

Análise da preservação do miocárdio após administração de N-2 mercaptopropionilglicina em modelo experimental de isquemia e reperfusão em cães*

Analysis of myocardial preservation after N2-mercaptopropionylglicin administration in an experimental model of ischemy and reperfusion in dogs

**Bernardo Mazzini Ketzer⁽¹⁾, Andre Feldman⁽¹⁾, Rony Grabarz⁽¹⁾,
Abrão Abuhab⁽²⁾, Carlos Gun⁽²⁾, Fabio Augusto de Luca⁽³⁾,
Emílio Abdo⁽⁴⁾**

Ketzer BM, Feldman A, Grabarz R, Abuhab A, Gun C, Luca FA, Abdo E. Análise da preservação do miocárdio após administração de N2-mercaptopropionilglicina em modelo experimental de isquemia e reperfusão em cães. Rev Med (São Paulo). 2004 jan.-jun.;83(1-2):33-45.

RESUMO: As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morbi-mortalidade da atualidade, sendo a doença arterial coronariana seu maior expoente. Novos conhecimentos fisiopatológicos indicam outros mecanismos para injúria miocárdica, ainda pouco estudados. O objetivo desse trabalho é analisar o efeito da N2-Mercaptopropionilglicina (N2-MPG) como agente protetor do miocárdio durante a isquemia/reperfusão, com base na preservação da área de necrose. Foram utilizados 16 cães alocados em dois grupos de oito cães cada: Grupo I (N2-MPG) e Grupo II (controle). Após a reprodução experimental de infarto agudo do miocárdio, os corações foram corados (TTC/Azul de Evans) e pesados para análise da preservação do miocárdio. Os resultados, em relação à preservação da área de necrose, foram: Grupo I (73,14%) e Grupo II (49,98%) através do método de Mann-Whitney. A redução da área de necrose obtida neste estudo apresentou diferença estatística significativa entre os grupos mostrando uma redução média de 23,16%, concluindo-se que a N2-MPG possui efeito protetor durante a isquemia/reperfusão do miocárdio.

DESCRITORES: Miocárdio. Mercaptopropionilglicina/farmacologia. Cães. Infarto do miocárdio. Antioxidantes/uso terapêutico. Modelos animais de doenças. Reperfusão miocárdica/métodos.

*Menção honrosa na área básica do XX COMU.

⁽¹⁾ Acadêmicos do 3º ano da Faculdade de Medicina de Santo Amaro.

⁽²⁾ Acadêmico do 5º ano da Faculdade de Medicina de Santo Amaro.

⁽³⁾ Médico Cardiologista Preceptor da Faculdade de Medicina de Santo Amaro.

⁽⁴⁾ Professor Titular da Disciplina de Cardiologia da Faculdade de Medicina de Santo Amaro.

Endereço para correspondência: Bernardo Mazzini Ketzer. Alameda dos Anapurus, 1790, apart. 12. CEP 04087-007. Moema, São Paulo, SP.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morbimortalidade da atualidade, sendo responsáveis por aproximadamente 45% das mortes da população geral. No Brasil ocorrem em cerca de 300.000 pessoas por ano, correspondendo a 820 óbitos por dia e 16,2% do total de gastos do Sistema Único de Saúde^{1,2}.

Nos Estados Unidos, a doença arterial coronariana (DAC) afeta cerca de sete milhões de pessoas, representando um custo anual de aproximadamente 14 bilhões de dólares, sendo responsável por quase metade dos óbitos que ocorrem naquele país¹.

A DAC caracteriza-se por um desequilíbrio entre a demanda e a oferta de suprimento sangüíneo ao miocárdio, e tem como principal etiologia o processo aterosclerótico (Figura 1)^{1,3}. Em decorrência da instabilização da placa ateromatosa (Figura 2) instala-se a Síndrome Coronariana Aguda (SCA), englobando angina instável, infarto agudo de miocárdio (IAM), e morte súbita³.

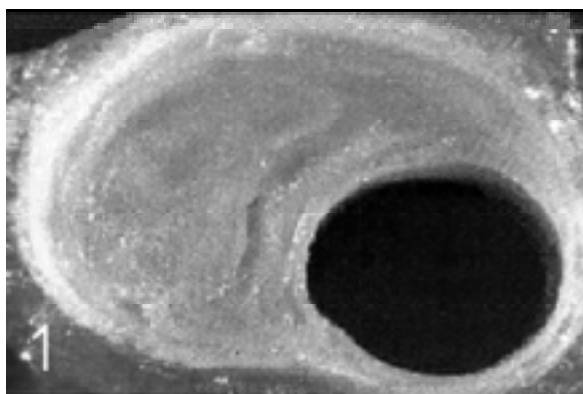


Figura 1. Corte de artéria coronária humana com placa ateromatosa.

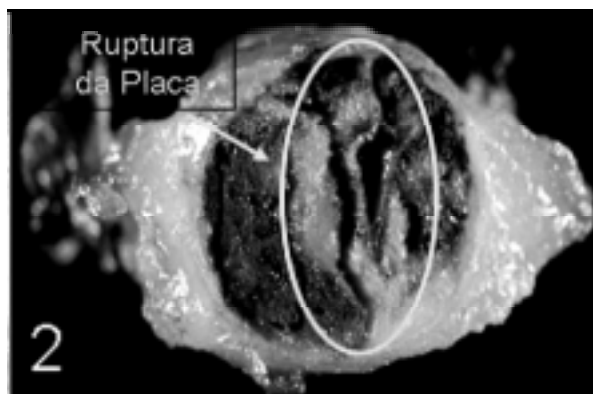


Figura 2. Corte de artéria coronária mostrando instabilidade da placa ateromatosa, sua ruptura, formação de trombo e agregação plaquetária.

Atualmente, o tratamento da SCA dispõe de procedimentos cirúrgicos, percutâneos e um amplo arsenal clínico, visando a antiagregação plaquetária, fibrinólise, vasodilatação coronariana, diminuição do consumo de oxigênio pelo miocárdio e anticoagulação, com o objetivo de se restabelecer o equilíbrio entre oferta e demanda miocárdica^{4,5}.

Os avanços no conhecimento fisiopatológico da SCA indicam outros mecanismos para injúria miocárdica, como a disfunção endotelial, microembolizações e o estresse oxidativo⁶. Embora a reperfusão miocárdica seja um objetivo indiscutível, o restabelecimento do fluxo pode induzir a mecanismos deletérios. Como exemplo, a ativação da peroxidação lipídica com conseqüente produção de radicais livres de O₂ e hidroxila (OH⁻)⁷.

Radicais livres são produzidos normalmente pelo metabolismo aeróbio sendo que em situações de isquemia-reperfusão essa produção é exacerbada levando a maior grau de lesão⁸. A possibilidade de combater esses efeitos deletérios incentivou diversos autores a buscarem substâncias e soluções antioxidantes objetivando o progresso no tratamento do infarto agudo do miocárdio^{9,10}.

O mecanismo de lesão celular mediada por radicais livres, reações de óxido-redução, foi estudado por diversos autores entre eles: McCord e Fridovch²² e Sanfey et al.³¹.

A N2-Mercaptopropionilglicina (N2-MPG), potente tiol inibidor da síntese de radicais superóxidos, tem sido testada como terapêutica adjuvante dos processos de isquemia/reperfusão em diversos órgãos, como fígado¹¹, pâncreas¹², pulmão¹³, e principalmente no coração^{14,15,16,17,18} freqüentemente acometido por tal processo.

OBJETIVO

Analisar o efeito da N2-MPG na preservação do miocárdio durante a fase de isquemia/reperfusão, em modelo experimental de infarto agudo em cães.

MATERIAL E MÉTODO

Amostra

Dezesseis cães machos, da raça *Canis familiaris*, com idade aproximada de 4 a 6 anos, peso variando entre 12 kg e 16 kg provenientes do Biotério Central.

Os cães receberam ração padrão *ad libitum* e mantidos em jejum alimentar de 12 horas antes da realização do experimento.

Os animais foram submetidos à avaliação pré-operatória rigorosa do estado clínico geral, da hidratação, da perfusão periférica, frequência respiratória, frequência cardíaca e eletrocardiograma (ECG) constando análise clínica, sendo que os animais fora dos quesitos de normalidade excluídos do estudo.

Delineamento experimental

Foram divididos aleatoriamente em dois grupos (I e II), sendo:

Grupo I - Composto por 8 animais, submetidos a infusão de solução de N2-MPG (via intravenosa);

Grupo II - Composto de 8 animais, submetidos a infusão de solução salina a 0,9% (Quadro 1).

Quadro 1 - Distribuição dos animais nos respectivos grupos.

Grupo	Grupo I (N2-MPG)	Grupo II
Módulo n=16	8	8

Procedimento operatório

Foi realizada pré-anestesia com Ketamina via intra-muscular na dose de 25 mg/kg, para obtenção de acesso venoso periférico.

Os cães foram anestesiados com Propofol, via intravenosa, na dose de 5 mg/kg/h e Ketamina via intravenosa na dose de 20 mg/kg/h.

Os animais foram intubados e mantidos em ventilação mecânica com respiradores Takaoka HB - Galant 4000, com controle da saturação de oxigênio durante o experimento.

Antes do início do procedimento foi realizada análise com ECG a fim de determinar traçado de controle.

Foi realizada tricotomia da região torácica seguida de assepsia e incisão em quarto espaço intercostal direito com cerca de 15 cm, chegando-se à cavidade torácica.

Após visualização das estruturas mediastinais e posterior localização do saco pericárdico, foi realizada abertura do mesmo com exposição do coração.

Feita a localização da artéria coronária

descendente anterior, seguida do isolamento e posterior dissecação do seguimento distal à emergência do primeiro ramo diagonal (Figura 3). Nesse local realizou-se o clampeamento e conseqüente isquemia da parede anterior do coração do cão.

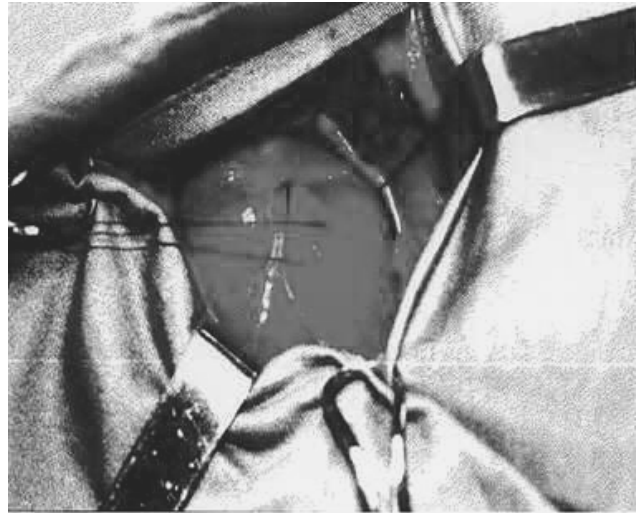


Figura 3. Localização anatômica do procedimento.

Para a oclusão da artéria descendente anterior utilizou-se sistema com fio de mercilene 3.0 e cateter de polietileno, de maneira que o fio tracionado foi fixado ao cateter e preso com uma pinça de Cocker (Figura 4), causando interrupção total do fluxo sanguíneo da determinada artéria por 90 minutos.

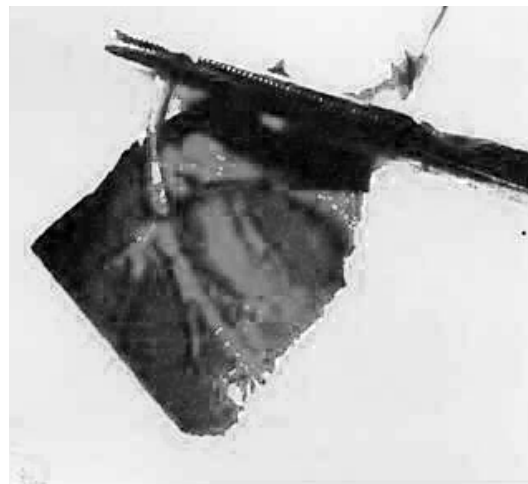


Figura 4. Clampeamento.

Quinze minutos antes da reabertura do fluxo foi iniciada a administração das soluções por veia periférica.

No grupo I, os animais receberam N2-MPG (100mg/kg/h) na concentração de 20mg/mL. No do grupo II, solução salina a 0,9% pela mesma via, com volume correspondente ao da N2-MPG.

As soluções foram administradas por 3 horas. O tempo de reperfusão observado foi de 3 horas, sendo realizado ECG no início do período de reperfusão.

Os cães foram sacrificados no fim das 3 horas com a administração de KCl 19,1% 0.5 mL/kg. Os

corações foram extraídos para uma análise macroscópica quantitativa da massa necrosada através de corantes. As áreas limítrofes entre o tecido isquêmico e o tecido necrosado foram submetidas a um estudo microscópico para a comprovação da necrose miocárdica.

Aleatoriamente animais representantes de cada grupo foram submetidos a coronariografia demonstrando a efetividade da oclusão da coronária (Figura 5).

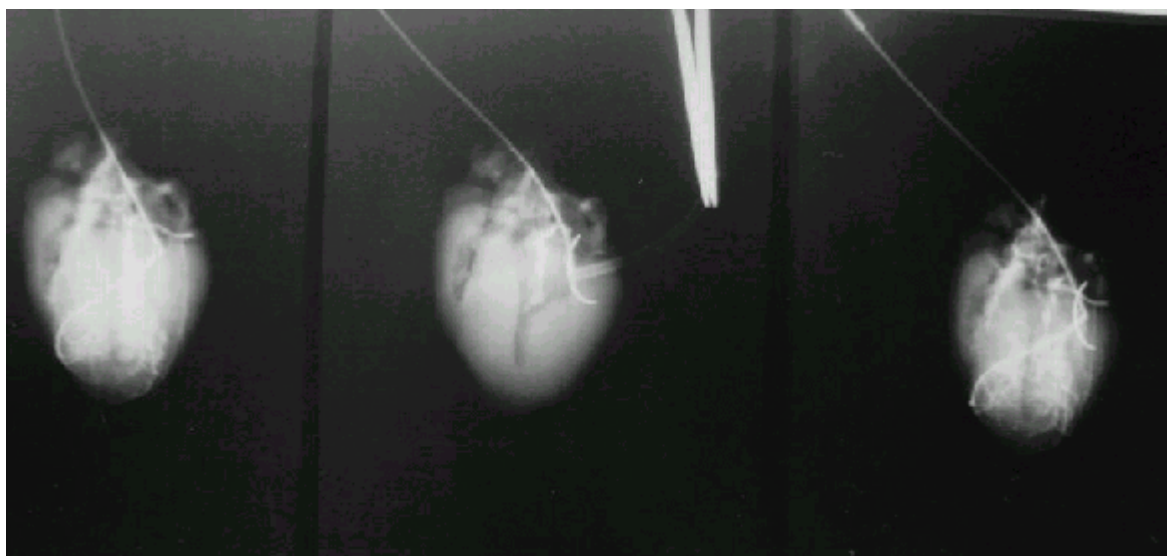


Figura 5. Angiocoronariografia, mostrando: A) perfusão normal; B) clameamento; C) reabertura do fluxo.

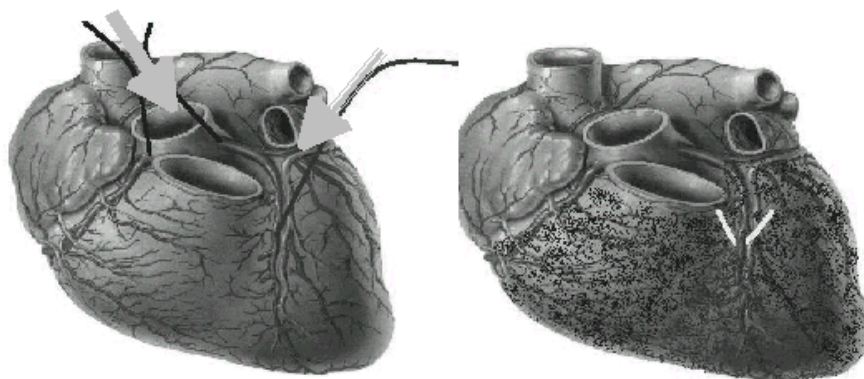
DETERMINAÇÃO DE ÁREA DE RISCO E NECROSE

As áreas de risco e necrose miocárdica foram avaliadas ao final de cada experimento, por uma técnica adaptada da descrita por Jolly et al.¹⁸.

Após o sacrifício do animal, o coração foi retirado sendo o mesmo suspenso em banho com soro fisiológico a 37°C. A artéria coronária descendente anterior foi canulada com cateter de polietileno imedia-

tamente após o local onde se realizou a oclusão. Os óstios coronarianos foram canulados com cateteres de polietileno através da raiz da aorta (Figura 6).

Injetou-se pelo cateter aórtico uma solução de Azul de Evans (0,5%), e simultaneamente, pelos cateteres coronários uma solução de cloreto de trifetil tetrazóico (TTC) (1,5%) ambos durante 5 minutos. A pressão média de perfusão foi mantida constante (100mmHg) nos três vasos durante a infusão (Figura 7).



Figuras 6 e 7. Mostrando procedimento usado para coloração.

Ao final do procedimento, o coração foi cortado em fatias transversais de 1,0 cm, do ápice para a base (Figura 8). As zonas ventriculares não isquêmicas foram

delimitadas em negro. A zona irrigada pela artéria coronária descendente anterior (área de risco) é marcada pelo cinza. A área de necrose permanece pálida (Figuras 8, 9 e 10).



Figura 8. Coração em fatias de 1 cm.



Figura 9. Fatia corada.

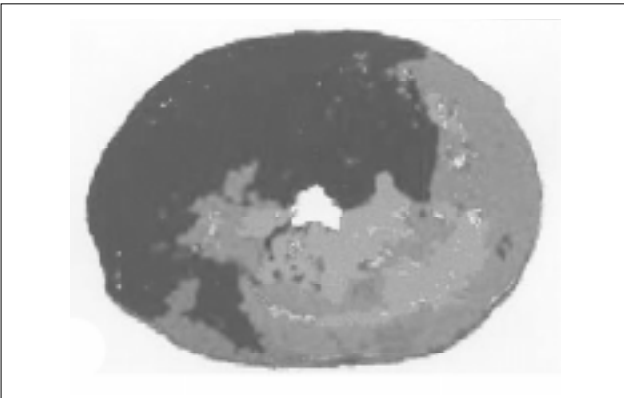


Figura 10. Marcação pelo scanner.

As fatias obtidas constituídas por pedaços de 1 cm de altura foram escaneadas (Figura 11) e separadas por cortes de acordo com a coloração macroscópica. Utilizou-se balança de precisão (OHAOS Analytic Standart AS-200) para pesagem das massas de necrose, risco e normoperfundidas.

As bordas das áreas de necrose foram, então, separadas para estudo microscópico utilizando-se, para coloração, corantes de hematoxilina/eosina.

A área de risco abrangeu a área irrigada pela artéria clampeada durante o procedimento cirúrgico. A preservação miocárdica será expressa através da relação abaixo.

$$\text{Preservação miocárdica} = \frac{\text{AR} - \text{AN}}{\text{AR}} \times 100$$

AR = área de risco; AN= área de necrose

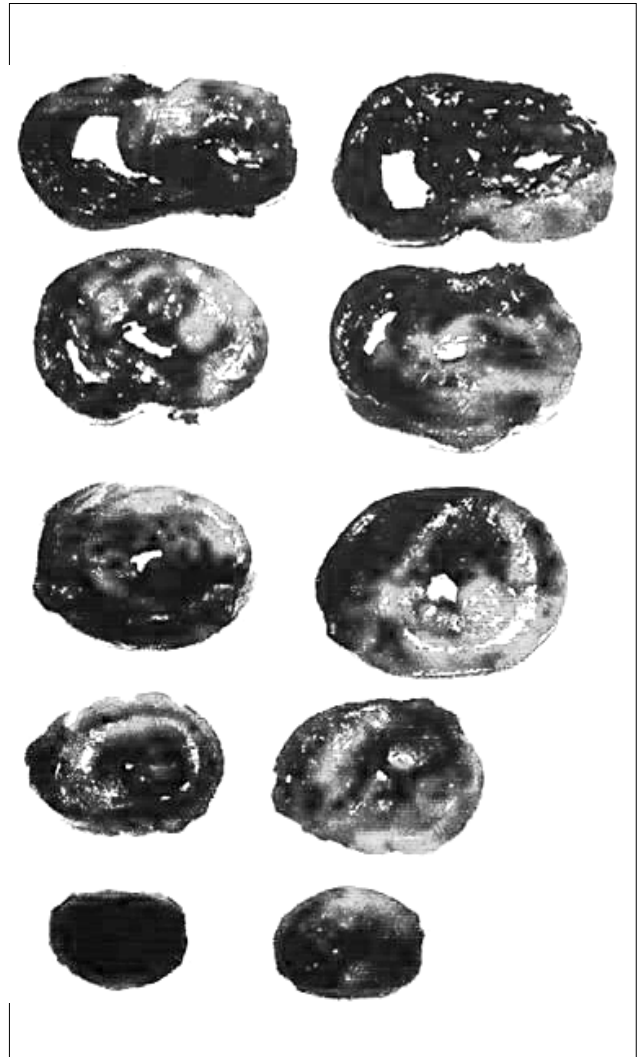


Figura 11. Cortes a serem analisados por scanner.

RESULTADOS

Tabela 1 – Análise dos pesos de massa miocárdica não irrigada pela artéria clampeada (fora de risco), grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Massa ventricular fora de risco	Grupo 2	Massa ventricular fora de risco
Cão 1	38,34	Cão 9	36,12
Cão 2	44,58	Cão 10	47,32
Cão 3	46,56	Cão 11	42,20
Cão 4	41,80	Cão 12	44,46
Cão 5	47,18	Cão 13	37,94
Cão 6	44,32	Cão 14	45,78
Cão 7	32,90	Cão 15	47,19
Cão 8	47,01	Cão 16	41,90

Tabela 2 – Análise estatística pelo método Mann-Whitney dos pesos de massa miocárdica não irrigada pela artéria clampeada, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Grupo 2
N = 8 Média = 42.83 R1 = 67	N = 8 Média = 43.12 R2 = 69
U Crítico= 31 → Não Significante	

Tabela 3 – Análise dos pesos de massa miocárdica irrigada pela artéria clampeada (região de risco), grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Região de risco	Grupo 2	Região de risco
Cão 1	32,81	Cão 9	20,11
Cão 2	20,26	Cão 10	25,95
Cão 3	38,31	Cão 11	32,68
Cão 4	43,72	Cão 12	39,34
Cão 5	38,10	Cão 13	14,61
Cão 6	23,10	Cão 14	25,62
Cão 7	23,66	Cão 15	22,92
Cão 8	37,68	Cão 16	27,90

Tabela 4 – Análise estatística pelo método Mann-Whitney dos pesos de massa miocárdica irrigada pela artéria clampeada, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Grupo 2
N = 8 Média = 32.20 R1= 80	N = 8 Média = 26.14 R2 = 56
U Crítico=20 → Não Significante	

Tabela 5 – Análise dos pesos de massa de necrose, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Região de necrose	Grupo 2	Região de necrose
Cão 1	9,69	Cão 9	11,23
Cão 2	4,96	Cão 10	12,20
Cão 3	9,68	Cão 11	14,57
Cão 4	12,01	Cão 12	19,46
Cão 5	9,50	Cão 13	8,03
Cão 6	6,15	Cão 14	11,32
Cão 7	6,62	Cão 15	11,01
Cão 8	10,73	Cão 16	15,62

Tabela 6 – Análise estatística pelo método Mann-Whitney dos pesos de massa de necrose, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Grupo 2
N = 8 Média = 8.66 R1 = 44	N = 8 Média = 12.93 R2 = 92
U Crítico= 8 é Não Significante	

Tabela 7 – Análise da porcentagem dos pesos de massa de necrose/massa de risco, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	% da região necrose/risco	Grupo 2	% da região necrose/risco
Cão 1	29,53	Cão 9	55,84
Cão 2	24,48	Cão 10	47,01
Cão 3	25,26	Cão 11	44,58
Cão 4	27,47	Cão 12	49,46
Cão 5	24,93	Cão 13	54,96
Cão 6	26,62	Cão 14	44,18
Cão 7	27,97	Cão 15	48,03
Cão 8	28,47	Cão 16	55,98

Tabela 8 – Análise estatística pelo método Mann-Whitney das porcentagens dos pesos de massa de necrose/massa de risco, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Grupo 2
N = 8 Média = 26.84 R1= 36	N = 8 Média = 50.00 R2 = 100
U Crítico= 0 é Significante (p = 0.05)	

Tabela 9 – Análise da porcentagem de Preservação Miocárdica (risco-necrose/risco x 100), grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	% da região necrose/risco	Grupo 2	% da região necrose/risco
Cão 1	70,46	Cão 9	44,15
Cão 2	75,51	Cão 10	52,98
Cão 3	74,73	Cão 11	55,41
Cão 4	72,52	Cão 12	50,53
Cão 5	75,06	Cão 13	45,03
Cão 6	73,37	Cão 14	55,81
Cão 7	72,02	Cão 15	51,96
Cão 8	71,52	Cão 16	44,01

Tabela 10 – Análise estatística pelo método Mann-Whitney da Preservação Miocárdica (risco-necrose/risco x 100), grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Grupo 2
N = 8	N = 8
Média = 73.14	Média = 49.98
R1= 100	R2 = 36
U Crítico=0 é Significante (p=0.05)	

Tabela 11 – Análise das porcentagens de áreas (medidas por scanner) de necrose/risco, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	% da região necrose/risco	Grupo 2	% da região necrose/risco
Cão 1	30,21	Cão 9	53,27
Cão 2	23,25	Cão 10	48,72
Cão 3	27,08	Cão 11	46,58
Cão 4	25,93	Cão 12	47,39
Cão 5	25,61	Cão 13	53,42
Cão 6	24,27	Cão 14	46,35
Cão 7	26,98	Cão 15	47,01
Cão 8	26,64	Cão 16	54,27

Tabela 12 – Análise estatística pelo método Mann-Whitney das porcentagens de áreas (medidas por scanner) de necrose/risco, grupo I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Grupo 2
N = 8	N = 8
Média = 26.24	Média = 49.62
R1= 36	R2 = 100
U Crítico = 0 é Significante (p = 0.05)	

Tabela 13 – Análise da elevação do segmento ST no ECG dos grupos I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Elevação de segmento ST	Grupo 2	Elevação de segmento ST
Cão 1	3mm	Cão 9	3mm
Cão 2	2mm	Cão 10	3mm
Cão 3	2mm	Cão 11	2mm
Cão 4	2mm	Cão 12	3mm
Cão 5	2mm	Cão 13	2mm
Cão 6	3mm	Cão 14	3mm
Cão 7	2mm	Cão 15	3mm
Cão 8	2mm	Cão 16	3mm

Tabela 14 – Análise estatística pelo método Mann-Whitney da elevação do segmento ST no ECG dos grupos I (N2-MPG) e II (Solução Salina).

Grupo 1	Grupo 2
N = 8	N = 8
Média = 2.25	Média = 2.75
R1= 52	R2 = 84
U Crítico=16 Não Significante	

Tabela 15 – Comparação dos valores percentuais (necrose/risco) obtidos nos métodos por peso e scanner respectivamente.

	% por massa	Scanner
Cão 1	29,53	30,21
Cão 2	24,48	23,25
Cão 3	25,26	27,08
Cão 4	27,47	25,93
Cão 5	55,84	53,27
Cão 6	47,01	48,72
Cão 7	44,58	46,58
Cão 8	49,46	47,39
Cão 9	24,93	53,42
Cão 10	26,62	46,35
Cão 11	27,97	47,01
Cão12	28,47	54,27
Cão13	54,96	25,61
Cão 14	44,18	24,27
Cão 15	48,03	26,68
Cão 16	55,98	26,64

Tabela 16 – Análise estatística Análise estatística pelo método Mann-Whitney da comparação dos valores percentuais (necrose/risco) obtidos nos métodos por peso e scanner respectivamente.

Pesagem	Scanner
N = 16	N = 16
Média = 38.42	Média = 37.93
R1 = 273.5	R2 = 254.5
U Crítico = 118.5 é Não Significante	

DISCUSSÃO

A doença arterial coronariana é caracterizada por alta prevalência e tem na síndrome coronariana aguda a maior expressão em relação à morbidade e mortalidade.

A isquemia resultante da síndrome coronariana aguda tem como principais conseqüências a desintegração bioquímica e estrutural da célula, iniciada a partir das mitocôndrias, evoluindo com desorganização citoplasmática e morte celular.

Inquestionavelmente, desde a descrição da SCA, a possibilidade de reperfusão do miocárdio isquêmico nas primeiras horas após a oclusão da coronária tem sido considerada a medida de maior relevância, pois evita a progressão da necrose, podendo preservar a função ventricular, e diminuir a mortalidade¹⁹.

Estudos com novos trombolíticos e a evolução de intervenções percutâneas têm sido o foco do tratamento para a SCA proporcionando a revascularização do músculo isquêmico. No entanto, a reperfusão não é inócua e a avaliação e prevenção da injúria causada merece maior atenção²⁰.

Kloner et al.²⁰ em 1983 relataram que a reperfusão também pode ser prejudicial por causar lesão miocárdica irreversível em um território isquêmico, porém viável, estendendo a necrose.

Este mecanismo estudado também por McCord e Fridovch²², Valentine³², Sanfey et al.³¹ e Romero et al.³³ constitui-se de reações de oxido-redução mediadas por radicais químicos altamente reativos. Esses são decorrentes da falta de oxigenação normal dos tecidos, sendo produzidos pela conversão degradativa de adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), até o produto intermediário, a hipoxantina, que não é passível de reconversão e poderá dar início a formação de radicais livres (Figura 12).

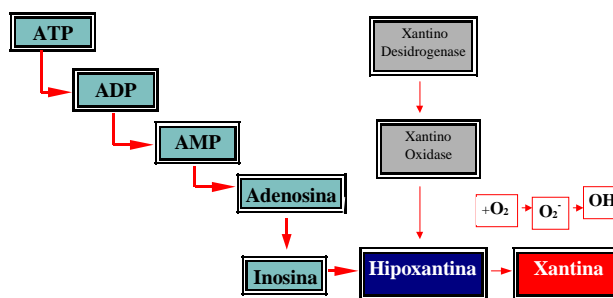


Figura 12 - Mecanismo de formação de radicais livres de O₂ através da degradação do ATP.

O radical hidroxila é produzido a partir de duas espécies ativas de oxigênio (O₂⁻ e H₂O₂) pela reação de Haber-Weiss. Quando a geração do radical ocorre após a ligação entre H₂O₂ e sais de ferro denomina-se reação de Fenton^{23,25}. O radical hidroxila devido sua grande citotoxicidade e extrema reatividade pode oxidar uma grande variedade de biomoléculas, iniciando então a peroxidação lipídica que acarreta a quebra da membrana e perda da regulação do volume celular^{26,27,28}.

Pesquisas com superóxido desmutase, catalase e alopurinol foram percussores no estudo da ação antioxidante na cardioproteção^{9,25,26,29}.

McCord e Fridovch²² demonstraram que no processo de reperfusão de qualquer tecido, a xantino-oxidase, formada em grande quantidade, fará com que o oxigênio recirculante seja utilizado na conversão da hipoxantina em ácido úrico, com grande liberação de radicais livres oxigenados.

Halliwell¹³ verificaram a associação do oxigênio à íons metálicos como o ferro e cobre, aumentando a produção de radicais livres oxigenados, principalmente hidroxila (OH⁻), sendo estes altamente lesivos ao parênquima reperfundido devido ao rompimento oxidativo de todas as estruturas celulares com sua conseqüente deterioração.

Estudo realizado por Fontana¹⁰ mostrou o potente efeito antioxidante do N2-MPG de fórmula C₅H₉NO₃S, na preservação de retalhos miocutâneos expostos a 12 horas de isquemia em normotermia. Embora a pele, juntamente com a musculatura esquelética, apresente uma resistência muito maior que outras estruturas do organismo, chama a atenção a possibilidade desta substância ser capaz de contribuir de forma significativa na prevenção do mecanismo de superoxidação de outros órgãos submetidos a anóxia por períodos variáveis, dependendo da resistência, maior ou menor, do tecido submetido à isquemia.

No processo de recirculação sanguínea, após período significativo de isquemia são produzidos resíduos superóxidos, derivados da atividade da enzima xantino-oxidase, que são considerados os principais responsáveis pelas lesões teciduais encontradas após a reperfusão.

Paralelamente ao consumo de ATP, em virtude do bloqueio funcional da cadeia respiratória, ocorre supressão dos mecanismos ativos de bombas de íons (sódio, potássio e cálcio) com conseqüente elevação dos íons cálcio localizados na região intracelular, que provocam ativação de proteases e promovem uma excessiva e prejudicial conversão da enzima xantino-desidrogenase em xantino-oxidase.

O potente efeito antioxidante da N2-MPG ocorre pois a droga citada acima inibe a conversão da enzima xantino-desidrogenase em xantino-oxidase, impedindo que ocorra formação excessiva de radicais livres oxigenados como pode ser observado na Figura 13.

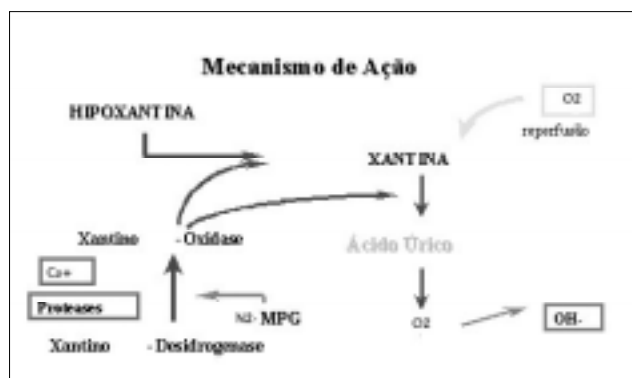


Figura 13 - Mecanismo de ação da N2-MPG.

Outras pesquisas mostraram a ação protetora do N2-MPG diminuindo as conseqüências deletérias anátomo-patológicas e clínicas, em órgãos como pâncreas e fígado, na preservação para transplante e na parada cardíaca por circulação extracorpórea^{10,12,18}.

Com meia vida plasmática de 7 minutos a N2-MPG tem mostrado efeito de antioxidante e varredor de radicais livres de hidroxila (OH⁻), diminuindo o dano endotelial e miocárdico após episódio de isquemia seguida de reperfusão, tendo como exemplo específico o infarto agudo do miocárdio³⁰.

No entanto, o uso da N2-MPG em tecido cardíaco permanece controverso devido a grande quantidade de estudos que utilizaram diferentes técnicas experimentais para avaliá-lo (Quadro 2).

Quadro 2. Comparação entre os estudos.

Autores	Ano	Tempo de	Dose isquemia	Tempo de	Animal
Mitsos et al. ²³	86	90 min	20mg/kg	6h	Cão
Mitsos et al. ²⁴	86	90 min	20mg/kg	15 min/45 min	Cão
Beyersdorf et al. ⁴	89	60 min de hipotermia	100mg/kg	15 min/30 min/1h	Cão
Bolli et al. ⁵	89	15 min	8mg/kg/h	4 h	Cão
Hoshida et al. ¹⁶	93	90 min	100mg/kg	1 – 3 h	Cão
Tanaka et al. ³⁴	94	30 min	20mg/kg	48h	Coelho
Horwitz et al. ¹⁴	94	90 min	100mg/kg/h	48h	Cão
Kilgore et al. ¹⁹	94	30 min	20mg/kg	70 min	Coelho
Li et al. ²¹	97	15 min	100mg/kg/h	48 h	Cão
Horwitz et al. ¹⁵	99	90 min	100mg/kg/h	48 h	Cão

A comparação entre o tempo de administração da N2-MPG é escassamente discutida na literatura, sendo o momento de infusão da droga um dos fatores limitantes para se avaliar seu efeito protetor. Mitsos et al.^{23,24}, Bolli et al.⁵, Tanaka et al.³⁴, Hoshida et al.¹⁶, Kilgore et al.¹⁹, Li et al.²¹ e Horwitz et al.¹⁵ preconizaram técnicas e metodologias diferentes para uso da N2-MPG nos experimentos de isquemia-reperfusão miocárdica (Quadro 2).

Objetivando confirmar a ação protetora da N2-MPG no IAM os autores utilizaram cães devido sua fácil aquisição e manutenção em nosso serviço, além de serem amostras de predileção em estudos semelhantes. Padronizou-se 90 minutos de isquemia baseando-se em estudos de Mitsos et al.^{23,24}, Horwitz et al.¹⁵ e Tripathi et al.³⁵ que constataram a efetividade do método experimental para promover o IAM.

O tempo de reperfusão estabelecido em 3 horas, foi estipulado mediante ao sucesso de estudos como o de Bolli et al.⁵ e Tripathi et al.³⁷. De acordo com Smith et al.³⁶ e Sheridan et al.⁴⁴ a resposta inflamatória responsável pelo acúmulo de polimorfonucleares e formação de radicais livres acontece nas primeiras duas horas de reperfusão.

O estudo realizado por Horwitz et al.¹⁵, enfatiza a ampla vantagem de iniciar a infusão da droga em até trinta minutos após o início da reperfusão, e que o tempo de infusão por três horas, utilizado neste estudo,

promove a possibilidade de ocorrer melhor efeito protetor no miocárdio.

O acesso, via toracotomia lateral esquerda, possibilitou a visualização da artéria coronária interventricular anterior, que foi clampeada após a emergência do primeiro ramo diagonal da artéria descendente anterior minimizando as variações anatômicas e complicações arritmogênicas do IAM.

O início da infusão da N2-MPG se deu 15 minutos antes do desclameamento da artéria coronária conforme descrito por Horwitz et al.¹⁵.

As áreas de risco e isquemia foram analisadas segundo o método descrito por Jolly et al.¹⁸. Esse método foi amplamente utilizado em outros estudos para análise das áreas em questão. O Azul de Evans a 0.5% se mostrou eficiente em excluir as áreas não irrigadas pela artéria clampeada. O TTC tem afinidade pelo mecanismo enzimático dos miócitos, corando de vermelho rutilante apenas as células vivas. As regiões pálidas caracterizam-se então por áreas de necrose. Bordas das áreas descritas foram analisadas por microscopia comprovando a eficiência do método (Figuras 14, 15 e 16).

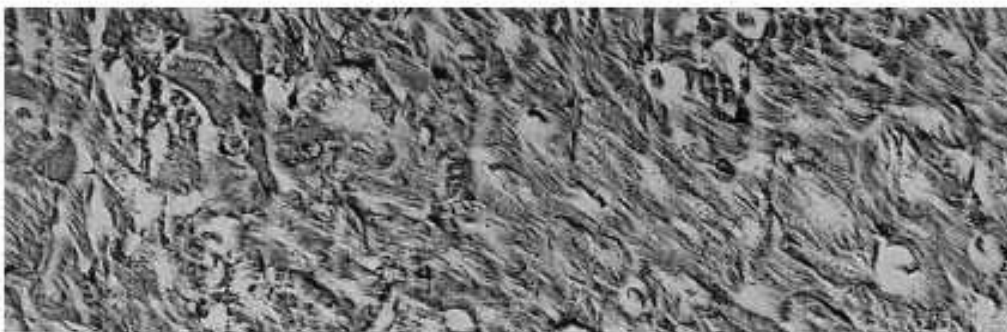


Figura 14. Região de necrose.

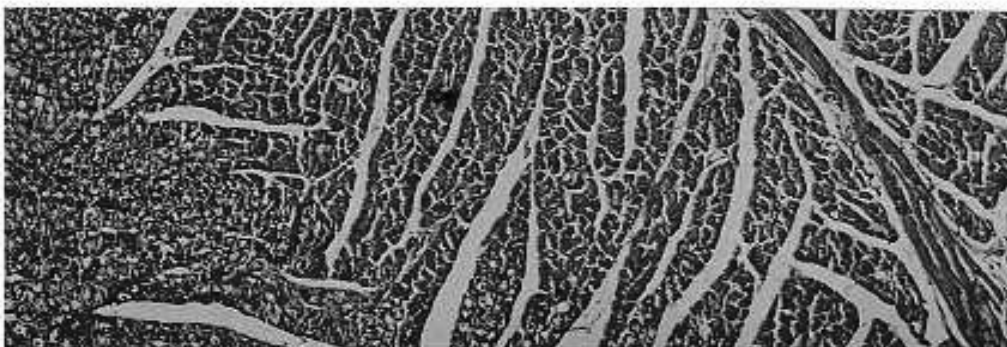


Figura 15. Região de transição.

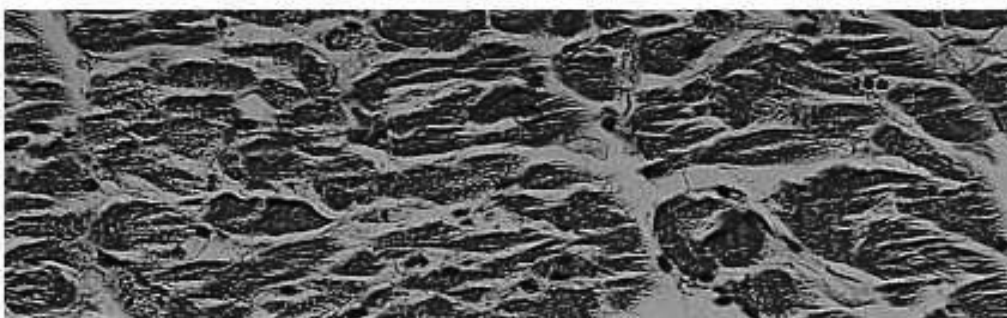


Figura 16. Região normal, sem necrose.

Antes da pesagem das massas, as fatias foram analisadas graficamente através das imagens geradas por scanner (Figuras 9, 10 e 11). Essas imagens tiveram suas áreas calculadas por computador, expressando uma relação de necrose/área de risco,

mostrando confiabilidade estatística com valores próximos aos obtidos por pesagem (Tabelas 15 e 16).

As análises de ECG basal, massa de regiões normoperfundidas (Tabelas 1 e 2), massa da área de risco (Tabelas 3 e 4) e de necrose (5 e 6) não

diferiram estatisticamente, demonstrando homogeneidade da amostra.

Os padrões eletrocardiográficos, ao final do experimento, mostraram-se com supradesnivelamento de ST em geral maior no grupo controle (Tabela 13 e Figura 17). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 14), o que poderia se tornar estatístico em amostras maiores.

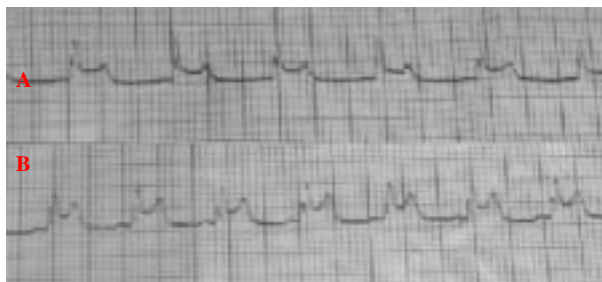


Figura 17. Exemplo de ECG obtidos nos grupos: A) N₂MPG e B) Controle.

Os resultados de área de necrose relativa à área de risco se mostraram estatisticamente significantes, comprovando redução da área de infarto (Tabelas 7, 8, 11 e 12) nos dois métodos de análise (pesagem e scanner). A preservação miocárdica também apresentou diferença estatística significativa entre os grupos (Tabelas 9 e 10).

Os resultados foram condizentes com literatura. A redução média percentual de necrose foi de 45,78%, e a preservação miocárdica teve aumento relativo de 44,4%.

Tais resultados podem ser associados à redução de superóxidos e radicais livres oxigenados decorrentes da supressão da atividade da enzima xantino-oxidase promovidos pela N₂-MPG, o que sugere a ação protetora desse agente no coração submetido a isquemia/reperfusão.

Apesar dos freqüentes relatos comprovando o efeito benéfico da utilização dos antioxidantes na isquemia/reperfusão, como demonstrado neste estudo, seu uso na prática clínica permanece vinculado a realização de maiores estudos sobre o tema, porém podem sugerir benefício importante à reperfusão.

CONCLUSÃO

A administração de N₂-Mercaptopropionilglicina, em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio em cães, apresentou aumento da área de preservação do miocárdio em relação ao grupo controle, sugerindo seu efeito protetor nas lesões de isquemia/reperfusão.

Ketzer BM, Feldman A, Grabarz R, Abuhab A, Gun C, Luca FA, Abdo E. Analysis of myocardial preservation after N₂-mercaptpropionylglycin administration in an experimental model of ischemia and reperfusion in dogs. *Rev Med (São Paulo)*. 2004 jan.-jun.; 83(1-2):33-45.

ABSTRACT: Nowadays, cardiovascular diseases are the principal cause of morbimortality, specially the coronary artery disease. New physiopathological acknowledgement indicates new mechanisms for myocardial injury, still not quite studied. The aim of this study is to analyze the effect of N₂-Mercaptopropionilglycine (N₂-MPG) as a myocardial protection agent during ischemia/reperfusion based on the preservation of the necrosis area. Sixteen dogs were divided into two groups of eight dogs each one: Group I (N₂-MPG) and Group II (control). After the experimental acute myocardial infarction reproduction, the hearts were colored (TTC/Blue Evans dye) and weighed for the myocardial preservation analysis. The amount of necrosis area were: Group I (73,14%) and Group II (49,98%) through the Mann-Whitney method. The necrosis area reduction showed an average reduction of 23,16%, concluding that N₂-MPG has a protection effect during myocardial ischemia/reperfusion.

KEY WORDS: Myocardium. Mercaptopropionylglycine/pharmacology. Dogs. Myocardial infarction. Antioxidants/therapeutic use. Disease models, animal. Myocardial reperfusion/methods.

REFERÊNCIAS

1. Abdo EE, Sanpietri SN, Coelho M, Molan N, Kubrusly M. Estudo da atividade do N2-MPG na pancreatite aguda experimental. *Anais do Curso Anual de Cirurgia do Aparelho Digestivo* 199, 1:54.
2. Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Flaherty JT. Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by a recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation*. 1987;75:282-91.
3. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988;45:670-3.
4. Beyersdorf F, Fuchs J, Eberhard B, Stauder M, Satter P, Zimmer G. Myocardial protection by 2 mercaptopropionyl glycine during global ischaemia in dog. *Arzneimittelforschung*. 1989;(5):87-91.
5. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, et al. Marked reduction of free radical generation and contractive dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res*. 1989;65(3):607-22.
6. Braunwald E, Gersh BJ, Rutherford JD. Chronic coronary artery disease. In: Braunwald E. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997;1289-90.
7. Burton KP, McCord JM, Ghai G. Myocardial alterations due to free radical generation. *Am J Physiol*. 1984;246: H776-H83.
8. De Luca FA, Mohamed IA, De Luca P, Suaki HE, Assad RL, Abdo EE, Monzani SD. Análise do efeito protetor do N2-Mercaptopropionilglicina durante a isquemia-reperusão de lobo hepático – estudo experimental em cães e ratos. *Rev Med (São Paulo)*. 1998;77(2):65-86.
9. Ellis SG, Henschke CI, Sador T, Wynne J, Braunwald E, Kloner RA. Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1983;1: 3-7.
10. Fontana C. Efeito da N2-mercaptopropionilglicina na sobrevivência de retalhos cutâneos submetidos a oclusão temporária do pedículo vascular. Estudo experimental em ratos [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1992.
11. Gauduel Y, Duvelloy M. Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16: 459-70.
12. Gutteridge JMC, Richmond R, Halliwell B. Unhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem J*. 1979;(184):469-72.
13. Halliwell B. Oxygen radicals and metals ions: potencial of antioxidants intervention strategies. *Ann Intern Med*. 1987;107:525-45.
14. Horwitz LD, Fenessey PV, Shikes RH, Kong Y. Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion. *Circulation*. 1994;89:1792-801.
15. Horwitz LD, Kong Y, Robertson AD. Timing of treatment for myocardial reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;33(1):19-29.
16. Hoshida S, Kuzuya T, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, et al. Transcardial alteration of neutrophil function relates to myocardial ischaemia / reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1993;27:377-83.
17. Ihnken K, Morita K, Buckberg GD, Sherman MP, Young HH. Studies of hypoxemic/reoxygenation injury: without aortic clamping. Counteraction of oxidant damage by exogenous antioxidants: N2-mercaptopropionylglycine and catalase. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110(4):1212-20.
18. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res*. 1984;54:277-85.
19. Kilgore KS, Homeister JW, Satoh PS, Lucchesi BR. Sulfhydryl compounds, captopril and MPG inhibit complet mediated myocardial injury. *Am J Physiol*. 1994;266:H28-35.
20. Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E. Studies of experimental coronary artery reperfusion: effect on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation*. 1983;68: 8-15.
21. Li XY, Zughuib M, Sekili S, Bolli R. N2-mercaptopropionylglycine improves recovery of myocardial stunning after reversible regional ischemia in conscious dogs. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 1997;13:32.
22. McCord JM, Fridovch I. The reduction of cytochrome by milk xanthine oxidase. *Biol Chem*. 1968;243: 5753-70.
23. Mitsos SE, Askew TE, Fantone JC, Kunkel SL, Abrams GD, Schork A et al. Protective effects of N2-mercaptopropionylglycine against myocardial reperfusion injury after neutrophil depletion in evidence for the role of intracellular derived free radicals. *Circulation*. 1986;(73):1077-86.
24. Mitsos SE, Fantone JC, Gallagher P, Walden KM, Simpson PJ, Abramd GD, et al. Canine myocardial reperfusion injury protection by a free scavenger, N2-mercaptopropionylglycine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1986;8:978-88.
25. Myers CL, Weiss SJ, Kirsh MM, Schlafer M. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the "oxygen Paradox". Redution of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not by superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol*. 1985;(17): 675-84.
26. Pfeferman E, Viecilli PR. In: Atendimento inicial ao infarto agudo do miocárdio. In: Timerman A. *Manual de cardiologia da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.167-9.
27. Poole-Wilson PA. Reperfusion damage in heart muscle: still unexplained but with new clinical relevance. *Clin*

- Physiol. 1987;7:439-53.
28. Ramires JFA, Nicolau JC. Infarto agudo do miocárdio. In: Porto CC. Doenças do coração. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.608-4.
 29. Ryan TJ, Antman EM, Brooks NH, Callif RM, Hillis LD, Hiratzka LF, et al. ACC/AHA guideline for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary and recommendation. *Circulation*. 1999;100:1016-30.
 30. Chagas ACP. Proteção miocárdica em isquemia e reperfusão: Estudo experimental sobre a preservação miocárdica e a ocorrência de fibrilação ventricular na reperfusão em cães. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1992.
 31. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The pathogenesis of acute pancreatitis: the source and role of oxygen derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg*. 1985;201: 633-8.
 32. Valentine JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*. 1983;94: 412-4.
 33. Romero A, Alvira D, Mur Villacampa M, Villalba Martín MP, Gerrero Navarro L, Farrer Velázquez M, Cabeza Lambán F, Simal Gil E. Prooxidación y antioxidación en gastroenterología. Importancia de los radicales libres. *Rev Esp Enf Digest*. 1990;77:64-72.
 34. Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K et al. Superoxide dismutase and N2-mercaptopyrionylglycine attenuate infarct size limitation effects of ischaemic preconditioning in rabbit. *Cardiovasc Res*. 1994;28:980-6.
 35. Tripathi Y, Hegde BM, Rai YS, Raghuvver CV. Effect of N-2-mercaptopyrionylglycine in limiting myocardial reperfusion injury following 90 minutes of ischemia in dogs. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2000;44:290-6.
 36. Smith EF III, Egan JW, Bugelski PJ, Hillegass LM, Hill DE, Griswold DE. Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988;225:H2060-8.
 37. Sheridan FM, Cole PG, Ramage D. Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model. *Circulation*. 1996;144:2702-11.