



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

HELISON RAFAEL PEREIRA DO CARMO

**A AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO MIOCÁRDICA UTILIZANDO SOLUÇÃO  
CARDIOPLÉGICA SANGUÍNEA VERSUS SOLUÇÃO CARDIOPLÉGICA  
CRISTALOIDE: *ESTUDO EM MODELO EXPERIMENTAL DE CORAÇÃO ISOLADO***

CAMPINAS

2018

HELISON RAFAEL PEREIRA DO CARMO

**A AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO MIOCÁRDICA UTILIZANDO SOLUÇÃO  
CARDIOPLÉGICA SANGUÍNEA VERSUS SOLUÇÃO CARDIOPLÉGICA  
CRISTALOIDE: *ESTUDO EM MODELO EXPERIMENTAL DE CORAÇÃO ISOLADO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADOR: PROF. DR. ORLANDO PETRUCCI JÚNIOR

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO HELISON RAFAEL PEREIRA DO CARMO E ORIENTADA PELO PROF. DR.  
ORLANDO PETRUCCI JUNIOR.

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2012/09130-1; CAPES, 02-P-4569/2018

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C213a Carmo, Helison Rafael Pereira do, 1986-  
A avaliação da proteção miocárdica utilizando solução cardioplégica sanguínea versus solução cardioplégica cristalóide : estudo em modelo experimental de coração isolado / Helison Rafael Pereira do Carmo. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Orlando Petrucci Junior.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Soluções cardioplégicas. 2. Parada cardíaca. 3. Isquemia. 4. Reperusão miocárdica. I. Petrucci Junior, Orlando, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** The evaluation of myocardial protection using blood cardioplegic solution versus crystalloid cardioplegic solution : study in an isolated heart model

**Palavras-chave em inglês:**

Cardioplegic solution

Cardiac arrest

Ischemia

Myocardial reperfusion

**Área de concentração:** Fisiopatologia Cirúrgica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Orlando Petrucci Junior [Orientador]

Otávio Rizzi Coelho Filho

Elaine Soraya Barbosa de Oliveira

Leonardo Antonio Mamede Zornoff

João Carlos Ferreira Leal

**Data de defesa:** 27-02-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Cirurgia

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**HELISON RAFAEL PEREIRA DO CARMO**

ORIENTADOR: ORLANDO PETRUCCI JÚNIOR

**MEMBROS:**

1. PROF. DR. ORLANDO PETRUCCI JÚNIOR
2. PROF. DR. OTÁVIO RIZZI COELHO FILHO
3. PROFA. DRA. ELAINE SORAYA BARBOSA DE OLIVEIRA
4. PROF. DR. LEONARDO ANTONIO MAMEDE ZORNOFF
5. PROF. DR. JOÃO CARLOS FERREIRA LEAL

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: DATA DA DEFESA 27/02/2018**

## **DEDICATÓRIA**

A Deus em primeiro lugar que proveu a mim saúde e capacidade para a concretização deste trabalho. A toda minha família com carinho especial aos meus pais Marcio & Ivone e meus irmãos Marcio Jr. & Hadneison. Ao meu mentor Prof. Orlando Petrucci Júnior.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior, meu orientador, responsável por todo ensinamento teórico e técnico dos quais foram preponderantes na formação do meu caráter ético e profissional.

Ao Sr. Willian Adalberto Silva biólogo do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental pela solicitude e ensinamentos.

A Srta. Ana Cristina Moraes bióloga do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental pela dedicação e suporte técnico nos experimentos.

A Srta. Cristina Tanikawa aos ensinamentos de bancada e conduta em práticas laboratoriais.

A Profa. Dra. Daniela Diógenes de Carvalho pelo respaldo técnico empregado nas análises.

Ao Prof. Dr. Karlos Alexandre de Souza Vilarinho pelos ensinamentos sempre que requisitado.

Aos amigos de trabalho: Anali Galluce Torina, Karla Reichert e Fany da Silva Lima pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Miguel Luiz Cândido e Waldemiro Benedito Costa funcionários Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental.

Aos membros da equipe de Cirurgia Cardíaca do Hospital de Clínicas - UNICAMP: Prof. Dr. Pedro Paulo Martins de Oliveira, Prof. Dr. Lindemberg da Mota Silveira Filho, Profa. Dra. Elaine Soraya Barbosa de Oliveira Severino.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O efeito deletério provocado pela isquemia e reperfusão do miocárdio durante a parada cardíaca apresenta-se como uma das principais causas da síndrome de baixo débito cardíaco no período pós-operatório. Neste sentido, a utilização de solução cardioplégica na indução da parada cardíaca eletiva tem sido o método mais utilizado e difundido de proteção do miocárdio. No entanto, a padronização do método ou tipo ideal de solução cardioplégica ainda é controverso devido à escassez de estudos com o delineamento claro das vantagens e desvantagens na comparação entre as soluções utilizadas nos serviços de cirurgia.

**OBJETIVOS:** A avaliação da recuperação contrátil dos corações com a administração em dose única das soluções cardioplégicas del Nido (sanguínea) versus Custodiol (cristalóide), após serem mantidos por longo período em isquemia global. E a avaliação de proteínas relacionadas com a dinâmica do cálcio intracelular, a atividade de proteases envolvidas com a morte celular programada assim como a preservação energética miocárdica.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Corações de ratos Wistar macho foram perfundidos de forma isolada de acordo com a técnica de Langendorff clássico. A administração das soluções cardioplégicas em dose única (30 ml/Kg) induziram os corações ao período 3 horas de isquemia fria, seguido pelo período de 90 minutos de reperfusão. Os corações foram divididos em dois grupos; (I) del Nido (n = 6) versus (II) Custodiol (n = 6). A avaliação da recuperação contrátil do ventrículo esquerdo foi realizada durante a reperfusão pelas variáveis hemodinâmicas: PSVE, PDVE, dP/dt máxima, dP/dt mínima, PPDFC e RC. Ao fim da reperfusão as amostras de tecido do ventrículo esquerdo foram coletadas para as análises de proteínas envolvidas com a dinâmica do cálcio intracelular (fosfolambam e SERCA2a) de acordo com a técnica de immunoblot, atividade das caspases 3/7 e a concentração de ATP miocárdico de acordo com a técnica de bioluminescência.

**RESULTADOS:** A solução cardioplégica sanguínea del Nido atribuiu aos corações a recuperação da função contrátil superior em comparação com a solução cristalóide Custodiol. As análises das variáveis hemodinâmicas mostraram resultados superiores com a solução sanguínea, conforme apresentam-se respectivamente: PSVE (90 minutos),  $28 \pm 7\%$  vs.

50 ± 2%; PDVE (90 minutos), 32 ± 6 vs. del 56 ± 2%; dP/dt máxima (30 minutos), 28 ± 12% vs. 66 ± 10%; dP/dt mínima (30 minutos), 24 ± 10% vs. 53 ± 9%; PPDFC (30 minutos), 18 ± 9% vs. 53 ± 11%. A concentração de ATP miocárdico ( $P < 0,05$ ) e a ativação da fosfolambam ( $P < 0,05$ ) também apresentaram resultados superiores nos corações que receberam a solução cardioplégica del Nido.

**CONCLUSÃO:** A solução cardioplégica sanguínea del Nido demonstrou maior capacidade de proteção do miocárdio em comparação com solução cardioplégica Custodiol de acordo com a maior preservação da recuperação contrátil do ventrículo esquerdo. A elevada concentração de ATP no miocárdio e a maior ativação da fosfolambam são dados que atestam o desempenho ventricular superior com a solução cardioplégica del Nido, demonstrando a maior capacidade de proteção do miocárdio por esta solução.

Palavras-chave: solução cardioplégica; parada cardíaca; isquemia; reperfusão miocárdica.



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The deleterious effect caused by myocardial ischemia and reperfusion during cardiac arrest is one of the main causes of low cardiac output syndrome in the postoperative period. In this sense, the use of cardioplegic solution on induction of elective cardiac arrest has been the most widely used and widespread method of myocardial protection. However, the standardization of the ideal method or type of cardioplegic solution is still controversial due to the scarcity of studies with a clear delineation about the advantages and disadvantages comparing solutions used in the surgery services.

**OBJECTIVES:** The contractile recovery evaluation from hearts induced to long-term of global ischemia with the single dose of cardioplegic solutions administration by del Nido (blood-based) versus Custodiol (crystalloid). In addition, the evaluation of intracellular calcium dynamics proteins, the activity of proteases involved with programmed cell death as well as myocardial energy preservation.

**MATERIAL AND METHODS:** Male Wistar hearts rats were submitted to isolated perfusion according to the classic Langendorff technique. The single dose of cardioplegic solutions (30 ml/kg), induced the hearts to the period 3-hours of cold ischemia, followed by the 90-minute of reperfusion. The hearts were divided into two groups; (I) del Nido (n = 6) versus (II) Custodiol (n = 6). The evaluation of left ventricular contractile recovery was performed throughout the reperfusion according to hemodynamic variables: LVSP, LVDP, maximum dP/dt, minimum dP/dt, RPP and CR. Subsequently, at the end of reperfusion the left ventricular tissue samples were collected for analysis of proteins involved with intracellular calcium dynamics (phospholamban and SERCA2a) according to the immunoblot technique and the activity of the caspases 3/7 and myocardial ATP concentration according to the bioluminescence technique.

**RESULTS:** The del Nido blood-based cardioplegic solution provided to the hearts higher contractile recovery comparing to the Custodiol crystalloid cardioplegic solution. The hemodynamic variables analysis showed superior results with the blood-based solution as presented respectively: LVSP (90 minutes),  $28 \pm 7\%$  vs.  $50 \pm 2\%$ ; LVDP (90 minutes),  $32 \pm 6$  vs.  $56 \pm 2\%$ ; dP/dt maximum (30 minutes),  $28 \pm 12\%$  vs.  $66 \pm 10\%$ ; dP/dt minimum (30

minutes),  $24 \pm 10\%$  vs.  $53 \pm 9\%$ ; RPP (30 minutes),  $18 \pm 9\%$  vs.  $53 \pm 11\%$ . Ultimately, both analysis with myocardial ATP concentration ( $P < 0.05$ ) and the activation of phospholamban ( $P < 0.05$ ) presented higher levels in the hearts which received the del Nido cardioplegic solution.

**CONCLUSION:** The del Nido a blood-based cardioplegic solution showed a greater capacity of myocardium protection comparing to Custodiol a crystalloid cardioplegic solution according to the higher preservation of the left ventricle contractile recovery. Also, the higher myocardium ATP concentration and phospholamban activation attest the superior ventricular recovery with del Nido cardioplegic solution showing a greater capacity of myocardium protection by this solution.

**Keywords:** cardioplegic solution; cardiac arrest; ischemia; myocardial reperfusion.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sistema de aquecimento composto de (I) termocirculador e (II) reservatório de manutenção para solução de perfusão.

Figura 2: Sistema de perfusão: transdutores de pressão (I) intraventricular e (II) perfusão.

Figura 3: Coração fixado ao sistema de perfusão; (I) cânula aórtica e (II) cateter de pressão intraventricular.

Figura 4: Desenho do experimento de acordo com o protocolo de perfusão e os instantes de isquemia e reperfusão.

Figura 5: (A) tempo de parada cardíaca induzida após administração de solução cardioplégica. (B) tempo de restauração o ritmo cardíaco na reperfusão.

Figura 6: Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Pressão sistólica do ventrículo esquerdo – PSVE.

Figura 7: Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo – PDVE.

Figura 8: Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Derivada positiva máxima do ventrículo esquerdo -  $dP/dt$  máxima.

Figura 9: Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Derivada negativa mínima do ventrículo esquerdo -  $dP/dt$  mínima.

Figura 10: Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Produto da pressão desenvolvida pela frequência cardíaca – PPDFC.

Figura 11: Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Resistência coronária - RC.

Figura 12: Figura representativa dos resultados do ensaio de Immunoblot pela técnica de Western blot das proteínas SERCA2a, fosfolambam total e fosfolambam fosforilada.

Figura 13: Figura representativa dos resultados do ensaio de concentração de ATP pela técnica de bioluminescência.

Figura 14: Figura representativa dos resultados do ensaio de atividade de caspases 3/7 pela técnica de bioluminescência.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Composição das soluções cardioplégicas Custodiol e del Nido

Tabela 2: Variáveis hemodinâmicas

## **LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS**

LVSP: Left ventricle systolic pressure.

LVDP: Left ventricle developed pressure.

RPP: rate product pressure.

CR: coronary resistance.

OMS: Organização Mundial da Saúde

PSVE: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo.

PSDVE: Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo.

dP/dt máxima: Derivada de pressão positiva máxima do ventrículo esquerdo.

dP/dt mínima: Derivada de pressão negativa mínima do ventrículo esquerdo.

FC: Frequência cardíaca.

PPDFC: Produto da pressão desenvolvida pela frequência cardíaca.

RC: Resistência coronária.

ATP: adenosina trifosfato

FLB: Fosfolambam

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório

COBEA: Conselho Brasileiro de Experimentação Animal

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

BCA: *Bicinchoninic acid assay*

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis*

PBS: *Phosphate-buffered saline*

## LISTA DE SÍMBOLOS

Kg: Quilograma

g: Grama

µg: Micrograma

mmHg: Milímetro de mercúrio

s: Segundos

±: Mais ou menos

µg: Micrograma

®: Marca registrada comercial

mmol/L: Milimol por litro

%: Porcentagem

p/p: Peso por peso

p/v: Peso por volume

v/v: Volume por volume

<: Menor

>: Maior

°C: temperatura



ml/Kg: Mililitro por quilograma

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Revisão da literatura: História.....	19
1.2 Soluções cardioplégicas e o efeito no metabolismo miocárdico.....	23
1.3 Metabolismo do cálcio intracelular.....	25
1.4 1.4 Solução cardioplégica Custodiol versus solução cardioplégica del Nido: características.....	26
1.5 Estudo comparativo entre soluções cardioplégicas: proposta e análises.....	27
2. OBJETIVO.....	29
2.1 Objetivo Principal.....	29
2.2 Objetivo Primário.....	29
2.3 Objetivo Secundário.....	29
3. MATERIAL E MÉTODODO.....	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Técnica de perfusão em coração isolado: Langendorff clássico.....	30
3.2.1 Sistema de Perfusão retrógrada em corações isolados.....	30
3.2.2 Solução de perfusão.....	31
3.2.3 Preparação do sistema de perfusão.....	32
3.2.4 Aquisição das variáveis hemodinâmicas.....	35
3.3 Protocolo cirúrgico de extração do coração.....	35
3.4 Desenho do estudo.....	37
3.5 Composição e preparo das soluções cardioplégicas.....	38
3.6 Extração de proteínas totais.....	40
3.7 Quantificação de Proteína.....	40
3.8 Immunoblot pela técnica de Western blot.....	41
3.9 Quantificação de Atividade da Caspase 3/7 e ATP miocárdico.....	41
4.0 Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1 Recuperação contráctil ventricular esquerda.....	43
4.2 Expressão de proteínas por Immunoblot.....	52
4.3 Concentração de ATP.....	53
4.4 Atividade das caspases 3/7.....	54
5. DISCUSSÃO.....	55
6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	62
7. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

### *1.1 Revisão da literatura: História*

A ciência e a medicina têm promovido progressos significativos no enfrentamento de doenças que afetam o sistema cardiovascular. No entanto, de acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS) “As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo: mais pessoas morrem anualmente por essas enfermidades do que por qualquer outra causa” (2017), condição a qual tem despertado o interesse global para o desenvolvimento de novos meios de conter este surto que tem acometido a sociedade nos últimos tempos.

A pesquisa científica na área médica é a principal aliada no desenvolvimento de métodos para contornar os efeitos deletérios provocados pelas doenças cardiovasculares. Portanto, a pesquisa aplicada nesta área denota um caráter multidisciplinar devido à complexidade da mesma ao tratar de diversas variáveis que estão relacionadas. Em termos práticos a pesquisa cardiovascular pode ser dividida em cinco áreas de atuação: fatores de risco, sintomas, diagnóstico, prevenção e tratamento. Por seguinte, o tratamento se subdivide em outros três campos, tais como: estilo de vida, medicamentos e cirurgia.

O tratamento viabilizado especificamente por meio de cirurgias com necessidade de parada cardíaca eletiva, possuem ao menos dois fatores inerentes que podem repercutir em potencial dano ao próprio coração, tais como: risco cirúrgico (i.e., trauma provocado pelo procedimento, formação de coágulo, perda de sangue, infecções, etc.), e o processo de isquemia e reperfusão do miocárdio. Estes danos têm sido constantemente minimizados de acordo com o desenvolvimento da prática cirúrgica, entretanto, a isquemia e reperfusão caracteriza-se como um processo singular por possuir um caráter ambíguo. Posto que o processo é considerado

essencial em procedimentos intracardíacos durante a indução da assistolia para a manutenção das artérias e cavidades cardíacas livres de sangue, características as quais beneficiam a atuação dos cirurgiões. E de modo paradoxal a isquemia e reperfusão provoca danos profundos ao metabolismo cardíaco caracterizado pelo próprio processo.

No âmbito da cirurgia cardíaca a isquemia ocorre quando o fluxo de sangue arterial coronariano é totalmente interrompido (isquemia global) promovendo supressão de substrato energético e oxigênio. A etapa após a isquemia denominada reperfusão, ocorre quando o fluxo sanguíneo nas artérias é retomado, tornando aparente os danos envolvidos no processo. Em suma, a isquemia e reperfusão do miocárdio provoca a lesão responsável por alterações deletérias que poderão ser reversíveis, como: arritmias, edema e disfunção contrátil ou irreversíveis, como: necrose e apoptose (1, 2).

O início dos estudos da proteção do miocárdio contra a isquemia e reperfusão global foi iniciado por Sidney Ringer (1883) quando a equipe do pesquisador britânico realizou a perfusão acidental de água não filtrada em coração de sapo e observou-se que o ritmo cardíaco era mantido por um certo período mesmo com a completa ausência de sangue (3). Fato este evidenciado devido a elevada concentração de cálcio e magnésio dissolvidos na água disponibilizada na cidade de Londres naquele período. Deste modo, o pesquisador empenhou-se em identificar substâncias que poderiam influenciar na atividade contrátil por meio de estudos em corações isolados. Portanto, a partir destes experimentos foi identificado que tanto o cloreto de cálcio quanto cloreto de potássio ambos distintamente dissolvidos em soluções salina produzem efeitos antagônicos ao ritmo cardíaco, aumentando e reduzindo respectivamente, a força e o tempo de contração do ventrículo (4). A contribuição e o pioneirismo do professor Ringer neste campo foi impulsionada por trabalhos científicos com a

participação de outros grandes pesquisadores com interesses em comum em avaliar a interação de compostos químicos com o ritmo cardíaco (1).

Entretanto, até o início na década de 1950 não havia um método de proteção contra a isquemia e reperfusão do miocárdio em cirurgias intracardíacas, a qual previa apenas a simples oclusão da aorta para a indução da parada cardíaca, assim como a reperfusão era conferida pela desobstrução da mesma (5). Sendo assim, a promoção desta conduta ocasionava em grande parte dos procedimentos o dano irreversível atribuído a contratatura isquêmica conhecida como “stone heart” (5, 6). No entanto, pesquisador americano Conrad Ramsey Lam em meados da mesma década, reportou os achados do primeiro modelo de parada reversível do coração por meio de injeções intracardíacas com cloreto de potássio em modelo experimental com corações caninos (7). O professor Lam também foi responsável por cunhar o termo cardioplegia, o qual possui o prefixo “cardio”, para referir-se ao coração e o sufixo “plegia”, para referir-se a paralisia (7). Muito embora o termo solução cardioplégica seja preferível de acordo alguns autores já que a exegese da palavra cardioplegia corresponde ao ataque ou agressão, sentidos estes muito diferente ao de proteção miocárdica o qual a descoberta se tornaria mundialmente conhecida (8). O método de indução de parada cardíaca indicava ser uma alternativa promissora de proteção ao miocárdio, no entanto, os episódios frequentes de fibrilação ventricular refratária evidenciados durante a reperfusão em modelo experimental, comprometeria a utilização do mesmo em humanos, segundo o professor Lam.

Neste cenário, na Inglaterra o professor Denis Graham Melrose (1955) havia proposto em modelo experimental com a técnica de parada cardíaca induzida, por meio de injeções na raiz da aorta com solução composta de sangue aquecido e oxigenado associado à 2,5% de citrato de potássio em solução aquosa (9). A utilização de citrato de potássio foi

determinada pois acreditava-se tornar o coração menos suscetível a episódios de fibrilação refratária comparado ao cloreto de potássio (9). Os resultados foram considerados satisfatórios de acordo com o retorno da função contrátil logo após o citrato de potássio era removido das artérias durante a reperfusão. Esta foi considerada primeira solução cardioplégica utilizada na parada cardíaca eletiva tornando-se amplamente conhecida como a “ técnica de Melrose” (9). A relevância dos resultados encontrados em modelo experimental motivaram Gerbone e Melrose (1958) a publicar uma serie de casos clínicos com 34 pacientes submetidos a parada cardíaca eletiva, no entanto, nenhum dos pacientes apresentaram um período de sobre vida longa, colocando sob suspeita a eficácia da técnica (10). Segundo Geoffrey P. Dobson a constatação do baixo desempenho em atribuir proteção ao miocárdio evidenciada pela elevada incidência fibrilação refratária, disfunção contrátil e morte celular a partir da experiência clínica de outros serviços de cirurgia, conduziu a técnica de Melrose ao ostracismo durante aproximadamente 15 anos (1).

As soluções cardioplégicas desenvolvidas por Melrose e Lam faziam uso de uma estratégia simples de induzir a assistolia por meio da despolarização das células cardíacas com a utilização do citrato de potássio ou cloreto de potássio, mas que geravam impacto negativo quando o órgão era reperfundido (11). O pesquisador Tyers (1975) demonstrou que os efeitos danosos provocado pela utilização da solução cardioplégica devia-se justamente a concentração elevada do elemento químico potássio empregado nestas soluções (12). Consequentemente este achado possibilitou que em períodos subsequentes, pesquisadores como: Bretschneider (13), Roe, et al. (14), Gay et al. e Ebert, et al. (15) pudessem elaborar novas propostas de soluções com maior espectro de proteção do miocárdio.

Predominantemente durante o desenvolvimento das novas soluções cardioplégicas preconizava-se o uso de veículo aquoso constituído de eletrólitos, muito semelhante à solução

*ringer* das quais foram denominadas soluções cardioplégicas cristalóides (16-18). Contudo, Eliot R. Rosenkranz e Gerald D. Buckberg (1978) tornaram a discussão ampliada sobre as possibilidades da diversidade de composição das soluções cardioplégicas quando os pesquisadores demonstraram que haviam benefícios em utilizar sangue como veículo, ofertando maior aporte de oxigênio ao coração durante a isquemia, desta forma, prevenir os efeitos adversos durante a reperfusão (19). A partir deste período a eficácia comparativa das soluções cardioplégicas sanguíneas e cristalóides resultaram em uma das maiores controvérsias acerca do tipo de solução cardioplégica atribuiria maior proteção do miocárdio.

### ***1.2 Solução cardioplégica e o efeito no metabolismo miocárdico***

A princípio tanto as soluções cardioplégicas cristalóides quanto as soluções cardioplégicas sanguíneas em sua maioria eram similarmente hipercalêmicas, ou seja, dependentes do efeito produzido pelos níveis elevados de potássio no meio extracelular que resulta no bloqueio do potencial de ação entre as células cardíacas, induzindo a parada despolarizada. A despolarização das membranas das células cardíacas pode alcançar níveis entre  $\pm 80$  mV a  $\pm 40$  mV, dependente da concentração de potássio no meio extracelular. Este método é responsável por uma parada cardíaca rápida e tecnicamente “simples” de ser empregada (20). Não obstante, os efeitos adversos como: arritmias, disfunção contrátil, vasoconstricção, espasmo coronariano e a síndrome de baixo débito cardíaco tem sido reportado como consequência do processo de despolarização (21).

O efeito lesivo ocasionado pelo excesso de potássio interfere na capacidade contrátil do coração por meio do desequilíbrio iônico que ocorre durante o período em que o coração permanece em assistolia. A parada cardíaca isquêmica promove a entrada do cálcio no

meio intracelular através da ação reversa das bombas de trocas entre sódio e cálcio ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ ) presentes na membrana das células cardíacas, entretanto, sem que o processo de contração do músculo se efetive (20). Desta maneira as soluções hipercalêmicas induzem o influxo excessivo de cálcio, ocasionando a lesão e morte celular logo nos primeiros instantes da reperfusão (18, 22-24). Esse processo pode ainda ocasionar o colapso da produção energética do metabolismo miocárdico, uma vez que as bombas de troca iônica continuam demandando energia durante a isquemia na tentativa de manter a homeostase celular, mesmo com a privação do oxigênio e o conseqüente acometimento da atividade mitocondrial responsável pela produção ATP.

Em razão dos efeitos nocivos relacionados ao excesso de potássio e o impacto provocados pela isquemia e reperfusão no miocárdio, algumas soluções cardioplégicas tiveram seus componentes alterados para o suprimento mais eficaz das necessidades de um músculo sensibilizado, ou *stunning*, termo de origem inglesa o qual identifica as anormalidades contráteis persistentes mesmo após um longo período desde o evento isquêmico (25, 26). Como alternativa para solucionar tais efeitos, pesquisadores visualizaram a possibilidade de aperfeiçoar a composição das soluções cardioplégicas ao adicionar substâncias com propriedades antioxidantes, substratos para aporte energético e tampões para evitar acidose tecidual (16). Tal como, a utilização de hipotermia associada a administração das soluções cardioplégicas conferindo o retardo na depleção energética inerente à hipóxia (11).

Entretanto, mesmo com o desenvolvimento das diversas tecnologias empregadas nos estudos de eletrofisiologia cardíaca e aqueles destinados aos meios de proteção contra a isquemia e reperfusão do miocárdio durante cirurgias cardíacas, o tipo ideal de solução cardioplégica continua controverso. As diferenças entre procedimentos cirúrgicos,



característica genética do paciente, tempo de isquemia, idade, status morfológico do miocárdio e comorbidades adquiridas estão entre os fatores que tornam este campo de estudo ainda desafiador (27).

### ***1.3 Metabolismo do cálcio intracelular***

A isquemia e reperfusão *per se* é um processo complexo responsável por um infindável número de vias que podem levar ao comprometimento da função cardíaca. A perda da homeostase do metabolismo do cálcio está intimamente associada a esta disfunção. Irregularidades na dinâmica de transferência do íon entre o retículo sarcoplasmático e o citosol é identificado como parte importante deste processo (22). A proteína fosfolambam (ou fosfolambano) regula o influxo de cálcio para o retículo sarcoplasmático pela modulação da bomba de cálcio dependente de ATP chamada SERCA com maior interação sob sua isoforma 2a (28, 29). A ativação da fosfolambam de acordo com o processo de fosforilação, reduz sua ação inibitória sob a SERCA2a, aumentando a afinidade da mesma ao cálcio presente no citosol. Esta fosforilação está associada ao aumento da contratilidade, a qual é necessária à manutenção do ciclo cardíaco, contudo, não a relatos deste mecanismo ao ser submetido sob a influência de soluções cardioplégicas (30).

Diversas soluções cardioplégicas tiveram seu uso consagrados durante anos, todavia, ensaios clínicos e estudos experimentais destas soluções têm maior foco na avaliação de dados fisiológicos, como pressão arterial sistólica, liberação de troponina ou mortalidade. Em contraste, raramente foram descritos mecanismos celulares subjacentes aos achados fisiológicos.

#### ***1.4 Solução cardioplégica del Nido versus solução cardioplégica Custodiol: características***

A solução cardioplégica del Nido recebeu o nome de seu idealizador Dr. Pedro del Nido e foi inicialmente desenvolvida para ser utilizada em cirurgias de pacientes neonatos (36). No entanto, seu uso vem sendo empregado em diversos tipos de cirúrgicas cardíacas em pacientes adultos (21, 37-41). Esta solução cardioplégica possui veículo sanguíneo e pode ser considerada hipercalêmica de ação modificada, porque faz o uso de elevada concentração de potássio para induzir a despolarização, entretanto, evita o desequilíbrio iônico durante a isquemia por meio do bloqueio dos canais de sódio (42, 43). A droga lidocaína corresponde ao agente responsável pelo bloqueio do influxo dos canais de sódio presente na membrana sarcoplasmática, evitando de forma indireta, a sobrecarga do cálcio no meio intracelular e conseqüentemente os danos ao miocárdio derivado deste processo (43, 44). A ação farmacológica da lidocaína bloqueia seletivamente e de forma reversível os canais de sódio, em razão disso, tem sido frequentemente empregada contra eventos de taquicardia ventricular (45). O uso de lidocaína também demonstrou resultados relevantes na recuperação de corações submetidos a protocolos experimentais após a isquemia e reperfusão miocárdica (42, 43, 46, 47).

A solução de Bretschneider, originalmente desenvolvida para preservação de órgãos foi concebida como uma alternativa às soluções cardioplégicas hipercalêmicas cristalóides (31, 32). Comumente conhecida como solução de HTK (na língua inglesa: Histidine/Tryptophan/Ketoglutarat) ou Custodiol<sup>®</sup>, esta solução é considerada uma microplegia ou solução cardioplégica com ação intracelular, devido as quantidades reduzidas de potássio, sódio e cálcio que resultam na parada cardíaca pela hiperpolarização da membrana. De acordo

com Chambers D.J. a parada polarizada ou hiperpolarizada pode ser considerada mais fisiológica, pois mantém o potencial de membrana próximo ao de repouso, resultando na redução da demanda metabólica do músculo cardíaco durante a isquemia (24). Ademais, este tipo de solução reduz os danos advindos das hipercontraturas associadas a hipercalemia (23, 24, 33) . Esta solução também possui um importante efeito no controle do pH atribuído pelo aminoácido histidina, importante no controle do balanço dos níveis de íons de hidrogênio que estão associados com influxo de sódio durante a isquemia (20, 34). Portanto, a solução Custodiol tem sido utilizada em muitos países europeus como a primeira escolha em cirurgias cardíacas convencionais e principalmente na preservação miocárdica em transplantes cardíacos (35).

Embora a natureza das soluções del Nido e Custodiol seja distinta em relação aos veículos (cristalóide e sanguíneo, respectivamente) ou de suas composições eletrolíticas (intracelular e extracelular, respectivamente), ambas estão associadas com a administração segura em dose única e capazes de preservar o miocárdio por um longo período durante a isquemia (35, 36). Contudo, os mecanismos envolvidos neste processo ainda não são inteiramente compreendidos.

### ***1.5 Estudo comparativo entre soluções cardioplégicas: proposta e análises***

O termo *from bench to bedside* com origem na língua inglesa, define conceitualmente a importância de estudos laboratoriais nos avanços de tratamentos clínicos (48). Portanto, o presente trabalho utilizou do mesmo conceito para avaliar a proteção miocárdica de duas soluções cardioplégicas com grande relevância na prática cirúrgica, entretanto, com foco na

elucidação do mecanismo associado a dinâmica do cálcio intracelular, o qual é suscetível a alterações após o processo de isquemia e reperfusão do miocárdio.

O presente estudo foi realizado em modelo *ex vivo* com sistema de perfusão retrógrada de acordo com a técnica de Langendorff. A avaliação da função de recuperação contrátil ventricular esquerda foi adquirida por meio de medida intraventricular isovolumétrica durante todo o protocolo experimental e a resistência coronária (RC) foi aferida com o uso de sensores interligados as linhas de perfusão do sistema. Para suportar os dados fisiológico de contratilidade, análises com amostradas de tecido do ventrículo esquerdo verificaram a expressão das proteínas como fosfolambam e SECA2a devido a importância de ambas no ciclo cardíaco. Assim como, análises da atividade das caspases 3/7 relevantes ao processo de morte celular programada e a concentração de ATP no miocárdio associada a atividade do metabolismo energético.

## **2. OBJETIVO**

A análise comparativa da proteção miocárdica atribuída por dois diferentes tipos de soluções cardioplégicas: sanguíneas e cristalóide, após 3 horas em parada cardíaca.

### ***2.1 Objetivo Principal***

A avaliação da recuperação funcional do ventrículo esquerdo de corações perfundidos de forma isolada após serem submetidos a administração de solução cardioplégica del Nido versus solução cardioplégica Custodiol.

### ***2.2 Objetivo Primário***

Avaliação hemodinâmica e a identificação da expressão de proteínas envolvidas com a dinâmica do cálcio intracelular após a isquemia e reperfusão do miocárdio.

### ***2.2 Objetivo Secundário***

Verificar a preservação de fosfatos energéticos e a atividade de enzimas envolvidas com a apoptose celular.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi aprovado pela CEUA - UNICAMP (protocolo nº 2806-1). Os experimentos foram realizados de acordo com o "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório", publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH Publication No. 85-23, revista em 1996) e do COBEA. O estudo recebeu suporte financeiro da FAPESP, 2012/09130-1; e o aluno responsável pela pesquisa recebeu bolsa de auxílio da CAPES modalidade doutorado, 02-P-4569/2018.

#### *3.1 Animais*

Ratos macho da linhagem Wistar pesando 250-350g, foram fornecidos pelo CEMIB – UNICAMP.

#### *3.2 Técnica de perfusão em coração isolado: Langendorff clássico.*

##### *3.2.1 Sistema de Perfusão retrógrada em corações isolados*

O sistema de perfusão utilizado no presente estudo foi descrito em 1985 pelo pesquisador alemão Oscar Langendorff (49).

A perfusão retrógrada em corações de ratos promove o fechamento dos folhetos da válvula aórtica e como consequência ocorre a entrada da solução nas artérias coronárias via os óstios presentes na raiz da aorta. Em seguida, a solução percorre a circulação coronária

posteriormente drenada para o átrio direito através do seio coronário (50, 51). Neste sistema, a solução de perfusão foi continuamente disponibilizada ao coração com a ação da gravidade mantendo a pressão de perfusão constante de 75 mmHg sem que houvesse a recirculação da solução (Radnoti LLC, Monrovia, Calif).

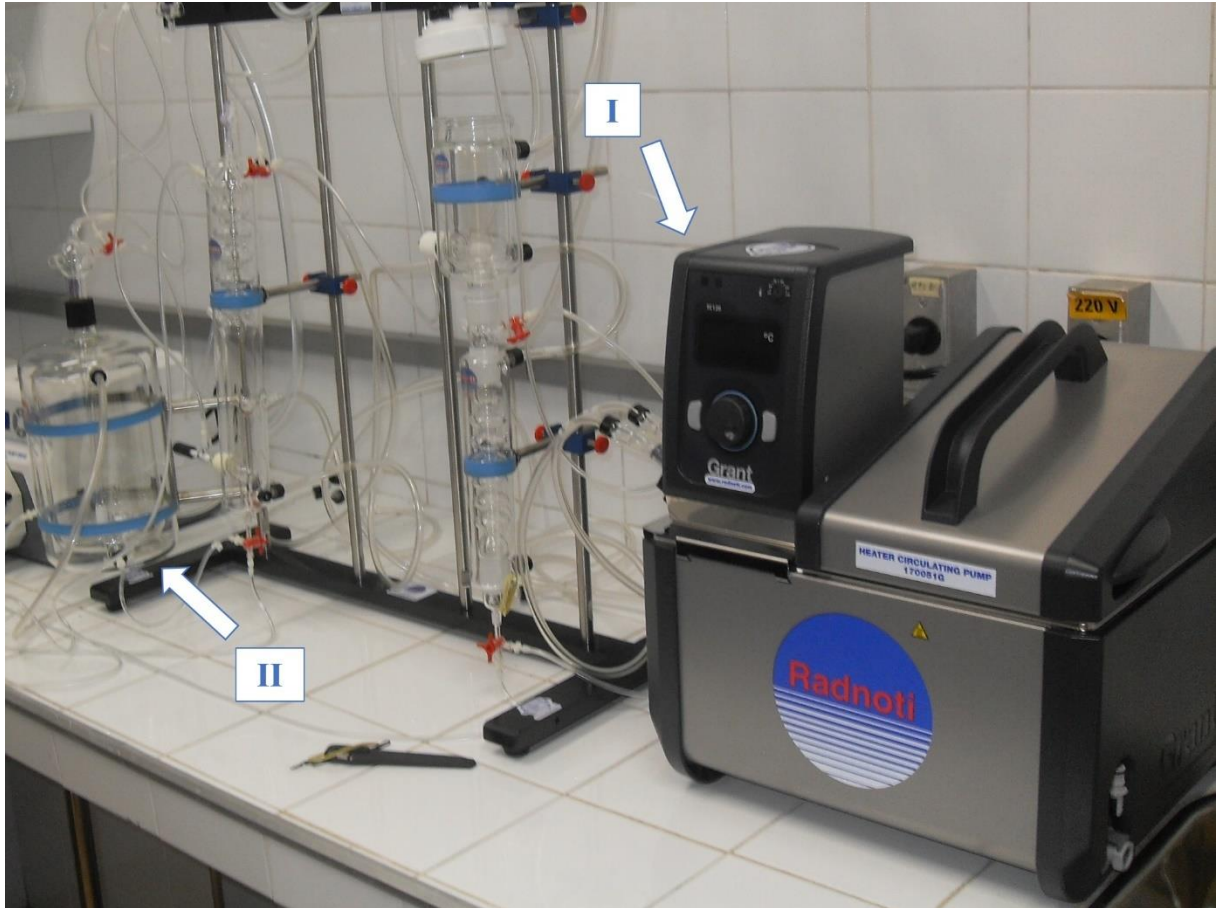
### 3.2.2 Solução de perfusão

Em sua totalidade, os corações isolados foram perfundidos com solução Krebs Henseleit *buffer*, a qual teve o preparo realizado pelo mesmo operador em todos experimentos conduzidos no estudo. A respectiva solução mimetiza o plasma sanguíneo, mas não compartilha das mesmas concentrações fisiológicas, ou seja, neste tipo de preparação denominado *ex vivo* a variedade e a concentração dos substratos presentes na solução são suficientes para atender a demanda metabólica dos corações durante o período de perfusão no sistema (51). A utilização deste tipo de solução de perfusão pode ser considerada vasta na literatura científica pertinente, devido a reprodutibilidade e consistência nos resultados obtidos (52). A solução de Krebs Henseleit *buffer* utilizada neste estudo possui as respectivas concentrações: NaCl 118,5 mmo/L; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 mmo/L; KCl 4,7 mmo/L; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mmo/L; glicose 11,0 mmo/L; CaCl<sub>2</sub> 1,0 mmol/L, a quantidade em gramas dos compostos químicos fora determinada com o auxílio de uma balança semi-analítica. Em seguida, os compostos foram dissolvidos em água deionizada sob agitação magnética constante. O pH da solução foi mantido entre 7,35 - 7,45 e o eventual ajuste destes níveis foi realizado com adição de HCl (0,5M) ou NaOH (0,5M).

### 3.2.3 Preparação do sistema de perfusão

Antes do início de cada experimento o sistema de perfusão foi submetido à pré-lavagem com 2 litros de água deionizada. De maneira simultânea a temperatura do sistema de perfusão era equilibrada com o auxílio de um termocirculador (170051G Thermo Pump<sup>®</sup>, Radnoti) acoplado a uma das vias de tubos com linhas de distribuição que revestem todos os circuitos e reservatórios (Figura 1). A temperatura dos corações foi mantida em 37°C em todos os experimentos. O reservatório do sistema destinado a manter a solução de Krebs Henseleit *buffer* era constantemente gaseificada com mistura carbogênica (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>) para garantir o aporte de oxigênio ao coração, assim como o controle do pH da solução (Figura 1).





**Figura 1:** Sistema de aquecimento composto de (I) termocirculador e (II) reservatório de manutenção para solução de perfusão.

Os transdutores de pressão foram calibrados antes da realização de todos os experimentos para garantir a acurácia e precisão dos dados obtidos. Com o auxílio de uma coluna de mercúrio o alcance da pressão era mantido em dois valores, sendo um mínimo e outro máximo, pois desta forma a aquisição do sinal captados originalmente em milivolts poderiam ser convertidos em milímetros de mercúrio pelo sistema de aquisição eletrônica (Power Lab<sup>®</sup>) (Figura 2). A calibração foi realizada sempre nos dois transdutores presentes no sistema: o primeiro, conectado ao balão de látex utilizados para medição da pressão

intraventricular; e o segundo, acoplado próximo a cânula aórtica para determinar a pressão de perfusão da solução disponibilizada ao coração.



**Figura 2:** Sistema de perfusão: transdutores de pressão (I) intraventricular e (II) perfusão.

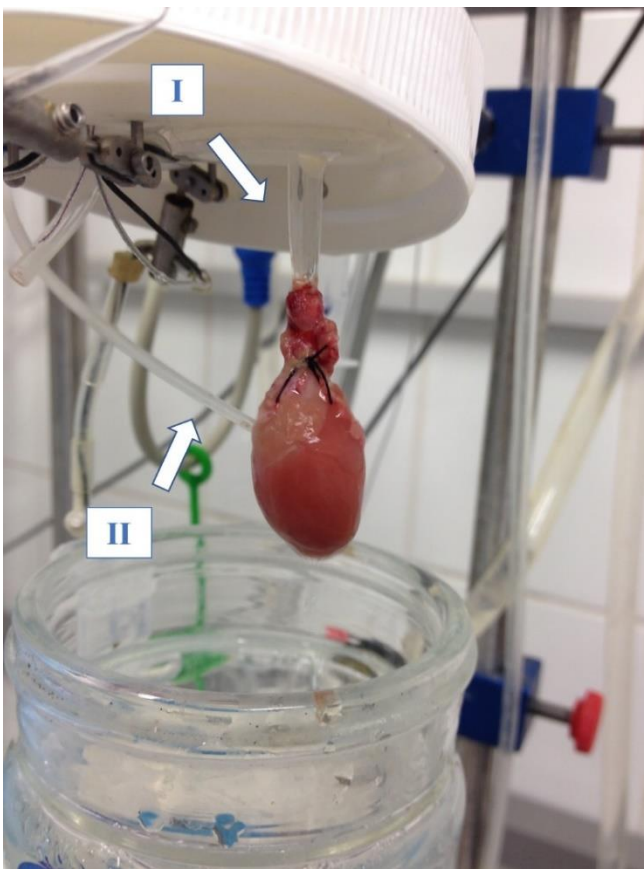
### *3.2.4 Aquisição das variáveis hemodinâmicas*

Os registros das variáveis de recuperação contrátil do ventrículo esquerdo foram obtidos durante todo o experimento e analisados com o software especializado (LabChart Pro 7<sup>®</sup>, ADInstruments). O módulo de registro de pressão o software proveu ininterrupta das variáveis, pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSDVE), derivada positiva máxima do ventrículo esquerdo (dP/dt máxima), derivada positiva mínima do ventrículo esquerdo (dP/dt mínima), produto da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo pela frequência cardíaca (PPDFC). A resistência coronária (RC) pode ser verificada com a utilização de medidores de fluxo (Transonic<sup>®</sup>) acoplados as linhas do circuito. Os dados obtidos foram reportados em porcentagem de recuperação após o período 3 horas de isquemia e avaliados a cada 30 minutos durante o período de reperfusão.

### *3.3 Protocolo cirúrgico de extração do coração*

Todos animais neste estudo receberam anestésico tiopental sódico (80 mg/Kg) e heparina sódica (2.500 UI/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida, estímulos na calda e patas eram realizados para atestar da indução da anestésica. A toracotomia bilateral foi realizada expondo o coração para a cardiectomia de forma rápida (< 3 minutos) de modo em que a aorta ascende permanesse íntegra. A fixação da aorta a cânula de perfusão do sistema era realizada com fio de sutura de algodão 4 - 0. Na etapa após a fixação da aorta a bomba peristáltica (Masterflex<sup>®</sup>) de rolete era acionada para dar início a perfusão dos corações sob pressão constante durante todo o experimento. Após o coração iniciar a contratilidade por meio da perfusão retrógrada, uma pequena incisão era realizada no átrio esquerdo para

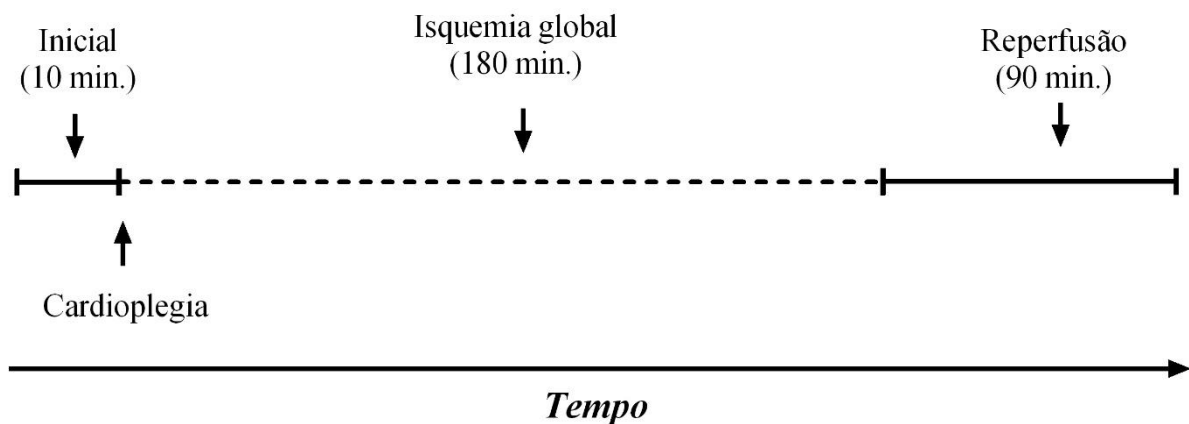
inserção do cateter com balão de látex através da válvula mitral e alocado no ventrículo esquerdo (Figura 3). De forma similar, uma segunda incisão era realizada na artéria pulmonar para alocar uma sonda de temperatura no ventrículo direito. A preparação foi excluída se algum dos seguintes critérios não fosse cumprido antes do início do protocolo: tempo desde a explantação do coração até o início da perfusão < 90 segundos, PSVE < 70 mmHg e frequência cardíaca < 200 ou > 400 batimentos por minuto (51).



**Figura 3:** Coração fixado ao sistema de perfusão; (I) cânula aórtica e (II) cateter de pressão intraventricular.

### 3.4 Desenho do estudo

Os corações foram inicialmente perfundidos por 10 minutos durante período de estabilização e a aquisição das medidas iniciais. Em seguida, foi induzida à parada cardíaca com administração em dose única das soluções cardioplégicas (30 ml/Kg) e os corações foram mantidos em isquemia global fria 4°C por 3 horas em solução salina e recipiente com gelo. A reperfusão foi realizada pelo reestabelecimento do fornecimento da solução de perfusão ao coração. A recuperação contráctil dos corações retornou de maneira espontânea durante os 90 minutos de reperfusão (Figura 4). O período de indução da parada cardíaca por meio da infusão das soluções cardioplégicas em estudo, assim como o período de retomada da contratilidade após o período de 3 horas de isquemia foram mensurados.



**Figura 4:** Desenho do experimento de acordo com o protocolo de perfusão e os instantes de isquemia e reperfusão.

### *3.5 Composição e preparo das soluções Cardioplégicas*

A solução cardioplégica sanguínea del Nido foi preparada com sangue autólogo coletado diretamente da cavidade torácica após a extração do coração. O sangue previamente com heparina sódica foi misturado com demais componentes dissolvidos em uma solução com veículo aquoso (Plasma-Lyte<sup>®</sup>, Baxter) na proporção de 1:4 (sangue:solução) (43). Ambas soluções cardioplégicas foram administradas ao coração com auxílio de bomba de infusão de seringa com fluxo contínuo 5 ml/min com pressão aórtica < 50 mmHg.

A solução Custodiol foi obtida por meio da Contatti Medical distribuidora no Brasil (Tabela 1).

**Tabela 1 – Composição das soluções cardioplégicas Custodiol e del Nido**

Composição (mmol/L)	del Nido	Custodiol
Veículo	Plasma-Lyte A <sup>®</sup>	Água estéril
Sangue: sol. cardioplégica	1:4	---
Cloreto de cálcio	0,24	0,02
Histidina	---	180
Histidina-HCl	---	18
Lidocaína	0,36	---
Cloreto de magnésio	1,13	4
Sulfato de magnésio	6,18	---
Manitol	13,72	30
Cloreto de potássio	24,3	9
Hidrogenado de hidrogênio de potássio 2-cetoglutarato	---	1
Acetato de sódio tri-hidratado	20,34	---
Bicarbonato de sódio	13,79	---
Cloreto de sódio	91,66	15
Gluconato de sódio	17,33	---
Triptofano	---	2

### ***3.6 Extração de proteínas totais***

As amostras do ventrículo esquerdo foram resfriadas em nitrogênio líquido logo após o experimento e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O preparo de amostras para extração foi realizado com a adição de tampão inibidor de protease RIPA com as concentrações: NP40 1% p/p; desoxicolato de sódio 1% p/p; dodecil sulfato de sódio 0,1% p/v; NaCl 150 mmol/L; HEPES (pH 7,0) 50 mmol/L; EDTA (pH 8,0) 2 mmol/L; NaF 100 mmol/L; glicerol 10% v/v;  $\text{MgCl}_2$  1,5 mmol/L; PMSF 100 mmol/L; ortovanadato de sódio 200 mmol/L; aprotinina 1  $\mu\text{g/ml}$ ; diluído em água deionizada. As amostras de corações foram homogeneizadas com auxílio de misturador e dispersador mecânico. Em seguida, o homogenato foi centrifugado à 11.000 RPM com temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos. Por fim, era realizado a coleta do sobrenadante com o extrato de proteico de tecido total (53).

### ***3.7 Quantificação de proteína total***

O extrato proteico das amostras de ventrículo esquerdo foi quantificado pelo ensaio de ácido bicinonínico ou método de BCA (Pierce, Ficsher Thermo Scientific<sup>®</sup>, Inc., Rochkford, IL, EUA). O BCA ao reagir com a solução proteica com característica alcalina promove a reação de redução do íon cobre  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^{1+}$ . No instante em que a reação é submetida a temperaturas elevadas o cobre reduzido ligado ao BCA produz a coloração proporcional à concentração de proteína do meio. A coloração pode ser quantificada em valores numéricos por um espectrofotômetro. O ensaio foi realizado em placa para cultura de células com 96 poços e as amostras foram mensuradas em duplicatas.



### ***3.8 Immunoblot pela técnica de Western blot***

O extrato total de proteína com 50 µg por amostra de ventrículo esquerdo foi aplicado em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE). A separação das proteínas de interesse foi realizada pela eletroforese efetuada em cuba de mini gel (Mini-PROTEAN II Cell<sup>®</sup> Bio Rad) com solução tampão para eletroforese previamente diluída. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com o equipamento de eletrotransferência (Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System Bio Rad). Finalizado o processo de transferência, as membranas foram bloqueadas com leite para subsequente incubação com anticorpos primários fosfolambam total (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>, 8495), fosfolambam fosforilada serina 16 / treonina 17 (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>, 8496) a 4°C durante 14 a 16 horas em agitação constante. Após o período de incubação as membranas foram lavadas com solução PBS e incubadas em solução de quimioluminescente (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate<sup>®</sup>). Imagens foram capturadas pelo sistema multi-função (Gel Logic Imaging System<sup>®</sup>, Rochester, NY, EUA). Todas as imagens foram quantificadas por densitometria e normalizados pelo método colorimétrico com Ponceau S.

### ***3.9 Quantificação de atividade da Caspase 3/7 e ATP miocárdico***

As amostras de ventrículo esquerdo submetidas ao congelamento rápido com nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer a -80°C foram colocadas em micro tubos estéreis com tampão de extração composto de Tris-HCl 25 mmol/L; NaCl 150 mmol/L; 1% NP-40; 1% desoxicolato de sódio; 0,1% de dodecilsulfato de sódio, e homogeneizadas com o auxílio de um triturador mecânico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 40 minutos a 4 °C, e o extratos de proteína total foram obtidos pela coleta do material

sobrenadante de cada amostra. As análises foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante do Kit de ensaio para determinação do conteúdo de ATP (ATP Enliten, Promega<sup>®</sup>, Madison, WI EUA) e o ensaio para caspases 3/7 (caspase-Glo 3/7, Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, EUA), por meio do equipamento Glomax 20/20 (Promega, Madison, WI, EUA) para a quantificação da bioluminescência.

#### ***4.0 Análise estatística***

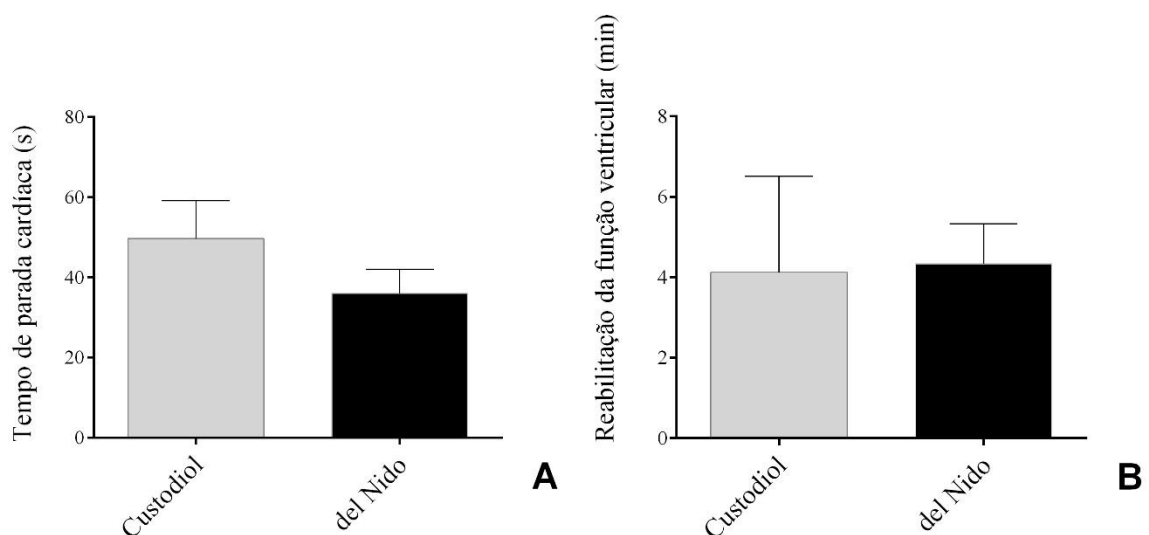
Todos os dados foram expressos em porcentual de recuperação (%) e como média e erro padrão (SEM). Os dados obtidos pelas variáveis hemodinâmica de recuperação ventricular foram normalizados com valores iniciais. As análises foram realizadas por 2-way ANOVA para medidas repetidas com o teste pós-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas. A comparação de determinação do tempo de indução da parada cardíaca, retomada da contratilidade pós isquemia, expressão proteica, concentração de ATP e atividade de Caspase 3/7 foram realizadas pelo teste não paramétrico t- student. A coloração Poceau S foi utilizado como controle interno para normalização de proteína no ensaio de western blot. A significância estatística foi assumida  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad<sup>®</sup> Prism 6.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Recuperação Contráctil ventricular esquerda

O total de 17 animais foram utilizados neste estudo, entretanto, foram excluídos 5 corações de acordo com o critério de exclusão durante o período de estabilização antes que o protocolo de estudo fosse iniciado.

Durante a administração das soluções cardioplégicas, o tempo de indução da parada cardíaca foi semelhante comparando o tempo em segundos dos grupos del Nido versus Custodiol (Figura 5A). O início da reperfusão, o período crítico no contexto do retorno da contratilidade espontânea após um longo período de isquemia, demonstrou que não houve diferença do tempo em minutos dos grupos experimentais avaliados (Figura 5B).



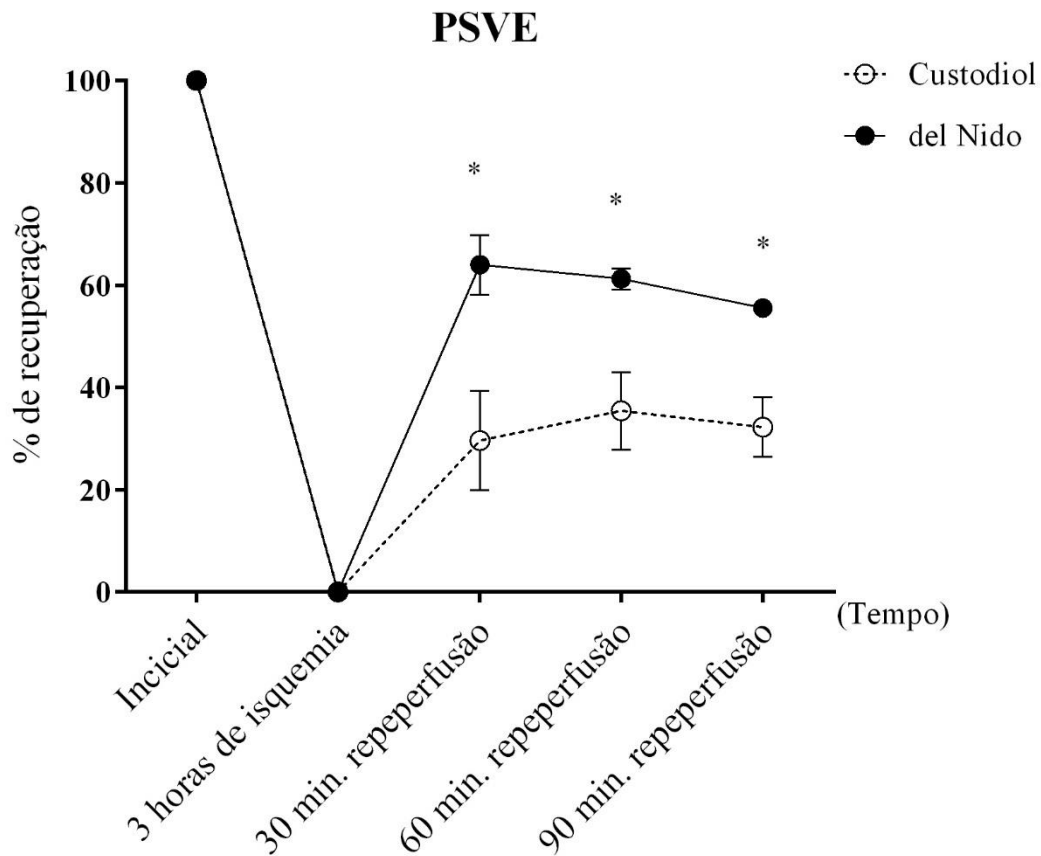
**Figura 5:** (A) tempo de parada cardíaca induzida após administração de solução cardioplégica. (B) tempo de restauração do ritmo cardíaco na reperfusão. Seis animais por grupo.

A função ventricular foi registrada durante todo o protocolo experimental. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada pelas medidas realizadas no início da perfusão dos corações, as quais correspondem aos valores iniciais, seguida das medidas realizadas respectivamente nos períodos 30, 60 e 90 minutos de reperfusão (Tabela 2).

**Tabela 2 – Variáveis hemodinâmicas**

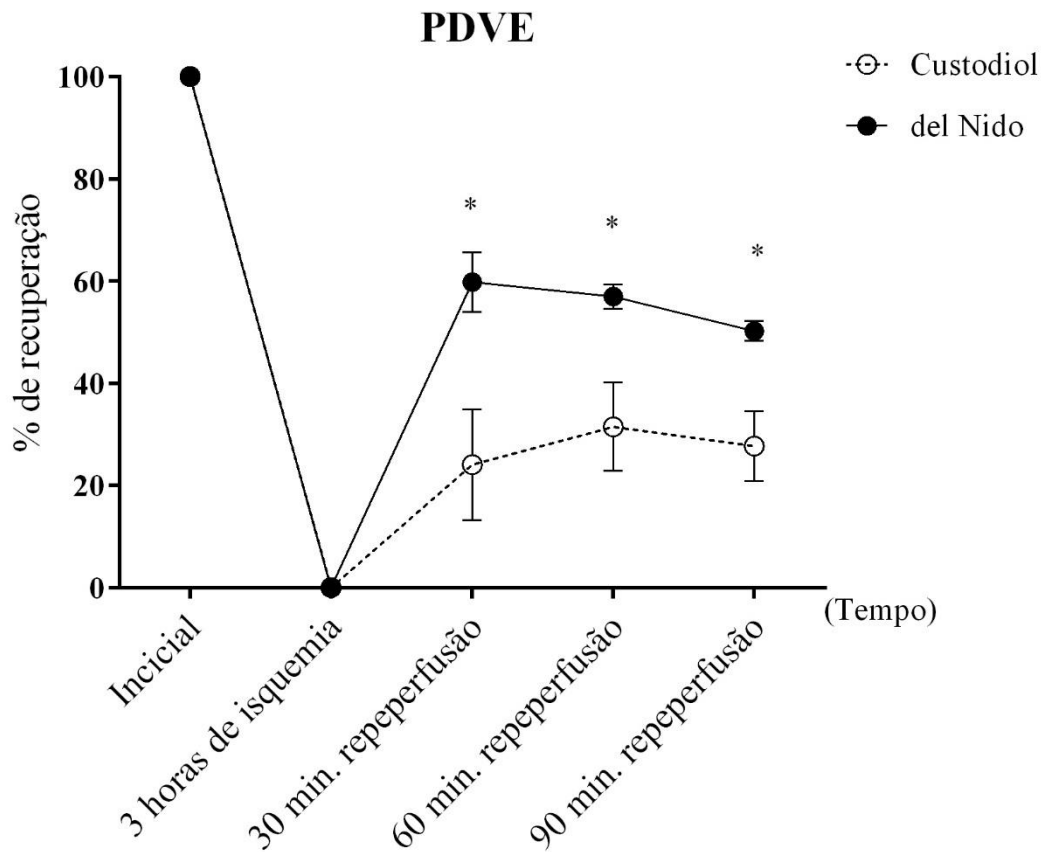
Varáveis hemodinâmicas	Grupos	Inicial	30 minutos	60 minutos	90 minutos
PDVE	del Nido	72 ± 3	42 ± 4	41 ± 2	36 ± 3
(mmHg)	Custodiol	75 ± 6	19 ± 9	24 ± 7	21 ± 6
PSVE	del Nido	79 ± 3	50 ± 4	48 ± 2	44 ± 3
(mmHg)	Custodiol	84 ± 5	25 ± 9	30 ± 7	28 ± 6
dP/dt máxima	del Nido	2228 ± 160	1507 ± 251	1357 ± 230	1172 ± 223
(mmHg/s)	Custodiol	1767 ± 152	478 ± 197	669 ± 201	597 ± 181
dP/dt mínima	del Nido	-1343 ± 189	-585 ± 77	-492 ± 55	-387 ± 47
(mmHg/s)	Custodiol	-1166 ± 64	-275 ± 116	-342 ± 102	-280 ± 75
FC	del Nido	309 ± 28	249 ± 35	202 ± 35	188 ± 37
(BPM)	Custodiol	218 ± 19	172 ± 54	130 ± 27	126 ± 28
PPDFC	del Nido	18574 ± 4134	8762 ± 2498	6829 ± 2062	5506 ± 1775
(mmHg.BPM)	Custodiol	16059 ± 1392	2879 ± 1391	3720 ± 1175	3020 ± 914
RC	del Nido	5 ± 1	12 ± 3	17 ± 5	21 ± 6
mmHg/ml/min	Custodiol	7 ± 1	17 ± 3	28 ± 8	32 ± 9

A PSVE após 3 horas de isquemia foi superior com o grupo del Nido em comparação com o grupo Custodiol ao longo de todo período de reperfusão (Figura 6).



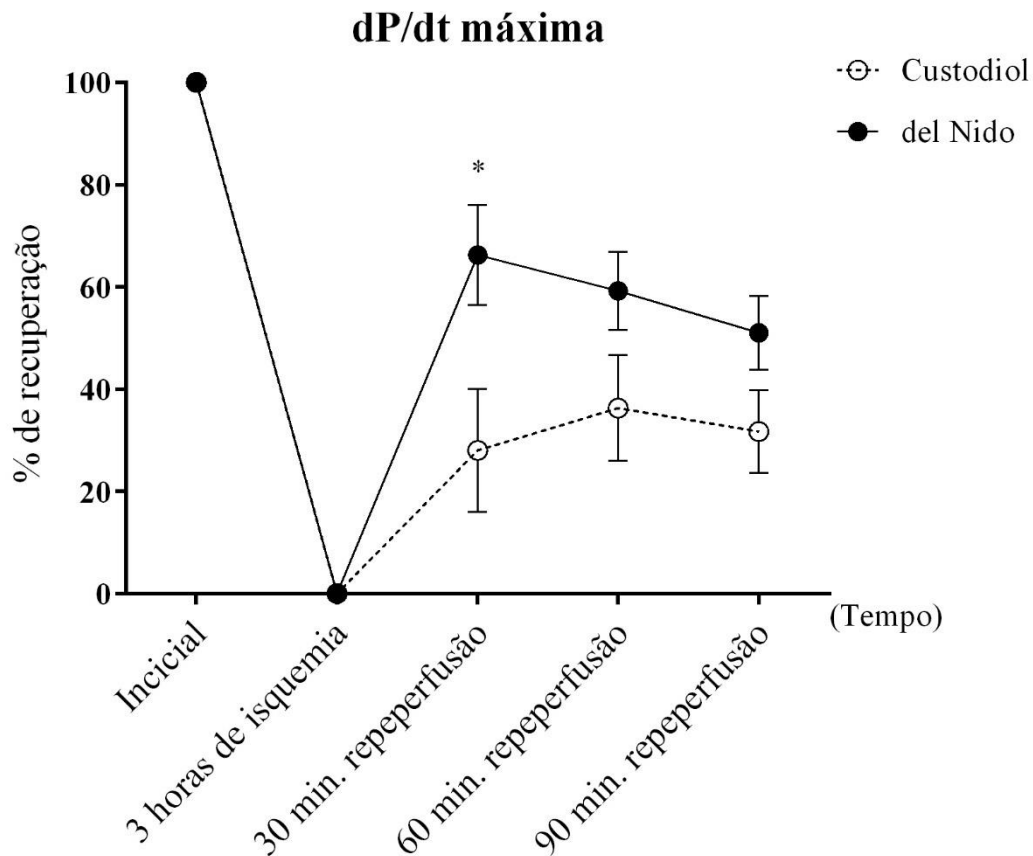
**Figura 6:** Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE). Todos os valores são expressos como média e SEM (barras de erro). As análises foram realizadas por 2-way ANOVA com o teste pós-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (\* $P < 0,05$ ). Seis animais por grupo.

A PDVE assim como PSVE demonstrou a recuperação superior com o grupo del Nido comparado ao grupo Custodiol ao longo do período de reperfusão (Figura 7).



**Figura 7:** Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE). Todos os valores são expressos como média e SEM (barras de erro). As análises foram realizadas por 2-way ANOVA com o teste pós-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (\* $P < 0,05$ ). Seis animais por grupo.

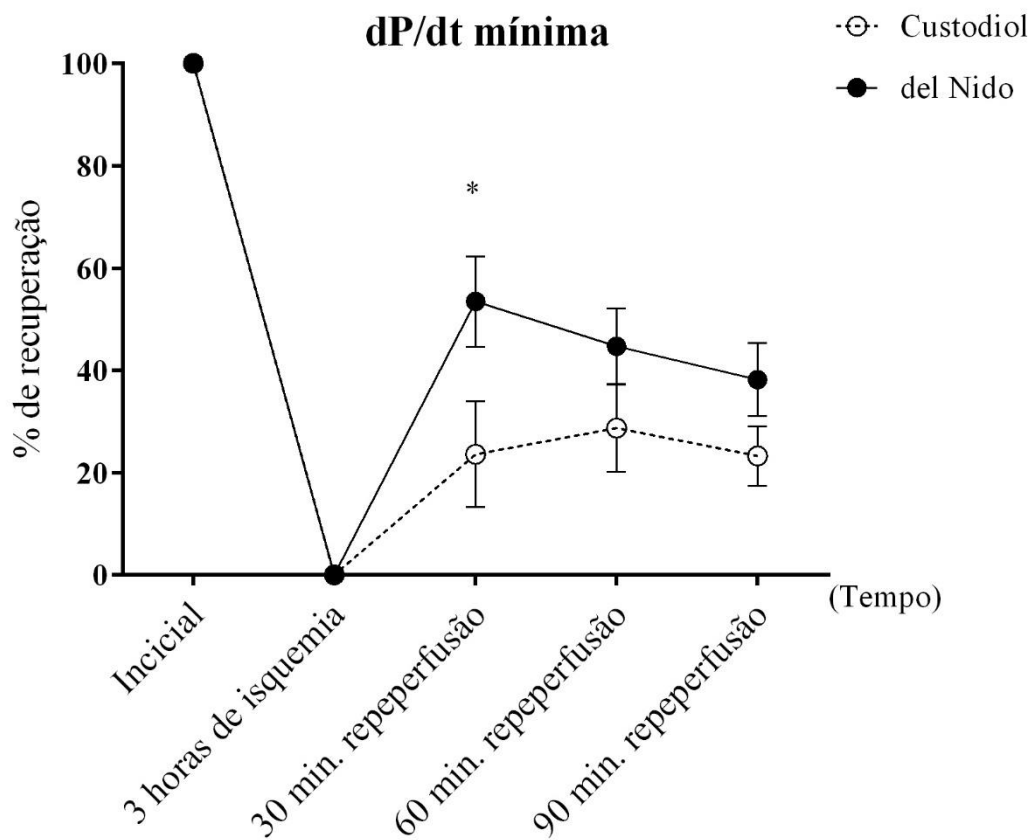
A porcentagem de recuperação ventricular esquerda de acordo com as medidas de contratilidade pela variável  $dP/dt$  máxima mostrou que o grupo del Nido teve recuperação ventricular superior comparado ao grupo Custodiol nos primeiros 30 minutos da reperfusão (Figura 8).



**Figura 8:** Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Derivada positiva máxima do ventrículo esquerdo ( $dP/dt$  máxima). Todos os valores são expressos como média e SEM (barras de erro). As análises foram realizadas por 2-way ANOVA com o teste pós-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (\* $P < 0,05$ ). Seis animais por grupo.

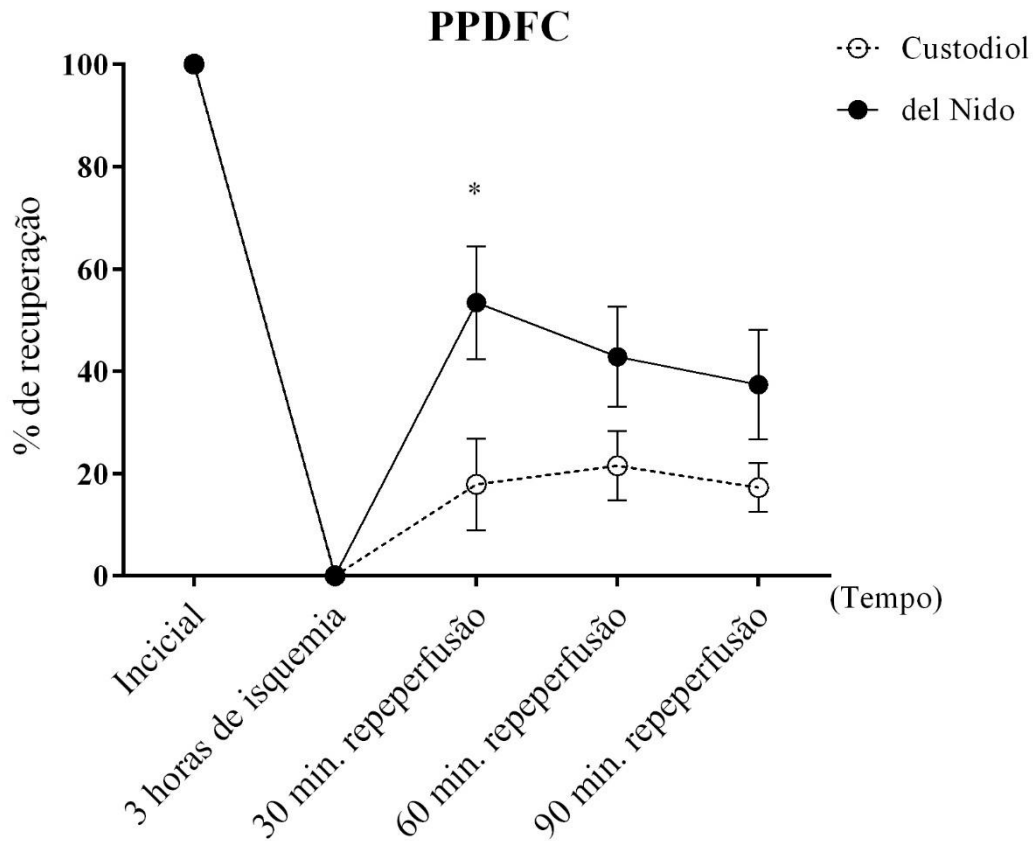


Os resultados  $dP/dt$  mínima foi semelhante a  $dP/dt$  máxima de acordo com a porcentagem de recuperação em que o grupo del Nido demonstrou recuperação ventricular superior comparado com o grupo Custodiol nos primeiros 30 minutos da reperfusão (Figura 9).



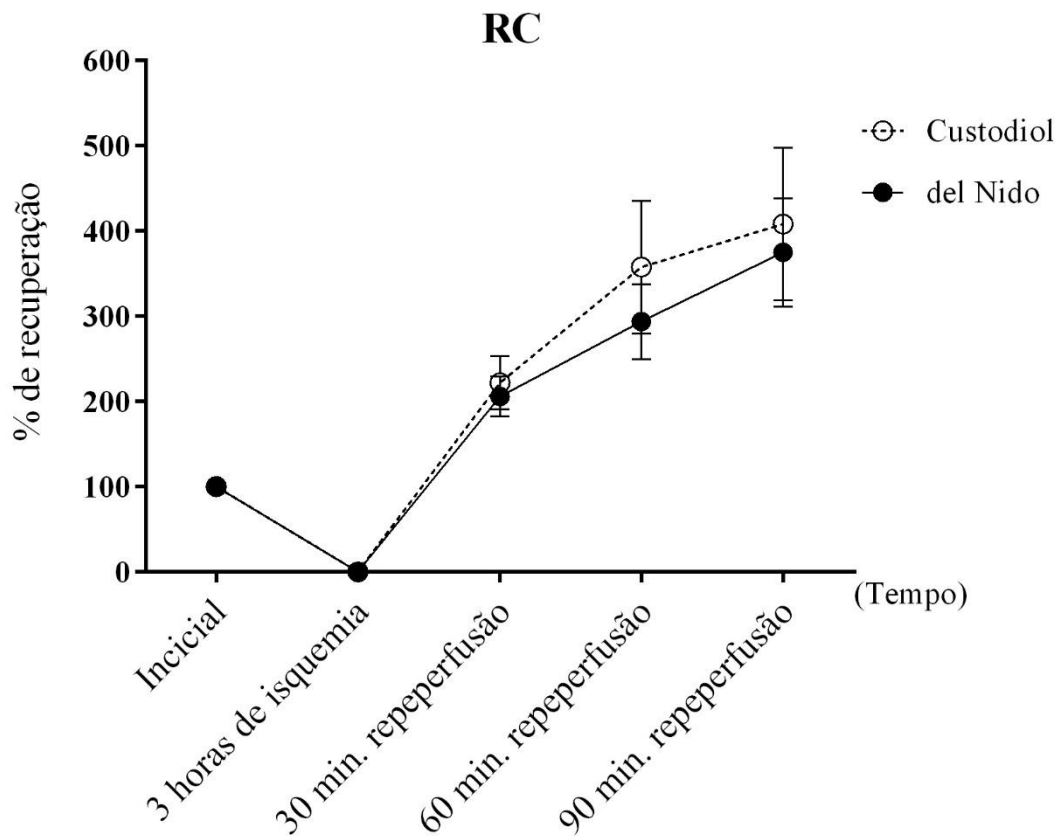
**Figura 9:** Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia, derivada positiva mínima do ventrículo esquerdo ( $dP/dt$  mínima). Todos os valores são expressos como média e SEM (barras de erro). As análises foram realizadas por 2-way ANOVA com o teste pós-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas ( $*P < 0,05$ ). Seis animais por grupo.

A PPDFC apresentou maior recuperação com o grupo del Nido em comparação com o grupo Custodiol nos primeiros 30 minutos de reperfusão (Figura 10)



**Figura 10:** Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Produto da pressão desenvolvida pela frequência cardíaca (PPDFC). Todos os valores são expressos como média e SEM (barras de erro). As análises foram realizadas por 2-way ANOVA com o teste pós-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (\* P <0,05). Seis animais por grupo.

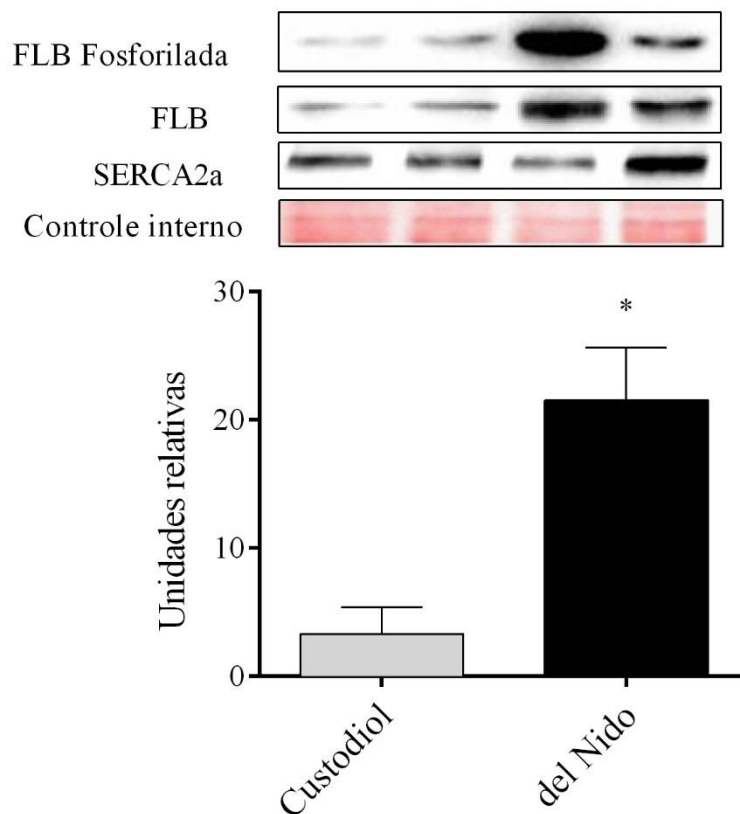
A análise da RC entre os grupos não demonstrou diferença durante o período de reperfusão (Figura 11).



**Figura 11:** Porcentagem de recuperação do ventrículo esquerdo após 3 horas de isquemia. Resistência coronária (RC). Todos os valores são expressos como média e SEM (barras de erro). As análises foram realizadas por 2-way ANOVA com o teste pós-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (\*  $P < 0,05$ ). Seis animais por grupo.

#### 4.2 Expressão de proteínas por Immunoblot

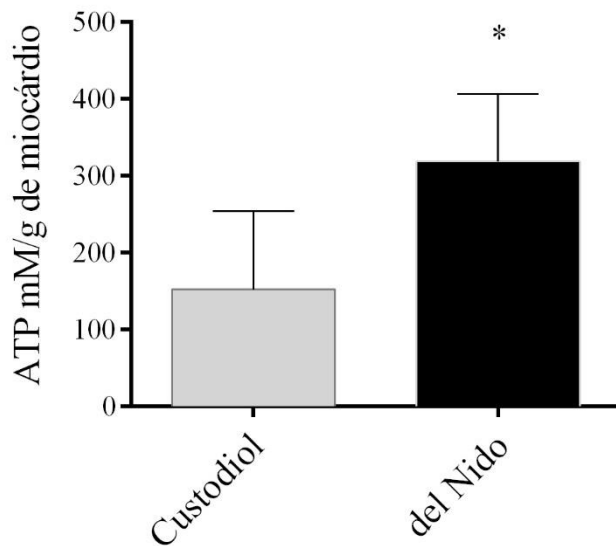
A expressão da proteína transmembranar SERCA2a foi normalizada pela expressão de fosfolambam em suas duas frações: totais (não fosforilada) e ativas (fosforiladas pela serina 16 e treonina 17). No entanto, a expressão da fosfolambam fosforilada foi marcadamente expressa com no grupo del Nido comparado ao grupo Custodiol (Figura 12).



**Figura 12:** Figura representativa dos resultados do ensaio de Immunoblot pela técnica de Western blot. Todos os valores são expressos como média  $\pm$  SEM (barras de erro) e unidades arbitrárias. As análises foram realizadas por teste não paramétrico t-student (\* $P < 0,05$ ). Quatro animais por grupo.

### 4.3 Concentração de ATP

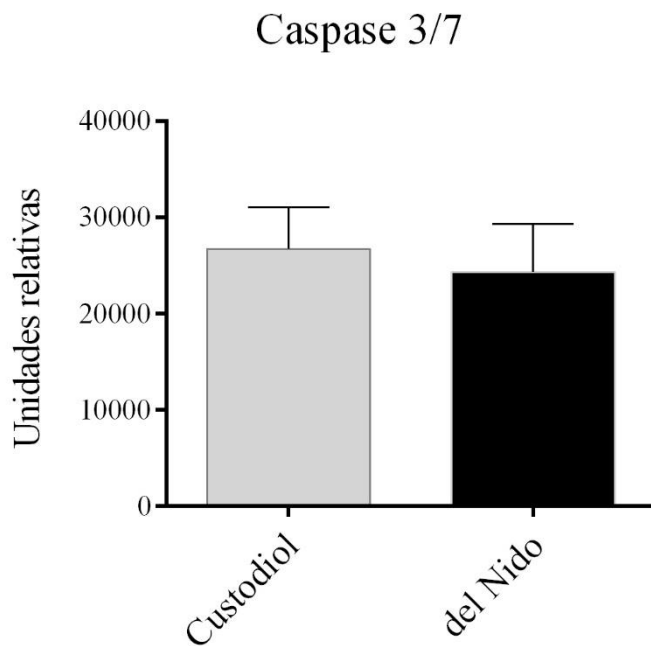
Os corações do grupo del Nido apresentaram níveis elevados de concentração de ATP no miocárdio em comparação ao grupo Custodiol após o período de 90 minutos de reperfusão (Figura 13).



**Figura 13:** Figura representativa dos resultados do ensaio de concentração de ATP pela técnica de bioluminescência. Todos os valores são expressos como média  $\pm$  SEM (barras de erro) e unidades arbitrárias. As análises foram realizadas por teste não paramétrico t-student ( $*P < 0,05$ ). Quatro animais por grupo.

#### 4.4 Atividade Caspase 3/7

A atividade das caspases 3/7 apresentaram níveis semelhantes nos grupos experimentais avaliados (Figura 14).



**Figura 14:** Figura representativa dos resultados do ensaio de atividade de caspases 3/7 pela técnica de bioluminescência. Todos os valores são expressos como média  $\pm$  SEM (barras de erro) e unidades arbitrárias. As análises foram realizadas por teste não paramétrico t-student ( $*P < 0,05$ ). Quatro animais por grupo.

## 5. DISCUSSÃO

A lesão provocada pela isquemia e reperfusão global inerente a cirurgia com parada cardíaca ou transplante, promove efeitos multifatoriais ao metabolismo celular miocárdico, tendo como um de seus desdobramentos o comprometimento da função contrátil do coração, o qual pode ser identificado pela síndrome de baixo débito cardíaco no período pós-operatório. Desde o ajuste da concentração de potássio para níveis reduzidos a partir das soluções cardioplégicas idealizadas pelos professores Lam e Melrose, a utilização deste método consagrou-se como o padrão de ouro proteção do miocárdio. A utilização de soluções cardioplégicas caracteriza-se como um meio tecnicamente “simples”, além de rápido e eficaz de conferir maior resistência do miocárdio contra a isquemia. No entanto, apesar de notório os benefícios atribuídos ao uso destas soluções, há ainda, a existência de variáveis como o tipo de veículo, composição e protocolo de administração/temperatura que se convergem em desafios para a padronização de um método ideal de proteção miocárdica que esteja ao alcance de todos os serviços de cirurgia.

As soluções cardioplégicas del Nido e Custodiol foram escolhidas devido a relevância clínica de ambas em procedimentos diversos associados operação cardíaca. Ademais, a importante capacidade que as soluções apresentam em proteger miocárdio com administração em dose única, característica que as distinguem das demais soluções cardioplégicas utilizadas em centros de cirurgia. Os resultados obtidos da avaliação de eficácia das soluções del Nido e Custodiol em induzir a parada cardíaca não divergiram em relação ao tempo em segundos contabilizado a partir do início da perfusão retrógrada via cânula aórtica até a completa assistolia do ventrículo esquerdo. A reversibilidade do efeito das soluções cardioplégicas, pôde ser avaliada por meio de análise do tempo em minutos a partir do retorno

da contratilidade espontânea dos corações reperfundidos com solução Krebs Henseleit *buffer*, entretanto, não houve diferença entre os grupos. Portanto, os dados obtidos validaram o desempenho de ambas soluções cardioplégicas como igualmente eficazes como método de parada cardíaca eletiva e reversível no modelo experimental utilizado.

As variáveis hemodinâmicas adquiridas por medida isovolumétrica e intraventricular através da inserção do balão de látex no ventrículo esquerdo, possibilitou avaliar o status contrátil dos corações tratados distintamente com as soluções cardioplégicas em estudo, após serem submetidos a parada cardíaca. A análise dos resultados expressa em porcentagem de recuperação, permite que as soluções del Nido e Custodiol possam ser comparadas quanto a capacidade em assegurar integridade funcional dos corações durante todo período de reperfusão. Os resultados da avaliação contrátil do ventrículo esquerdo após os corações serem mantidos em parada cardíaca durante 3 horas em isquemia fria a 4°C, demonstraram que o grupo experimental que recebeu a solução cardioplégica del Nido obteve a recuperação ventricular superior comparado ao grupo experimental que recebeu a solução cardioplégica Custodiol. De acordo com as variáveis hemodinâmicas PSVE e PDVE, os corações tratados com a solução del Nido obtiveram a porcentagem recuperação superior ao grupo de corações tratados com a solução Custodiol durante os 90 minutos do período de reperfusão. As variáveis hemodinâmicas  $dP/dt$  máxima e  $dP/dt$  mínima demonstraram que a porcentagem de recuperação se mostrou igualmente superior com os corações que receberam a solução cardioplégica del Nido nos primeiros 30 minutos do período de reperfusão comparado a solução cardioplégica Custodiol. A variável hemodinâmica PPDFC como um indicador de desempenho cardíaco aplicado especificamente em modelo experimental de corações isolados, apresentou porcentagem de recuperação superior com os corações que receberam solução cardioplégica del Nido nos primeiros 30 minutos do período de reperfusão comparado com os



corações que receberam a solução cardioplégica Custodiol. Portanto, de acordo com o método proposto a solução cardioplégica del Nido demonstrou maior potencial de proteção do miocárdio comparado a solução cardioplégica Custodiol. Porém, a resistência coronária dos corações que receberam a solução cardioplégica del Nido não demonstrou resultado diferente ao comparado com os corações que receberam a solução cardioplégica Custodiol, resultado este que evidencia que a diferença na recuperação contrátil dos corações ao receberem os dois tipos de soluções, origina de causas que diferem às relacionadas com a eventual disfunção dos vasos coronarianos.

Os resultados obtidos no presente estudo da função contrátil foram consistentes aos encontrados por Fannelop et al. em estudo comparativo com soluções cardioplégicas constituídas de veículos igualmente distintos (54). De acordo com o modelo descrito, os corações porcinos foram induzidos a parada cardíaca pela administração com dose única de solução cardioplégica Custodiol versus administração multidoses de solução cardioplégica sanguínea constituída por procaína durante 60 minutos de parada cardíaca. As variáveis hemodinâmicas de elastância máxima e a relação de trabalho sistólico foram superiores com a solução sanguínea e um menor nível de liberação de troponina-T, um marcador associado a lesão miocárdica, foram identificados após 3 horas de reperfusão (54).

A disfunção contrátil que acomete o miocárdio proveniente do processo provocado pela isquemia e reperfusão está diretamente associado com comprometimento da dinâmica do influxo de cálcio do meio citosólico para o interior do retículo sarcoplasmático, ou seja, quando a concentração do cálcio permanece elevada no citosol a fase de diastólica que pressupõe o relaxamento do músculo cardíaco torna-se prejudicada. Este processo promove a hipercontração das miofibrilas miocárdicas que pode ser intensificado devido a lesão

mitocondrial igualmente induzidos pela isquemia e reperfusão (50). Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que os corações que receberam a solução cardioplégica Custodiol apresentaram níveis reduzidos de concentração de ATP obtidos em extrato do tecido cardíaco após o período de 90 minutos de reperfusão comparado com os corações que receberam a solução cardioplégica del Nido. No trabalho de Yang et al. foi identificado que a solução cardioplégica Custodiol em sua formulação original pode resultar em danos ultra estruturais das mitocôndrias o que poderia gerar o déficit de produção de ATP durante o período de recuperação do miocárdio. O mesmo estudo identificou que a extensão deste danos pode ser reduzida com a associação farmacológica de um ativador dos canais de potássio, como forma de elevar o efeito protetor da solução cardioplégica ao miocárdio (42). A presença de fármacos adicionados a soluções cardioplégicas como alternativa para aumentar a proteção do miocárdio, tem sido viabilizada por estudos em modelos pré-clínicos, principalmente pela utilização de drogas com propriedades ativadoras ou inibitórias dos canais iônicos presentes na membrana celular dos cardiomiócitos. A solução cardioplégica del Nido faz uso desta estratégia farmacológica pelo ação da droga lidocaína a qual realiza o bloqueio seletivo e reversível dos canais de sódio, prevenindo demanda de energia das bombas iônicas e a levada depleção ATP precursoras da formação de edema e morte celular (43).

A apoptose, corresponde ao proeminente processo de morte celular programada e vital ao metabolismo, a qual por meio da eliminação de células ineficientes promove a manutenção da homeostasia. Este processo é iniciado a partir de estímulos de natureza tanto fisiológica quanto patológica (55). Contudo, se faz notório que eventos associados a isquemia e reperfusão do miocárdio também são capazes de induzir a progressão do processo apoptótico, evidenciados principalmente pela manifestação de doenças crônicas como a insuficiência cardíaca congestiva (56).

As caspases são proteases de cisteína, ou seja, proteases que possuem o sítio ativo em um resíduo de cisteína que promove a clivagem de resíduos de aspartato presente em diversas proteínas. Estas proteases figuram como uma das principais promotoras do processo de morte apoptótica, dividindo-se entre iniciadoras, caspases 2, 8, 9 e 10 e efetoras, caspases 3, 6 e 7 (57). No presente estudo, a avaliação da atividade das caspases 3/7 foi metodologicamente empregada a partir da premissa da importância destas proteases em estudos com modelo de isquemia e reperfusão (58, 59). Ao explorar o comportamento destas proteases após os corações serem submetidos a parada cardíaca induzida com as soluções cardioplégicas del Nido e Custodiol, objetivou-se identificar a diferença entre os dois tipos de proteção do miocárdio em razão do processo de desencadeamento de uma via diretamente associada a morte celular. Entretanto, a análise da atividade destas proteases demonstrou níveis semelhantes em ambas as soluções cardioplégicas após o período de 3 horas de isquemia e 90 minutos de reperfusão neste modelo. Os dados obtidos demonstram que o efeito deletério destas proteases iniciados pela isquemia e reperfusão não pode distinguir os dois diferentes tipos de soluções utilizadas, possivelmente pelo caráter agudo do modelo experimental. Todavia, os resultados podem indicar que duas soluções cardioplégicas com grande relevância clínica são equivalentes em relação atividade das caspases 3/7, levando-se em consideração o limite de detecção do modelo e do ensaio utilizado no estudo.

O processo de contração do miocárdio responsável pela efetivação do ciclo cardíaco (sístole e diástole), é determinado pela atividade de proteínas que participam respectivamente da dinâmica do cálcio entre o meio extracelular e o citosol, seguido pela dinâmica entre o citosol e o retículo sarcoplasmático. Embora muitas destas proteínas possam sofrer profunda alteração ao serem submetidas a isquemia e reperfusão, o particular acometimento da atividade da

proteína transmembranar (SERCA2a) está intimamente relacionado ao processo de disfunção contrátil do coração. A SERCA2a localizada no meio intracelular corresponde como a principal promotora da efetivação da fase diastólica a respeito de sua e função no processo de captura do cálcio do meio citosólico para o interior do retículo sarcoplasmático. Em condições fisiológicas normais nos seres humanos a taxa de permutação do cálcio é exercida > 70% da atividade desta proteína (60). Todavia, a atividade da SERCA2a permanece sob modulação da proteína fosfolambam por meio da constante interação entre ambas na membrana do retículo sarcoplasmático. O mecanismo desta interação molecular tem origem a partir do estímulo  $\beta$ -adrenérgico, o qual sinaliza aos receptores acoplados a proteína G presente na membrana plasmática à formação no interior da célula de 3'-5' adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e de proteína quinase A (PKA) responsável pela fosforilação da fosfolambam e o consequente aumento da afinidade da SERCA2a aos íons de cálcio (60). Ou seja, a ativação da fosfolambam está diretamente associada a contratilidade pela redução da concentração do cálcio no citosol durante a diástole repercutindo no efeito lusitrópico positivo importante à função cardíaca (61).

Portanto, a manutenção do manejo do cálcio por meio da atividade do complexo SERCA2a/fosfolambam apresenta-se como fundamentalmente importante em estudos associados a recuperação contrátil após cirurgia cardíaca, ressuscitação cardíaca e de métodos que preveem a reperfusão do miocárdio (29, 30, 62-64). Em vista disto, os estudos aplicados à utilização de solução cardioplégica na indução da parada cardíaca podem ser beneficiados com técnicas de biologia molecular na avaliação da dinâmica do cálcio. A análise do status de ativação da fosfolambam respalda outros dados a respeito dos movimentos de contração do coração auxiliando na interpretação do desempenho contrátil. No presente estudo, a utilização da solução cardioplégica del Nido, demonstrou maior ativação da fosfolambam comparada a solução cardioplégica Custodiol correspondendo aos índices superiores das variáveis

hemodinâmicas PSVE e PDVE, durante todo período reperfusão avaliado. Contudo, os índices  $dP/dt$  máxima e  $dP/dt$  mínima associados a contratilidade apresentaram níveis de recuperação superior apenas nos 30 minutos de reperfusão, mesmo com os índices elevados da ativação da fosfolambam pela solução del Nido. No entanto, experimentos com perfusão isolada podem sofrer deterioração gradativa principalmente após a indução isquêmica. As medidas de  $dP/dt$  máxima e  $dP/dt$  mínima adquiridas de ambos os grupos experimentais podem ter sofrido influência do modelo experimental utilizado, promovendo incapacidade de verificação de diferença da recuperação funcional após ao longo do período de 90 minutos de reperfusão.

O presente estudo realizou análise comparativa das soluções cardioplégicas del Nido versus Custodiol com a avaliação da dinâmica cálcio intracelular por meio da expressão da fração ativa da fosfolambam. Não foram encontrados relatos na literatura sobre a investigação deste mecanismo molecular em estudos relacionados a soluções cardioplégicas, de modo controverso a importância de que estas proteínas representam para o ciclo cardíaco. A recuperação da função contrátil ventricular após a isquemia e reperfusão é dependente da integridade das vias moleculares associadas a dinâmica do cálcio. A fosforilação da fosfolambam é intensamente afetada nos eventos isquêmicos, em face disto, sua preservação corresponde a um importante alvo terapêutico na recuperação de corações submetidos a cirurgia cardíaca ou em procedimentos que preveem um longo período de isquemia, como o transplante de coração.

## **6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

O modelo experimental de perfusão em coração isolado de acordo com a técnica clássica de Langendorff, apresenta desafios inerente a qualquer modelo experimental que utilize soluções distintas de sangue para a perfusão de órgãos. No entanto, este modelo tem sido amplamente utilizado e relatado na literatura científica de estudos com soluções protetoras e modelos de isquemia e reperfusão.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo identificou níveis elevados de ativação da fosfolambam após o período prolongado de isquemia com a solução cardioplégica del Nido em comparação com a solução cardioplégica Custodiol. A fosfolambam é uma proteína com papel substancial no controle da entrada do cálcio do meio citosólico para o interior retículo sarcoplasmático por meio do controle da atividade da SERCA2a. O aumento da a captação de cálcio devido a fosforilação da fosfolambam está associado a recuperação da função contrátil após isquemia, o qual foi demonstrado no presente trabalho, sofrer influência de acordo com os diferentes métodos de proteção miocárdica provida pelas soluções cardioplégicas em estudo. A solução cardioplégica del Nido, demonstrou maior concentração de ATP presentes no extrato total do tecido e variáveis hemodinâmica demonstrando maior recuperação contrátil dos corações em consonância com elevada atividade do complexo fosfolambam/SERCA comparado a solução cardioplégica Custodiol. Os resultados demonstram que a via molecular associada a fosfolambam e SERCA2a pode representar um importante alvo terapêutico em estudos direcionados a comparação entre soluções cardioplégicas, considerando a importância do mecanismo para a contratilidade cardíaca.

## REFERÊNCIAS

1. Dobson GP, Faggian G, Onorati F, Vinten-Johansen J. Hyperkalemic cardioplegia for adult and pediatric surgery: end of an era? *Frontiers in physiology*. 2013;4:228.
2. Bhakri K, Mulholland J, Punjabi P. Understanding innovations in the evolving practice of blood and crystalloid cardioplegia. *Perfusion*. 2014.
3. Moore B. In Memory of Sidney Ringer [1835-1910]: Some account of the Fundamental Discoveries of the Great Pioneer of the Bio-Chemistry of Crystallo-colloids in Living Cells. *The Biochemical journal*. 1911;5(6-7):i.b3-xix.
4. Ringer S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *The Journal of physiology*. 1883;4(1):29-42.3.
5. Yamamoto H, Yamamoto F. Myocardial protection in cardiac surgery: a historical review from the beginning to the current topics. *General thoracic and cardiovascular surgery*. 2013;61(9):485-96.
6. Cooley DA, Reul GJ, Wukasch DC. Ischemic contracture of the heart: "stone heart". *The American journal of cardiology*. 1972;29(4):575-7.
7. Lam CR, Gahagan T, Sergeant C, Green E. Clinical Experiences with Induced Cardiac Arrest During Intracardiac Surgical Procedures. *Annals of Surgery*. 1957;146(3):439-48.
8. Oliveira MABd, Godoy MFd, Braile DM, Lima-Oliveira APMd. Solução cardioplégica polarizante: estado da arte. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2005;20:69-74.
9. Melrose DG, Dreyer B, Bentall HH, Baker JB. Elective cardiac arrest. *Lancet*. 1955;269(6879):21-2.
10. Gerbode F, Melrose D. The use of potassium arrest in open cardiac surgery. *American journal of surgery*. 1958;96(2):221-7.



11. Chambers DJ, Fallouh HB. Cardioplegia and cardiac surgery: pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;127(1):41-52.
12. Tyers GF, Manley NJ, Williams EH, Shaffer CW, Williams DR, Kurusz M. Preliminary clinical experience with isotonic hypothermic potassium-induced arrest. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1977;74(5):674-81.
13. Bretschneider HJ, Hubner G, Knoll D, Lohr B, Nordbeck H, Spieckermann PG. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *The Journal of cardiovascular surgery*. 1975;16(3):241-60.
14. Roe BB, Hutchinson JC, Fishman NH, Ulliyot DJ, Smith DL. Myocardial protection with cold, ischemic, potassium-induced cardioplegia. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1977;73(3):366-74.
15. Gay WA, Jr., Ebert PA. Functional, metabolic, and morphologic effects of potassium-induced cardioplegia. *Surgery*. 1973;74(2):284-90.
16. Lin H, Mo A, Zhang F, Huang A, Wen Z, Ling S, et al. Donor heart preservation in an empty beating state under mild hypothermia. *The Annals of thoracic surgery*. 2010;89(5):1518-23.
17. Chambers DJ. Polarization and myocardial protection. *Current opinion in cardiology*. 1999;14(6):495-500.
18. Chambers DJ. Mechanisms and alternative methods of achieving cardiac arrest. *The Annals of thoracic surgery*. 2003;75(2):S661-6.
19. Rosenkranz ER, Buckberg GD. Myocardial protection during surgical coronary reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology*. 1983;1(5):1235-46.
20. Brandi AC, Oliveira MABd, Santos CA, Botelho PHH, Cortez JLL, Braile DM. Modes of induced cardiac arrest: hyperkalemia and hypocalcemia - literature review. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 2014.

21. Ota T, Yerebakan H, Neely RC, Mongero L, George I, Takayama H, et al. Short-term outcomes in adult cardiac surgery in the use of del Nido cardioplegia solution. *Perfusion*. 2016;31(1):27-33.
22. Egar J, Ali A, Howlett SE, Friesen CH, O'Blenes S. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor SEA0400 limits intracellular Ca<sup>2+</sup> accumulation and improves recovery of ventricular function when added to cardioplegia. *Journal of cardiothoracic surgery*. 2014;9:11.
23. Chambers DJ, Hearse DJ. Developments in cardioprotection: "polarized" arrest as an alternative to "depolarized" arrest. *The Annals of thoracic surgery*. 1999;68(5):1960-6.
24. Maruyama Y, Chambers DJ, Ochi M. Future perspective of cardioplegic protection in cardiac surgery. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*. 2013;80(5):328-41.
25. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*. 2001;104(24):2981-9.
26. Camici PG, Prasad SK, Rimoldi OE. Stunning, hibernation, and assessment of myocardial viability. *Circulation*. 2008;117(1):103-14.
27. Ginther RM. Del Nido Cardioplegia: Elixir of Choice for Pediatric Myocardial Protection. *The Journal of extra-corporeal technology*. 2016;48(2):P21-4.
28. Mattiazzi A, Kranias EG. CaMKII regulation of phospholamban and SR Ca<sup>2+</sup> load. *Heart Rhythm*. 2011;8(5):784-7.
29. Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovascular research*. 2005;68(3):366-75.
30. Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K. Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca<sup>2+</sup>(+) overload. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;53(2):233-9.

31. Groenewoud AF, Buchholz B, Gubernatis F, Holscher M, Hoyer J, Isemer F, et al. First results of the multicenter study of HTK protection for kidney transplants. *Transplantation proceedings*. 1990;22(5):2212.
32. Holscher M, Groenewoud AF. Current status of the HTK solution of Bretschneider in organ preservation. *Transplantation proceedings*. 1991;23(5):2334-7.
33. Rudd DM, Dobson GP. Early reperfusion with warm, polarizing adenosine-lidocaine cardioplegia improves functional recovery after 6 hours of cold static storage. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;141(4):1044-55.
34. 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.
35. Edelman JJ, Seco M, Dunne B, Matzelle SJ, Murphy M, Joshi P, et al. Custodiol for myocardial protection and preservation: a systematic review. *Annals of cardiothoracic surgery*. 2013;2(6):717-28.
36. Matte GS, del Nido PJ. History and use of del Nido cardioplegia solution at Boston Children's Hospital. *The Journal of extra-corporeal technology*. 2012;44(3):98-103.
37. Guajardo Salinas GE, Nutt R, Rodriguez-Araujo G. Del Nido cardioplegia in low risk adults undergoing first time coronary artery bypass surgery. *Perfusion*. 2017;32(1):68-73.
38. Kim K, Ball C, Grady P, Mick S. Use of del Nido Cardioplegia for Adult Cardiac Surgery at the Cleveland Clinic: Perfusion Implications. *The Journal of extra-corporeal technology*. 2014;46(4):317-23.
39. Mongero LB. Del Nido Cardioplegia—Not Just Kids Stuff. *The Journal of extra-corporeal technology*. 2016;48(2):P25-8.

40. Najjar M, George I, Akashi H, Nishimura T, Yerebakan H, Mongero L, et al. Feasibility and safety of continuous retrograde administration of Del Nido cardioplegia: a case series. *Journal of cardiothoracic surgery*. 2015;10:176.
41. Yerebakan H, Sorabella RA, Najjar M, Castillero E, Mongero L, Beck J, et al. Del Nido Cardioplegia can be safely administered in high-risk coronary artery bypass grafting surgery after acute myocardial infarction: a propensity matched comparison. *Journal of cardiothoracic surgery*. 2014;9:141.
42. Dobson GP, Jones MW. Adenosine and lidocaine: a new concept in nondepolarizing surgical myocardial arrest, protection, and preservation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2004;127(3):794-805.
43. Govindapillai A, Hua R, Rose R, Friesen CH, O'Blenes SB. Protecting the aged heart during cardiac surgery: Use of del Nido cardioplegia provides superior functional recovery in isolated hearts. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2013;146(4):940-8.
44. O'Blenes SB, Friesen CH, Ali A, Howlett S. Protecting the aged heart during cardiac surgery: The potential benefits of del Nido cardioplegia. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;141(3):762-70.
45. Betrian Blasco P, Antunez Jimenez MI, Falcon Gonzalez LH, Suarez Cabrera P. Neonatal life-threatening arrhythmia responding to lidocaine, a probable LQTS3. *International journal of cardiology*. 2007;117(2):e61-3.
46. Rudd DM, Dobson GP. Eight hours of cold static storage with adenosine and lidocaine (Adenocaine) heart preservation solutions: toward therapeutic suspended animation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;142(6):1552-61.
47. Yamine M, Neely RC, Loberman D, Rajab TK, Grewal A, McGurk S, et al. The Use of Lidocaine Containing Cardioplegia in Surgery for Adult Acquired Heart Disease. *J Card Surg*. 2015;30(9):677-84.

48. Sipido KR, Casadei B, Holvoet P, Janssens S, Luttun A, Sampaolesi M. Bedside to bench: a look at experimental research with a clinical trial checklist. *Cardiovascular research*. 2014;101(1):1-3.
49. Zimmer HG. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 1998;13:203-10.
50. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2000;41(6):613-27.
51. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;50(6):940-50.
52. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2007;55(2):113-26.
53. Reichert K, Pereira do Carmo HR, Galluce Torina A, Diogenes de Carvalho D, Carvalho Sposito A, de Souza Vilarinho KA, et al. Atorvastatin Improves Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction by Interfering with Collagen Metabolism. *PloS one*. 2016;11(11):e0166845.
54. Fannelop T, Dahle GO, Salminen PR, Moen CA, Matre K, Mongstad A, et al. Multidose cold oxygenated blood is superior to a single dose of Bretschneider HTK-cardioplegia in the pig. *The Annals of thoracic surgery*. 2009;87(4):1205-13.
55. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:383-424.
56. Merkle S, Frantz S, Schon MP, Bauersachs J, Buitrago M, Frost RJ, et al. A role for caspase-1 in heart failure. *Circulation research*. 2007;100(5):645-53.
57. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(6).

58. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology*. 2000;1(6):489-95.
59. Galluzzi L, Lopez-Soto A, Kumar S, Kroemer G. Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(2):221-31.
60. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(7):566-77.
61. Lim CC, Liao R, Varma N, Apstein CS. Impaired lusitropy-frequency in the aging mouse: role of Ca(2+)-handling proteins and effects of isoproterenol. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 1999;277(5):H2083-h90.
62. Duffy JY, Petrucci O, Baker RS, Lam CT, Reed CA, Everman DJ, et al. Myocardial function after fetal cardiac bypass in an ovine model. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;141(4):961-8, 8 e1.
63. Huang Y, He Q, Zhan L, Yang M. Sarcoplasmic phospholamban protein is involved in the mechanisms of postresuscitation myocardial dysfunction and the cardioprotective effect of nitrite during resuscitation. *PloS one*. 2013;8(12):e82552.
64. Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(1):39-50.

## ANEXOS

Parecer referente a aprovação do Comitê de Ética no uso de animais.



UNICAMP

CEUA/Unicamp

---

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "**Ação de agentes químicos na isquemia e reperfusão miocárdica**" (protocolo nº **2428-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Orlando Petrucci Jr.**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **06 de junho de 2011**.

Campinas, 25 de julho de 2011.  
2ª. VIA

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva