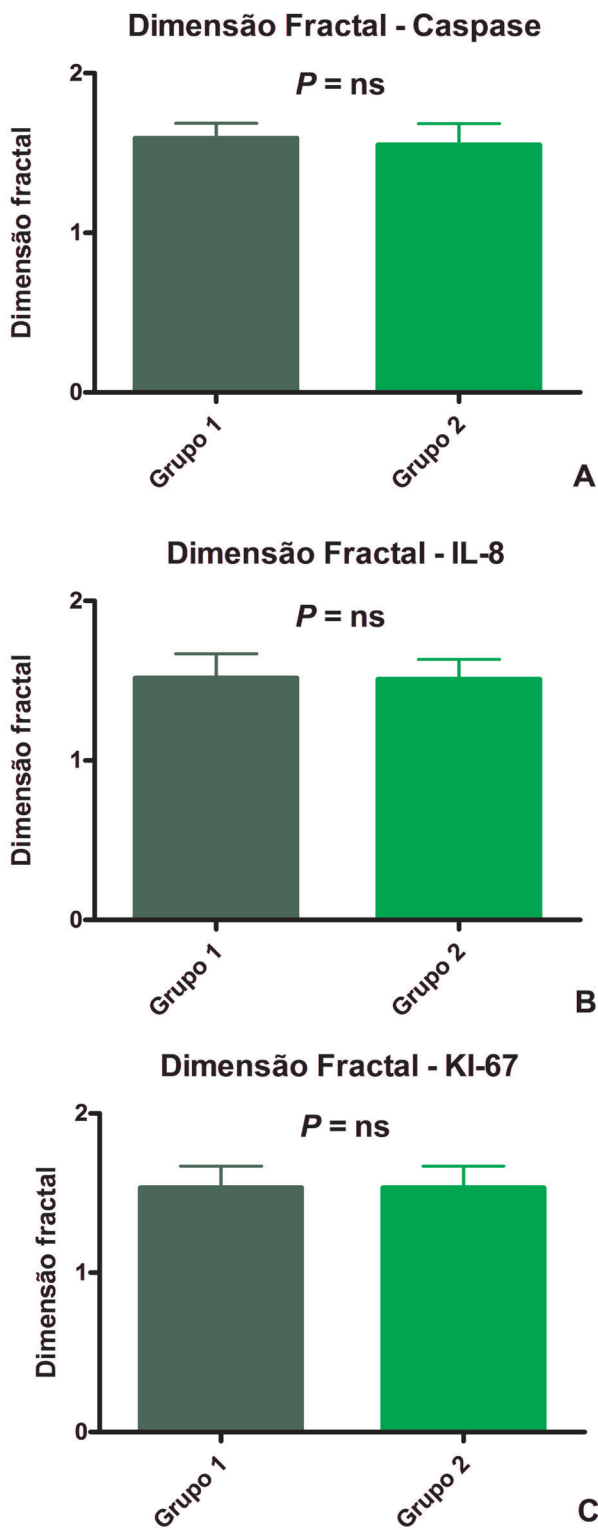


Fig. 1 - Histogramas demonstrando distribuição da dimensão fractal em: (A) caspase, (B) IL-8 e (C) KI-67. Grupo 1: solução com histidina-triptofano-cetogluturato, Grupo 2: solução com histidina-triptofano-glutamato

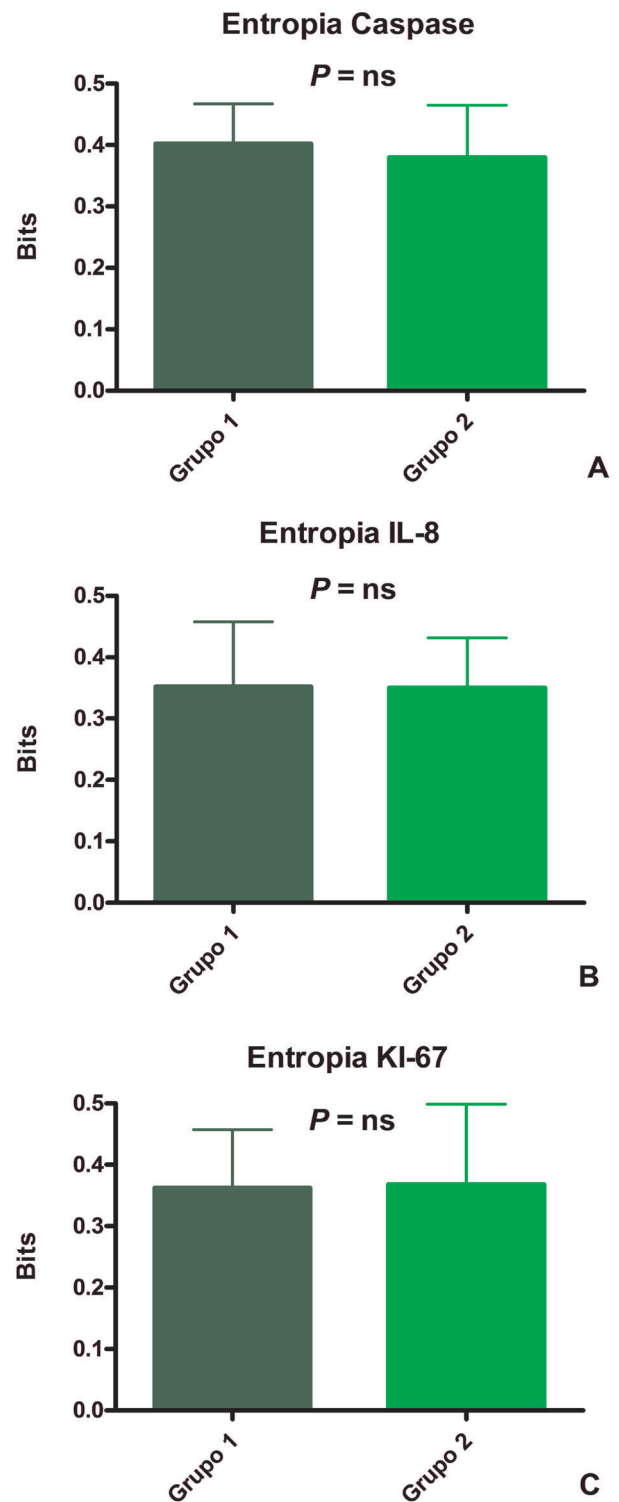


Fig. 2 - Histogramas demonstrando distribuição da entropia em: (A) caspase, (B) IL-8 e (C) KI-67. Grupo 1: solução com histidina-triptofano-cetogluturato, Grupo 2: solução com histidina-triptofano-glutamato

A dimensão fractal é um parâmetro útil para caracterização de estruturas complexas irregulares, mas que quando observadas matematicamente, sua análise denota figuras regulares com característica de autossimilaridade, ou seja, assemelham-se a elas mesmas quando observadas em diferentes escalas de tamanho^[24].

A dimensão fractal do objeto conta o número efetivo de graus de liberdade no sistema dinâmico e, portanto, quantifica a sua complexidade. Assim, infere-se que imagens evidenciando maior dimensão fractal sejam, conseqüentemente, mais complexas. Não se pode, porém, apenas pelo aspecto visual, quantificar essa complexidade. A dimensão fractal viria então sanar essa dificuldade ao adicionar um valor numérico^[12].

O tamanho das caixas para cálculo da dimensão fractal no método Box-counting foi padronizado em 4, 8, 16, 32 e 64 pixels. Sabe-se que o tamanho do pixel depende do grau de resolução utilizado. Como comenta Tambasco et al.^[24], o tamanho da caixa utilizado deve guardar uma certa relação com a estrutura estudada, pois pode ser tão pequeno que, na verdade, esteja avaliando subcomponentes da estrutura ou tão grande que, na verdade, estariam sendo incluídos na medição componentes dos arredores da estrutura de interesse e não a estrutura em si. Esses valores, no entanto, são os valores padrão utilizados na literatura e, portanto, provavelmente não causaram interferência nos resultados^[12].

Em nosso estudo, não houve diferença significativa da dimensão fractal entre os grupos. Dessa maneira, consideramos que a distribuição das informações contidas nas lâminas dos corações tratados com as soluções HTK ou HTG não foram diferentes.

Uma contribuição importante na Teoria da Informação introduzida por CE Shannon em 1948 foi o conceito de Entropia como sendo a quantidade de informação em um sistema^[25]. Vale ressaltar que não se deve confundir “entropia estado” da Termodinâmica com “entropia conceito” da Teoria da Informação^[26].

Segundo Shannon, se X é o conjunto de todas as mensagens de x , e $p(x)$ é a probabilidade (variando de 0 a 1) de uma mensagem x , então a entropia de X será^[26]:

$$H(X) = - \sum_{x \in X} p(x) \log p(x)$$

A entropia de Shannon quantifica o grau de “incerteza” ou grau de “complexidade” de uma informação. Por essa formulação fica fácil entender que, se a probabilidade de ocorrência de um determinado fato é de 100%, ou seja, se $P=1$ (ausência de incerteza), então a entropia contida na mensagem será zero ($\log 1 = \text{zero}$)^[26].

Considerando que uma imagem é o resultado de um processo estocástico, no qual a probabilidade p_i do cálculo da entropia de Shannon corresponderia à probabilidade de um

pixel apresentar uma determinada cor ou intensidade de cinza (variando de 0 a 255). Essa probabilidade de cada intensidade de cinza pode ser obtida facilmente pela construção de um histograma de frequências^[26].

Entropia zero de uma imagem é obtida quando todos os pixels se apresentam com a mesma cor ou mesma intensidade de cinza (probabilidade 100%, ou seja 1; $\log 1=0$). Por outro lado, a máxima entropia ocorreria quando a imagem contivesse a mesma quantidade de pixels para cada uma das intensidades presentes. Assim, demonstramos que a entropia não está relacionada com a disposição espacial da informação. Duas imagens podem possuir igual quantidade de pixels com a mesma intensidade e, portanto a entropia total seria a mesma, porém, distribuídos espacialmente de maneira diferente^[26].

Em nosso estudo, não houve diferença significativa entre a entropia de Shannon entre os grupos. Dessa maneira, consideramos que as informações contidas nas lâminas dos corações tratados com as soluções HTK ou HTG não foram diferentes.

A literatura mostra vários trabalhos em que há diferença estatística entre grupos avaliados com dimensão fractal ou entropia de Shannon, chamando a atenção do leitor do seu caráter imageológico discriminativo, mas não apresenta qualquer relato da relevância quando os resultados encontrados não alcançam significância estatística, como o que ocorreu em nosso trabalho. A interpretação dos resultados deste estudo é que o grupo HTG não alterou a quantidade ou a distribuição da informação imageológica dos corações de rato quando comparados aos tratados com HTK.

A entropia de Shannon e a dimensão fractal quantificam a distribuição e o grau de complexidade da imagem, respectivamente. Assim, essa técnica não é comparável com o Western-Blot ou PCR, já que essas quantificam o valor total das proteínas estudadas e não sua distribuição ou seu grau de complexidade no tecido.

CONCLUSÃO

A quantidade e distribuição das informações avaliadas pela entropia de Shannon e dimensão fractal nas lâminas de coração de rato submetidas à cardioplegia com soluções HTK ou HTG não foram diferentes, o que mostra que a solução de HTG é tão boa quanto a HTK na preservação dos miócitos em modelo de coração isolado de rato.

Papéis & responsabilidades dos autores

MABO	Autor principal
ACB	Confecção dos gráficos
CAS	Confecção dos gráficos
PHHB	Manipulação dos animais
JLLC	Manipulação dos animais
MFG	Coorientador e ajuda na redação final
DMB	Orientador e ajuda na redação final

REFERÊNCIAS

1. Miller BJ, Gibbon JH, Jr., Greco VF, Smith BA, Cohn CH, Allbritten FF, Jr. The production and repair of interatrial septal defects under direct vision with the assistance of an extracorporeal pump-oxygenator circuit. *J Thorac Surg.* 1953;26(6):598-616.
2. Melrose DG, Dreyer B, Bentall HH, Baker JB. Elective cardiac arrest. *Lancet.* 1955;266(6879):21-2.
3. Fallouh HB, Kentish JC, Chambers DJ. Targeting for cardioplegia: arresting agents and their safety. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(2):220-6.
4. Braile DM. Cardioplegia isotérmica anterógrada retrógrada de baixo volume. São José do Rio Preto, 1997. 27p.
5. Lima-Oliveira APM, Azevedo-Oliveira MTV, Taboga SR, Godoy MF, Braile DM. Cardioplegia utilizando baixo volume de agentes cardioplégicos: estudo morfológico em coração isolado de coelhos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2003;18(3):227-34.
6. Bretschneider HJ. Survival time and recuperative time of the heart in normothermia and hypothermia. *Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch.* 1964;30:11-34.
7. Scrascia G, Guida P, Rotunno C, De Palo M, Mastro F, Pignatelli A, et al. Myocardial protection during aortic surgery: comparison between Bretschneider-HTK and cold blood cardioplegia. *Perfusion.* 2011;26(5):427-33.
8. Holper K, Meisner H, Hähnel C, Massoudy P. Technical refinements in myocardial protection: infants-adults. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;46 Suppl 2 292-5; discussion 6-7.
9. Pisarenko OI, Solomatina ES, Ivanov VE, Studneva IM, Kapelko VI, Smirnov VN. On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res Cardiol.* 1985;80(2):126-34.
10. Rebeyka IM, Axford-Gatley RA, Bush BG, del Nido PJ, Mickle DA, Romaschin AD, et al. Calcium paradox in an in vivo model of multidose cardioplegia and moderate hypothermia. Prevention with diltiazem or trace calcium levels. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(3):475-83.
11. Arruda PFF, Gatti M, Facio Jr FN, Arruda JGF, Moreira RD, Murta LO, et al. Quantification of fractal dimension and Shannon's entropy in histological diagnosis of prostate cancer. *BMC Clin Pathol.* 2013;13:6.
12. Moreira RD, Moriel AR, Murta Junior LO, Neves LA, Godoy MF. Fractal dimension in quantifying the degree of myocardial cellular rejection after cardiac transplantation. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011;26(2):155-63.
13. Keipes M, Ries F, Dicato M. Of the British coastline and the interest of fractals in medicine. *Biomed Pharmacother.* 1993;47(9):409-15.
14. Karperien A, Jelinek HF, Leandro JJ, Soares JV, Cesar Jr RM, Luckie A. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. *Clin Ophthalmol.* 2008;2(1):109-22.
15. Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: National Academies Press; 2010. 211p.
16. Lahaye Sle D, Gratas-Delamarche A, Malardé L, Vincent S, Zguira MS, Morel SL, et al. Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β -adrenoceptors in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:72.
17. Xu YJ, Saini HK, Zhang M, Elimban V, Dhalla NS. MAPK activation and apoptotic alterations in hearts subjected to calcium paradox are attenuated by taurine. *Cardiovasc Res.* 2006;72(1):163-74.
18. Fischer UM, Cox Jr CS, Laine GA, Mehlhorn U, Bloch W, Allen SJ. Induction of cardioplegic arrest immediately activates the myocardial apoptosis signal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1630-3.
19. Pirnia F, Schneider E, Betticher DC, Borner MM. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ.* 2002;9(9):905-14.
20. Lee S, Huang CS, Kawamura T, Shigemura N, Stolz DB, Billiar TR, et al. Superior myocardial preservation with HTK solution over Celsior in rat hearts with prolonged cold ischemia. *Surgery.* 2010;148(2):463-73.
21. Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GG, Possati G, et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;25(3):304-11.
22. Lee Y. To proliferate or not to proliferate. *Cardiovasc Res.* 2010;86(3):347-8.
23. Walsh S, Pontén A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo: an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res.* 2010;86(3):365-73.
24. Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron.* 2009;40(4):486-94.
25. Shannon CE. 1948. A Mathematical Theory of Communication [Acesso 2/12/2013]. <http://archive.org/details/bellssystemtechni27amerrich>
26. Arruda PFF. Quantificação da dimensão fractal e entropia de Shannon no diagnóstico histológico do câncer de próstata [Tese de doutorado]. São José do Rio Preto: FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011. 80p.

3. DISCUSSÃO

3. DISCUSSÃO

3.1. Cardioplegia hipercalcêmica versus hipocalcêmica

Apesar da cardioplegia hipercalcêmica bloquear a condução do potencial de ação miocárdico, ela não inativa completamente os canais lentos de sódio, fazendo com que sua concentração intracelular aumente, tornando o potencial transmembrana menos negativo.^(1,10) Quando esse potencial chega de -20 a -30mV, o cálcio entra na célula tanto pelos canais dihidropiridínicos⁽²⁶⁾ como pela bomba antiporte Na⁺/Ca⁺⁺ ativada ao contrário.^(1,10)

A elevação do íon cálcio intracelular provoca contração do miócito, gerando gasto energético e conseqüente acidose intracelular.⁽¹⁾ Esse íon H⁺ sairá da célula em troca da entrada de um íon Na⁺. O sódio elevado produz edema celular e citólise no momento da reperfusão.⁽¹⁾

A cardioplegia hipocalcêmica evita que haja piora da função ventricular esquerda e melhora os níveis de ATP^(27,28), melhora o relaxamento diastólico, reduz consumo de oxigênio^(27,29) e a resistência coronariana quando comparado com concentrações fisiológicas de cálcio.⁽²⁷⁾ Baker *et al.* correlacionam a queda da concentração do cálcio com concomitante queda nos valores da creatinofosfoquinase (CPK) e melhora da recuperação do fluxo aórtico, com valor máximo quando a concentração de cálcio na cardioplegia atinge 0,3mmol/L.⁽³⁰⁻³²⁾

Talvez a solução hipocalcêmica mais difundida atualmente seja a solução de HTK. Ela reduz a queda do ATP intracelular em um fator de 7-8 em

comparação com isquemia pura; leva a uma boa recuperação miocárdica com base nos critérios metabólico, morfológico e funcional depois do estresse isquêmico de 300 minutos a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, especialmente após adição de quinina; seu fator de proteção é reduzido quando adicionado 50 mmol/L de cálcio; causa paradoxo do cálcio quando infundido por 30 minutos a 35°C (isso não ocorre se infundido por 60 minutos a 25°C ou por 120 minutos a 15°C ou adicionando 50 mmol/L de cálcio à solução e injetando por 35 minutos a 35°C ; melhora consideravelmente a contração miocárdica mesmo após cardioplegia intermitente se 50 mmol/L de cálcio é adicionado ou magnésio é reduzido de 9 para 4 mmol/L.⁽³³⁾

Entretanto, o uso de soluções desprovidas de cálcio apresenta diversos problemas como diminuição do volume de ejeção do ventrículo esquerdo, aumento da CPK,⁽³⁴⁾ redução na recuperação do fluxo aórtico,⁽³⁵⁾ pior recuperação da função cardíaca⁽³⁶⁾ e desencadeamento da apoptose.

Foi do estudo mais aprofundado sobre mecanismo da parada cardíaca sem cálcio o mérito para esclarecer o efeito inicial benéfico no uso de soluções com concentrações decrescentes de cálcio até um valor nadir, além do qual o comportamento da recuperação cardíaca assumia caminho paradoxal com piora do mesmo, sendo acompanhado por elevação do consumo de oxigênio, da CPK e apoptose. A esse efeito bimodal foi dado o nome de paradoxo do cálcio.⁽³⁷⁾

3.2. Paradoxo do cálcio

Na década de 1960 Zimmerman *et al.* descreveram artefato obtido após administração de solução sem cálcio em coração isolado de ratos.^(38,39) Esse artefato foi relevante na compreensão do chamado paradoxo do cálcio. O experimento consistiu na substituição da solução de Krebs-Henseleit por solução sem cálcio para perfusão em coração isolado de ratos. Na reperfusão, utilizando solução com cálcio, houve lise maciça de miócitos, com perda de constituintes intracelulares.⁽³⁸⁾

Diversas hipóteses foram formuladas para explicar o paradoxo do cálcio como aumento da permeabilidade do cálcio no sarcolema,⁽⁴⁰⁾ no glicocálix⁽⁴¹⁾ e separação dos discos intercalares,^(42,43) porém nenhuma isoladamente esclareceu todo o mecanismo do paradoxo do cálcio.

A partir de 10 minutos miócitos de ratos submetidos a um meio isento de cálcio apresentam separação intercelular entre as regiões de *macula adherens* e *fascia adherens*, sendo que o *nexus* ainda se mantém intacto.^(40,43,44) Há também destacamento do glicocálix, sem contudo alterar a permeabilidade da membrana ao cálcio,⁽⁴⁵⁾ mas contribui para o aumento da concentração do íon sódio.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾

Os miócitos permanecem unidos somente na região do *nexus*.^(40,43,44) No momento da reintrodução dessas células em meio com concentração fisiológica de cálcio, há entrada rápida desse íon via bomba antiporte Na⁺/Ca⁺⁺ funcionando ao contrário.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ Os sarcômeros de cada célula condensam em uma única banda de contração, os quais ficam conectados a *fascia adherens*.⁽⁴⁹⁾

Então, no momento descrito acima, a membrana celular do miócito estará submetida a duas forças de sentidos opostos: uma por estar conectada às outras células adjacentes somente na região do *nexus* e outra pela contração dos sarcômeros, arrastando a *fascia adherens* para junto de si. A membrana celular se fragmenta por não suportar essas duas forças e provoca a lise celular.⁽⁴⁹⁾

A adição de pequenas concentrações de cálcio,⁽⁵⁰⁾ bloqueadores de canal de cálcio,⁽⁵¹⁾ hiponatremia⁽⁵²⁾ ou hipotermia,⁽⁵³⁻⁵⁹⁾ são importantes para evitar que haja lesão celular no momento da reperfusão com soluções com concentração fisiológica de cálcio.

Tanto na solução de HTK quanto na solução HTG encontramos hipocalcemia, hiponatremia e a solução é infundida a 4°C, garantindo sua segurança para o músculo miocárdico.

3.3. Comparação das soluções HTG e HTK

Isquemia miocárdica causa diversos efeitos cardíacos tais como: diminui força de contração; aumenta pressão diastólica, indicando contratura das miofibrilas em condições isovolumétricas; provoca queda na fosfocreatina e ATP; diminui a contratura, glutamato e aspartato; aumenta lactato, piruvato, alanina e succinato.⁽¹⁸⁾ Segundo Pisarenko *et al.*, a adição de glutamato no perfusato mantém o ATP intracelular e diminui tanto o lactato quanto o piruvato, que contribuiriam para acidose. Esses efeitos contribuem para melhorar a função cardíaca na recuperação após isquemia.⁽¹⁸⁾ Nossos resultados

demonstram comportamento semelhante nas duas soluções estudadas referente ao tempo de fibrilação ventricular e tempo de primeiro batimento, entretanto foi melhor para grupo 2 para frequência cardíaca, que encontrava-se mais baixa, o que pode ser correlacionado provavelmente com menor acidose do miócito (não dosado no presente estudo).

Outro processo que está intrinsecamente relacionado com lesão isquemia-reperfusão é a apoptose,^(60,61) caracterizada por alterações morfológicas como condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de “corpos apoptóticos”. Essas mudanças são feitas por uma família de proteases denominadas caspases.⁽⁶²⁾ O grau de ativação das caspases é diretamente relacionado ao grau de apoptose, que desempenha fator crítico na recuperação da função cardíaca.⁽⁶³⁾ Nossos resultados mostram atividade de caspase menor no grupo 2, sugerindo um potencial protetor para função miocárdica.

Em contraste com a apoptose, a necrose é um processo irreversível de morte celular em consequência à quebra na homeostase celular. Há ruptura da membrana celular, com extravasamento do citosol ao meio extracelular, marginação leucocitária e ativação da cascata inflamatória.^(63,64) Anselmi *et al.* descreveram pico da IL-8 em 35 minutos de reperfusão e da IL-6 em 75 minutos.⁽⁶⁴⁾ Lee *et al.* afirmaram que a solução de HTK inibe aumento das interleucinas.⁽⁶³⁾ Assim, como nesta pesquisa não houve diferença significativa da IL-8 entre os grupos 1 e 2, podemos inferir que a proteção anti-inflamatória dada pela solução HTG não foi diferente daquela dada pela solução HTK.

Corações de mamíferos apresentam pequena capacidade proliferativa após o nascimento. Um dos marcadores utilizados para avaliar proliferação celular é o KI-67.⁽⁶⁵⁾ Com esse marcador, Walsh *et al.* mostraram que 12-23% dos cardiomiócitos fetais de ratos apresentam atividade proliferativa, passando a 1-8% até o 7º dia e praticamente indetectável a partir do 14º dia.⁽⁶⁶⁾ Em nosso estudo, houve aumento significativo do KI-67 no grupo 2, mostrando atividade proliferativa precoce da solução HTG garantida já com 2 horas de isquemia. Associado a isso, Walsh *et al.* também chamam a atenção da atividade do KI-67 também ser inversamente proporcional à apoptose,⁽⁶⁶⁾ o que também é confirmado nesta pesquisa, na qual a caspase é menor no grupo 2 que no 1. Entretanto, o aumento da atividade desse marcador é preocupante, pois já foi associado a mixomas^(67,68) e sarcomas cardíacos.⁽⁶⁹⁾

Apesar dos resultados aqui obtidos serem concordantes com os da literatura, ainda não são definitivos em relação à substituição do alfacetoglutarato pelo glutamato. Análises quantitativas com ATP e outros marcadores nucleares para proliferação celular devem ser utilizados visando conclusão mais abrangente e segura. Outro aspecto relevante é a concentração do glutamato. Teria o mesmo efeito protetor no coração se alterarmos sua concentração? Novos estudos ainda são necessários para responder essas questões.

3.4. Análise dos dados histológicos pela dimensão fractal e entropia de Shannon

A dimensão fractal é um parâmetro útil para caracterização de estruturas complexas irregulares, mas que quando observadas matematicamente, sua análise denota figuras regulares com característica de autossimilaridade, ou seja, assemelham-se a elas mesmas quando observadas em diferentes escalas de tamanho.⁽⁷⁰⁾

A dimensão fractal do objeto conta o número efetivo de graus de liberdade no sistema dinâmico e, portanto, quantifica a sua complexidade. Assim, infere-se que imagens evidenciando maior dimensão fractal sejam, conseqüentemente, mais complexas. Não se pode, porém, apenas pelo aspecto visual, quantificar essa complexidade. A dimensão fractal viria então sanar essa dificuldade ao adicionar um valor numérico.⁽⁷¹⁾

O tamanho das caixas para cálculo da dimensão fractal no método *Box-counting* foi padronizado em 4, 8, 16, 32 e 64 pixels. Sabe-se que o tamanho do pixel depende do grau de resolução utilizado. Como comenta Tambasco *et al.*⁽⁷⁰⁾, o tamanho da caixa utilizado deve guardar uma certa relação com a estrutura estudada, pois pode ser tão pequeno que, na verdade, esteja avaliando subcomponentes da estrutura ou tão grande que, na verdade, estariam sendo incluídos na medição componentes dos arredores da estrutura de interesse e não a estrutura em si. Esses valores, no entanto, são os valores padrão utilizados na literatura e, portanto, provavelmente não causaram interferência nos resultados.⁽⁷¹⁾

Em nosso estudo, não houve diferença significativa da dimensão fractal

entre os grupos. Dessa maneira, consideramos que a distribuição das informações contidas nas lâminas dos corações tratados com as soluções HTK ou HTG não foram diferentes.

Uma contribuição importante na Teoria da Informação introduzida por CE Shannon em 1948 foi o conceito de Entropia como sendo a quantidade de informação em um sistema.⁽⁷²⁾ Vale ressaltar que não se deve confundir “entropia estado” da Termodinâmica com “entropia conceito” da Teoria da Informação.⁽⁷³⁾

Segundo Shannon, se X é o conjunto de todas as mensagens de x , e $p(x)$ é a probabilidade (variando de 0 a 1) de uma mensagem x , então a entropia de X será:⁽⁷³⁾

$$H(X) = - \sum_{x \in X} p(x) \log p(x)$$

A entropia de Shannon quantifica o grau de “incerteza” ou grau de “complexidade” de uma informação. Por essa formulação fica fácil entender que, se a probabilidade de ocorrência de um determinado fato é de 100%, ou seja, se $p = 1$ (ausência de incerteza), então a entropia contida na mensagem será zero ($\log 1 = \text{zero}$).⁽⁷³⁾

Observa-se, por exemplo, que entropia de 0,447 é menor que 0,477 e a interpretação é que este segundo conjunto tem maior complexidade que o primeiro. Um outro fato conhecido é que se dois sistemas tiverem, cada um deles, distribuições equitativas de probabilidades, o que tiver maior número de elementos terá também a maior entropia, ou seja, será mais complexo.⁽⁷³⁾

Considerando que uma imagem é o resultado de um processo estocástico, no qual a probabilidade p_i do cálculo da entropia de Shannon corresponderia à probabilidade de um pixel apresentar uma determinada cor ou intensidade de cinza (variando de 0 a 255). Essa probabilidade de cada intensidade de cinza pode ser obtida facilmente pela construção de um histograma de frequências.⁽⁷³⁾

Entropia zero de uma imagem é obtida quando todos os pixels se apresentam com a mesma cor ou mesma intensidade de cinza (probabilidade 100% ou seja $1; \log 1 = 0$). Por outro lado, a máxima entropia ocorreria quando a imagem contivesse a mesma quantidade de pixels para cada uma das intensidades presentes. Assim, demonstramos que a entropia não está relacionada com a disposição espacial da informação. Duas imagens podem possuir igual quantidade de pixels com a mesma intensidade e, portanto a entropia total seria a mesma, porém, distribuídos espacialmente de maneira diferente.⁽⁷³⁾

Em nosso estudo, não houve diferença significativa entre a entropia de Shannon entre os grupos. Dessa maneira, consideramos que as informações contidas nas lâminas dos corações tratados com as soluções HTK ou HTG não foram diferentes, lembrando que o método não se preocupa com a distribuição espacial das mesmas.

A literatura mostra vários trabalhos em que há diferença estatística entre grupos avaliados com dimensão fractal ou entropia de Shannon, chamando a atenção do leitor do seu caráter imageológico discriminativo, mas não

apresenta qualquer relato da relevância quando os resultados encontrados não alcançam significância estatística, como o que ocorreu em nosso trabalho. A interpretação dos resultados deste estudo é que o grupo HTG não alterou a quantidade ou a distribuição da informação imageológica dos corações de rato quando comparados aos tratados com HTK.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Nenhum trabalho científico responde somente as perguntas feitas no início do mesmo. Ele gera novas dúvidas, novos pensamentos, novas hipóteses, que serão investigadas em um novo ensaio. O presente trabalho não foi diferente. Ainda não sabemos se o KI-67 é protetor ou desencadeia neoplasia e o papel da concentração do glutamato na proteção miocárdica. Serão motivo de novos trabalhos na sequência.

As análises imuno-histoquímicas da substituição do alfacetoglutarato pelo glutamato na cardioplegia com histidina e triptofano mostraram que as células musculares cardíacas não apresentaram maior ocorrência de necrose, visto pela mensuração da IL-8, apresentaram menor ocorrência de apoptose, visto pela caspase encontrar-se mais baixa que no grupo 1 e melhor atividade proliferativa, com valores maiores da KI-67 em relação ao grupo 1.

No que concerne à avaliação pela entropia de Shannon, não houve diferença na quantidade de informação, tanto no grupo 1 quanto no 2. O mesmo ocorreu com a dimensão fractal, que demonstrou que a distribuição das informações nas lâminas de coração de rato submetidas a cardioplegia com HTK ou HTG não foram diferentes, o que mostra que a solução de HTG é melhor que a HTK na preservação dos miócitos em modelo de coração isolado de rato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fallouh HB, Kentish JC, Chambers DJ. Targeting for cardioplegia: arresting agents and their safety. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 220-6.
2. Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954; 37: 171-85; passim.
3. Buckberg GD. Update on current techniques of myocardial protection. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 805-14.
4. Buckberg GD. Myocardial protection: an overview. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 5: 98-106.
5. Melrose D, Dreyer B, Bentall H, Baker J. Elective cardiac arrest. *Lancet* 1955; 266: 21-3.
6. Braile DM. *Cardioplegia isotérmica anterógrada retrógrada de baixo volume*. 2ª ed. São José do Rio Preto; 1997.
7. Lima-Oliveira APM, Azevedo-Oliveira MTV, Taboga SR, Godoy MF, Braile DM. Cardioplegia using low volumic cardioplegic agents: morphological study in isolated rabbit hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2003; 18: 227-34.
8. Bretschneider HJ. Survival time and recuperative time of the heart in normotermia and hypotermia. *Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch* 1964; 30: 11-34.
9. Shiroishi MS. Myocardial protection: the rebirth of potassium-based cardioplegia. *Tex Heart Inst J* 1999; 26: 71-86.

10. Chambers DJ, Hearse DJ. Developments in cardioprotection: "polarized" arrest as an alternative to "depolarized" arrest. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1960-6.
11. Oliveira M, Godoy M, Braile D, Lima-Oliveira A. Solução cardioplégica polarizante: estado da arte. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 2005; 20: 69-74.
12. Chambers DJ. Mechanisms and alternative methods of achieving cardiac arrest. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S661-6.
13. Snabaitis AK, Shattock MJ, Chambers DJ. Long-term myocardial preservation: effects of hyperkalemia, sodium channel, and Na/K/2Cl cotransport inhibition on extracellular potassium accumulation during hypothermic storage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118: 123-34.
14. Scrascia G, Guida P, Rotunno C, De Palo M, Mastro F, Pignatelli A, et al. Myocardial protection during aortic surgery: comparison between Bretschneider-HTK and cold blood cardioplegia. *Perfusion* 2011; 26: 427-33.
15. Holper K, Meisner H, Hahnel C, Massoudy P. Technical refinements in myocardial protection: infants--adults. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 46 Suppl 2 292-5; discussion 6-7
16. Antunovic M, Aleksic D. Preparation and testing of solutions for organ perfusion and preservation in transplantation. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65: 596-600.
17. Hachida M, Ookado A, Nonoyama M, Koyanagi H. Effect of HTK solution for myocardial preservation. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1996; 37 269-74

18. Pisarenko OI, Solomatina ES, Ivanov VE, Studneva IM, Kapelko VI, Smirnov VN. On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res Cardiol* 1985; 80: 126-34
19. Jin Z, Wu T, Bi S, Zhou H, Cui Q, Zhou J, et al. Myocardial protective effect of urethane on isolated rat hearts in prolonged hypothermic preservation. *Heart Surg Forum* 2009; 12: E316-9
20. Loganathan S, Radovits T, Hirschberg K, Korkmaz S, Koch A, Karck M, et al. Effects of Custodiol-N, a novel organ preservation solution, on ischemia/reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139: 1048-56.
21. Schroder C, Heintz A, Pexa A, Rauen U, Deussen A. Preclinical evaluation of coronary vascular function after cardioplegia with HTK and different antioxidant additives. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 31: 821-6.
22. Saad S, Minor T. Short-term resuscitation of predamaged donor livers by brief machine perfusion: the influence of temperature. *Transplant Proc* 2008; 40: 3321-6.
23. Poffo R, Pope RB, Toschi AP. Minimally invasive video-assisted atrial septal defect correction and myocardial revascularization. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009; 24: 586-9
24. Poffo R, Pope RB, Selbach RA, Mokross CA, Fukuti F, Silva Junior I, et al. Video-assisted cardiac surgery: results from a pioneer project in Brazil. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009; 24: 318-26

25. Croti UA, Braile DM, Moscardini AC, Kozak AC. Heart transplantation in child with non-compacted myocardium. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010; 25: 261-3.
26. Chen RH. The scientific basis for hypocalcemic cardioplegia and reperfusion in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 910-4.
27. Aoki M, Nomura F, Kawata H, Mayer JE, Jr. Effect of calcium and preischemic hypothermia on recovery of myocardial function after cardioplegic ischemia in neonatal lambs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 207-12; discussion 12-3.
28. Bolling K, Kronon M, Allen BS, Ramon S, Wang T, Hartz RS, et al. Myocardial protection in normal and hypoxically stressed neonatal hearts: the superiority of hypocalcemic versus normocalcemic blood cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112: 1193-200; discussion 200-1.
29. Burkhoff D, Kalil-Filho R, Gerstenblith G. Oxygen consumption is less in rat hearts arrested by low calcium than by high potassium at fixed flow. *Am J Physiol* 1990; 259: H1142-7.
30. Baker EJt, Olinger GN, Baker JE. Calcium content of St. Thomas' II cardioplegic solution damages ischemic immature myocardium. *Ann Thorac Surg* 1991; 52: 993-9.
31. Robinson LA. Calcium in neonatal cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1991; 51: 1043-4.
32. Kober IM, Obermayr RP, Ehsani N, Schneider B, Spieckermann PG. HTK versus UW solution for myocardial protection during moderate hypothermia. *Eur Surg Res* 1997; 29 264-72

33. Gebhard MM, Bretschneider HJ, Gersing E, Preusse CJ, Schnabel PA, Ulbricht LJ. Calcium-free cardioplegia--pro. *Eur Heart J* 1983; 4 Suppl H: 151-60.
34. Hendriks FF, Jonas J, van der Laarse A, Huysmans HA, van Rijk-Zwikker GL, Schipperheyn JJ. Cold ischemic arrest: comparison of calcium-free and calcium-containing solutions. *Ann Thorac Surg* 1985; 39: 312-7.
35. Nakamura Y, Kuroda H, Takemoto N, Ohgi S, Mori T. Risk of low calcium and high magnesium in continuous warm hyperkalemic cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1295-301.
36. Pearl JM, Laks H, Drinkwater DC, Meneshian A, Sun B, Gates RN, et al. Normocalcemic blood or crystalloid cardioplegia provides better neonatal myocardial protection than does low-calcium cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 201-6.
37. Piper HM. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res* 2000; 45 123-7
38. Zimmerman AN, Hulsmann WC. Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 1966; 211: 646-7.
39. Zimmerman ANE, Daems W, Hülsmann WC, Snijder J, Wisse E, Durrer D. Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc Res* 1967; 1: 201-9.

40. Ashraf M. Correlative studies on sarcolemmal ultrastructure, permeability, and loss of intracellular enzymes in the isolated heart perfused with calcium-free medium. *Am J Pathol* 1979; 97: 411-32.
41. Frank JS, Rich TL, Beydler S, Kreman M. Calcium depletion in rabbit myocardium. Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox. *Circ Res* 1982; 51: 117-30.
42. Vander Heide RS, Ganote CE. Caffeine-induced myocardial injury in calcium-free perfused rat hearts. *Am J Pathol* 1985; 118: 55-65.
43. Muir AR. The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J Anat* 1967; 101: 239-61.
44. Yates JC, Dhalla NS. Structural and functional changes associated with failure and recovery of hearts after perfusion with Ca²⁺-free medium. *J Mol Cell Cardiol* 1975; 7: 91-103.
45. Ganote CE, Nayler WG. Contracture and the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 733-45.
46. Altschuld R, Gibb L, Ansel A, Hohl C, Kruger FA, Brierley GP. Calcium tolerance of isolated rat heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 1980; 12: 1383-95.
47. Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. The isolation of Ca²⁺-resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol* 1980; 12: 715-23.
48. Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. Mechanism of Ca²⁺ resistance in adult heart cells isolated with trypsin plus Ca²⁺. *J Mol Cell Cardiol* 1982; 14: 523-30.

49. Hunter DR, Haworth RA, Berkoff HA. Cellular calcium turnover in the perfused rat heart: modulation by caffeine and procaine. *Circ Res* 1982; 51: 363-70.
50. Rebeyka IM, Axford-Gatley RA, Bush BG, del Nido PJ, Mickle DA, Romaschin AD, et al. Calcium paradox in an in vivo model of multidose cardioplegia and moderate hypothermia. Prevention with diltiazem or trace calcium levels. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99 475-83
51. Baker JE, Hearse DJ. Slow calcium channel blockers and the calcium paradox: comparative studies in the rat with seven drugs. *J Mol Cell Cardiol* 1983; 15: 475-85.
52. Dhalla NS, Alto LE, Singal PK. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchange in the development of cardiac abnormalities due to calcium paradox. *Eur Heart J* 1983; 4 Suppl H: 51-6.
53. Baker JE, Bullock GR, Hearse DJ. The temperature dependence of the calcium paradox: enzymatic, functional and morphological correlates of cellular injury. *J Mol Cell Cardiol* 1983; 15: 393-411.
54. Holland CE, Jr., Olson RE. Prevention by hypothermia of paradoxical calcium necrosis in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1975; 7: 917-28.
55. Rich TL, Langer GA. Calcium depletion in rabbit myocardium. Calcium paradox protection by hypothermia and cation substitution. *Circ Res* 1982; 51: 131-41.
56. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 1968; 195: 451-70.

57. Boink AB, Ruigrok TJ, de Moes D, Maas AH, Zimmerman AN. The effect of hypothermia on the occurrence of the calcium paradox. *Pflugers Arch* 1980; 385: 105-9.
58. Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 1978; 10: 641-68.
59. Bulkley BH, Nunnally RL, Hollis DP. "Calcium paradox" and the effect of varied temperature on its development: a phosphorus nuclear magnetic resonance and morphologic study. *Lab Invest* 1978; 39: 133-40.
60. Xu YJ, Saini HK, Zhang M, Elimban V, Dhalla NS. MAPK activation and apoptotic alterations in hearts subjected to calcium paradox are attenuated by taurine. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 163-74.
61. Fischer UM, Cox CS, Jr., Laine GA, Mehlhorn U, Bloch W, Allen SJ. Induction of cardioplegic arrest immediately activates the myocardial apoptosis signal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1630-3.
62. Pirnia F, Schneider E, Betticher DC, Borner MM. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ* 2002; 9: 905-14.
63. Lee S, Huang CS, Kawamura T, Shigemura N, Stolz DB, Billiar TR, et al. Superior myocardial preservation with HTK solution over Celsior in rat hearts with prolonged cold ischemia. *Surgery* 2010; 148 463-73
64. Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GG, Possati G, et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis

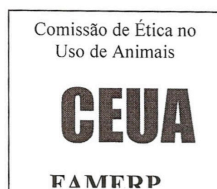
- during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 304-11.
65. Lee Y. To proliferate or not to proliferate. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 347-8.
 66. Walsh S, Ponten A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 365-73.
 67. Kusumi T, Minakawa M, Fukui K, Saito S, Ohashi M, Sato F, et al. Cardiac tumor comprising two components including typical myxoma and atypical hypercellularity suggesting a malignant change. *Cardiovasc Pathol* 2009; 18: 369-74.
 68. Suvarna SK, Royds JA. The nature of the cardiac myxoma. *Int J Cardiol* 1996; 57: 211-6.
 69. Brunner-La Rocca HP, Vogt PR, Burke AP, Schneider J, Jenni R, Turina MI. A primary cardiac sarcoma with unusual histology and clinical course. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1675-7.
 70. Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron* 2009; 40: 486-94.
 71. Moreira RD, Moriel AR, Murta Junior LO, Neves LA, Godoy MF. Fractal dimension in quantifying the degree of myocardial cellular rejection after cardiac transplantation. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2011; 26: 155-63.
 72. Shannon CE. *A Mathematical Theory of Communication*. 1948; <http://archive.org/details/bellsystemtechni27amerrich>

73. Arruda PFFd. Quantificação da dimensão fractal e entropia de Shannon no diagnóstico histológico do câncer de próstata [Doutorado]. São José do Rio Preto: Univ.; 2011.

6. ANEXOS

6. ANEXOS

1. Comitê de ética



Faculdade de Medicina de São José do Rio

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/ SP

DELIBERAÇÃO CEUA Nº 015/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEUA/FAMERP, em reunião desta data, analisou o projeto intitulado “**Avaliação da substituição do alfacetoglutarato pelo ácido glutâmico na solução HTK utilizada como agente cardioplégico em modelo de coração isolado**” (Protocolo FAMERP nº 001-007167/2012), sob responsabilidade do Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi **aprovado** por essa Comissão.

Atenção: **Até 30 dias após a finalização do projeto**, o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final disponível no site e enviar ao CEUA. O descumprimento desta obrigação poderá prejudicar o andamento de futuras solicitações.

São José do Rio Preto, 21 de Dezembro de 2012.

Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari

Presidente da CEUA

FAMERP

2. Desenvolvimento de software de estilo da FAMERP

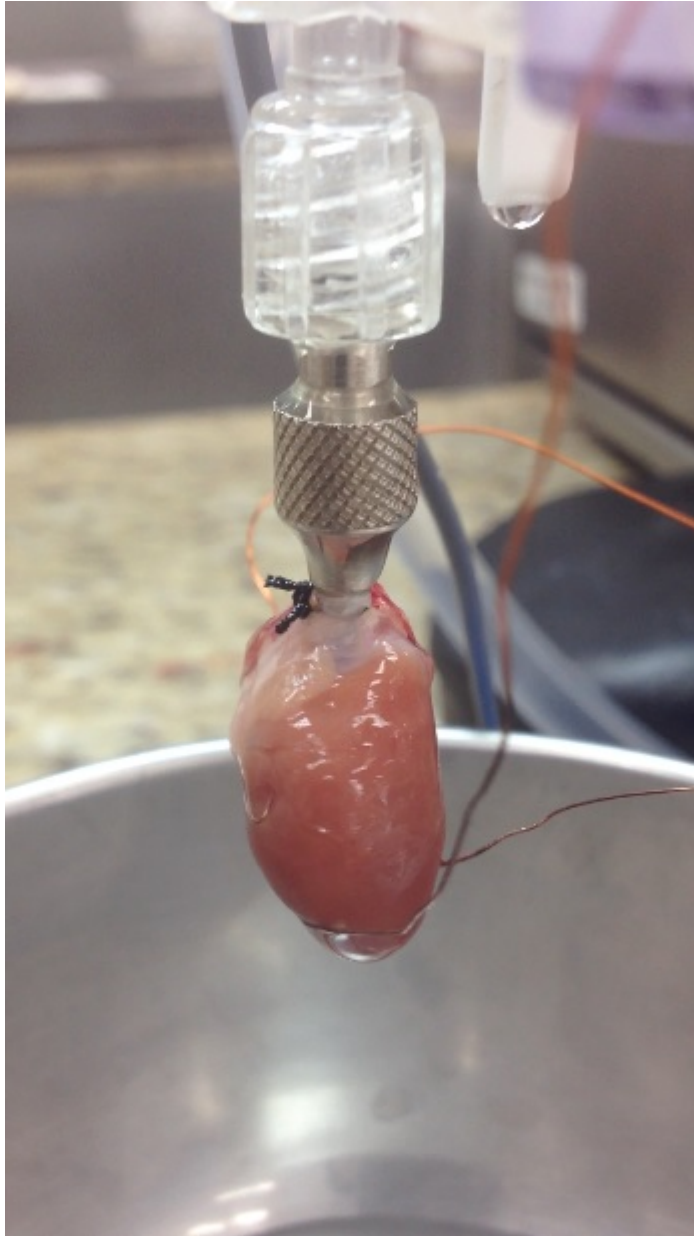
<http://endnote.com/downloads/style/famerp-postgraduate-style-faculdade-de-medicina-de-sao-jose-do-rio-preto-brazil>

3. Desenvolvimento de software de estilo da Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular

<http://endnote.com/downloads/style/rbccv-brazilian-journal-cardiovascular-surgery-revista-brasileira-de-cirurgia>

4. Foto do Sistema de Langendorf utilizado

5. Coração de rato com artéria aorta ascendente canulada em sistema de Langendorff



6. A Fórmula de Nernst e o potencial de repouso transmembrana:

O potencial de repouso transmembrana da célula muscular cardíaca é determinado predominantemente pelas concentrações intra e extracelular do íon potássio. A correlação entre as concentrações obedece a equação de Nernst:^(1,2)

$$E_k = \frac{F \cdot T}{F} \cdot \ln\left(\frac{K_e^+}{K_i^+}\right), \text{ onde:}$$

E_k = Potencial de ação transmembrana;

R = constante dos gases;

T = temperatura absoluta;

F = constante de Faraday;

Ln = logaritmo neperiano;

K_e^+ = concentração extracelular de potássio;

K_i^+ = concentração intracelular de potássio

Substituindo os valores na fórmula, temos:

$$E_k = 26,6 \cdot \ln\left(\frac{4,0}{150,0}\right) \Rightarrow E_k = -96,6 \text{ mV}$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adrian R. The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. J Physiol 1956; 133: 631-58.
2. Braile DM. Cardioplegia isotérmica anterógrada retrógrada de baixo volume. 2ª ed. São José do Rio Preto; 1997.