

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**AÇÃO DA VITAMINA A E DO TROLOX
SOBRE O STRESS OXIDATIVO PRODUZIDO
PELO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO
MIOCÁRDIO ISOLADO DE RATO**

ADRIANE BELLÓ KLEIN

**Orientador
Prof.Dr. ANTONIO ANDRÉA BELLÓ**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas - Fisiologia.

Porto Alegre

1993

"Houve tempo em que o cientista era ser alado, imaginação selvagem, que explicava às crianças e aos jovens os gestos de sua mão e os movimentos do seu pensamento, apontando para um mundo novo que se anunciava no horizonte. Terra sem males, a natureza a serviço dos homens, o fim da dor, a expansão da compreensão, o domínio da justiça. Claro, o saber iria tornar os homens mais tolerantes. Compreenderiam o absurdo da violência. Deixariam de lado o instrumento de tortura pela persuasão suave do ensino. Os campos ficariam gordos e perfumados. As máquinas libertariam os corpos para o brinquedo e o amor. E os exércitos progressivamente seriam desativados, porque mais vale o saber que o poder. As espadas seriam transformadas em arados e as lanças em tesouras de podar. Realização do sonho do profeta Isaías, de harmonia entre bichos, coisas e pessoas".

(Rubem Alves - Estórias de quem gosta de ensinar)

Dedico este trabalho ao meu pai e orientador, Antonio, com amor e gratidão por todas as lições recebidas, pela sua ajuda constante, pelo seu exemplo de vida e por me presentear esta linha de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força espiritual para vencer todos os obstáculos.

Ao meu esposo José Paulo e ao meu filho Rafael pela compreensão, pelo afeto, pelo apoio em todos os momentos, por fazerem todas as coisas valerem a pena.

À minha mãe, Marina e ao meu irmão, André, pelo carinho e atenção constantes e por estarem sempre prontos a me ajudar.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, em especial ao Álvaro, à Madalena, à Liliâne, ao Brunetto, ao Hélio e à Patrícia pelo auxílio na parte experimental e pela preciosa amizade.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen por todo apoio recebido.

À funcionária Tânia Regina Gattelli Fernandes pela sua inestimável colaboração nas tarefas de laboratório, por sua competência e amizade.

Ao Dr. Alberto Boveris, Dra. Susana Llesuy e Dra. Beatriz Gonzalez-Flecha da Universidade de Buenos Aires por nos terem aberto as portas de seu laboratório e nos terem ensinado várias técnicas fundamentais à execução deste trabalho.

Ao colega Luiz Carlos Rios Kucharski pela sua imprescindível colaboração e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia da UFRGS pelos ensinamentos e solicitude.

Ao funcionário Luis Roberto G. Silva, pelo valiosa colaboração na impressão desta tese.

Ao Prof.Eng. José Carlos Fortuna pelo auxílio na instrumentação e na manutenção dos equipamentos.

A todos os amigos e familiares que viveram comigo esta "aventura".

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Ao CNPq, FINEP, FAPERGS e PROPESP/UFRGS, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	viii
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas.....	xv
Resumo.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Espécies ativas de oxigênio.....	1
1.2 Formação das espécies ativas de oxigênio.....	5
1.3 Reatividade das EAO em sistemas biológicos.....	11
1.4 Sistemas de defesa contra as EAO.....	15
1.4.1 Defesas enzimáticas.....	17
1.4.2 Defesas não-enzimáticas.....	19
1.4.2.1 Tocoferóis.....	19
1.4.2.2 Carotenóides.....	24
1.5 Stress oxidativo no coração.....	28
1.5.1 Modelo de contratatura cardíaca.....	34
1.6 Objetivos.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Animais experimentais.....	37
2.2 Reagentes.....	37
2.3 Líquidos de perfusão.....	39
2.3.1 Tyrode.....	39
2.3.2 Tyrode-H ₂ O ₂	40
2.3.3 Tyrode-vitamina A.....	40
2.3.4 Tyrode-trolox.....	41
2.4 Grupos experimentais.....	41
2.5 Seqüência experimental.....	43
2.6 Perfusão do coração.....	44
2.7 Registro da atividade contrátil.....	47
2.8 Registro do fluxo coronariano.....	47
2.9 Dosagem do glicogênio cardíaco.....	47
2.10 Preparação do homogeneizado de coração.....	49
2.11 Teste do TBA no homogeneizado.....	49

2.12	Teste do TBA no perfusado.....	50
2.13	Medida do consumo de oxigênio.....	50
2.14	Determinação da quimioluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butil.....	52
2.15	Dosagem de proteínas.....	53
2.16	Análise dos dados.....	53
2.17	Apresentação dos dados.....	55
2.18	Análise estatística.....	56
3	RESULTADOS.....	57
3.1	Efeito do peróxido de hidrogênio no relaxamento cardíaco, no conteúdo de glicogênio e na LPO.....	58
3.2	Ação da vitamina A na contratatura cardíaca, no conteúdo de glicogênio e na LPO.....	75
3.3	Ação do trolox na contratatura cardíaca, no conteúdo de glicogênio e na LPO.....	94
3.4	Efeito do peróxido de hidrogênio na força de contração: ação da vitamina A e do trolox.....	123
3.5	Efeito do peróxido de hidrogênio na frequência cardíaca: ação da vitamina A e do trolox.....	134
3.6	Efeito do peróxido de hidrogênio no fluxo coronariano: ação da vitamina A e do trolox.....	144
4	DISCUSSÃO.....	154
5	CONCLUSÕES.....	183
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	186

ABREVIATURAS

AA	- ácido araquidônico
AMP	- adenosina monofosfato
ANOVA	- análise da variância
ATP	- trifosfato de adenosina
CAT	- catalase
cGMP	- guanosina monofosfato cíclica
cps	- contas por segundo
EAO	- espécies ativas de oxigênio
EDCF	- fator constrictor derivado do endotélio
EDRF	- fator relaxante derivado do endotélio
E.P.M.	- erro padrão da média
GC	- guanilato ciclase
GPx	- glutationala peroxidase
GSH	- glutationala reduzida
GSSG	- glutationala oxidada
H2O2	- peróxido de hidrogênio
HPLC	- cromatografia líquida de alta pressão

LPO	- lipoperoxidação
M	- molar (mol/litro)
MDA	- malondialdeído
mg	- miligrama
min	- minuto
ml	- mililitro
mM	- milimolar (milimol/litro)
NAD	- adenina dinucleotídeo
nmol	- nanomol
NO.	- óxido nítrico
.O2-	- radical superóxido
1O2	- oxigênio <i>singlet</i>
.OH	- radical hidroxil
PG	- prostaglandinas
PUFA	- ácidos graxos polinsaturados
prot.	- proteína
QL	- quimioluminescência
RO*	- carbonila excitada
seg	- segundo
SOD	- superóxido dismutase
TBA	- ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	- hidroperóxido de tert-butil
TBA-RS	- substâncias que reagem com o TBA
TCA	- ácido tricloroacético
U.I.	- unidades internacionais

ÍNDICE DE FIGURAS

I	- Redução monoelétrica do oxigênio, formando EAO.....	2
II	- Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização de EAO.....	10
III	- Reações em cadeia da LPO.....	13
IV	- Efeitos da LPO sobre as membranas celulares.....	16
V	- Estrutura dos tocoferóis.....	20
VI	- Estrutura da vitamina E e do trolox.....	23
VII	- Estrutura do licopeno e do beta-caroteno.....	26
VIII	- Interações dos micronutrientes no sistema de defesa antioxidante.....	28
IX	- Produção de EAO durante a isquemia-reperfusão. Teoria de Mc Cord (1985).....	32
X	- Hipóteses da seqüência de eventos bioquímicos relacionados com a isquemia-reperfusão.....	34
XI	- Esquema geral do aparelho de perfusão (Langendorff, 1895).....	46
XII	- Mecanismos geradores de dano celular mediado por EAO durante o processo de isquemia-reperfusão.....	157
XIII	- Reações em cadeia da LPO, levando à formação de MDA...166	

XIV	- Reações envolvidas na QL iniciada por t-BOOH em homogeneizados de tecido.....	171
XV	- Regulação do tônus vascular.....	179
1A	- Variação percentual da contratatura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	60
1B	- Mecanocardiogramas típicos dos grupos controle e H ₂ O ₂	61
2	- Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	63
3	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	65
4	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados cardíacos dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	67
5A	- Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	69
5B	- Registros típicos do consumo de oxigênio dos grupos controle e H ₂ O ₂	70
6	- Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	72
7A	- Variação percentual da contratatura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	73
7B	- Mecanocardiogramas típicos dos grupos vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂	79
8	- Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	82
9	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	84

10	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	86
11A	- Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	88
11B	- Registros típicos do consumo de oxigênio dos grupos vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂	89
12A	- Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	91
12B	- Perfil da cinética da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos vitamina A, H ₂ O ₂ e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de linhas.....	92
13A	- Variação percentual da contratatura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	99
13B	- Mecanocardiogramas típicos dos grupos trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂	100
14A	- Variação percentual da contratatura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	102
14B	- Mecanocardiogramas típicos dos grupos trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂	103
15	- Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	105
16	- Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	107
17	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	109

18	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	111
19	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	113
20	- Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	115
21A	- Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	117
21B	- Registros típicos do consumo de oxigênio dos grupos trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂	118
22A	- Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	120
22B	- Perfil da cinética da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos trolox 2 mM, H ₂ O ₂ e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de linhas.....	121
23	- Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	126
24	- Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	128
25	- Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	130
26	- Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....	132

27	- Variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....136
28	- Variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....138
29	- Variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....140
30	- Variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....142
31	- Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....146
32	- Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , vitamina A e vitamina A + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....148
33	- Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....150
34	- Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H ₂ O ₂ , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H ₂ O ₂ . Gráfico de barras.....152

ÍNDICE DE TABELAS

I	- Principais fontes celulares de produção de EAO.....	6
II	- Reagentes utilizados, seus respectivos pesos moleculares e fornecedores.....	38
III	- Métodos de detecção de stress oxidativo.....	164
1	- Medidas das porcentagens de contratura cardíaca nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle e grupo H ₂ O ₂	62
2	- Medidas do conteúdo de glicogênio cardíaco (g%), comparando grupo controle e grupo H ₂ O ₂	64
3	- Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados de corações de rato, comparando os grupos controle e H ₂ O ₂	66
4	- Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações de rato, comparando os grupos controle e H ₂ O ₂	68
5	- Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle e H ₂ O ₂	71
6	- Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle e H ₂ O ₂	74

- 7 - Medidas das porcentagens de contratura cardíaca nos distintos tempos de estudo, comparando os grupos controle, vitamina A, H₂O₂ e grupo vitamina A + H₂O₂.....81
- 8 - Medidas do conteúdo de glicogênio cardíaco (g%), comparando os grupos controle, vitamina A, H₂O₂ e vitamina A + H₂O₂.....83
- 9 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados de corações de rato, comparando os grupos controle, vitamina A, H₂O₂ e vitamina A + H₂O₂....85
- 10 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações de rato, comparando os grupos controle, vitamina A, H₂O₂ e vitamina A + H₂O₂....87
- 11 - Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle, vitamina A, H₂O₂ e vitamina A + H₂O₂.....90
- 12 - Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle, vitamina A, H₂O₂ e vitamina A + H₂O₂.....93
- 13 - Medidas das porcentagens de contratura cardíaca nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂.....101
- 14 - Medidas do conteúdo de glicogênio cardíaco (g%), comparando os grupos controle, trolox 0,2 mM, H₂O₂ e trolox 0,2 mM + H₂O₂.....104
- 15 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados de corações de rato, comparando os grupos controle, trolox 0,2 mM, H₂O₂ e trolox 0,2 mM + H₂O₂.....106
- 16 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações de rato, comparando os grupos controle, trolox 0,2 mM, H₂O₂ e trolox 0,2 mM + H₂O₂.....108
- 17 - Medidas das porcentagens de contratura cardíaca nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 2 mM + H₂O₂.....110

18	- Medidas do conteúdo de glicogênio cardíaco (g%), comparando os grupos controle, trolox 2 mM, H ₂ O ₂ e trolox 2 mM + H ₂ O ₂	112
19	- Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados de corações de rato, comparando os grupos controle, trolox 2 mM, H ₂ O ₂ e trolox 2 mM + H ₂ O ₂	114
20	- Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações de rato, comparando os grupos controle, trolox 2 mM, H ₂ O ₂ e trolox 2 mM + H ₂ O ₂	116
21	- Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle, trolox 2 mM, H ₂ O ₂ e trolox 2 mM + H ₂ O ₂	119
22	- Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle, trolox 2 mM, H ₂ O ₂ e trolox 2 mM + H ₂ O ₂	122
23	- Medidas da variação percentual da força de contração inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle e grupo H ₂ O ₂	127
24	- Medidas da variação percentual da força de contração inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo vitamina A, grupo H ₂ O ₂ e grupo vitamina A + H ₂ O ₂	129
25	- Medidas da variação percentual da força de contração inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H ₂ O ₂ e grupo trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂	131
26	- Medidas da variação percentual da força de contração inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 2 mM, grupo H ₂ O ₂ e grupo trolox 2 mM + H ₂ O ₂	133
27	- Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle e grupo H ₂ O ₂	137

28	- Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo vitamina A, grupo H ₂ O ₂ e grupo vitamina A + H ₂ O ₂	139
29	- Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H ₂ O ₂ e grupo trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂	141
30	- Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 2 mM, grupo H ₂ O ₂ e grupo trolox 2 mM + H ₂ O ₂	143
31	- Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle e grupo H ₂ O ₂	147
32	- Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo vitamina A, grupo H ₂ O ₂ e grupo vitamina A + H ₂ O ₂	149
33	- Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H ₂ O ₂ e grupo trolox 0,2 mM + H ₂ O ₂	151
34	- Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 2 mM, grupo H ₂ O ₂ e grupo trolox 2 mM + H ₂ O ₂	153



RESUMO

Foram estudados, neste trabalho, os efeitos do *stress* oxidativo induzido pelo H_2O_2 no miocárdio isolado e perfundido de ratos machos Wistar e a ação da vitamina A e do trolox nestes fenômenos. Para a perfusão do coração, foi empregado o método de Langendorff (1895), utilizando-se como solução perfusora um Tyrode com pH 7,4, borbulhado com carbogênio, com temperatura de 31 °C e pressão constante de 8,02 kPa. O modelo de estudo usado para produzir *stress* oxidativo foi o acréscimo de H_2O_2 (256 mM) à solução perfusora por 20 minutos, após a preparação haver se estabilizado (10 minutos). A proteção antioxidante foi oferecida mediante perfusão, por 10 minutos antes do *stress* oxidativo, com vitamina A (50 U.I./ml) ou com um análogo hidrossolúvel da vitamina E, o trolox (0,2 e 2 mM). O *stress* oxidativo foi avaliado por alterações fisiológicas (alterações na contratilidade e no fluxo coronariano) e por alterações bioquímicas (alterações no conteúdo de glicogênio cardíaco e na LPO). As alterações fisiológicas puderam ser analisadas a partir dos mecanocardiogramas e registros de fluxo efetuados. O glicogênio cardíaco foi estimado pelo método de Van Handel (1965), que quantifica glicose após a hidrólise ácida do tecido. A LPO foi determinada pelo teste do TBA-RS realizado no homogeneizado e no perfusado cardíacos, pela técnica do consumo de oxigênio e pela QL iniciada por t-BOOH. A alteração fisiológica mais evidente induzida pelo H_2O_2 foi o aparecimento da contratatura cardíaca. Este fenômeno foi acompanhado por alterações bioquímicas: redução do conteúdo de glicogênio e aumento da LPO. A contratatura observada parece ter uma relação íntima com a depleção de energia e o aumento da LPO. Estes fatores

determinariam uma elevação do nível intracelular de cálcio que seria responsável pelos efeitos observados. A vitamina A reduziu a magnitude da contratatura cardíaca, impediu a redução do conteúdo de glicogênio e o aumento da LPO. Isto evidencia um efeito protetor da vitamina A contra o *stress* oxidativo induzido pelo H_2O_2 no miocárdio. O trolox não reduziu a contratatura cardíaca, porém protegeu contra a depleção de energia e a LPO. Estes resultados podem ser reflexo da estrutura molecular do trolox que, por ser hidrossolúvel, não conseguiu se intercalar aos lipídios da membrana e proteger contra as alterações fisiológicas. Outra alteração contrátil observada no miocárdio após a perfusão com H_2O_2 foi uma queda na força de contração (efeito inotrópico negativo). Este efeito foi reduzido apenas pelo trolox na concentração de 0,2 mM. Observou-se uma diminuição da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo) induzida pelo H_2O_2 , que foi atenuada pela vitamina A e pelo trolox. A perfusão com H_2O_2 determinou, ainda, uma pronunciada vasoconstrição coronariana. As vitaminas aumentaram o fluxo coronariano em relação ao controle, contudo não foram efetivas na proteção contra a vasoconstrição induzida pelo H_2O_2 .

Os resultados obtidos são muito interessantes em vista do curto período de exposição do tecido às vitaminas (apenas 10 minutos) e da elevada concentração de H_2O_2 utilizada por um período de tempo duas vezes maior.

O modelo de estudo empregado reforça as hipóteses de geração de EAO nos tecidos submetidos à isquemia-reperfusão. Este modelo tem-se mostrado muito útil para investigar os efeitos do *stress* oxidativo no coração isolado e possíveis mecanismos protetores.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

A toxicidade do oxigênio foi descrita de forma quase simultânea à descoberta deste elemento como componente químico do ar por Priestley (1774). Lavoisier, já em 1783, provou que altas pressões de oxigênio tinham efeito tóxico sobre o pulmão de animais. No entanto, foi Paul Bert (1871), discípulo de Claude Bernard, que estabeleceu as bases da toxicidade do oxigênio. Ao expor animais, plantas e microorganismos a oxigênio hiperbárico, ele concluiu que todas as formas de matéria viva sofriam efeitos tóxicos sob estas circunstâncias experimentais.

Avanços no mecanismo molecular da toxicidade do oxigênio só vieram neste século com o trabalho de Gerschman e colaboradores (1954). Eles assinalaram a semelhança entre o efeito deletério da irradiação com raios X e a exposição a oxigênio hiperbárico e propuseram a participação dos intermediários da redução do oxigênio à água (Figura I) em ambos processos.

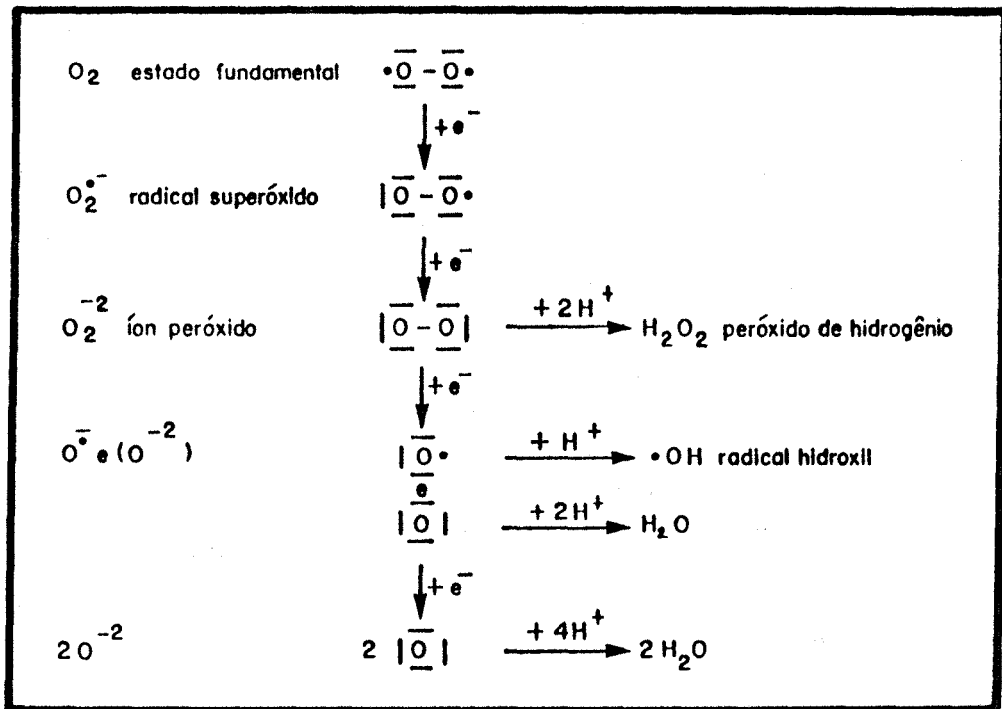


FIGURA I - Redução monoelétrica do oxigênio, formando EAO.

Também neste século, investigadores descobriram que a rancificação das gorduras era devida às espécies intermediárias de oxigênio (DORMANDY, 1969). Esta descoberta foi importante no estudo da química de radicais livres que é atualmente utilizada na indústria moderna de síntese de plásticos e polímeros.

Acredita-se que o fogo seja uma reação de radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989) e a água do mar, uma solução de radicais livres (ZAFIRIOU, 1987).

Ainda que os químicos orgânicos conheçam as espécies ativas de oxigênio (EAO) há muitos anos, só recentemente sua importância em Biologia e Medicina tem sido avaliada. Somam-se evidências de que as EAO causam ou influenciam inúmeros processos orgânicos degenerativos como a catarata, o enfisema, a doença de Parkinson, a porfiria aguda intermitente, a lesão isquêmica, o diabetes aloxânico e até mesmo a mutação, o câncer e o envelhecimento (MENECHINI, 1987; CHOW, 1990).

O radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) são espécies ativas de oxigênio que se formam durante a redução do oxigênio à água (Figura I). Esta reação ocorre na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e a energia produzida é utilizada na formação de trifosfato de adenosina (ATP). As mitocôndrias contêm em suas membranas uma série de proteínas, em especial os citocromos, que são transportadoras de elétrons e que procedem das reações de transformação dos nutrientes. Durante a respiração, as proteínas transportam os elétrons até que reduzem à água uma molécula de oxigênio. É precisamente este transporte de elétrons e a redução final do oxigênio que permitem a produção de energia sob a forma de ATP. A maior parte do oxigênio (aproximadamente 95%) é reduzida tetravalentemente, ou seja, recebe quatro elétrons de uma só vez. Esta reação é efetuada pelo complexo enzimático citocromo oxidase: quatro elétrons são transferidos do citocromo c reduzido através dos grupos prostéticos heme e íon cobre para a

citocromo oxidase e para o oxigênio molecular (FISHER, 1988). No entanto, nem sempre o oxigênio se transforma em água diretamente. Em cerca de 5% dos casos, a redução é monoelétrica, isto é, a molécula de oxigênio recebe um elétron de cada vez, formando uma série de intermediários tóxicos e reativos que são as EAO (Figura I). Elas também são conhecidas como radicais livres de oxigênio, porém esta denominação não é totalmente correta, já que, o H_2O_2 , por exemplo, não é uma espécie radical. Um radical livre é definido como qualquer espécie química capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Portanto, esta denominação não inclui só os radicais de oxigênio, mas vários outros como o átomo de hidrogênio, os íons de metais de transição, o óxido nítrico, o dióxido de nitrogênio etc..

Além disso, é importante ressaltar que a toxicidade do oxigênio não se deve apenas aos radicais livres dele derivados, mas também a outros estados do oxigênio como o peróxido de hidrogênio ao qual já nos referimos e o oxigênio *singlet*, um estado excitado do oxigênio molecular. O oxigênio *singlet* pode apresentar dois estados: o sigma e o delta. O estado sigma (Σg^+O_2) é o mais reativo porque tem dois elétrons desemparelhados. O oxigênio *singlet* delta ($\Delta g O_2$) não é um radical, já que não apresenta elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Por isso, a expressão espécies ativas de oxigênio é mais

adequada quando queremos nos referir ao conjunto dessas substâncias.

A presença de um ou mais elétrons desemparelhados torna a espécie levemente atraída por um campo magnético (é paramagnética) e pode torná-la altamente reativa. O oxigênio molecular, ou dioxigênio, ao contrário, tem baixa reatividade relativa, apesar de também ser um birradical (tem dois elétrons desemparelhados). O fato desses elétrons terem seus spins paralelos reduz sua reatividade, a qual aumentaria muito se os spins dos elétrons fossem em direções opostas.

1.2 FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Eles podem também ser formados quando uma ligação covalente é quebrada, se cada um dos átomos ficar com um elétron, num processo conhecido como fissão homolítica. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A formação de EAO em sistemas biológicos está bem estabelecida. Nas células animais, comprovou-se a geração destas espécies em diversos locais como mitocôndria, lisossomas, peroxissomas, membrana plasmática, nuclear e do retículo endoplasmático, bem como locais do citosol (Tabela I).

TABELA I - Principais fontes celulares de produção de EAO.

Fonte intracelular	Espécie gerada
1. Mitocôndria: cadeia respiratória	
Ubiquinona (Coenzima Q)	$\cdot\text{O}_2^-$
NADH desidrogenase	$\cdot\text{O}_2^-$
2. Retículo endoplasmático e membrana nuclear	
Transporte de elétrons	
NADH citocromo-redutase	$\cdot\text{O}_2^-$ ou H_2O_2
Citocromo P450	$\cdot\text{O}_2^-$
Citocromo b ₅	$\cdot\text{O}_2^-$
3. Membrana plasmática	
Lipoxigenase	$^1\text{O}_2\cdot$
Prostaglandina sintetase	$^1\text{O}_2\cdot$
NADPH oxidase (céls. fagocíticas)	$\cdot\text{O}_2^-$
4. Citosol	
a) Enzimas solúveis e proteínas	
Hemoglobina	$\cdot\text{O}_2^-$
Xantina oxidase	$\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2
b) Moléculas pequenas	
Flavinas reduzidas	$\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2
Tióis	$\cdot\text{O}_2^-$

O radical superóxido pode ser produzido pelas células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos. A partir do superóxido são formadas outras EAO que são utilizadas pelas células fagocitárias para matar os microorganismos invasores (MENEHINI, 1987; SOUTHORN & POWIS, 1988). Nos pacientes acometidos de granulomatose crônica, as células fagocitárias são incapazes de produzir EAO, embora sejam aptas a fazer fagocitose. O fato destes pacientes apresentarem processos inflamatórios agravados mostra que a produção de EAO é importante no combate à bactéria invasora (BABIOR, 1982). Muitos sistemas enzimáticos catalisam a redução univalente do oxigênio molecular à radical superóxido. Como exemplos podemos citar: xantina oxidase, aldeído oxidase, di-hidro-orótico desidrogenase (FRIDOVICH apud PRYOR, 1976), flavina desidrogenase e peroxidases (MC CORD apud SOUTHORN & POWIS, 1988). Outras enzimas como aquelas que catalisam a formação de prostaglandinas (ciclooxigenase) e leucotrienos (lipoxigenase) também são fontes de superóxido (MACHLIN & BENDICH, 1987). A redução univalente do oxigênio também ocorre em reações não-enzimáticas e em reações de autoxidação como as que ocorrem com catecolaminas, flavinas e ferridoxinas reduzidas (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988). A autoxidação das catecolaminas leva a produção de EAO e estas podem produzir danos ao coração, como a necrose miocárdial observada após a administração de altas doses de catecolaminas (SINGAL et al., 1982). Uma fonte substancial de radical

superóxido é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

O peróxido de hidrogênio é produzido por duas fontes básicas: indiretamente pela redução univalente do oxigênio, seguida por dismutação do ânion radical superóxido ou diretamente pela redução divalente do oxigênio molecular. O processo indireto é catalisado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) cobre-zinco (CuZn-SOD) que é citosólica e pela manganês (Mn-SOD) que é mitocondrial. O processo direto é realizado por oxidases encontradas nos peroxissomas como a D-aminoácido oxidase, xantina oxidase, uricase, alfa-hidroxiácido oxidase e glicolato oxidase (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988). A geração mitocondrial de H_2O_2 é um evento fisiológico sob condições aeróbias e depende do estado metabólico em que a célula se encontra. O aumento da pressão parcial de oxigênio produz uma elevação proporcional na formação de H_2O_2 pela mitocôndria (BOVERIS & CHANCE, 1973). Os peroxissomas contêm grande número de enzimas geradoras de H_2O_2 que estão envolvidas em importantes funções fisiológicas como a oxidação de ácidos graxos, produção de hormônios esteróides, produção de lipídios em glândulas sebáceas, fagocitose, termogênese e esterificação da vitamina A em células da retina (CHANCE et al., 1979).

As reações que produzem o radical hidroxil são mais raras e necessitam a presença de íons metais de transição como o ferro e

Em uma célula aeróbia, em condições fisiológicas, as reações de produção de EAO ocorrem a relativamente baixa velocidade, utilizando aproximadamente 2 à 5% do oxigênio total consumido (BOVERIS & CADENAS, 1982). Isto, somado à existência de sistemas de defesa específicos, determina que as concentrações de EAO se mantenham em valores muito baixos nos tecidos.

A figura II sumariza as principais fontes celulares de espécies ativas de oxigênio e sua metabolização.

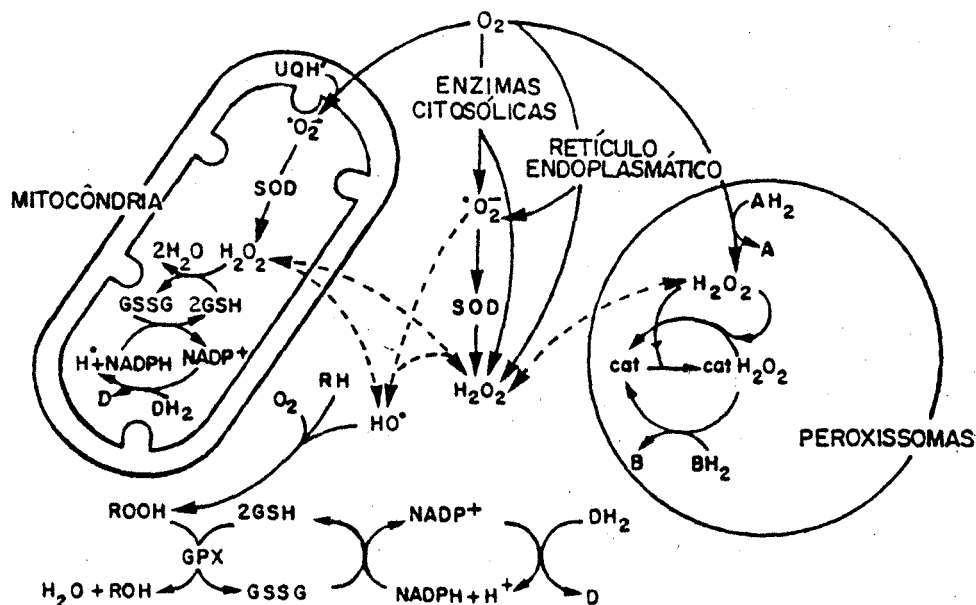


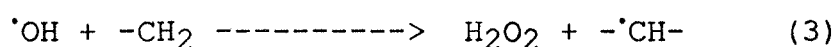
FIGURA II - Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização de EAO. UQH• = ubisemiquinona; GSSG = glutathiona oxidada; GSH = glutathiona reduzida; DH₂ e D = sistemas redutores de NADP não-específicos; SOD = superóxido dismutase; GPx = glutathiona peroxidase; Cat = catalase; B e BH₂ = doadores de hidrogênio (CHANCE et al., 1979).

1.3 REATIVIDADE DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

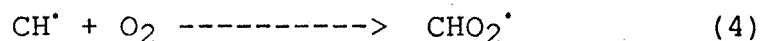
A reatividade das EAO varia; algumas são relativamente estáveis (como o H_2O_2), mas a maioria tende a ser extremamente reativa e instável. Assim sendo, estas espécies apresentam uma vida-média muito curta, da ordem de frações de segundo. O fato dos radicais possuírem um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo favorece as colisões bimoleculares e sua aproximação com outras moléculas. Considerando que a velocidade das reações químicas está determinada pela eficácia das colisões moleculares, estando estas aumentadas, as reações se dão muito mais rapidamente. Por causa da sua reatividade, a maioria dos radicais existe apenas em baixas concentrações (10^{-4} a 10^{-9} M) e não se distancia do seu sítio de formação. O radical hidroxil, o mais reativo de todos, atua num raio de 30 angstroms e tem um tempo de vida da ordem de microssegundos (SOUTHORN & POWIS, 1988).

Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado, induzindo, assim, reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro radical livre formado. As reações em cadeia têm uma série de etapas durante as quais: se consome uma espécie intermediária, os reativos se convertem em produtos e os intermediários são regenerados, permitindo que o ciclo recomece.

O primeiro passo das reações em cadeia consiste na iniciação, ou seja, é necessário que a EAO ataque uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Na LPO, a EAO é o radical hidroxil e o grupamento químico é um metileno pertencente a um ácido graxo polinsaturado da membrana (reação 3).



A retirada de um átomo de hidrogênio do grupamento metileno, leva à formação de um radical centrado no carbono ($\text{-}\cdot\text{CH-}$), o qual, tende a se estabilizar por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado (Figura III). Este, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio, produz o radical peroxil (reação 4) também chamado radical peróxi.



No estágio de propagação, os radicais peroxil são capazes de abstrair hidrogênio de outra molécula lipídica, ou seja, de um ácido graxo adjacente. O radical peroxil pode, também, se combinar com o átomo de hidrogênio que ele abstraiu, produzindo um lipídio hidroperóxido. Os lipídios hidroperóxidos se decompõe numa reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como o malondialdeído, hidrocarbonetos voláteis (como o gás pentano) e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente (Figura III) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Foi sugerido que as reações de degradação que ocorrem durante a LPO podem originar oxigênio *singlet*, acelerando este processo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

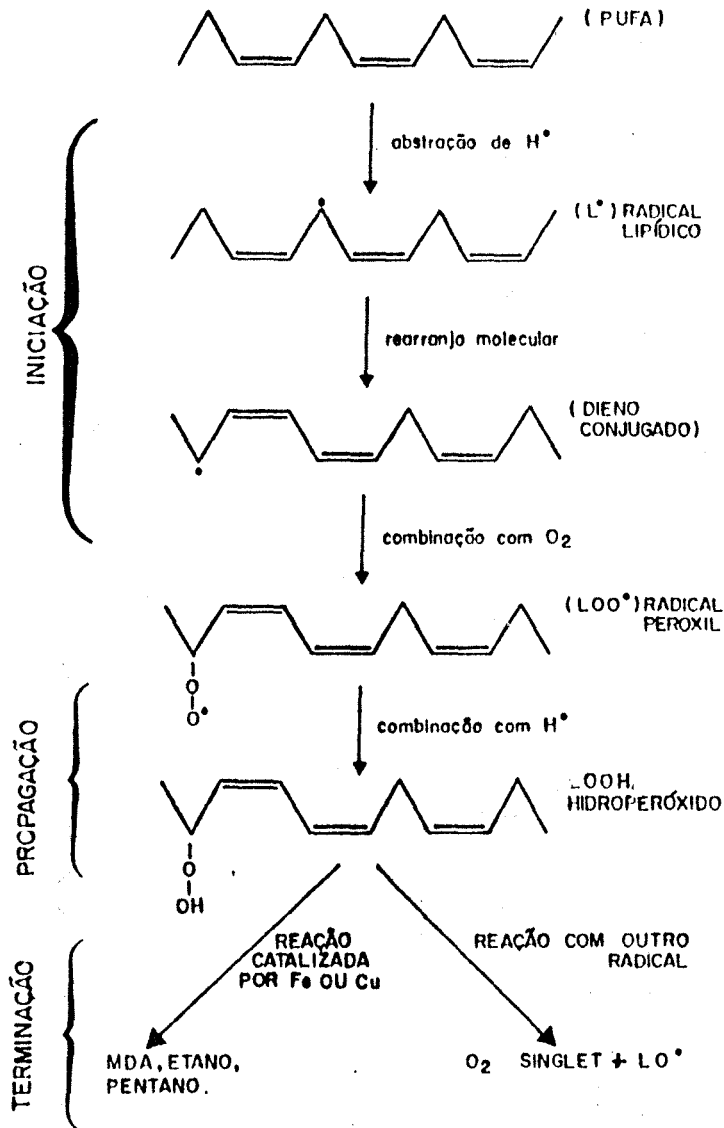


FIGURA III - Reações em cadeia da LPO.

Na etapa de terminação, dois radicais peróxil reagiriam entre si formando um tetróxido instável que se decompõe dando

origem ao oxigênio singlet (1O_2) e carbonilas excitadas (RO^*) (RUSSEL, 1957). Estas espécies excitadas retornam ao seu estado fundamental emitindo quantas de luz visível. Este processo é conhecido como quimioluminescência e constitui-se num importante método de quantificação da LPO.

As vitaminas A (KRINSKY, 1989) e E (PRYOR, 1976), a glutathiona (KOSOWER, 1976) e o ácido úrico (WILSON, 1985) são efetivos inibidores fisiológicos das reações em cadeia da LPO. Outro inibidor da LPO é o hidroxitolueno butilado (BHT). Este composto é utilizado como aditivo alimentar, já que os produtos finais da LPO são tóxicos e podem acarretar a perda do sabor e tornar rançosos os alimentos (ARUOMA et al., 1990).

A LPO é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Além de ser um fator de renovação da membrana, a LPO é um passo essencial na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose, pinocitose e lise de membranas intracelulares (MEERSON et al., 1982). Os efeitos da LPO sobre as biomembranas podem ser classificados em pelo menos 4 grupos: a) mudanças no microambiente lipídico de enzimas ligadas à membrana, em canais iônicos e receptores, ativando ou inibindo a atividade destas proteínas; b) formação de novos canais de permeabilidade; c)

formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-as irreversivelmente; d) oxidação de grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, acarretando perda de suas propriedades funcionais (Figura IV). Dependendo do grau de severidade, a LPO causa desde alterações na permeabilidade da membrana e perda da função secretória até morte celular (MEERSON et al., 1982; MEAD apud PRYOR, 1976). Se a LPO atingir a membrana lisossomal pode haver a liberação de enzimas lisossômicas e fosfolipases, o que acelera a degradação das membranas. Também as alterações na permeabilidade podem levar a um acúmulo de cálcio intracelular, ativando fosfolipases cálcio-dependentes, formando um ciclo vicioso (RICHTER & FREI, 1988).

1.4 SISTEMAS DE DEFESA CONTRA AS EAO

Os organismos vivos dispõem de sistemas enzimáticos específicos que oferecem a primeira linha de defesa frente à produção fisiológica de EAO. Estas enzimas evitam o acúmulo de O_2^- e H_2O_2 para que não haja a produção do radical hidroxil, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa.

Existem substâncias que neutralizam a ação dos radicais livres. Se esta neutralização ocorrer na fase de iniciação ou propagação da LPO, havendo a formação de produtos menos tóxicos, a substância é chamada *scavenger*. A substância pode, também,

absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os; neste caso é chamada *quencher* (SIES & MURPHY, 1991).

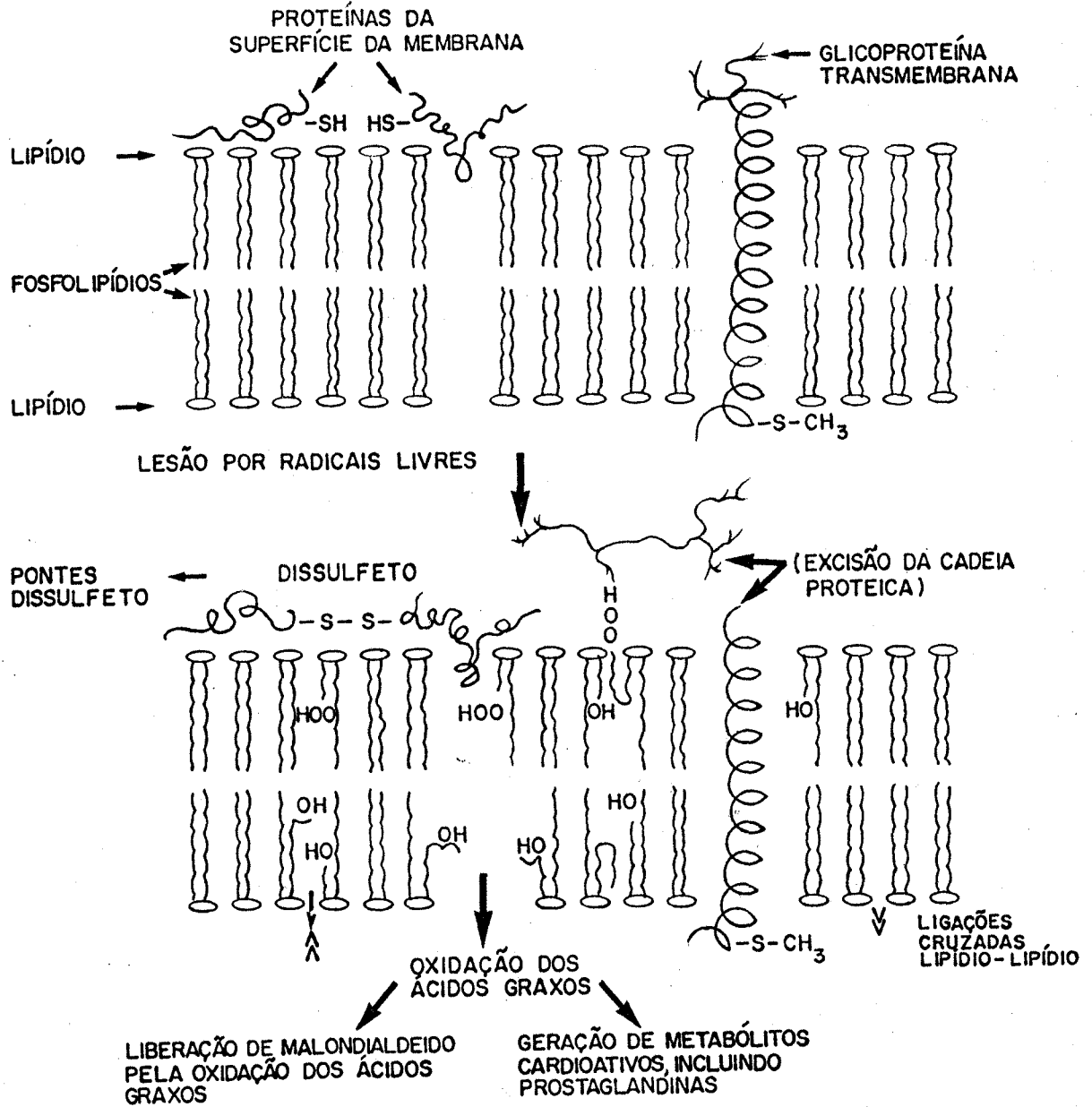
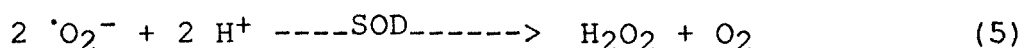


FIGURA IV - Efeito da LPO sobre as membranas celulares.

1.4.1 DEFESAS ENZIMÁTICAS

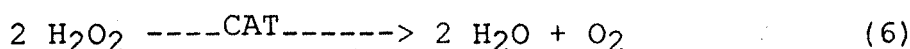
Dentre o sistema enzimático de defesa contra as EAO, salientam-se três enzimas: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx).

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima que cataliza a dismutação do radical superóxido para formar peróxido de hidrogênio e oxigênio (reação 5). Esta reação pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico, porém, com a presença da SOD, a velocidade desta reação é 10^4 vezes maior (SOUTHORN & POWIS, 1988).

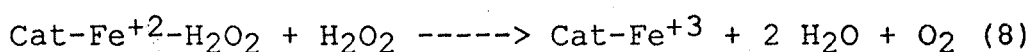
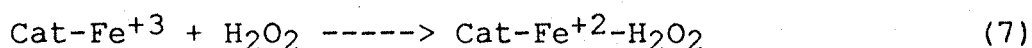


Esta enzima está amplamente distribuída, com uma variedade de formas. Há uma forma que contém cobre e zinco (CuZn-SOD) em seu sítio de ativação e é encontrada no citosol das células eucarióticas. Sua atividade enzimática foi descoberta por Mc Cord e Fridovich (1969). A mitocôndria apresenta um tipo distinto de SOD, contendo manganês (Mn-SOD), localizada na matriz mitocondrial. Além disso, uma ferro-enzima (Fe-SOD) foi identificada em bactérias (CHANCE et al., 1979).

O H_2O_2 formado pela dismutação do $^\cdot\text{O}_2^-$ pode ser transformado em água pela ação da enzima catalase (CAT) (equação 6).

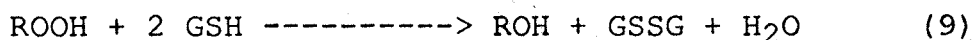


A CAT está presente em todos os tipos de células de mamíferos. Ela é uma hemoproteína com atividade de peroxidase específica para H_2O_2 , atuando este, simultaneamente, como hidroperóxido e como doador de hidrogênio (reações 7 e 8) (CHANCE et al., 1979).



A CAT está localizada principalmente em organelas intracelulares como os peroxissomas.

A glutathiona peroxidase (GPx), descoberta em 1957 por Mills, tem uma ação não específica sobre H_2O_2 , atuando sobre vários substratos como os hidroperóxidos orgânicos. Há dois tipos de GPx: uma que utiliza selênio como cofator e uma selênio independente. A GPx cataliza a reação de hidroperóxidos com glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido (reação 9).



A GPx tem alta atividade no fígado e nos eritrócitos, onde ela foi descoberta. Tem moderada atividade no coração e nos pulmões e baixa atividade no músculo (MILLS, 1960).

Outras peroxidases são essenciais no metabolismo, como a iodeto peroxidase, importante na biossíntese dos hormônios

tireoidianos e a mieloperoxidase, presente nos eritrócitos (DEL MAESTRO, 1980).

A distribuição das enzimas antioxidantes nas células está intimamente relacionada com as fontes de EAO. Estão em maior quantidade em locais particularmente expostos às EAO.

1.4.2 DEFESAS NÃO-ENZIMÁTICAS

As defesas não-enzimáticas incluem antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e antioxidantes hidrofílicos (ascorbato, glutatona, indóis e catecóis) (SIES & MURPHY, 1991). Vamos citar algumas propriedades e características dos tocoferóis e carotenóides por serem o foco de estudo deste trabalho.

1.4.2.1 TOCOFERÓIS

A vitamina E é um tipo de tocoferol (alfa-tocoferol) (Figura V). É o principal antioxidante lipossolúvel responsável pela proteção dos ácidos graxos polinsaturados das membranas contra a LPO (KAGAN, 1989). Esta vitamina está implicada na permeabilidade e estabilidade das membranas celulares (LUCY, 1972). A distribuição da vitamina E nos tecidos e fluidos biológicos mostra uma relação íntima com a concentração de ácidos graxos polinsaturados e com as concentrações de oxigênio às quais eles estão expostos. As concentrações de vitamina E parecem maiores

nos lugares onde a LPO está favorecida (KORNBRUST & MAVIS, 1980; VATASSERY et al., 1988; DREVON, 1991).

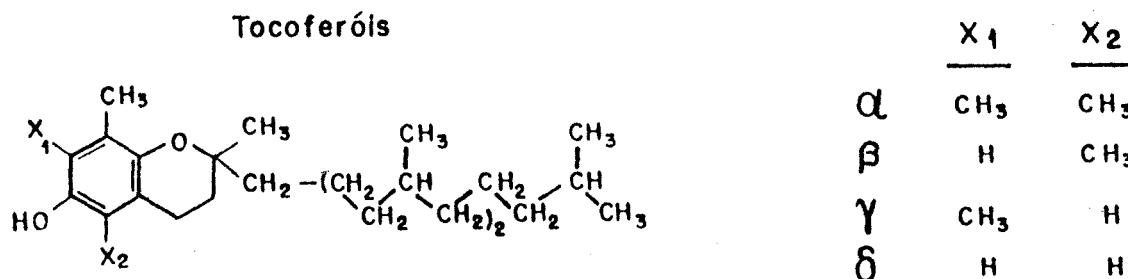


FIGURA V - Estrutura dos tocoferóis.

A vitamina E foi descoberta em 1922 por Evans e Bishop da Universidade da Califórnia. Eles descobriram um fator não-identificado em óleos vegetais que era necessário para a reprodução em ratas. Foi chamado fator reprodutivo solúvel em gordura. Em 1924, este fator foi identificado e chamado de vitamina E por Barnett Sure. Comprovou-se que, em humanos, a vitamina E tem pouco ou nenhum efeito na reprodução. Esta vitamina encontra-se presente no gérmen de trigo, em folhas de alfafa seca, na alface fresca (SCOTT, 1980).

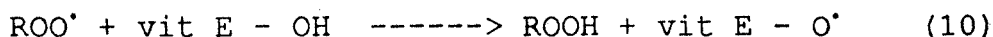
O ser humano não sintetiza vitamina E. Portanto, o nível desta vitamina depende da quantidade ingerida na dieta; do nível de pró-oxidantes, antioxidantes, selênio e aminoácidos sulfurados

presentes na dieta. O selênio economiza vitamina E de três maneiras: 1) ele é necessário para o funcionamento normal do pâncreas, que permite uma digestão normal das gorduras, formação das micelas e absorção normal de vitamina E; 2) ele é o cofator da enzima GPx que destrói peróxidos, assim menos vitamina E é necessária para a defesa das membranas; 3) ele ajuda, de um modo desconhecido, a retenção de vitamina E no plasma sanguíneo.

A ingesta necessária de vitamina E na dieta está na faixa de 4 a 22 UI/dia em adultos, com valores médios entre 11 e 13 UI/dia. Isto mantém níveis plasmáticos em torno de 23 $\mu\text{mol/l}$ (DI MASCIO et al., 1991).

Sabe-se que várias doenças podem ser aliviadas pela ingesta de vitamina E como a tromboflebite e a claudicação intermitente e pode também melhorar a circulação nas extremidades dos anciãos (SCOTT, 1980). Estudos indicam que a vitamina E tem efeito benéfico na prevenção de doenças cardíacas, doenças nos olhos, na pele e úlceras. No caso do câncer, a queda no conteúdo de vitamina E plasmático observada, parece ser mais consequência do que causa da doença (DIPLOCK, 1991).

Os tocoferóis protegem as membranas por sua ação de scavenger de radicais peroxil, sem agir em outros passos da propagação da LPO. A reação envolve um radical peroxil e um grupo hidroxil fenólico do tocoferol para gerar o hidroperóxido orgânico e o radical tocoferil (reação 10) (SIES & MURPHY, 1991).



O resultado desta reação é que um radical orgânico relativamente reativo (ROO[•]) é transformado em um menos reativo, o radical cromanoxil (ROOH). Assim, o tocoferol pode inibir as reações em cadeia da LPO.

O ácido ascórbico (vitamina C) pode interagir com o radical tocoferil, regenerando a vitamina E e convertendo-se em radical ascorbil, muito estável (BISBY, 1990; SIES & MURPHY, 1991). No entanto, na presença de metais de transição, o ácido ascórbico pode provocar a formação de radicais livres (MACHLIN & BENDICH, 1987). Sabe-se também que, na presença de quantidades traço de ferro e cobre, o ácido ascórbico pode potencializar a LPO (WOODWARD & ZAKARIA, 1985). Não há, contudo, evidência de que a autooxidação da vitamina C conduza à LPO. A vitamina C pode atuar também como *quencher* de EAO como, por exemplo, o oxigênio *singlet*.

O tocoferol pode, também, fazer *quenching* de oxigênio *singlet* (MC CAY, 1989). O alfa-tocoferol é mais efetivo que seus homólogos neste processo de *quenching* de ¹O₂[•]; na seqüência: alfa > beta > gama > delta - tocoferol (KAISER et al., 1990).

Um análogo hidrossolúvel do alfa-tocoferol ou vitamina E é o trolox (Trolox C; 6-hidroxi-2,5,7,8,tetrametil-croman-2-ácido carboxílico). O trolox é a região polar, aromatizada da molécula e a longa cauda apolar é o fitol (Figura VI). O trolox tem sido

1.4.2.2 CAROTENÓIDES

Os pigmentos carotenóides são compostos isoprenóides amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham um importante papel protetor das células e organismos. Mais de 500 carotenóides já foram isolados e caracterizados, porém apenas cerca de 50 deles têm atividade biológica, ou seja, podem ser convertidos enzimaticamente à vitamina A em tecidos animais (PAWSON, 1981; KRINSKY, 1989). Uma das fontes mais ricas em vitamina A é o fígado, em especial os óleos de fígado de peixes e de mamíferos marinhos. Tem-se notícia que os gregos e egípcios recomendavam comer fígado cozido. Também era utilizada a aplicação tópica de suco de fígado cozido e espremido na cura da cegueira noturna, a primeira doença a ser reconhecida como resultado de deficiência nutricional de vitamina A. Esta vitamina é também encontrada no leite, na manteiga, no colostro, na gema de ovo. A vitamina A, como tal, não ocorre em plantas, mas muitos vegetais contêm carotenóides, tais como a cenoura, a alface, o espinafre, a ervilha, a banana, o tomate. O β -caroteno é o seu principal precursor, sendo chamado de pró-vitamina A.

O nível plasmático de vitamina A é controlado por um mecanismo homeostático que envolve a proteína transportadora do retinol. Assim, um aumento no consumo de vitamina A na dieta, não aumenta significativamente o nível de retinol circulante e o excesso é estocado no fígado. Sabe-se que o consumo exagerado

desta vitamina pode levar a um quadro de hipervitaminose A, caracterizado por hiperpigmentação da pele, perda de cabelos, problemas de visão, anorexia, hemorragias, danos ao fígado (MOBARHAN et al., 1990). Contudo, dietas enriquecidas com β -caroteno têm um efeito protetor contra o câncer de pulmão em fumantes (DIPLOCK, 1991).

O nível plasmático de vitamina A em crianças normais é de 20 a 30 $\mu\text{g/ml}$ e na puberdade e em adultos é da ordem de 40 a 50 $\mu\text{g/ml}$. A quantidade de vitamina A recomendada é de 5000 UI por dia (Recommended Dietary Allowances - National Academy of Sciences).

Estudos utilizando uma dose maciça de 200000 UI de vitamina A aplicada a crianças tailandesas com xeroftalmia (sinal de hipovitaminose A), melhorou este quadro e a condição hematológica das crianças que eram também anêmicas. Estes resultados sugerem que a vitamina A tem uma relação com o metabolismo do ferro, podendo aumentar a concentração sérica deste íon (BLOEM et al., 1990).

Estudos revelaram que a concentração de vitamina A decrescia com a idade. No entanto, o que acontecia, na verdade, era que a maior parte das pessoas idosas estudadas apresentavam hipercolesterolemia ou doença coronária. A estes pacientes, recomendava-se dietas pobres em gorduras e esta medida reduzia a absorção de vitaminas lipossolúveis como a A e a E (MOBARHAN et

al., 1990). Estas vitaminas podem também reduzir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), cujo processo está envolvido no surgimento da aterosclerose. Esta oxidação de LDL é iniciada por radicais livres de oxigênio (SATO et al., 1990; ESTERBAUER et al., 1989).

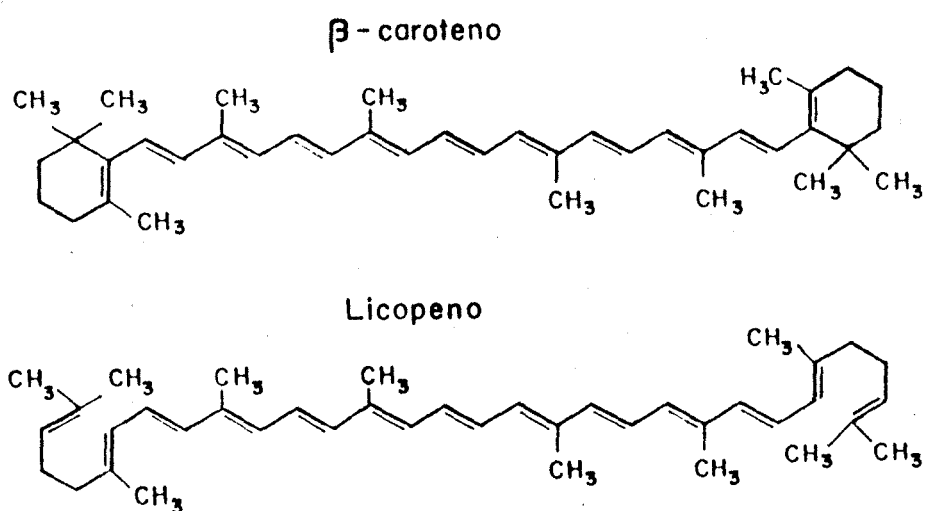
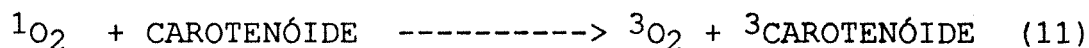


FIGURA VII - Estrutura do licopeno e do beta-caroteno.

Os carotenóides como o licopeno (presente no tomate) e o β -caroteno (Figura VII) são compostos que podem inativar moléculas eletronicamente excitadas, através do processo de *quenching* anteriormente explicado. Foote e Denny descobriram, em 1968, que os carotenóides podem fazer *quenching* de oxigênio *singlet*. Pelo seu considerável sistema de duplas ligações conjugadas, a vitamina A pode absorver a energia de excitação do 1O_2 , resultando na formação do carotenóide *triplet* (reação 11). Essa energia de excitação é dissipada numa reação subsequente, através de interações rotacionais e translacionais entre o carotenóide

triplet e o solvente, regenerando a molécula de carotenóide original (reação 12) (KRINSKY, 1989).



O licopeno tem duas vezes mais habilidade como *quencher* de oxigênio *singlet* do que o β -caroteno. Comparando as estruturas das duas substâncias, nota-se que o licopeno tem o anel β -ionona aberto (ver Figura VII) e parece que isto aumenta esta sua propriedade. Portanto, a propriedade de *quencher* dos carotenóides reside não apenas no estado de energia *triplet*, isto é, no sistema de duplas ligações conjugadas, mas também nos seus grupos funcionais. Os pigmentos biliares bilirrubina e biliverdina também têm ação de *quencher* de ${}^1\text{O}_2$, porém são menos efetivos do que os carotenóides (DI MASCIO et al., 1991).

A taxa de *quenching* do alfa-tocoferol é de $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sendo mais baixa do que a dos carotenóides como o licopeno ($3,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ou o β -caroteno ($1,4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (SIES & MURPHY, 1991). No entanto, as concentrações de tocoferol no plasma e nos tecidos são cerca de uma a duas ordens de magnitude maiores do que as de carotenóides (ITO et al., 1990). Portanto, ambos, carotenóides e tocoferóis são fisiologicamente potentes *quenchers* de oxigênio *singlet*.

A figura VIII mostra as interações dos micronutrientes no sistema de defesa antioxidante intracelular.

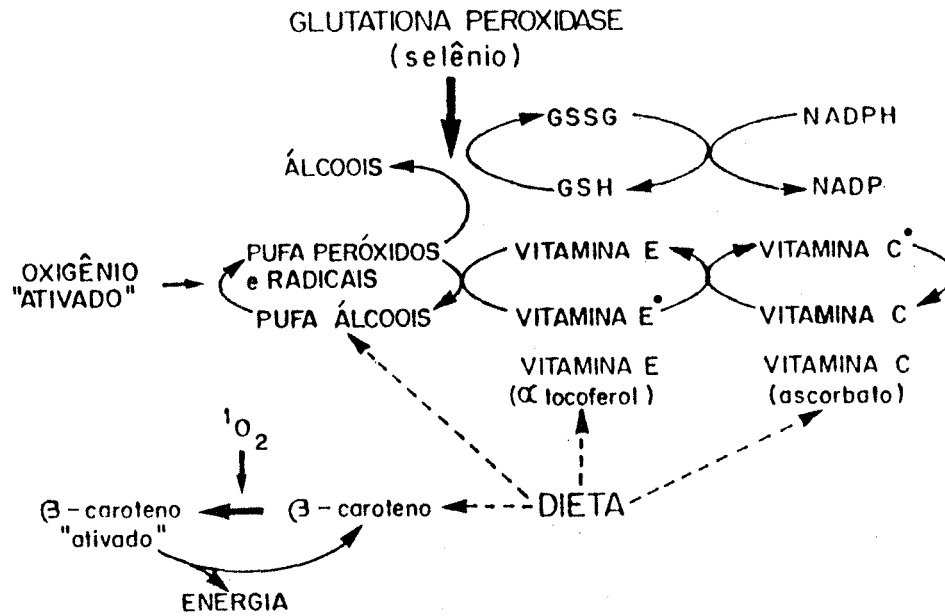


FIGURA VIII - Interações dos micronutrientes no sistema de defesa antioxidante (MACHLIN & BENDICH, 1987).

1.5 STRESS OXIDATIVO NO CORAÇÃO

A vida aeróbia é caracterizada por um estado estacionário de formação de oxidantes e por uma taxa de consumo de antioxidantes, que precisam ser regenerados continuamente para manter a homeostasia. Quando há um desequilíbrio no balanço pró-oxidantes/antioxidantes em favor dos pró-oxidantes, temos uma situação de *stress oxidativo* (SIES & MURPHY, 1991). Tanto os

aumentos nas velocidades de geração de $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 como a diminuição na atividade da catalase, SOD, glutathiona peroxidase ou ambas as coisas, podem levar à situação de stress oxidativo (GERSCHMAN et al., 1954). As enzimas antioxidantes podem ter sua função afetada por ação das EAO, agravando o stress oxidativo original (GONZALEZ FLECHA, 1991).

No coração, o stress oxidativo pode se instalar quando houver a interrupção temporária da circulação (isquemia) seguida do restabelecimento da mesma (reperfusão). Se os miócitos ficarem em isquemia podem ser viáveis por um período aproximado de 4 horas. Entretanto, se a isquemia for curta, mas seguida de reperfusão, a função contrátil pode ser afetada; o coração tornar-se-á arritmico (*stunned heart* = coração atordado) (HEARSE & TOSAKI, 1987). Sendo a isquemia mais prolongada e seguida de reperfusão, o coração fica num estado de contração mantida ou em contratura (*stone heart* = coração de pedra) (KATZ & TADA, 1972; COOLEY, 1972; WUKASCH et al., 1972; HEARSE et al., 1977). A falta de circulação é prejudicial já que priva os tecidos de oxigênio, nutrientes e fatores essenciais e promove o acúmulo de substâncias tóxicas. No entanto, a falta de oxigenação tecidual seguida de sua reposição, ao invés de melhorar o quadro, agrava-o ainda mais, reduzindo o tempo de sobrevivência celular. Por isto, este fenômeno é também conhecido como "paradoxo do oxigênio".

É conhecido da literatura um fenômeno semelhante chamado "paradoxo do cálcio" que se trata da perfusão sem cálcio seguida por perfusão contendo este íon. Nessa situação, também podem ser observadas contraturas cardíacas (GANOTE & NAYLER, 1985).

Há relatos de que o cálcio transiente aumenta muito durante a reperfusão, após curtos períodos de isquemia (LEE & ALLEN, 1992). Este aumento no influxo de cálcio requer mais ATP para a recaptação deste íon; isto poderia explicar a redução na utilização de energia do miocárdio arritmico por reperfusão (LASTER et al., 1989). Sabe-se também que bloqueadores de cálcio como o verapamil poderiam atenuar a depleção de ATP por reduzir o acúmulo de cálcio e/ou por reduzir a performance cardíaca e, assim, a utilização de ATP (NEUBAUER & INGWALL, 1989). O influxo e a sobrecarga de cálcio no miocárdio são os responsáveis pela lesão celular observada no início da reperfusão (DU TOIT & OPIE, 1992). Porém, parece não haver consenso entre os autores se o aumento do cálcio citosólico seria causa ou consequência dos danos observados na reperfusão do miocárdio isquêmico. Alguns sugerem que o aumento do cálcio intracelular desencadearia sistemas enzimáticos que levariam à formação de radicais livres (SOUTHORN & POWIS, 1988). Outros, porém, sugerem que a formação de radicais livres de oxigênio durante a reperfusão provocaria lesões de membrana, permitindo a entrada de cálcio no citosol (MEERSON et al., 1982). Assim sendo, o paradoxo do oxigênio e o

paradoxo do cálcio têm sido considerados "duas facetas do mesmo problema" (HEARSE et al., 1978).

Várias alterações funcionais podem se manifestar após isquemia/reperfusão: rompimento das membranas plasmática e lisossomal, desorganização miofibrilar, edema e rompimento de mitocôndrias, distensão do retículo sarcoplasmático e túbulos T, aumento da permeabilidade vascular (SHLAFER et al., 1982; SIMPSON et al., 1987; FERREIRA et al., 1988).

As lesões observadas no miocárdio isquêmico podem ser desencadeadas pela inibição, induzida por radicais livres, de enzimas como a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (THOMAS & REED, 1990; HUANG et al., 1992) e Ca^{++} ATPase (KANEKO et al., 1989). A $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase é uma enzima da membrana que mantém os gradientes iônicos através da mesma. A Ca^{++} ATPase atua no sentido de manter o nível intracelular de cálcio dentro dos limites fisiológicos. Ambas enzimas, portanto, são indispensáveis para a viabilidade celular.

Até o presente momento não se conhecem os mecanismos pelos quais haveria o aumento na produção de EAO durante a isquemia/reperfusão do miocárdio. A hipótese mais aceita é a de Mc Cord (1985). Este autor propôs que a enzima xantina oxidase seria a responsável pelo aumento na velocidade de formação de O_2^- durante a reoxigenação. Durante a isquemia, há um acúmulo de hipoxantina nos tecidos, resultante da degradação do ATP através

de ADP, AMP e adenosina. A hipoxantina é oxidada a xantina e ácido úrico. A reação em tecidos normais é efetuada pela xantina desidrogenase. A isquemia converte esta enzima a sua forma oxidase que formará $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 quando o O_2 volta na reperfusão (Figura IX) (KELLOG & FRIDOVICH, 1975; CHAMBERS et al., 1985; MARKLUND, 1988). Esta conversão dever-se-ia à ativação de uma protease cálcio-dependente (SIMPSON et al., 1987). Segundo Myers e colaboradores (1985), a isquemia cardíaca por oclusão coronariana resultaria em 300% de aumento na atividade da xantina oxidase.

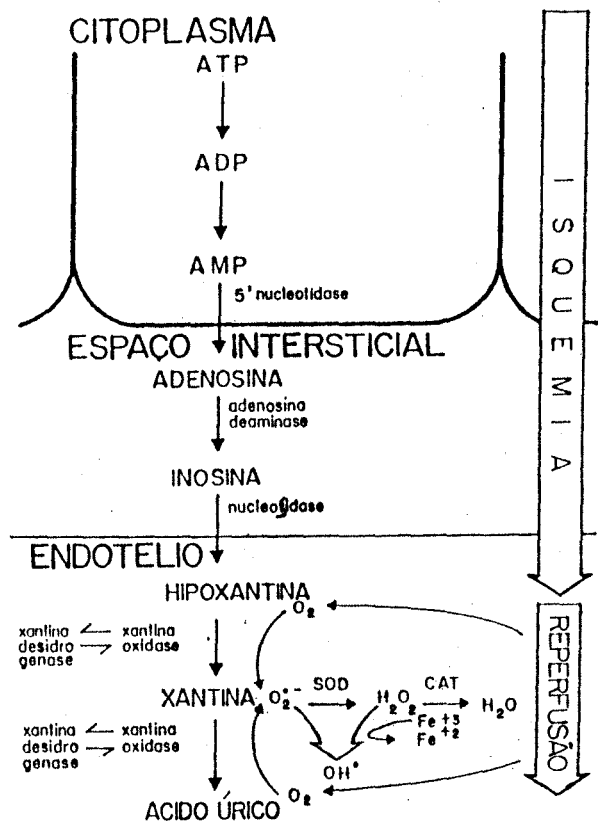


FIGURA IX - Produção de EAO durante a isquemia-reperfusão. Teoria de Mc Cord (1985).

A hipótese alternativa apresenta a mitocôndria como principal sítio gerador de $\cdot\text{O}_2^-$ durante a reperfusão (JONES, 1985). Durante a isquemia, a ausência de oxigênio determina um estado máximo de redução dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Na reperfusão, o vazamento de elétrons da cadeia respiratória é maior e, portanto, aumentaria a concentração de O_2^- intramitocondrial.

A primeira hipótese é aplicável a tecidos com alta atividade de xantina desidrogenase (como é o caso do intestino e do coração de rato) e tem seu mais forte apoio experimental no efeito protetor observado pela administração de inibidores da xantina oxidase (como o alopurinol). A segunda, no entanto, é válida para tecidos com baixa atividade de xantina desidrogenase como é o caso do coração de humanos. Apoia-se experimentalmente no marcante dano mitocondrial observado no miocárdio humano após isquemia/reperfusão (FERREIRA et al., 1988).

A figura X resume as hipóteses de formação de EAO durante a isquemia-reperfusão.

Existem dados na literatura de que as vitaminas A e E poderiam reduzir os efeitos das EAO no coração (CAVAROCCHI et al., 1986; MILEI et al., 1986; MASSEY & BURTON, 1989; MAGNER-WRÓBEL et al., 1990; MASSEY & BURTON, 1990; FERREIRA et al., 1991; LE et al., 1992).

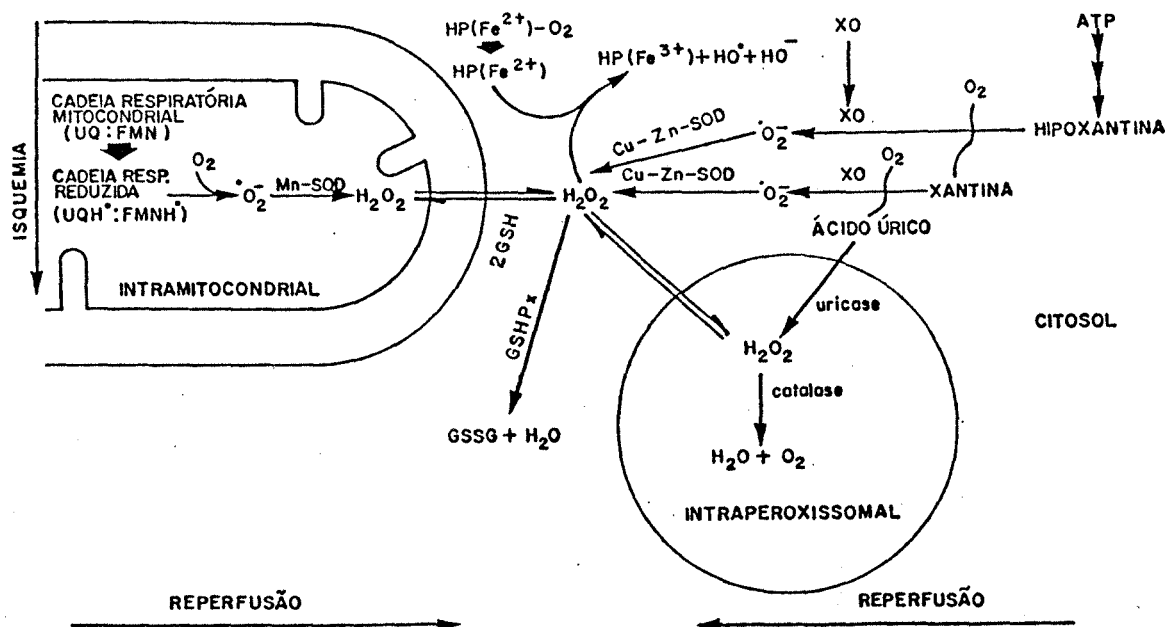


FIGURA X - Hipóteses da seqüência de eventos bioquímicos relacionados com a isquemia-reperfusão.

1.5.1 MODELO DE CONTRATURA CARDÍACA

Em qualquer uma das hipóteses propostas para explicar os danos reperfusion, sugere-se a formação de $O_2^{\cdot -}$ que, pela ação da SOD, irá formar H_2O_2 . Nós temos utilizado esta EAO, o H_2O_2 , como ferramenta de estudo para produzir stress oxidativo em coração isolado. Mazzella e colaboradores (1971) injetaram H_2O_2 na circulação de um cão para testar a sensibilidade de um eletrodo de oxigênio implantado no coração. Eles observaram que o H_2O_2 produzia um efeito inotrópico positivo sobre o miocárdio do cão.

O mesmo efeito foi observado em átrio e ventrículo de rã, ventrículo de rato e átrio de cão (MAZZELLA et al., 1980). Bianchini e Belló (1988) observaram que o H_2O_2 tem efeito inotrópico positivo, cronotrópico negativo e é vasoconstritor coronariano em coração isolado e perfundido de rato. Estes efeitos foram reduzidos pela administração de indometacina à solução perfusora.

No nosso trabalho de Mestrado, estabelecemos um modelo de estudo da contratura cardíaca. Ao injetarmos altas concentrações de H_2O_2 (a partir de 128 mM) no coração isolado e perfundido de rato, observamos o surgimento de contraturas (BELLÓ & BELLÓ, 1988). Esse efeito foi dose-dependente e reduzido pela adição de nifedipina (BELLÓ & BELLÓ, 1989a) e indometacina (BELLÓ & BELLÓ, 1989b) ao líquido perfusor. Este modelo de estudo mimetiza a situação de isquemia/reperfusão do miocárdio com a vantagem de ser muito mais rápido do que submeter o coração a um longo período de isquemia seguido por reperfusão para poder se observar a contratura cardíaca. Além disso, ele reforça a hipótese de que a contratura cardíaca é resultado da produção de EAO no coração.

1.6 OBJETIVOS

Foram objetivos desta tese:

1. determinar o efeito do H_2O_2 sobre a contratilidade, o conteúdo de glicogênio e lipoperoxidação de corações isolados e perfundidos de rato.

2. determinar a ação da vitamina A e do trolox nos efeitos do H_2O_2 sobre a contratilidade, conteúdo de glicogênio e a lipoperoxidação de corações isolados e perfundidos de rato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais eram mantidos em caixas de 270 x 260 x 310 mm com assoalho recoberto de serragem (5 animais por caixa). Eles recebiam água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS) *ad libitum*.

2.2 REAGENTES

Nos experimentos realizados neste trabalho, foram utilizados os reagentes apresentados na tabela II, onde também estão colocados seus respectivos pesos moleculares e fornecedores.

TABELA II - Reagentes utilizados, seus respectivos pesos moleculares e fornecedores.

REAGENTE	PESO MOLECULAR	FORNECEDOR
NaCl	58,45	Reagen
KCl	74,50	Reagen
MgCl ₂ + 6 H ₂ O	203,30	Reagen
CaCl ₂ + 2 H ₂ O	147,00	Reagen
NaHCO ₃	84,00	Reagen
NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O	138,00	Reagen
Na ₂ SO ₄	142,00	Reagen
glicose	180,20	Reagen
H ₂ O ₂	34,00	Merck
H ₂ SO ₄	98,08	Synth
ácido tiobarbitúrico	144,10	Sigma
ácido tricloroacético	163,39	Vetec
antrona	194,23	Reagen
trolox	250,29	Aldrich
vitamina A (Tanvimil A)	286,50	Lab. Raymos
tBOOH	90,12	Sigma

2.3 LÍQUIDOS DE PERFUSÃO

2.3.1 TYRODE

A solução de Tyrode, empregada para a perfusão do coração de rato, apresentava a seguinte composição, em mM: NaCl 120; KCl 5,4; MgCl₂ 1,8; CaCl₂ 1,25; NaHCO₃ 27; NaH₂PO₄ 2; Na₂SO₄ 1,8 e glicose 11,1.

Eram preparadas três "soluções-mãe": uma contendo NaCl, KCl e MgCl₂ denominada "Cloretos", outra contendo Na₂SO₄, NaHCO₃ e NaH₂PO₄, denominada "Sódios" e outra contendo CaCl₂ denominada "Cálcio". As soluções-mãe eram preparadas com uma concentração 20 vezes maior, ou seja, a partir delas, podiam ser preparados 20 litros de Tyrode. Para tanto, pesavam-se as seguintes quantidades de cada reagente, em água destilada:

Para preparar a solução-mãe "Cloretos": NaCl 140,4; KCl 8,05; MgCl₂ 4,07.

Para preparar a solução-mãe "Sódios": NaHCO₃ 45,36; NaH₂PO₄ 5,52; Na₂SO₄ 5,11.

Para preparar a solução-mãe "Cálcio": CaCl₂ 14,7.

Para preparar um litro de Tyrode era necessário misturar 50 ml de "Cloretos", 50 ml de "Sódios", 12,5 ml de "Cálcio", 2 gramas de glicose e completar com água destilada.

As "soluções-mãe" eram guardadas (0-4 °C) e o Tyrode era preparado minutos antes de ser utilizado para a perfusão do coração.

O Tyrode, preparado como descrito acima, era borbuhlado com carbogênio (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico) por 10 minutos aproximadamente, para acidificar a solução, a fim de ajustar o pH em 7,4. Depois deste período, media-se o pH com um instrumento digital (Digimed, modelo DMPH - 2). A solução era borbuhlada com carbogênio durante todo o experimento, para mantê-la oxigenada.

2.3.2 TYRODE - H₂O₂

As soluções de H₂O₂ utilizadas para a perfusão dos corações foram preparadas em Tyrode a partir de uma solução a 30% (Perhidrol, Merck). Foi escolhida a concentração 256 mM a partir do trabalho de Oliveira (1993). Para tanto, era adicionado um volume de 28,4 ml da solução a 30% de H₂O₂ a 1 litro de Tyrode. Após a perfusão com H₂O₂, lavava-se todo o sistema com Tyrode para evitar a contaminação do experimento seguinte.

2.3.3 TYRODE - VITAMINA A

Após preparado o Tyrode, era acrescida a vitamina A, momentos antes da perfusão. Diluía-se uma cápsula de vitamina A hidrossolúvel em dois litros de Tyrode. Como cada cápsula continha 100000 U.I., a concentração final da vitamina era de 50000 U.I./l ou 50 U.I./ml. O pH da solução final era medido e

ajustado com carbogênio no valor de 7,4. Todo o aparelho perfusor era escurecido para evitar a ação da luz sobre a solução perfusora.

2.3.4 TYRODE - TROLOX

Ao Tyrode era acrescentado, momentos antes da perfusão, trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) na concentração de 0,2 ou 2 mM. Para tanto, colocava-se, respectivamente, 0,05 ou 0,50 gramas de trolox em 1 litro de Tyrode. Mesmo sendo uma substância hidrossolúvel, a solubilização no Tyrode não era muito boa; era necessário aquecer um pouco a solução e agitá-la com agitador magnético por alguns minutos. O pH final da solução era ajustado em 7,4 mediante carbogênio. A solução também foi protegida da ação da luz.

2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Estabeleceram-se 8 grupos experimentais: grupo controle, grupo H_2O_2 , grupo vitamina A, grupo vitamina A + H_2O_2 , grupo trolox 0,2 mM, grupo trolox 0,2 mM + H_2O_2 , grupo trolox 2 mM e grupo trolox 2 mM + H_2O_2 .

No grupo controle os corações eram perfundidos por 30 minutos com Tyrode (n=6).

O grupo H_2O_2 foi perfundido por 10 minutos com Tyrode e, após esse período, os corações recebiam uma solução de Tyrode

acrescido de H_2O_2 (concentração final de 256 mM), durante o período de 20 minutos (n=5).

O grupo vitamina A foi perfundido por 10 minutos com Tyrode e por mais 20 minutos com Tyrode acrescido de vitamina A (concentração final 50 U.I./ml) (n=6).

O grupo vitamina A + H_2O_2 foi perfundido por 10 minutos com uma solução de Tyrode acrescido de vitamina A (concentração final de 50 U.I./ml), recebendo, em seguida, uma solução de Tyrode mais H_2O_2 (256 mM) por um período de 20 minutos (n=6).

O grupo trolox foi perfundido com Tyrode durante 10 minutos e por mais 20 minutos com Tyrode acrescido de trolox (concentração final 0,2 ou 2mM) (n=6).

O grupo trolox + H_2O_2 foi perfundido durante 10 minutos com Tyrode acrescido de trolox (0,2 ou 2 M) e por mais 20 minutos com Tyrode mais H_2O_2 (256 mM) (n=6).

Em cada grupo experimental, foram analisados: contratatura cardíaca, força de contração, frequência cardíaca, fluxo coronariano, conteúdo de glicogênio cardíaco e lipoperoxidação através de três técnicas distintas: teste do TBA-RS, consumo de oxigênio e quimioluminescência (QL) iniciada por hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH).

2.5 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Cada rato foi pesado (balança Marte) e sacrificado com uma pancada na cabeça. O tórax foi aberto, o coração removido e imerso numa solução de Tyrode à temperatura ambiente. Imediatamente, a aorta era fixada à cânula do aparelho de perfusão. Utilizava-se o líquido perfusor de acordo com o grupo experimental. Registrava-se a atividade mecânica do coração.

Do sétimo ao oitavo minuto de perfusão, coletava-se o perfusado num frasco para posterior realização do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA). O mesmo procedimento foi realizado do décimo quinto ao vigésimo minuto.

Após trinta minutos, os corações eram retirados do aparelho de perfusão. Removiam-se os restos de vasos e gorduras e separava-se uma fatia (em torno de 200 mg) do ventrículo esquerdo para a dosagem de glicogênio. O restante do coração era pesado (balança Marte A-500), colocado em *buffer* fosfato e homogeneizado em Potter. Este homogeneizado era centrifugado por 10 minutos a 1000 g. Tomava-se uma alíquota do sobrenadante para realizar o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA). As medidas de glicogênio e o teste do TBA eram realizados logo após a perfusão. Guardava-se cerca de 0,5 ml do homogeneizado (0-4 °C) para posterior dosagem de proteínas, que era realizada até um mês depois.

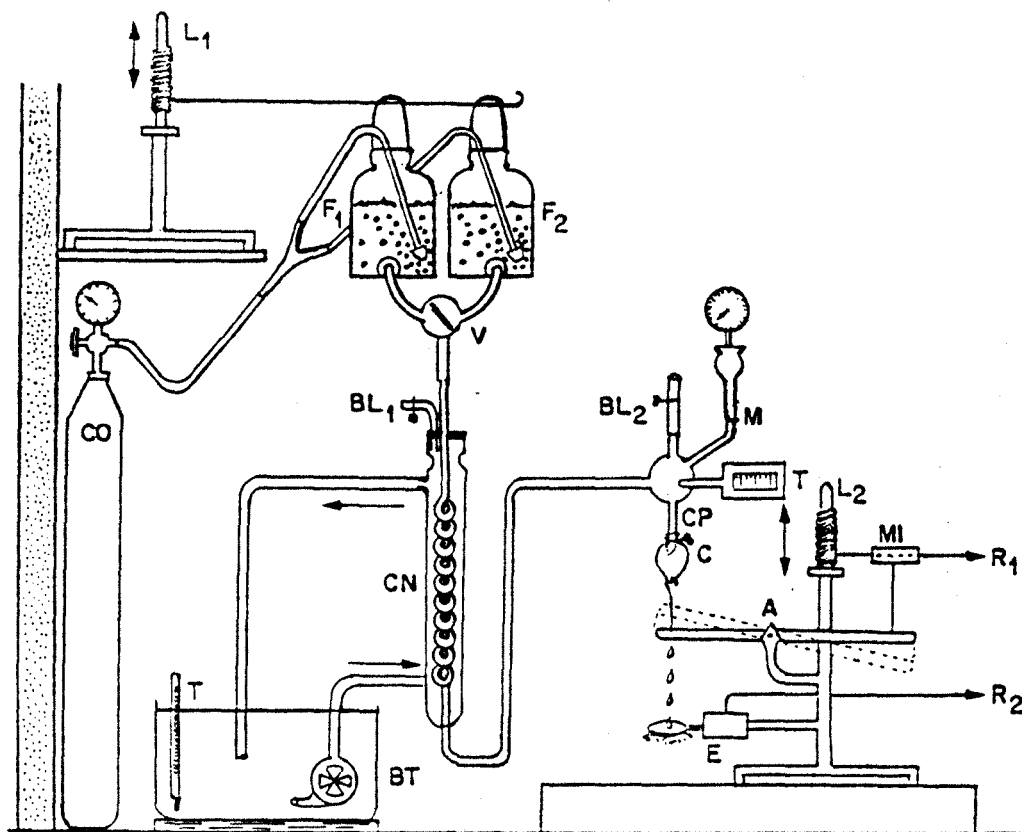
Em outros 6 grupos de animais, submetidos às mesmas condições experimentais dos grupos controle, H_2O_2 , vitamina A, vitamina A + H_2O_2 , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H_2O_2 , realizaram-se as medidas de consumo de oxigênio (que eram feitas logo após a perfusão) em homogeneizados de coração. Pedacos de tecido eram congelados ($-76\text{ }^\circ\text{C}$) por até 72 horas após a perfusão e as medidas de quimioluminescência eram realizadas nos homogeneizados destes corações.

2.6 PERFUSÃO DO CORAÇÃO

A perfusão do coração foi feita utilizando-se o método de Langendorff (1895) modificado (Figura XI).

Antes do início de cada série de experimentos, todo o sistema, desde os frascos (F1 e F2, Figura XI) até a cânula, era preenchido com a solução perfusora (Tyrode) e as bolhas eram retiradas através dos tubos BL1 e BL2 (Figura XI). A troca do líquido de perfusão era feita através de uma válvula de três vias (V, Figura XI), colocada acima do tubo de aquecimento (CN, Figura XI). Os frascos eram mantidos a uma altura de 82 cm da extremidade da cânula de perfusão (CP, Figura XI), o que determinava uma pressão constante de 8,02 kPa, em todos os experimentos. A altura dos frascos podia ser ajustada mediante um regulador de tensão (Lifter, E & M Instruments; L1, Figura XI). A pressão de perfusão era verificada através de um manômetro aneróide (barômetro metálico, E & M Instruments; M, Figura XI). O

Tyrode era gaseificado durante todo o experimento com carbogênio (CO₂, Fig. XI), uma mistura de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. Sua temperatura era mantida em 31 °C, mediante uma bomba circuladora de água, com termostato (bomba Haake FE Circulators; BT, Fig. XI). A temperatura da solução perfusora podia ser medida através de um termômetro digital (T, Fig. XI), colocado próximo à cânula de perfusão. A aorta era fixada ao aparelho de perfusão e, quando a cânula ultrapassava a válvula aórtica, penetrando no ventrículo esquerdo, a pressão no manômetro tornava-se pulsátil. Quando isto acontecia, tais preparações eram desprezadas. A perfusão das coronárias através da aorta fazia com que a solução perfusora saísse principalmente pelo seio venoso coronariano. Daí, a solução podia refluir pelas veias cavas ou passar ao ventrículo direito e ser expulsa através da artéria pulmonar. Parte da solução perfusora saía pelas veias de Tebésio de ambos os ventrículos. O líquido proveniente das veias de Tebésio do ventrículo direito era expulso através da artéria pulmonar. Todo o líquido escorria pelas paredes cardíacas externas, umedecendo o coração. Este líquido caía sob a forma de gotas sobre um estalagmógrafo (E, Figura XI) para seu registro. O líquido que chegava ao ventrículo esquerdo pelas veias de Tebésio era aí acumulado e, após, ejetado para a aorta, sendo reperfundido.



- | | | | |
|-----|----------------------|----|------------------------|
| A | - Alavanca | F1 | - Frasco de vidro |
| BL1 | - Tubo lateral | F2 | - Frasco de vidro |
| BL2 | - Tubo lateral | L1 | - Regulador de tensão |
| BT | - Bomba circuladora | L2 | - Regulador de tensão |
| C | - Coração | M | - Manômetro aneróide |
| CN | - Condensador | MI | - Miógrafo |
| CO | - Carbogênio | R1 | - Polígrafo |
| CP | - Cânula de perfusão | R2 | - Polígrafo |
| E | - Estalagmógrafo | T | - Termômetro digital |
| | | V | - Válvula de três vias |

Figura XI - Esquema geral do aparelho de perfusão
(Langendorff, 1895).

2.7 REGISTRO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL

Para o registro da atividade contrátil, o ápice do coração era transfixado por um pequeno gancho de aço ligado a uma alavanca interfixa (A, Fig. XI). A outra extremidade da alavanca era ligada a um miógrafo (MI, Figura XI) com calibração interna de 0,5 a 5 g (F-60) que era ligado ao polígrafo modelo MK-IV-P, ambos da marca Narco Bio-Systems (Houston, Texas, USA). Assim, eram efetuados os registros da atividade contrátil, ou mecanocardiogramas (R1, Figura XI). Para uniformizar o máximo possível a tensão diastólica, cada coração, após ser preso à alavanca de registro, era estirado progressivamente até próximo do pico de tensão ativa ($L_{máx}$).

2.8 REGISTRO DO FLUXO CORONARIANO

O fluxo coronariano foi registrado mediante um contador de gotas ou estalagmógrafo (E, Figura XI) que constava de uma cápsula de Marey conectada a um transdutor de pressão (Pneumatic Pulse Transducer, Narco Bio-Systems) que era ligado ao polígrafo. O registro do fluxo coronariano está representado por R2 na figura XI.

2.9 DOSAGEM DO GLICOGÊNIO CARDÍACO

Para a dosagem do glicogênio cardíaco, procedeu-se conforme o método de Van Handel (1965), que quantifica glicose após

hidrólise ácida do tecido. Os resultados foram expressos em g% de tecido úmido.

Retirava-se uma fatia (em torno de 200 mg) do ventrículo esquerdo de cada coração após a perfusão. O tecido era secado em papel de filtro e pesado numa balança de torção (Bethlehem Balance, Bethlehem Instruments CO., Inc.). Colocava-se o tecido em 2,0 ml de KCl à 30% e fervia-se por 1 hora para realizar a hidrólise ácida. Após este período, colocava-se 4,5 ml de etanol absoluto em cada tubo, agitava-se até ficar homogêneo e centrifugava-se os tubos por 10 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante era desprezado e o precipitado era guardado (0-4 ° C), após ter sido escorrido todo o sobrenadante em papel absorvente. O precipitado era ressuspenso em 5,0 ml de água destilada fervente e agitado até ficar homogêneo. Desta solução, tomava-se uma alíquota de 0,5 ml e diluía-se em 2,5 ml de água destilada. A estes tubos, colocados em gelo, acrescia-se vagarosamente 4 ml de reativo de antrona (200 mg por 100 ml de H₂SO₄). Agitava-se os tubos e lia-se no espectrofotômetro (Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20) a 620 nm. Eram preparadas três soluções-padrão, contendo, respectivamente, 20, 30 e 50 µg de glicose. Preparava-se uma solução-estoque de glicose dissolvendo-se 0,1 g de glicose anidra em 100 ml de ácido benzóico a 0,30%. As soluções-padrão de glicose eram preparadas a partir da solução-estoque, diluindo-se 2, 3 e 5 ml da mesma em 100 ml de ácido benzóico.

2.10 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO DE CORAÇÃO

Após serem perfundidos, os corações eram secados e pesados, depois da retirada dos restos de vasos e gorduras. Colocava-se 5 ml de *buffer* (KCl 140 mM, fosfatos 20 mM) por grama de tecido. Nos experimentos de consumo de oxigênio utilizaram-se 3 ml (em lugar de 5 ml) de *buffer* por grama de tecido para aumentar a concentração de proteínas. O coração era cortado com uma tesoura e, em seguida, era homogeneizado em Potter-Elvehjem por um minuto à temperatura de 0-2 °C. Este homogeneizado era centrifugado em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24) por 10 minutos a 1000 g (LLESUY et al., 1985). O precipitado era desprezado e o sobrenadante, utilizado para as medidas de LPO.

2.11 TESTE DO TBA-RS NO HOMOGENEIZADO

A técnica do TBA-RS (*TBA reactive substances*, ou seja, substâncias que reagem com o TBA) consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico, sob condições ácidas, e medir a formação de um produto rosa, espectrofotometricamente (BUEGE & AUST, 1978).

Colocava-se 0,5 ml do homogeneizado em 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) à 10%, 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) à 0,67% e 0,5 ml de água destilada para atingir o volume adequado à cubeta do espectrofotômetro. Agitava-se 10 segundos cada tubo

e incubava-se à 100 °C por 15 minutos. Após a fervura, observava-se a formação de um produto rosado. Os tubos eram resfriados e centrifugados por 10 minutos à 2500 rpm. O precipitado era desprezado e o sobrenadante, colocado na cubeta do espectrofotômetro para a leitura (535 nm).

A concentração de TBA-RS nos homogeneizados foi expressa em nmol por mg de proteína, utilizando um coeficiente de extinção= 156 mM⁻¹cm⁻¹.

2.12 TESTE DO TBA-RS NO PERFUSADO

O teste do TBA-RS foi também realizado no líquido que passava pelo coração, o perfusado. Para tanto, este líquido era coletado antes e depois do stress oxidativo induzido pelo H₂O₂. Procedia-se como explicado no item anterior, colocando-se 0,5 ml do perfusado, ao invés do homogeneizado de tecido. Comparava-se a formação de TBA-RS antes e depois do stress.

Os resultados foram expressos em nmol de TBA-RS por ml de perfusado.

2.13 MEDIDA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

O equipamento utilizado para a determinação do consumo de oxigênio constava de um eletródio do tipo Clark de platina, rodeado por uma membrana permeável ao oxigênio e um eletródio de calomelano, adquirido de FQ/IQUIFIB/MAIDEC, Buenos Aires,

Argentina. Quando se aplicava uma diferença de potencial de um valor tal que o eletrodo de platina fosse negativo em relação ao de calomelano (0,5-0,8 V), o oxigênio presente na solução se reduzia eletroliticamente à $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 dando uma corrente de difusão assimétrica que se define pela equação de Ilkovic modificada:

$$i = B.n.F.A.D.[\text{O}_2]$$

onde: i = intensidade de corrente; B = fator de difusão assimétrica regido pela agitação; n = número de elétrons; F = constante de Faraday; A = área do eletrodo; D = coeficiente de difusão ($D = k.T/8.\pi.\eta$) que é diretamente proporcional à concentração de oxigênio (ESTABROOK, 1967). Esta corrente foi medida com um amplificador conectado ao registrador (polígrafo MK-IV-P, Narco Bio-Systems). Os eletródios eram colocados dentro de uma câmara de vidro de 1,9 ml de volume, termostatizada e com agitação controlada. Para a determinação da velocidade de consumo de oxigênio, utilizaram-se homogeneizados de tecido. As determinações se realizaram à 30 °C. A concentração de oxigênio dissolvida nas soluções a esta temperatura foi estimada em 0,22 mM (ESTABROOK, 1967). Os resultados foram expressos em nmol de O_2 por min por mg de proteína.

2.14 DETERMINAÇÃO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA INICIADA POR HIDROPERÓXIDO DE TERT-BUTIL

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido em estudo. Se avalia a capacidade de resposta, mediante a determinação de quimioluminescência (QL) produzida pela amostra. Em tecidos submetidos a stress oxidativo, o valor da QL iniciada por hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH) é maior que o valor correspondente a este tecido em condições fisiológicas (pré-stress), de modo que a relação QL pós-stress/ QL pré-stress, resulta maior que $1,0 \pm 0,1$.

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer - 1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. Os homogeneizados de tecido foram colocados em viais de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos viais ativada pela luz fluorescente, estes foram conservados na obscuridade até o momento de seu uso e as determinações se realizaram em sala escura. As condições gerais do ensaio foram: meio de reação consistindo numa solução reguladora de KCl 120 mM, fosfatos 40 mM, pH 7,4, concentração de proteínas do homogeneizado aproximadamente 1 mg/ml, concentração de t-BOOH 3mM. Os resultados foram expressos em contas por

segundo (cps) por miligrama de proteína (BOVERIS et al., 1985; GONZALEZ FLECHA, 1991).

2.15 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas do homogeneizado de coração foi determinada através do método de Lowry et al. (1951). Este método utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/ml (no nosso caso, utilizaram-se volumes de 30, 60 e 90 μ l). Colocava-se uma alíquota do homogeneizado em 0,8 ml de água destilada e 2,0 ml do reativo C. Este último era preparado no momento e consistia na mistura de 50 ml do reativo A (NaHCO_3 2% em NaOH 0,10 N), 0,5 ml do reativo B₁ ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1%) e 0,5 ml do reativo B₂ (tartarato de sódio e potássio 2%). Aguardava-se 10 minutos e, após este período, colocava-se 0,2 ml de reagente de Folin (na concentração de 1/3 em água destilada). Após 30 minutos, desenvolvia-se cor azul que pode ser medida espectrofotometricamente a 625 nm.

2.16 ANÁLISE DOS DADOS

Os parâmetros fisiológicos estudados neste trabalho foram: contratura cardíaca, força de contração, frequência cardíaca e fluxo coronariano. Os três primeiros, eram medidos a partir dos mecanocardiogramas e o último, a partir do registro efetuado pelo estalagmógrafo. Estabelecia-se o período inicial, que correspondia aos primeiros 10 minutos de perfusão e servia para

estabilizar os corações com o líquido perfusor. Após estes 10 minutos, era trocado o líquido perfusor, de acordo com cada grupo experimental, com exceção do grupo controle. Todos os parâmetros foram medidos 15 segundos antes de se completarem os 10 minutos de perfusão e este foi considerado o tempo zero. Decorridos 5, 10, 15 e 20 minutos após este período, foram realizadas novas medidas. Todos os dados foram expressos como valores percentuais relativos ao tempo zero, considerado como 100%.

A contratatura e a força de contração foram medidas através de um paquímetro. Para a medida da contratatura, estabelecia-se uma linha de base, ou seja, o nível de relaxamento do coração no tempo zero. A contratatura era avaliada pela elevação da linha de base, em cada tempo de estudo.

A força de contração era medida pela amplitude (em cm) dos traçados no tempo zero. Após cada registro, era feita a calibração, a partir de um sinal emitido pelo transdutor, equivalente a uma força de 5 gramas. Para se obter a força em gramas, comparava-se a amplitude deste sinal com os traçados nos tempos de interesse. Os valores percentuais eram calculados a partir da força em gramas em relação ao tempo zero.

A frequência cardíaca era calculada como o número de sístoles por minuto. Os dados de frequência apresentados estão expressos como diferença percentual nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos em relação ao tempo zero.

O fluxo coronariano foi medido, em gotas por minuto, a partir dos registros efetuados pelo estalagmógrafo. Estabeleceu-se o fluxo no tempo zero e os valores obtidos nos tempos 5, 10, 15 e 20 foram expressos como diferença percentual em relação ao zero.

O fato dos resultados serem expressos em valores percentuais reflete o cuidado que se tinha em tomar cada medida em relação ao tempo zero. Cada coração, no tempo zero, servia como seu próprio controle. Dessa forma, se consegue eliminar muitas influências devidas à variabilidade biológica de cada coração.

Os dados de LPO e glicogênio estão expressos em valores absolutos.

Para o cálculo da QL iniciada por t-BOOH, foi considerada a emissão máxima, sendo descontada a emissão basal (a QL do vial mais o buffer).

2.17 APRESENTAÇÃO DOS DADOS

Os dados apresentados em "Resultados" estão colocados em tabelas e figuras numerados com algarismos arábicos. As figuras apresentadas nos outros capítulos, receberam numeração com algarismos romanos. Este artifício tem o intuito de facilitar a compreensão dos resultados, sendo que para cada parâmetro há uma tabela e uma ou mais figuras com a mesma numeração. Quando há mais de uma figura para cada parâmetro, estas recebem índices

(1A, 1B etc.) Todos os resultados apresentados estão expressos como média \pm erro padrão da média, quer sejam valores absolutos quer sejam diferenças percentuais.

2.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados coletados, foram calculadas as médias e os erros padrão das médias para cada grupo experimental. Foi utilizada a análise da variância (ANOVA) para dados não pareados, a fim de comparar as diferenças observadas dentro de cada parâmetro de estudo. Além disso, foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados, para comparar os valores obtidos em cada um dos grupos experimentais. Quando for afirmado que existem diferenças estatisticamente significativas, o nível de significância é de, pelo menos, 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa computacional Primer of Biostatistics.

3 RESULTADOS

A apresentação dos resultados obedece à seguinte ordem:

- 1) valores de contratatura, conteúdo de glicogênio e LPO (medida através do teste do TBA-RS, do consumo de oxigênio e da QL iniciada por t-BOOH) dos grupos controle e H_2O_2 (3.1);
- 2) valores de contratatura, conteúdo de glicogênio e LPO dos grupos vitamina A e vitamina A + H_2O_2 (3.2);
- 3) valores de contratatura, conteúdo de glicogênio e LPO dos grupos trolox (0,2 e 2 mM) e trolox (0,2 e 2 mM) + H_2O_2 (3.3);
- 4) dados relativos à força de contração de cada grupo experimental (3.4);
- 5) dados relativos à frequência cardíaca de cada grupo experimental (3.5);
- 6) dados relativos ao fluxo coronariano de cada grupo experimental (3.6).

3.1 INFLUÊNCIA DO H₂O₂ NO RELAXAMENTO, NO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO E NA LIPOPEROXIDAÇÃO CARDÍACOS

A perfusão com H₂O₂ (256 mM) provoca contratura no coração isolado de rato. O grupo H₂O₂ apresentou contraturas cardíacas significativamente maiores que o grupo controle a partir do tempo 15 minutos (Tabela 1, Figura 1A). A análise da variância (ANOVA) para as contraturas obtidas nos tempos 5, 10, 15 e 20 revelou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo H₂O₂ no décimo quinto (F_{cal} = 5,86) e no vigésimo minuto (F_{cal} = 12,08). Mecanocardiogramas típicos do grupo controle e do grupo H₂O₂ podem ser vistos na figura 1B.

As quantidades de glicogênio cardíaco dos grupos controle e H₂O₂ podem ser vistas na tabela 2 e na figura 2. A perfusão com H₂O₂ reduziu significativamente o conteúdo de glicogênio cardíaco. A ANOVA revelou diferença significativa entre os dois grupos experimentais (F_{cal} = 13,77).

A LPO foi medida através de três métodos. O teste do TBA-RS foi realizado no homogeneizado de tecido e no líquido de perfusão (perfusado).

No homogeneizado cardíaco, encontrou-se uma quantidade de TBA-RS significativamente maior no grupo H₂O₂ do que no grupo controle (Tabela 3, Figura 3). A ANOVA demonstrou diferença significativa entre os dois grupos (F_{cal} = 4,98).

A quantidade de TBA-RS no perfusado do grupo H_2O_2 foi significativamente maior do que a do grupo controle (Tabela 4, Figura 4). Pela ANOVA observou-se diferença significativa entre os dois grupos ($F_{cal} = 27,5$).

O consumo de oxigênio do grupo H_2O_2 foi maior do que o do grupo controle (Tabela 5, Figura 5A). Esta diferença foi considerada significativa pela ANOVA ($F_{cal} = 6,00$). Na figura 5B, podem ser observados registros típicos do consumo de oxigênio dos grupos controle e H_2O_2 .

No método da QL iniciada por t-BOOH, observou-se um incremento da emissão luminosa no grupo H_2O_2 em relação ao grupo controle (Tabela 6, Figura 6). A ANOVA detectou diferença significativa entre os dois grupos ($F_{cal} = 52,27$). A relação QL pós-stress/ QL pré-stress foi 1,66, o que indica a presença de stress oxidativo.

Observou-se, portanto, que o H_2O_2 provocou contratura cardíaca, redução do glicogênio cardíaco e aumento da LPO.

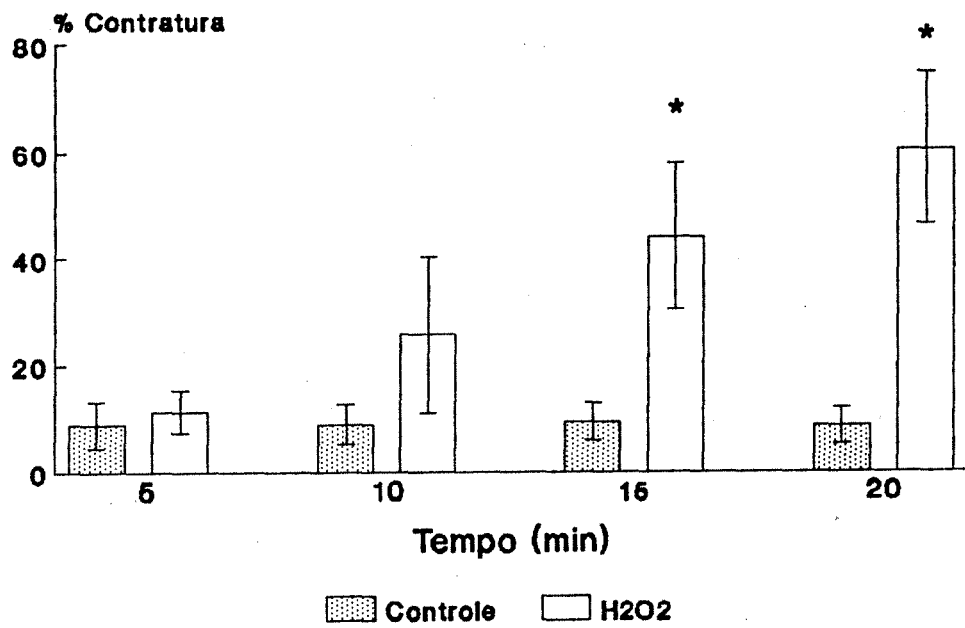


Figura 1A - Variação percentual da contratura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média + E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p< 0,05)

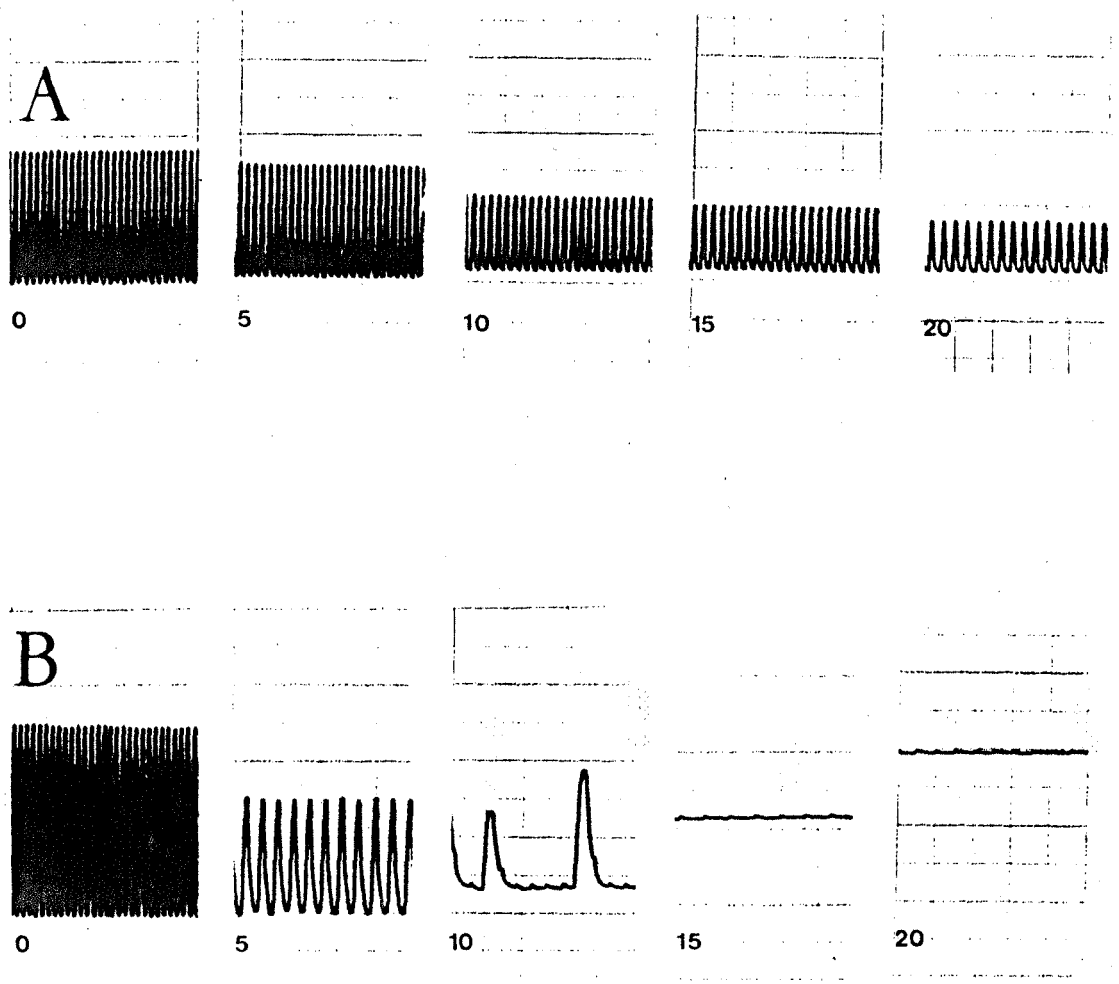


Figura 1B - Mecanocardiogramas típicos dos grupos controle (A) e H₂O₂ (B), nos distintos tempos de estudo.

TABELA 1 - Medidas das porcentagens de contratatura cardíaca nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle (0 mM) e grupo H₂O₂ (256 mM).

% CONTRATURA

TEMPO (min)	CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ (mM)	
	0 (n=5)	256 (n=6)
5	5,92 ± 3,95	11,45 ± 4,04
10	6,50 ± 3,46	25,64 ± 14,57
15	6,36 ± 3,11	44,14 ± 13,89*
20	5,90 ± 3,22	60,56 ± 13,98*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em comparação com controle 0 mM (p < 0,05).

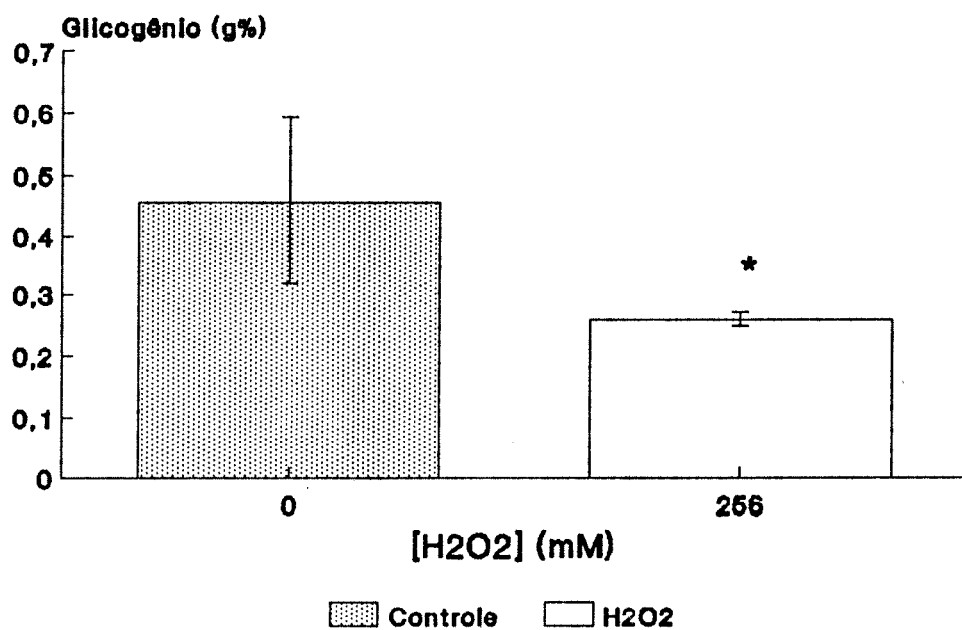


Figura 2 - Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos animais dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 4.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

TABELA 2 - Medidas do conteúdo de glicogênio cardíaco (g%), comparando grupo controle e grupo H₂O₂.

GRUPOS	GLICOGÊNIO (g%)
CONTROLE	0,46 ± 0,06
H ₂ O ₂	0,26 ± 0,01*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

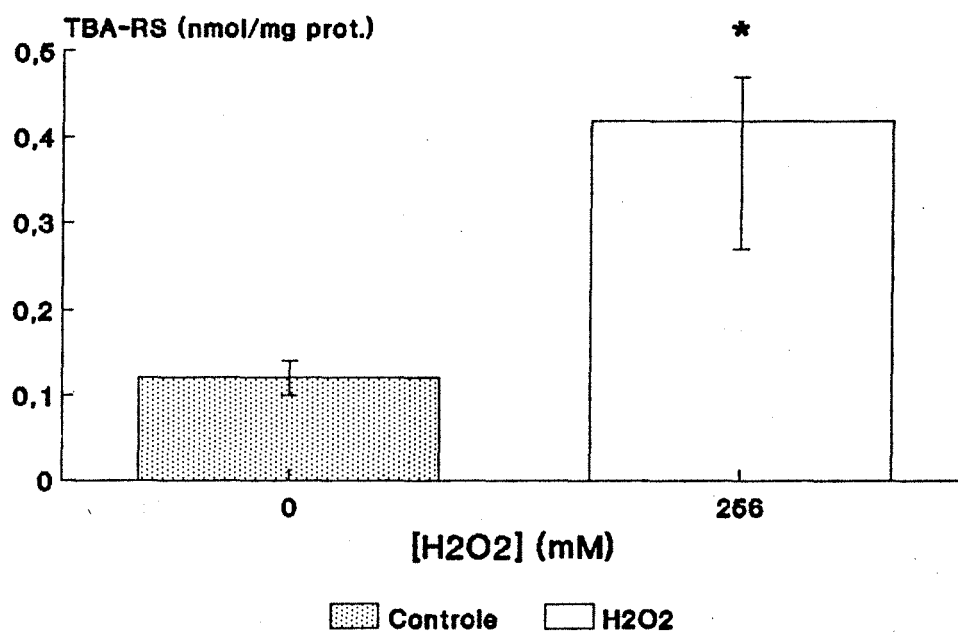


Figura 3 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) nos homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05).

TABELA 3 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg de proteína) em homogeneizados de corações de rato, comparando os grupos controle e H₂O₂.

GRUPOS		[TBA-RS] (nmol/mg prot.)
CONTROLE	(n=5)	0,12 ± 0,02
H ₂ O ₂	(n=5)	0,37 ± 0,10*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

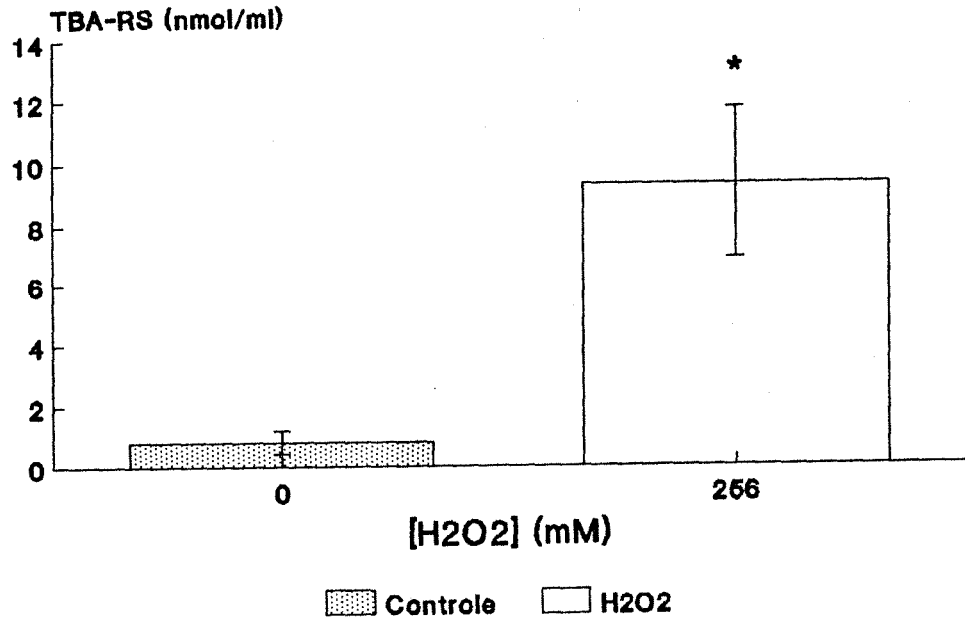


Figura 4 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) nos perfusados cardíacos dos animais dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p 0,05).

TABELA 4 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações de rato, comparando os grupos controle e H₂O₂.

GRUPOS		[TBA-RS] (nmol/ml)
CONTROLE	(n=5)	0,81 ± 0,36
H ₂ O ₂	(n=5)	9,33 ± 2,44*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

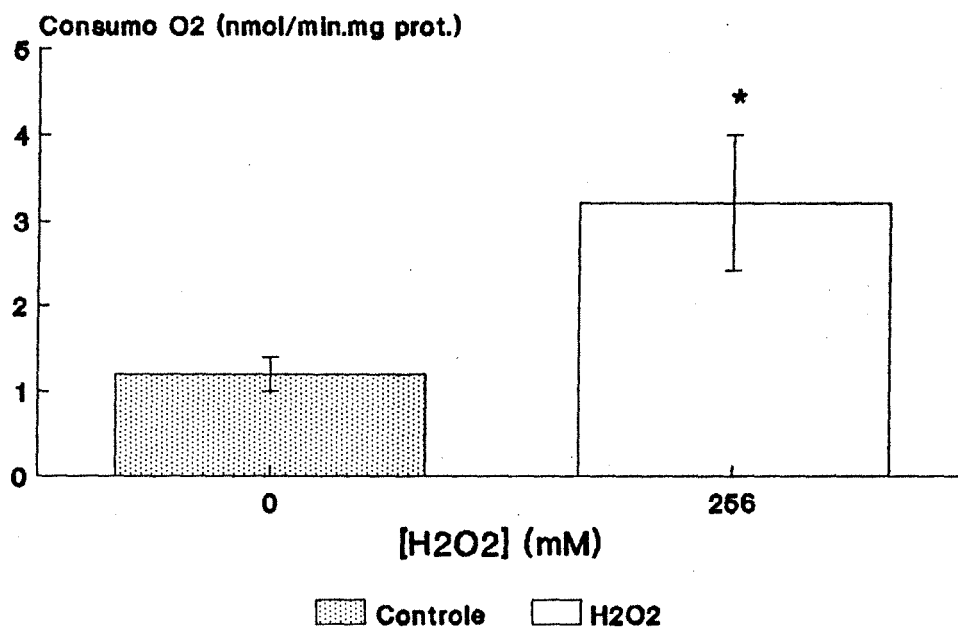


Figura 5A - Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) nos homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 6; grupo H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

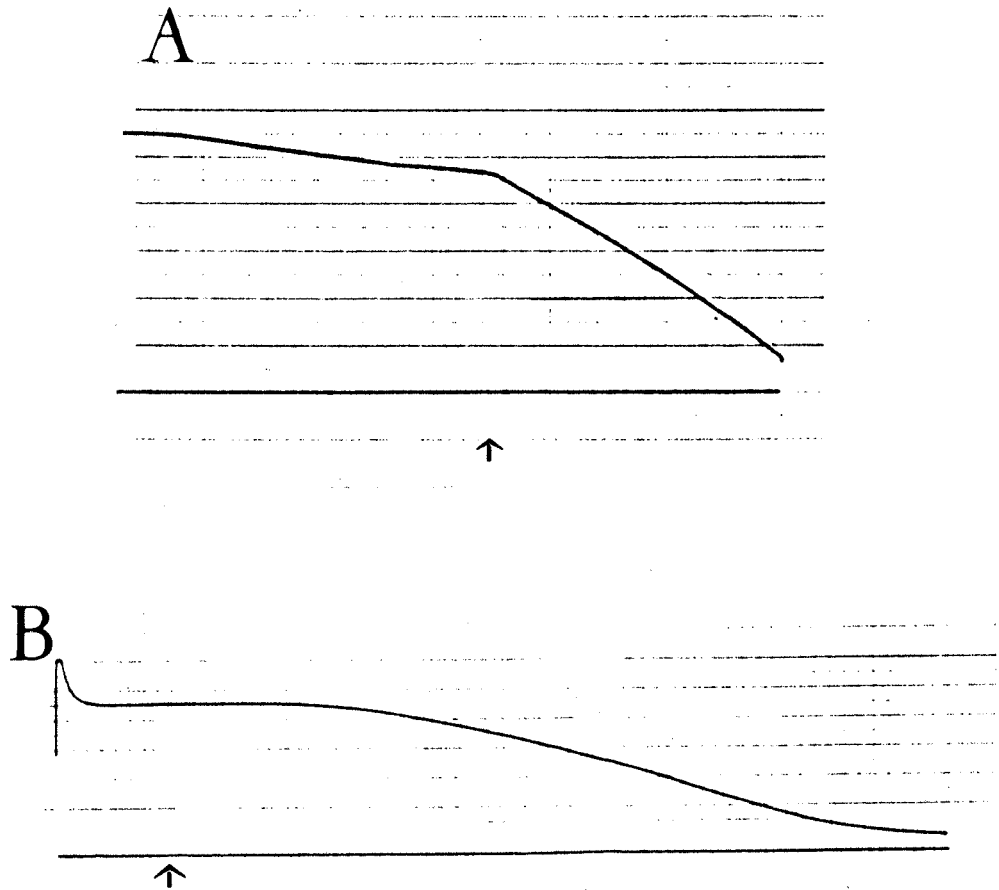


Figura 5B - Registros típicos do consumo de oxigênio dos animais do grupo controle (A) e H_2O_2 (B). As setas indicam o momento da adição de t-BOOH.

TABELA 5 - Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min/mgprot) de homogeneizados de coração, comparando os grupos controle e H₂O₂.

GRUPOS	CONSUMO DE O ₂ (nmol/min.mgprot.)
CONTROLE (n=6)	1,19 ± 0,20
H ₂ O ₂ (n=6)	3,21 ± 0,80*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa com relação ao grupo controle (p < 0,05).

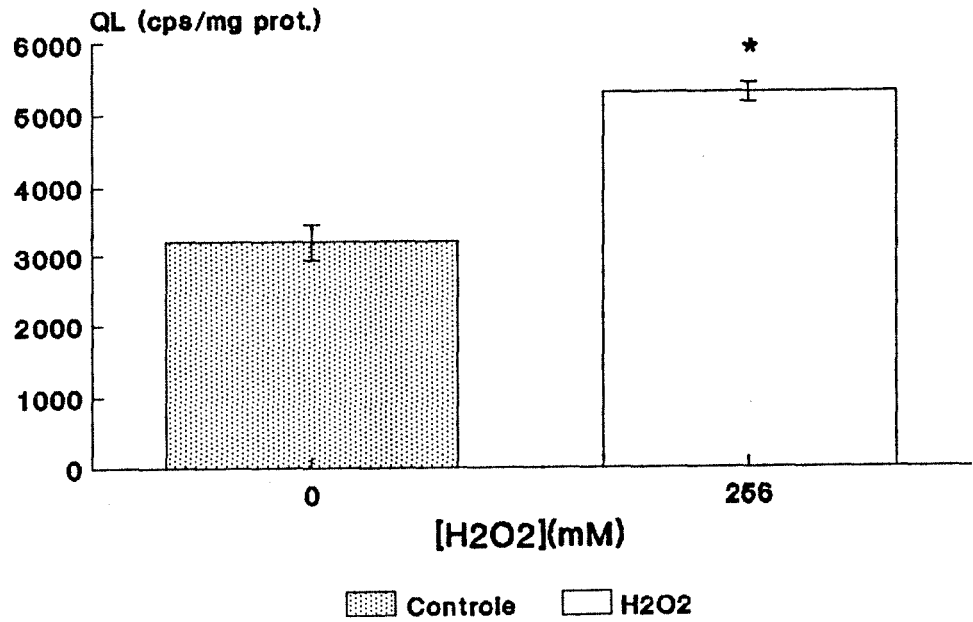


Figura 6A - Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 6; grupo H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

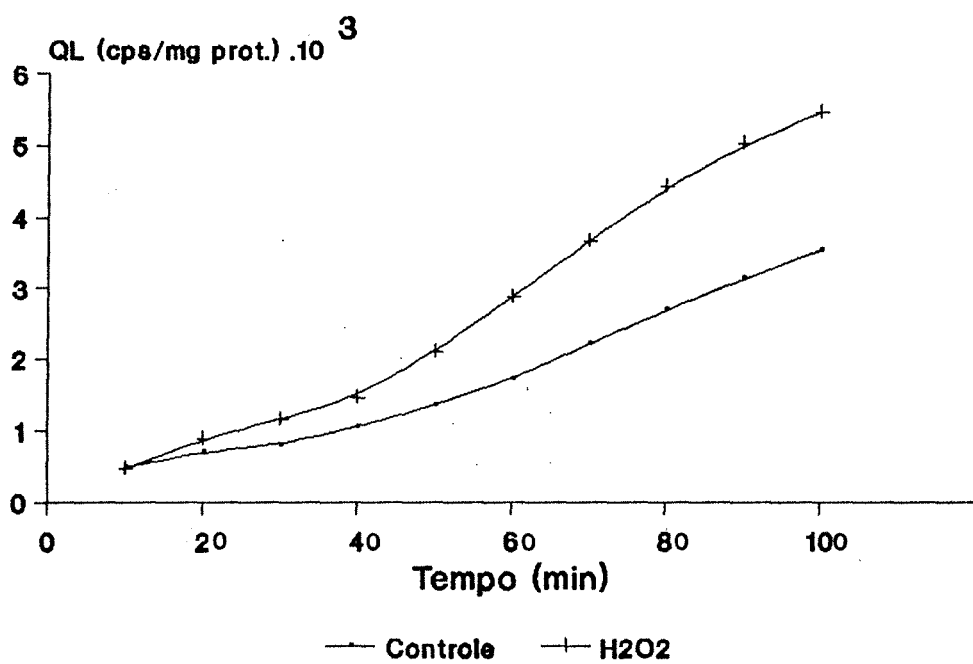


Figura 6B - Perfil da cinética da QL iniciada t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos grupos controle e H₂O₂.

TABELA 6 - Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mgprot) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle e H₂O₂.

GRUPOS	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (cps/mgprot.)
CONTROLE (n=6)	3199 ± 259
H ₂ O ₂ (n=6)	5304 ± 133*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa com relação ao grupo controle (p < 0,05).

3.2 AÇÃO DA VITAMINA A NA CONTRATURA, NO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO E NA LIPOPEROXIDAÇÃO

O grupo vitamina A apresentou diferença significativa com relação à porcentagem de contratura do grupo vitamina A + H₂O₂ a partir do tempo 10 (Tabela 7, Figura 7A). A ANOVA revelou diferença significativa entre os dois grupos (Fcal = 14,77). É interessante notar que o grupo vitamina A apresentou, ao invés de contratura, relaxamento em relação ao período inicial (Tabela 7). Estes valores foram significativamente diferentes do grupo controle a partir do tempo 10 minutos (Tabela 7). Esta diferença foi detectada pela ANOVA (Fcal = 9,23). No grupo vitamina A + H₂O₂ observaram-se contraturas significativamente menores em relação ao grupo H₂O₂ (Tabela 7). A ANOVA demonstrou diferença significativa entre os dois grupos (Fcal = 7,96). Mecanocardiogramas típicos dos grupos vitamina A e vitamina A + H₂O₂ podem ser vistos na figura 7B.

O conteúdo de glicogênio do grupo vitamina A foi significativamente menor do que o do grupo controle (Tabela 8, Figura 8). Pela ANOVA foi confirmada esta diferença (Fcal = 10,97). O grupo vitamina A + H₂O₂ apresentou um conteúdo de glicogênio significativamente maior do que o grupo H₂O₂. A ANOVA revelou diferença significativa entre os dois grupos (Fcal = 12,10). Comparando os grupos vitamina A e vitamina A + H₂O₂,

observou-se que o conteúdo de glicogênio do último foi significativamente maior (Tabela 8, Figura 8). Esta diferença foi considerada significativa pela ANOVA ($F_{cal} = 7,69$).

Encontrou-se um aumento significativo na produção de TBA-RS nos homogeneizados do grupo vitamina A + H₂O₂ em relação ao grupo vitamina A (Tabela 9, Figura 9). Diferença esta confirmada pela ANOVA ($F_{cal} = 7,20$). Entre os grupos vitamina A e controle não foram observadas diferenças significativas ($F_{cal} = 3,07$). As diferenças entre a produção de TBA-RS do grupo vitamina A + H₂O₂ e do grupo H₂O₂ também não foram significativas ($F_{cal} = 2,79$). Portanto, não se observaram diferenças significativas na produção de TBA-RS nos homogeneizados após a perfusão com vitamina A.

Constatou-se, pelo teste do TBA no perfusado, um aumento significativo na produção de TBA-RS no grupo vitamina A + H₂O₂ em relação ao grupo vitamina A (Tabela 10, Figura 10). Esta diferença foi confirmada pela ANOVA ($F_{cal} = 7,54$). A quantidade de TBA-RS do grupo vitamina A + H₂O₂ foi significativamente menor do que a do grupo H₂O₂. Pela ANOVA, houve diferença significativa entre os dois grupos ($F_{cal} = 8,06$). A diferença entre a produção de TBA-RS no grupo vitamina A e no grupo controle não se revelou significativa ($F_{cal} = 2,21$). Estes resultados indicam que a perfusão com vitamina A preveniu o aumento da quantidade de TBA-RS induzida pelo H₂O₂ no perfusado.

O consumo de oxigênio dos grupos vitamina A e vitamina A + H₂O₂ pode ser visto na tabela 11 e na figura 11A. As diferenças entre estes dois grupos foi considerada não significativa (F cal = 4,50). O consumo de oxigênio do grupo vitamina A + H₂O₂ foi significativamente menor do que o do grupo H₂O₂ (Tabela 11, Figura 11). Pela ANOVA, confirmou-se esta diferença (F cal = 24,04). A diferença entre os grupos vitamina A e H₂O₂ foi significativa (Fcal = 61,54). Isto indica que, nos corações perfundidos com H₂O₂, o consumo de oxigênio aumentou e que a perfusão prévia com vitamina A reduziu este efeito. Na figura 11B podem ser vistos registros típicos do consumo de oxigênio dos grupos vitamina A e vitamina A + H₂O₂.

Com relação à QL iniciada por t-BOOH, observou-se que a emissão luminosa não apresentou diferenças significativas entre os grupos vitamina A e vitamina A + H₂O₂ (Tabela 12, Figura 12). A ANOVA, da mesma forma, não detectou diferenças significativas entre estes dois grupos (Fcal = 2,68). Entre os grupos vitamina A e controle também não se observaram diferenças significativas (Fcal = 0,39). Entretanto, o grupo vitamina A + H₂O₂ apresentou uma redução na QL quando comparado ao grupo H₂O₂ (Tabela 12, Figura 12). A ANOVA confirmou esta diferença (Fcal = 6,14). Assim, a perfusão com vitamina A reduziu significativamente o efeito do H₂O₂ sobre a QL iniciada por t-BOOH. A relação QL pós-stress/ QL pré-stress caiu para 1,27, comparativamente ao grupo

H₂O₂ que era 1,66. Isto indica que a perfusão com vitamina A reduziu o stress oxidativo induzido pelo H₂O₂.

Resumindo, a vitamina A diminuiu a contratura cardíaca e impediu a redução do conteúdo de glicogênio e reduziu a LPO induzida pelo H₂O₂.

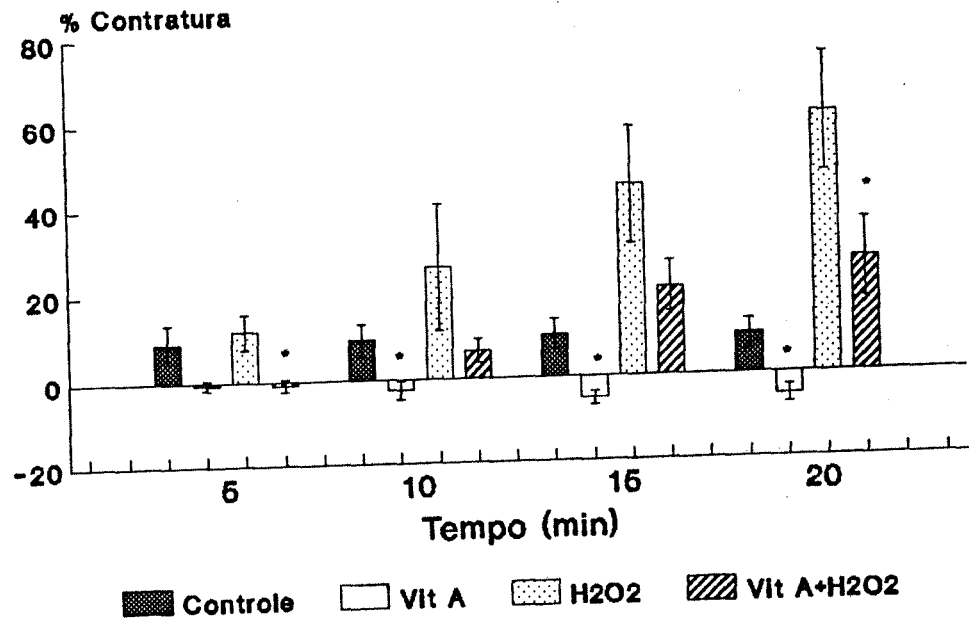


Figura 7A - Variação percentual da contratatura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média + E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo vitamina A: n= 6; grupo vitamina A + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

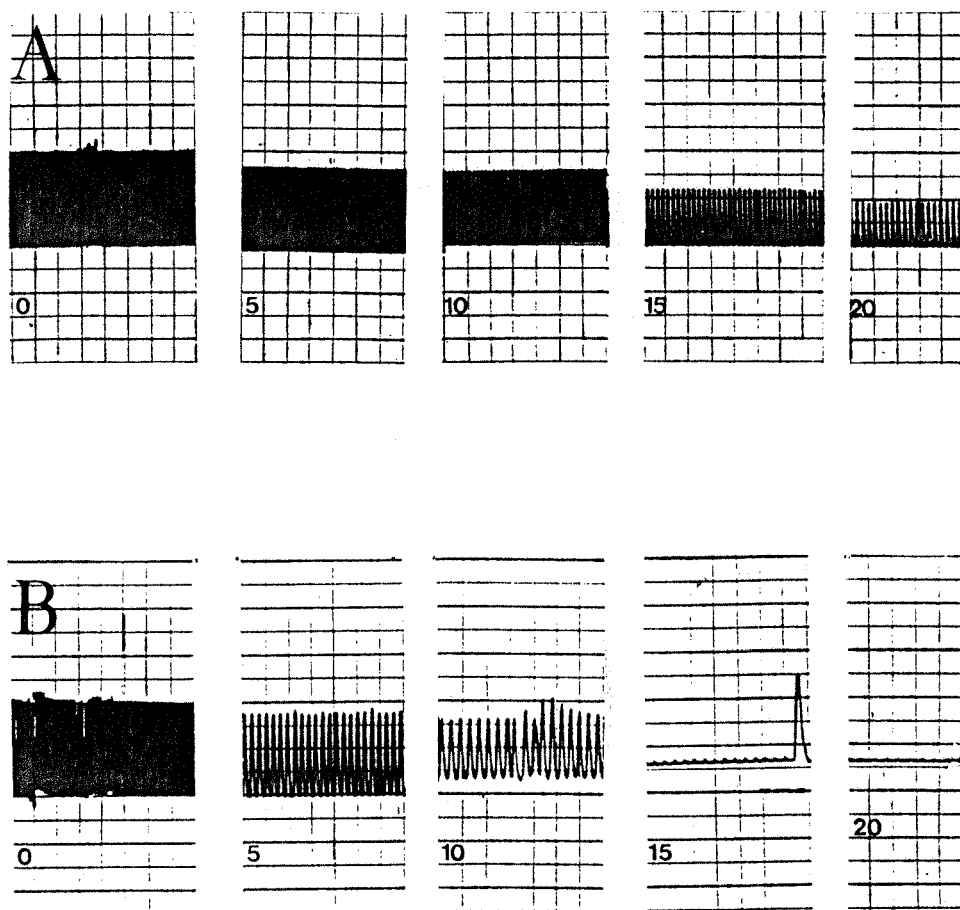


Figura 7B - Mecanocardiogramas típicos dos grupos vitamina A (A) e vitamina A + H₂O₂ (B), nos distintos tempos de estudo.

TABELA 7 - Medidas das porcentagens de contratatura cardíaca nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo vitamina A, grupo H₂O₂ e grupo vitamina A + H₂O₂.

% CONTRATURA				
TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	VIT.A	H ₂ O ₂	VIT.A+H ₂ O ₂
5	5,92 ± 3,95	-0,76 ± 1,28	11,45 ± 04,04 [§]	-1,08 ± 1,52 [#]
10	6,50 ± 3,46	-2,64 ± 2,34 [*]	25,64 ± 14,57 [§]	6,14 ± 2,68
15	6,36 ± 3,11	-5,37 ± 1,76 [*]	44,14 ± 13,89 [§]	20,20 ± 5,86
20	5,90 ± 3,22	-5,36 ± 2,08 [*]	60,56 ± 13,98 [§]	17,96 ± 5,70 [#]

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (p< 0,05).

§ diferença significativa em comparação com o grupo vitamina A (p< 0,05).

diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p< 0,05).

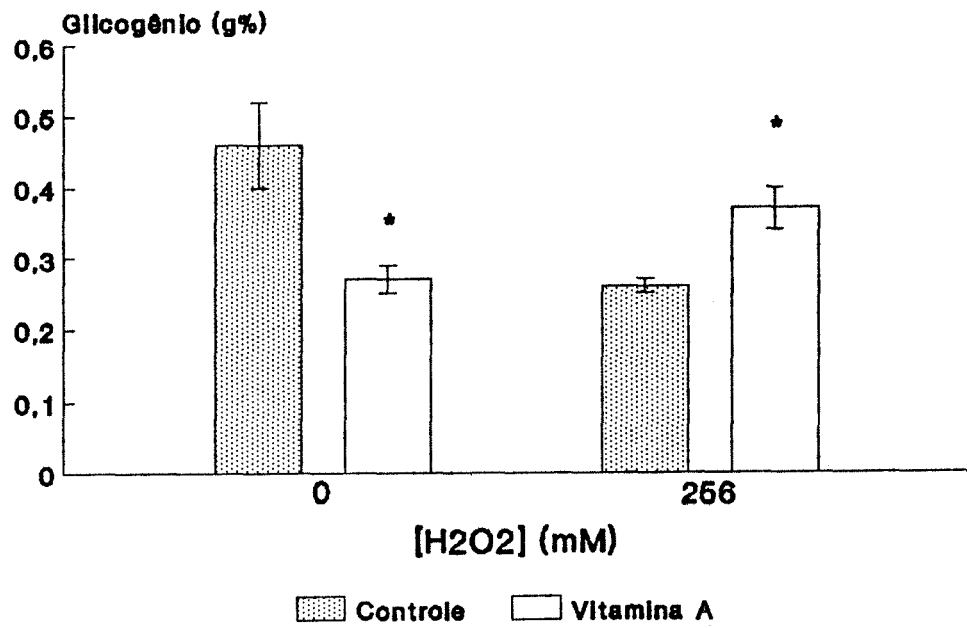


Figura 8 - Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos animais dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 4; grupo vitamina A: n= 5; grupo vitamina A + H₂O₂: n=5.

* diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).

TABELA 8 - Medidas do conteúdo de glicogênio (g%) de corações de rato, comparando os grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂.

GRUPOS	CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO (g%)
CONTROLE (n=5)	0,46 ± 0,06
H ₂ O ₂ (n=4)	0,26 ± 0,01*
VIT.A (n=5)	0,27 ± 0,02*
VIT.A+H ₂ O ₂ (n=5)	0,37 ± 0,03

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

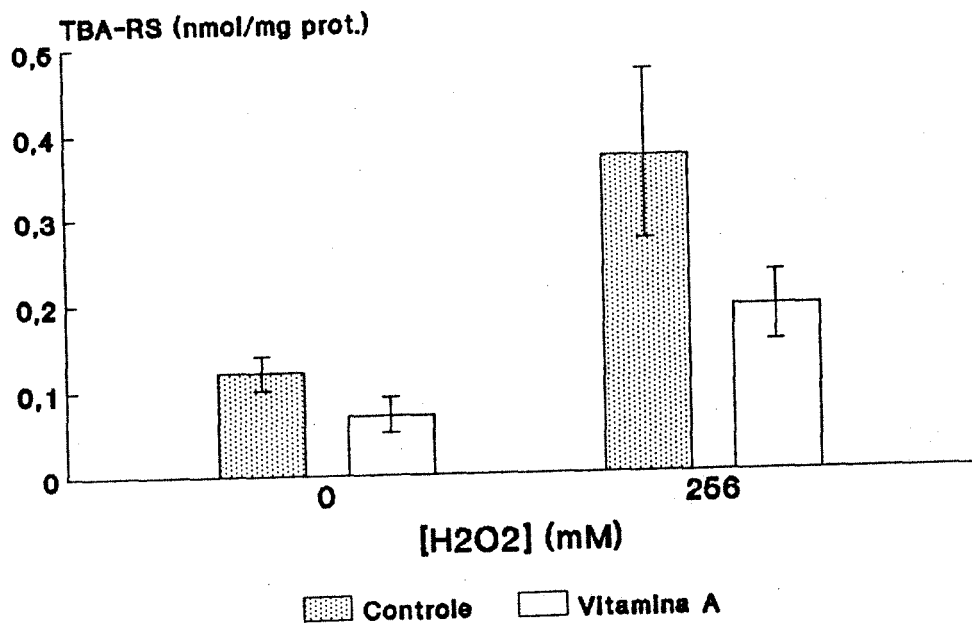


Figura 9 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) nos homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 5; vitamina A: n= 6; vitamina A + H₂O₂: n= 5.

TABELA 9 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados de corações, comparando os grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂.

GRUPOS		[TBA-RS] (nmol/mg prot.)
CONTROLE	(n=5)	0,12 ± 0,02
H ₂ O ₂	(n=5)	0,37 ± 0,10*
VIT.A	(n=6)	0,07 ± 0,02
VIT.A+H ₂ O ₂	(n=5)	0,19 ± 0,04

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

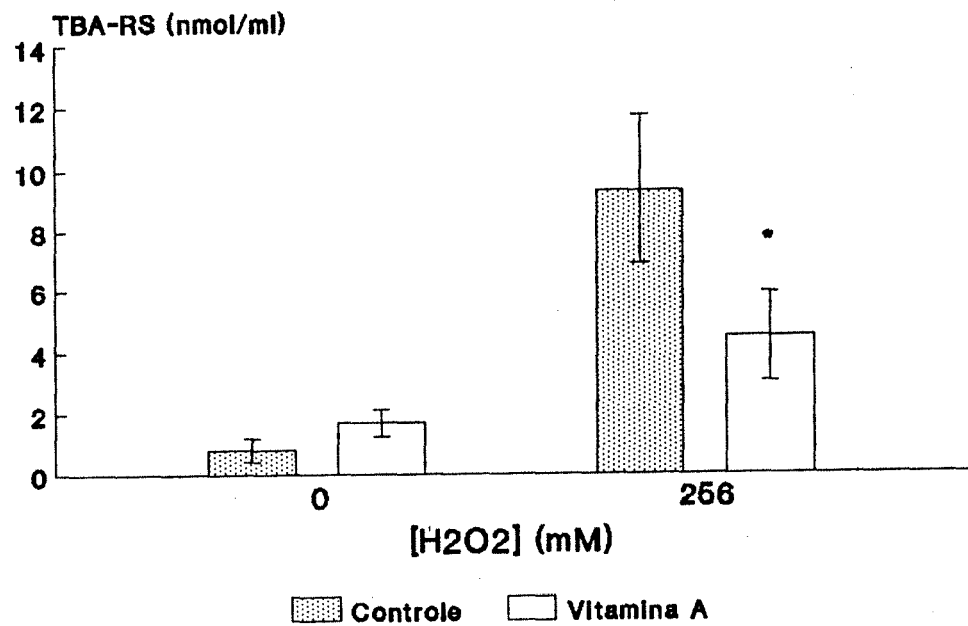


Figura 10 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) nos perfusados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 5; vitamina A: n= 6; vitamina A + H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao controle (p< 0,05).

TABELA 10 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações de rato, comparando os grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂.

GRUPOS	[TBA-RS] (nmol/ml)
CONTROLE (n=5)	0,81 ± 0,36
H ₂ O ₂ (n=5)	9,33 ± 1,44*
VIT. A (n=6)	1,68 ± 0,44#
VIT.A+H ₂ O ₂ (n=5)	4,48 ± 0,92*#

Os valores estão expressos como média + E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

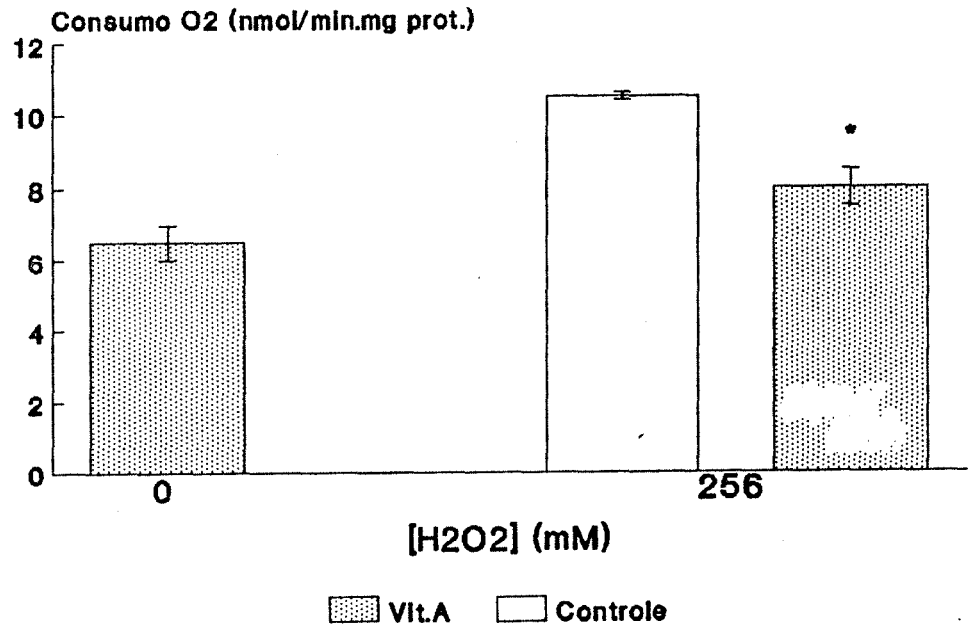


Figura 11A - Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) nos homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M..

grupo H₂O₂: n= 6; grupo vitamina A: n= 6; grupo vitamina A + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao controle (p< 0,05).

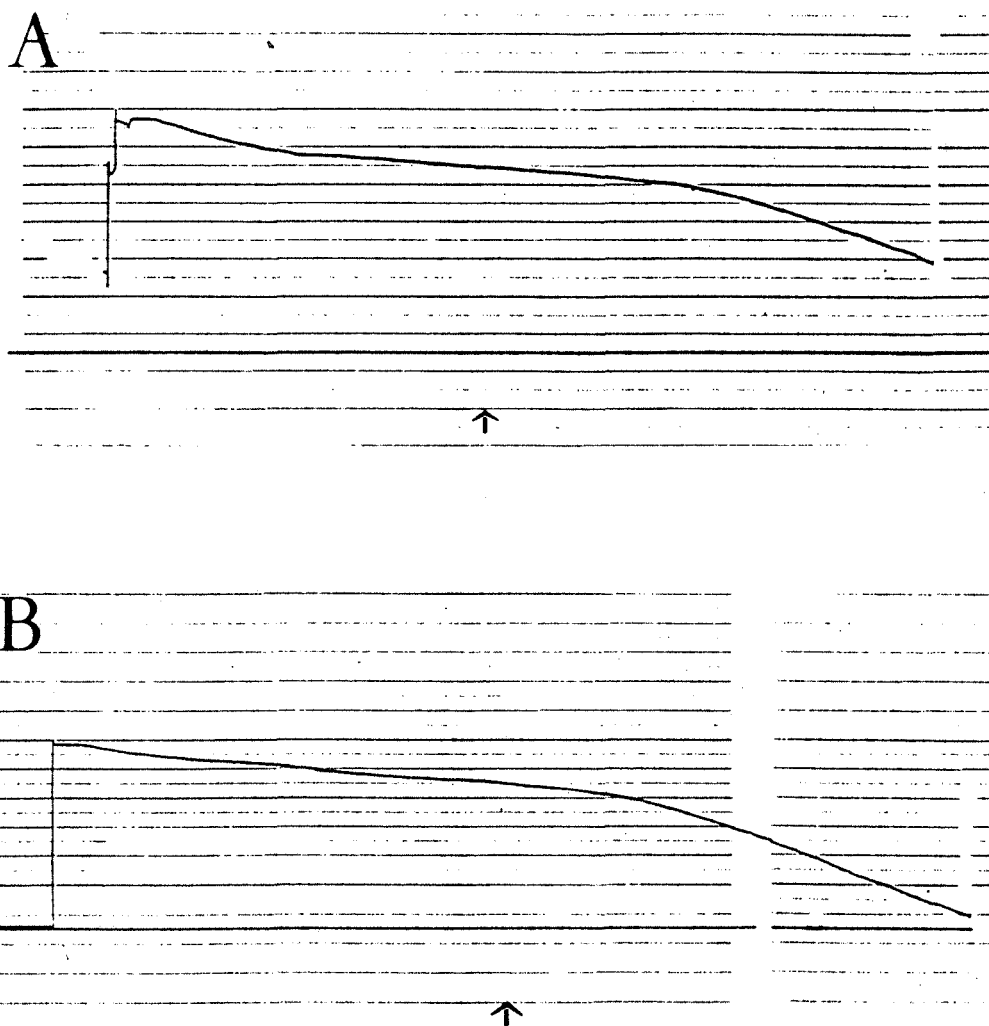


Figura 11B - Registros típicos do consumo de oxigênio dos animais do grupo vitamina A (A) e vitamina A + H₂O₂ (B). As setas indicam o momento da adição de t-BOOH.

TABELA 11 - Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min/mgprot) de homogeneizados de coração, comparando os grupos vitamina A, H₂O₂ e vitamina A + H₂O₂.

GRUPOS	CONSUMO DE O ₂ (nmol/min.mgprot.)
VIT.A (n=6)	8,0 ± 0,5
H ₂ O ₂ (n=6)	10,0 ± 0,1*
VIT.A+H ₂ O ₂ (n=6)	6,5 ± 0,5#

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa com relação ao grupo vitamina A (p< 0,05).

diferença significativa com relação ao grupo H₂O₂ (p< 0,05).

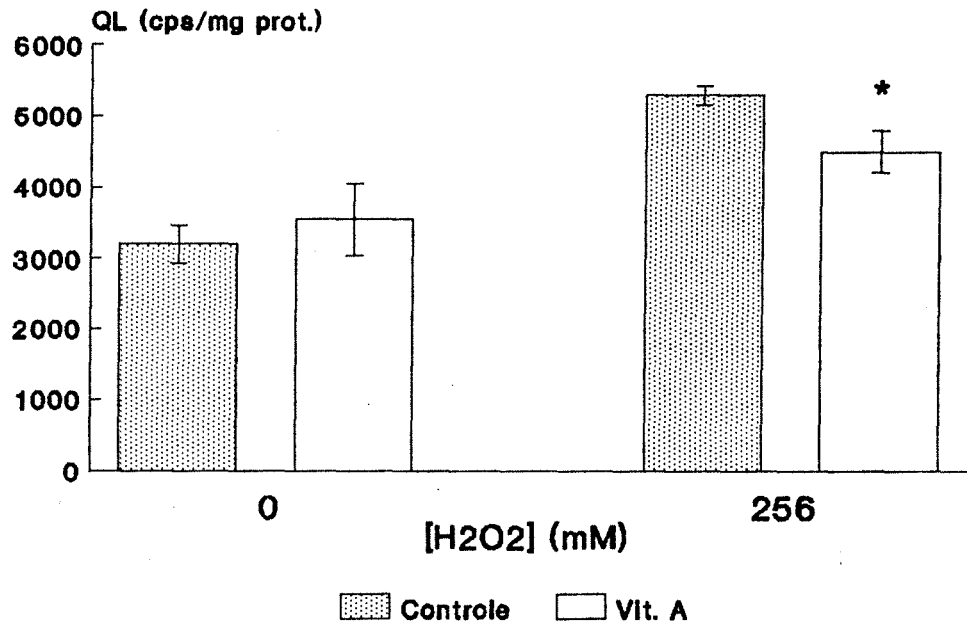


Figura 12A - Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 6; grupo H₂O₂: n= 6; grupo vitamina A: n= 6; grupo vitamina A + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).

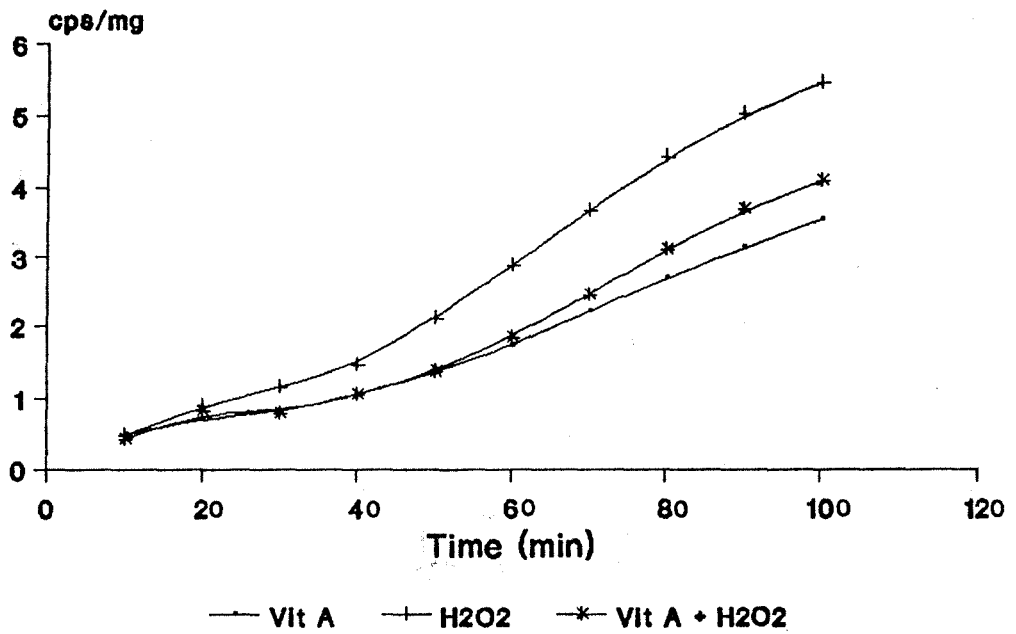


Figura 12B - Perfil da cinética da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂.

TABELA 12 - Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mgprot) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle, vitamina A, H₂O₂ e vitamina A + H₂O₂.

GRUPOS	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (cps/mgprot.)
CONTROLE (n=6)	3.199 ± 259
VIT.A (n=6)	3.551 ± 500
H ₂ O ₂ (n=6)	5.304 ± 133*
VIT.A+H ₂ O ₂ (n=6)	4.502 ± 295*#

* diferença significativa com relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa com relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

3.3 AÇÃO DO TROLOX NA CONTRATURA, NO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO E NA LIPOPEROXIDAÇÃO

Os corações do grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂, apresentaram porcentagens de contraturas que não diferiram significativamente do grupo trolox 0,2 mM, senão no tempo 5 minutos (Tabela 13, Figura 13A). A ANOVA não detectou diferença significativa entre estes dois grupos (F_{cal} = 1,24). Quando compararam-se as contraturas dos grupos H₂O₂ e trolox 0,2 mM + H₂O₂ não se observaram diferenças significativas pelo teste t nem pela ANOVA (F_{cal} = 1,64) (Tabela 13). Isto indica que o trolox, na concentração utilizada, não protegeu significativamente o coração das contraturas induzidas pelo H₂O₂. As contraturas observadas no grupo trolox 0,2 mM não diferiram significativamente do grupo controle (F_{cal} = 1,72).

Mecanocardiogramas típicos dos grupos trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂ podem ser vistos na figura 13B.

Utilizou-se uma concentração de trolox dez vezes maior (2 mM) na tentativa de encontrar alguma proteção em relação à contratura observada no grupo H₂O₂. O grupo trolox 2 mM apresentou contraturas que não diferiram significativamente do grupo controle (F_{cal} = 0,90). As contraturas observadas no grupo trolox 2 mM + H₂O₂ foram significativamente maiores do que as do

grupo trolox 2 mM (Tabela 14). A ANOVA confirmou a diferença entre estes dois grupos ($F_{cal} = 12,32$). As diferenças entre os grupos H_2O_2 e trolox 2 mM + H_2O_2 não foram significativas (Tabela 14, Figura 14A). Pela ANOVA, da mesma forma, não se encontrou diferença significativa ($F_{cal} = 0,06$). No grupo trolox 2 mM observaram-se contraturas que não diferiram significativamente em relação ao grupo trolox 0,2 mM ($F_{cal} = 4,79$). As contraturas do grupo trolox 0,2 mM + H_2O_2 também não diferiram significativamente das do grupo trolox 2 mM H_2O_2 ($F_{cal} = 0,97$). Estes resultados indicam que a perfusão com trolox não reduziu a contratura induzida pelo H_2O_2 .

Mecanocardiogramas típicos dos grupos trolox 2 mM e trolox 2mM + H_2O_2 podem ser vistos na figura 14B.

Os conteúdos de glicogênio dos grupos trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H_2O_2 podem ser vistos na tabela 15 e na figura 15. O grupo trolox 0,2 mM + H_2O_2 apresentou um conteúdo de glicogênio significativamente maior do que o do grupo trolox 0,2 mM. A ANOVA revelou diferença significativa entre os dois grupos ($F_{cal} = 8,10$). O grupo trolox 0,2 mM mostrou menor conteúdo de glicogênio do que o grupo controle. Esta diferença foi considerada significativa pela ANOVA ($F_{cal} = 26,98$). Entre os grupos trolox 0,2 mM + H_2O_2 e H_2O_2 não se observaram diferenças significativas pelo teste t nem pela ANOVA ($F_{cal} = 0,10$).

Os valores de glicogênio dos grupos trolox 2 mM e trolox 2mM + H₂O₂, estão colocados na tabela 16 e na figura 16. O grupo trolox 2 M + H₂O₂ apresentou maior conteúdo de glicogênio do que grupo trolox 2 mM. Pela ANOVA, foi confirmada esta diferença (Fcal = 20,0). O conteúdo de glicogênio do grupo trolox 2 mM foi significativamente menor do que o do grupo controle, diferença esta detectada também pela ANOVA (Fcal = 18,27). Em comparação com o grupo H₂O₂, encontrou-se que o grupo trolox 2 mM + H₂O₂ apresentou maior conteúdo de glicogênio. A ANOVA considerou não significativa a diferença entre estes dois grupos (Fcal = 3,66).

Quanto ao teste do TBA-RS no homogeneizado, encontrou-se que, entre os grupos trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂, não houve diferença significativa (Fcal = 3,19). Entre os grupos controle e trolox 0,2 mM também não se encontrou diferença significativa (Fcal = 4,17). Porém, o grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂ apresentou uma produção de TBA-RS significativamente menor do que a do grupo H₂O₂ (Fcal = 5,28) (Tabela 17, Figura 17).

Entre os grupos trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂ não se observou diferença significativa em termos de TBA-RS (Fcal = 0,31). O grupo trolox 2 mM apresentou maior conteúdo de TBA-RS que o grupo controle (Fcal = 11,25). Entre os grupos trolox 2 mM + H₂O₂ e H₂O₂ não se observou diferença significativa (Fcal = 0,24) (Tabela 18, Figura 18).

Com relação ao teste do TBA no perfusado, não se encontrou diferença significativa entre o grupo trolox 0,2 mM e o grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂ (Fcal = 4,39). Também não houve diferença entre os grupos trolox 0,2 mM e controle (Fcal = 0,88). Entre os grupos H₂O₂ e trolox 0,2 mM + H₂O₂ não se detectou diferença significativa (Fcal = 1,63) (Tabela 19, Figura 19).

Para o grupo trolox 2 mM + H₂O₂, em comparação com o trolox 2mM, encontrou-se um aumento significativo na produção de TBA-RS no perfusado (Fcal = 82,01). Não houve diferença significativa entre os grupos controle e trolox 2 mM em termos de produção de TBA-RS (Fcal = 4,52). O grupo trolox 2 mM + H₂O₂ apresentou uma redução significativa na produção de TBA-RS em relação ao grupo H₂O₂ (Fcal = 9,88) (Tabela 20, Figura 20).

O consumo de oxigênio e a QL foram realizados apenas com a maior concentração de trolox (2 mM). O consumo de oxigênio do grupo trolox 2 mM foi significativamente menor do que o do grupo controle (Fcal = 9,0). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos trolox 2 mM + H₂O₂ e trolox 2 mM (Fcal = 0,18). O grupo trolox 2 mM + H₂O₂ apresentou um consumo de oxigênio significativamente menor do que o grupo H₂O₂ (Fcal = 11,30) (Tabela 21, Figura 21A). Ou seja, a perfusão prévia com trolox preveniu o aumento no consumo de oxigênio induzido pelo H₂O₂. Registros típicos do consumo de oxigênio dos grupos trolox 2 mM e trolox 2mM + H₂O₂ podem ser vistos na figura 21B.

A QL iniciada por t-BOOH não mostrou diferença significativa entre os grupos controle e trolox 2 mM (Fcal = 0,08). O grupo trolox 2 mM + H₂O₂ também não diferiu significativamente do grupo trolox 2 mM (Fcal = 3,56). A emissão luminosa do grupo trolox 2 mM + H₂O₂ foi significativamente reduzida em comparação com o grupo H₂O₂ (Fcal = 25,21) (Tabela 22, Figura 22). Portanto, a perfusão com trolox reduziu a QL induzida por H₂O₂ a valores próximos do controle. A relação QL pós-stress / QL pré-stress foi de 1,23, ou seja o stress oxidativo produzido pelo H₂O₂ foi reduzido (a relação era 1,66).

Assim, o trolox, nas duas concentrações utilizadas, não reduziu a contratatura, porém impediu a redução do glicogênio e o aumento da LPO induzidos pelo H₂O₂.

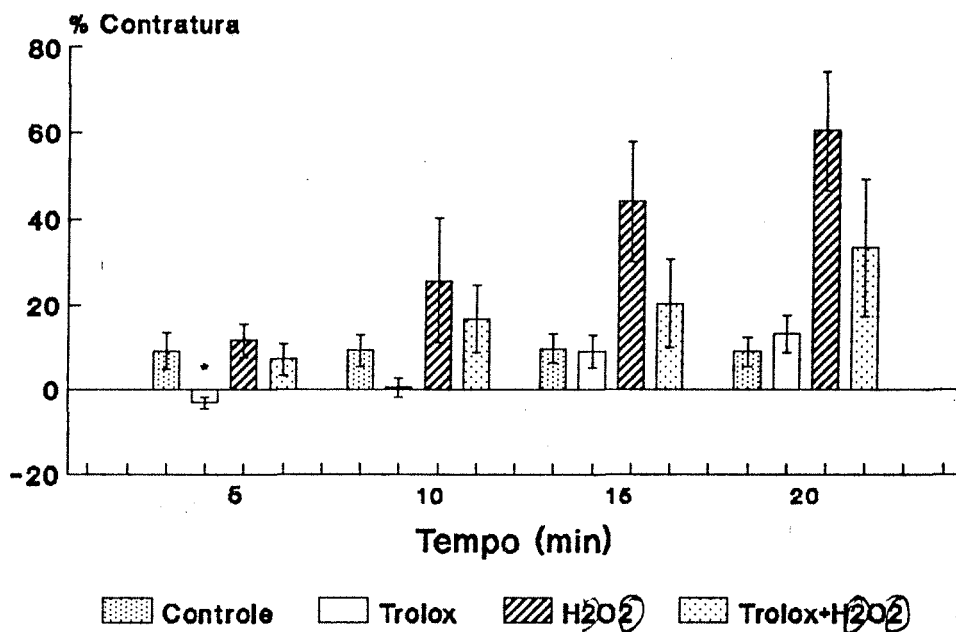


Figura 13A - Variação percentual da contratatura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 0,2 mM: n= 5; grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p< 0,05).

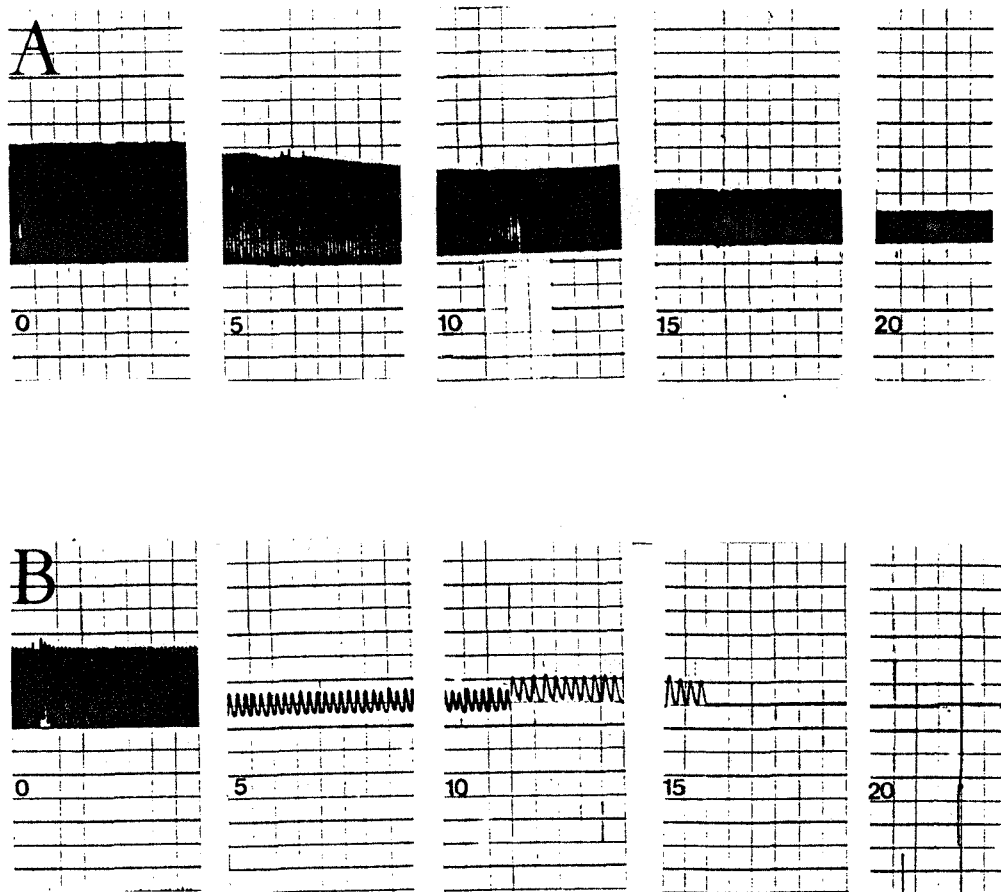


Figura 13B - Mecanocardiogramas típicos dos grupos trolox 0,2 mM (A) e trolox 0,2 mM + H₂O₂ (B), nos distintos tempos de estudo.

TABELA 13 - Medidas das porcentagens de contratatura cardíaca nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂.

% CONTRATURA

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	TROLOX	H ₂ O ₂	TROLOX +H ₂ O ₂
5	5,92 ± 3,95	-3,24 ± 1,33*	11,45 ± 4,04	7,00 ± 3,74#
10	6,50 ± 3,46	0,34 ± 2,14	25,64 ± 14,57	16,71 ± 8,03
15	6,36 ± 3,11	8,85 ± 3,83	44,14 ± 13,89	20,20 ± 10,49
20	5,90 ± 3,22	13,16 ± 4,50	60,56 ± 13,98	33,37 ± 16,01

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em comparação com o grupo trolox 0,2 mM (p < 0,05).

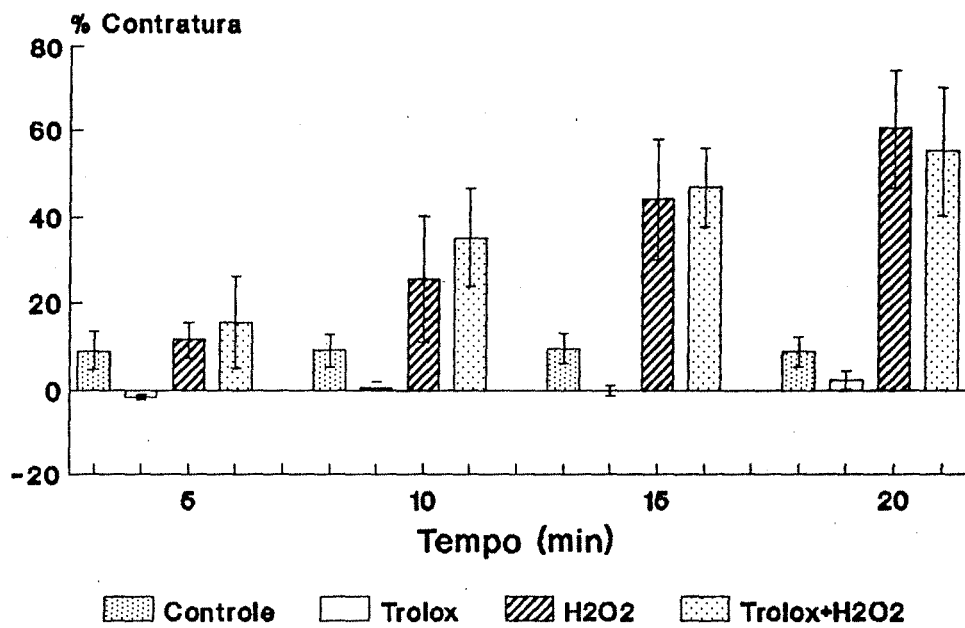


Figura 14A - Variação percentual da contratatura cardíaca, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 2 mM: n= 5; grupo trolox 2 mM + H₂O₂: n= 5.

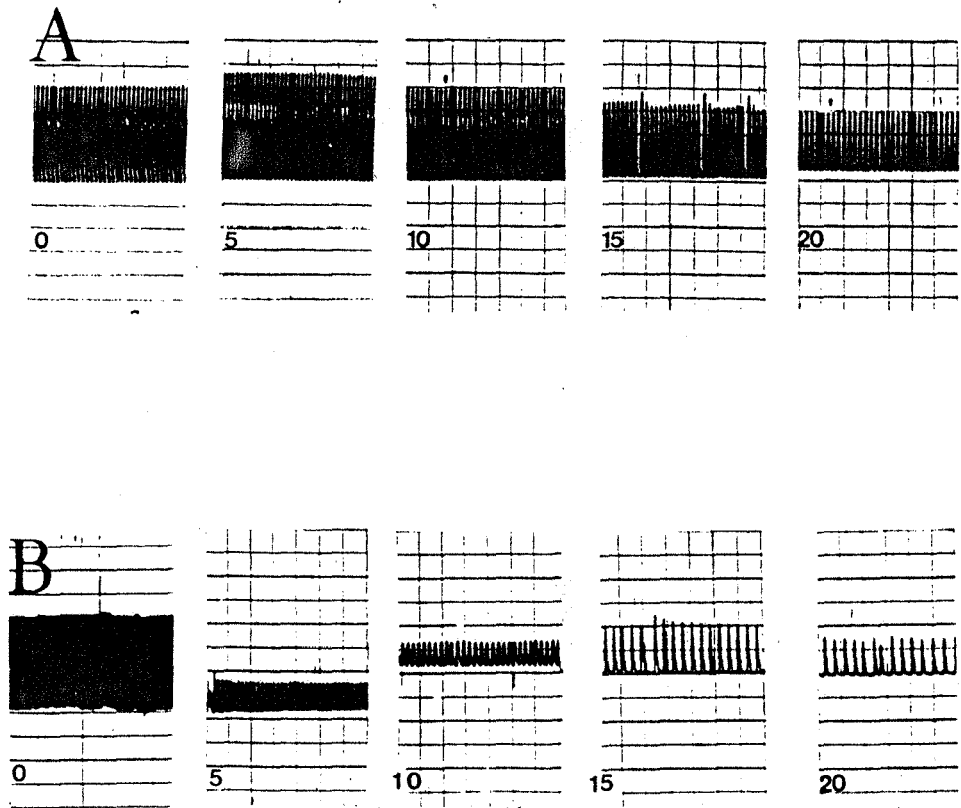


Figura 14B - Mecanocardiogramas típicos dos grupos trolox 2 mM (A) e trolox 2 mM + H₂O₂ (B), nos distintos tempos de estudo.

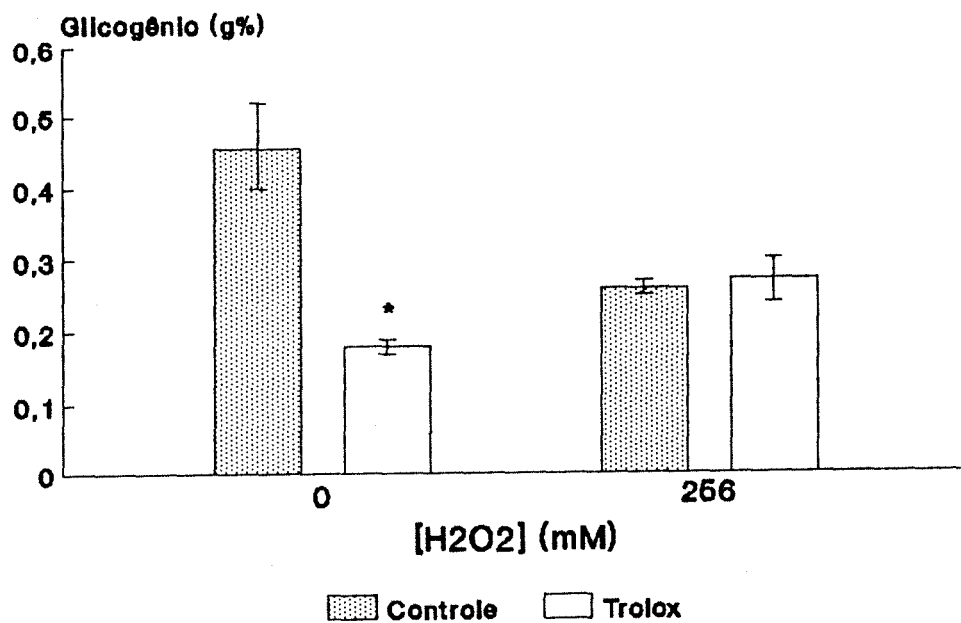


Figura 15 - Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos animais dos grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 4; grupo trolox 0,2 mM: n= 4; grupo trolox + H₂O₂: n=5.

* diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

TABELA 15 - Medidas do conteúdo de glicogênio (g%) de corações de rato, comparando os grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO (g%)
CONTROLE (n=5)	0,46 ± 0,06
H ₂ O ₂ (n=4)	0,26 ± 0,01*
TROLOX 0,2 mM (n=5)	0,18 ± 0,01*
TROLOX 0,2 mM+H ₂ O ₂ (n=5)	0,27 ± 0,03#

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo trolox 0,2 mM (p < 0,05).

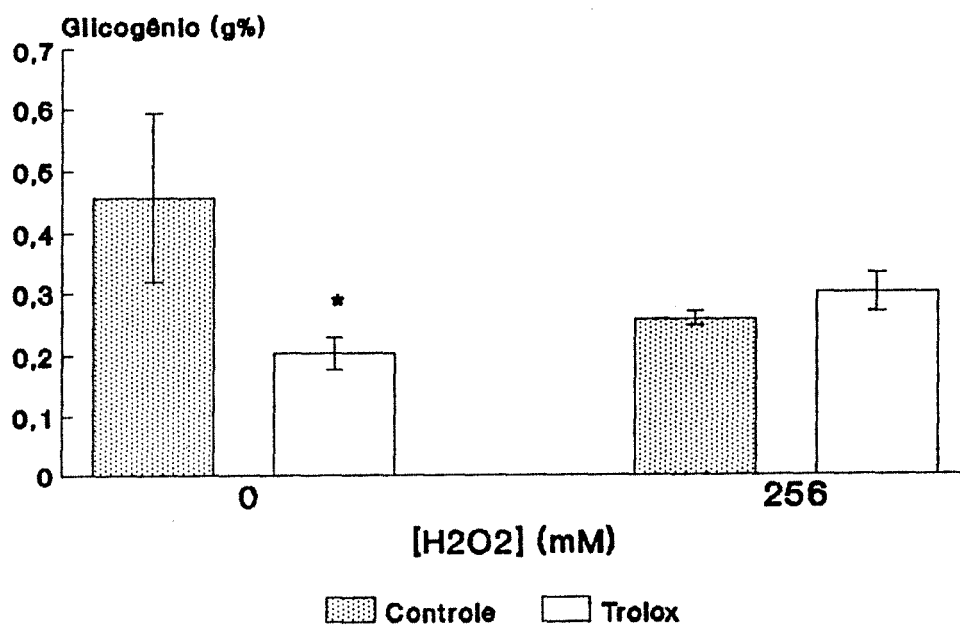


Figura 16 - Conteúdo de glicogênio cardíaco (g%) dos animais dos grupos controle, H_2O_2 , trolox 2 mM e trolox 2 mM + H_2O_2 . Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H_2O_2 : n= 4; grupo trolox 2 mM: n= 4; grupo trolox + H_2O_2 : n=4.

* diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

TABELA 16 - Medidas do conteúdo de glicogênio (g%) de corações de rato, comparando os grupos controle, H₂O₂, trolox 2mM e trolox 2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO (g%)
CONTROLE (n=5)	0,46 ± 0,06
H ₂ O ₂ (n=4)	0,26 ± 0,01*
TROLOX 2 mM (n=4)	0,20 ± 0,01
TROLOX 2 mM+H ₂ O ₂ (n=4)	0,30 ± 0,02#§

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

§ diferença significativa em relação ao grupo trolox 2 mM (p < 0,05).

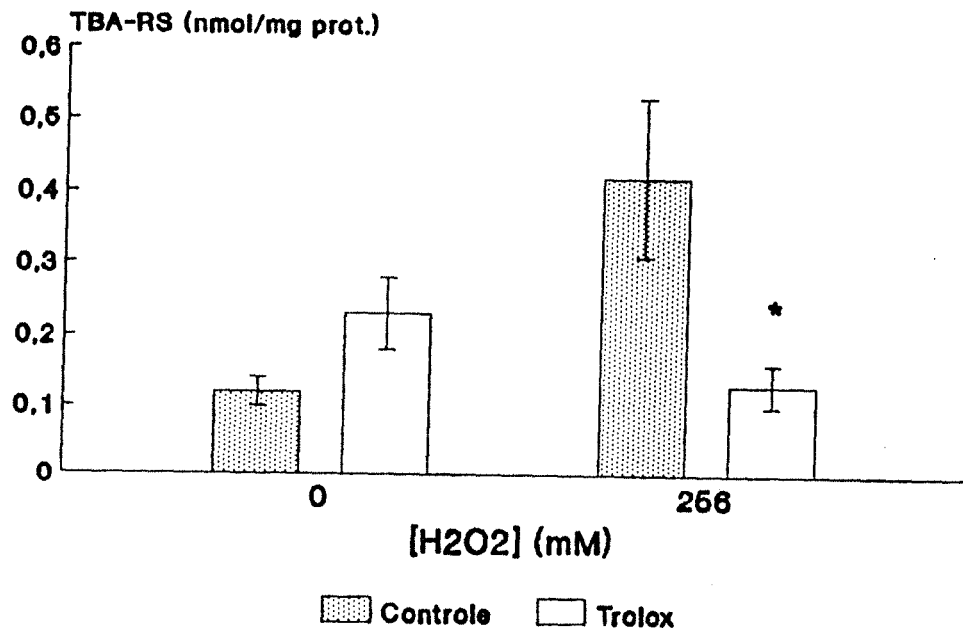


Figura 17 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) nos homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 5; trolox 0,2 mM: n= 6; trolox 0,2 mM + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao controle (p< 0,05).

TABELA 17 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados de corações, comparando os grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	[TBA-RS] (nmol/mg prot.)
CONTROLE (n=5)	0,12 ± 0,02
H ₂ O ₂ (n=5)	0,37 ± 0,10*
TROLOX 0,2 mM (n=5)	0,23 ± 0,05
TROLOX 0,2 mM+H ₂ O ₂ (n=5)	0,13 ± 0,03#

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

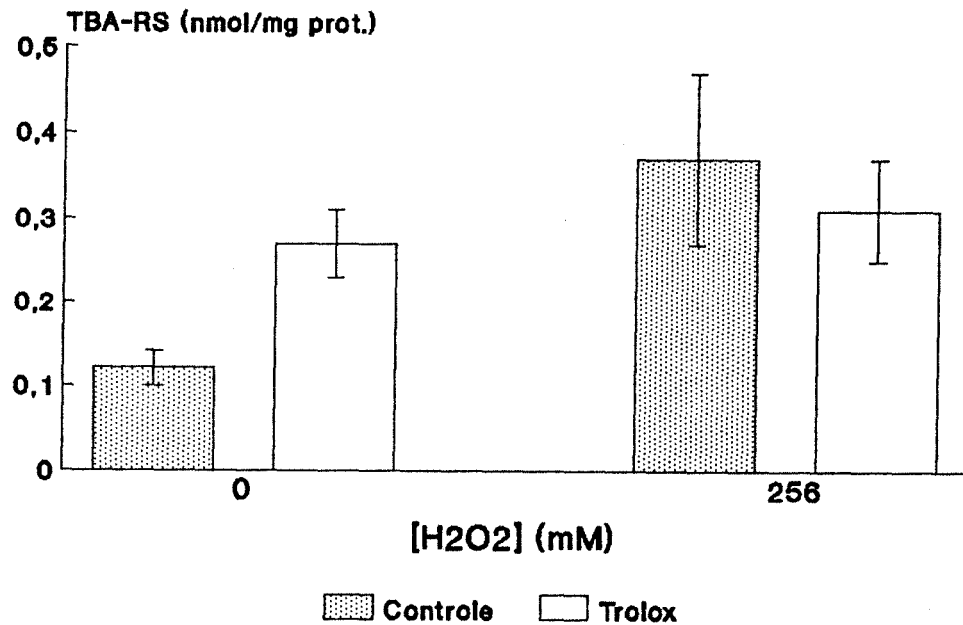


Figura 18 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/mg prot.) nos homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média + E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 5; trolox 2 mM: n= 5; trolox 0,2 mM + H₂O₂: n= 5.

TABELA 18 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot.) em homogeneizados de corações, comparando os grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	[TBA-RS] (nmol/mg prot.)
CONTROLE (n=5)	0,12 ± 0,02
H ₂ O ₂ (n=5)	0,37 ± 0,10*
TROLOX 2 mM (n=5)	0,27 ± 0,04
TROLOX 2 mM+H ₂ O ₂ (n=5)	0,31 ± 0,06*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

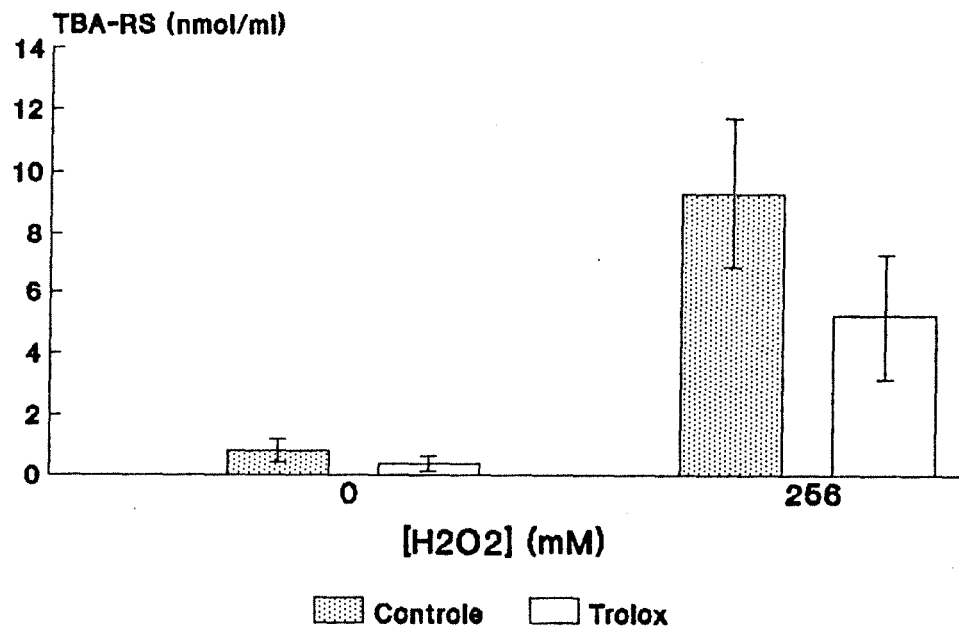


Figura 19 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) nos perfusados cardíacos dos animais dos grupos controle, H_2O_2 , trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H_2O_2 . Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H_2O_2 : n= 5; trolox 0,2 mM: n= 5; trolox 0,2 mM + H_2O_2 : n= 6.

TABELA 19 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações de rato, comparando os grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	[TBA-RS] (nmol/ml)
CONTROLE (n=5)	0,81 ± 0,36
H ₂ O ₂ (n=5)	9,33 ± 2,44*
TROLOX 0,2 mM (n=5)	0,40 ± 0,25
TROLOX 0,2 mM+H ₂ O ₂ (n=6)	5,24 ± 2,08*

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

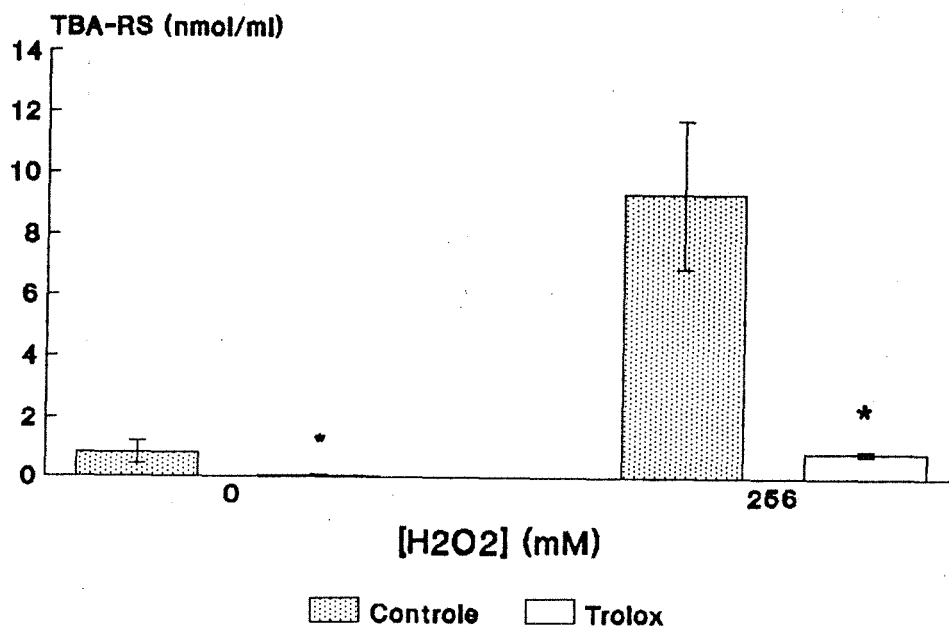


Figura 20 - Conteúdo de TBA-RS (nmol/ml) nos perfusados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 5; trolox 2 mM: n= 5; trolox 2 mM + H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

TABELA 20 - Medidas das concentrações de TBA-RS (nmol/ml) em perfusados de corações, comparando os grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	[TBA-RS] (nmol/ml)
CONTROLE (n=5)	0,81 ± 0,36
H ₂ O ₂ (n=5)	9,33 ± 2,44*
TROLOX 2 mM (n=5)	0,04 ± 0,04
TROLOX 2 mM+H ₂ O ₂ (n=5)	0,85 ± 0,08#§

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

§ diferença significativa em relação ao grupo trolox 2mM (p < 0,05).

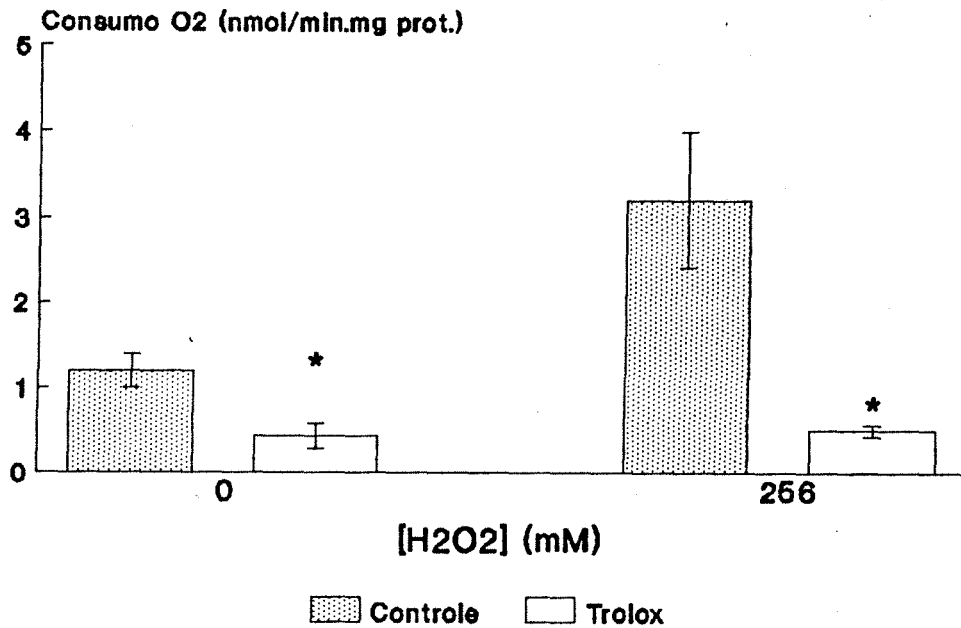


Figura 21A - Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min.mg prot.) nos homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 6; grupo H₂O₂: n= 6; grupo vitamina A: n= 6; grupo vitamina A + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

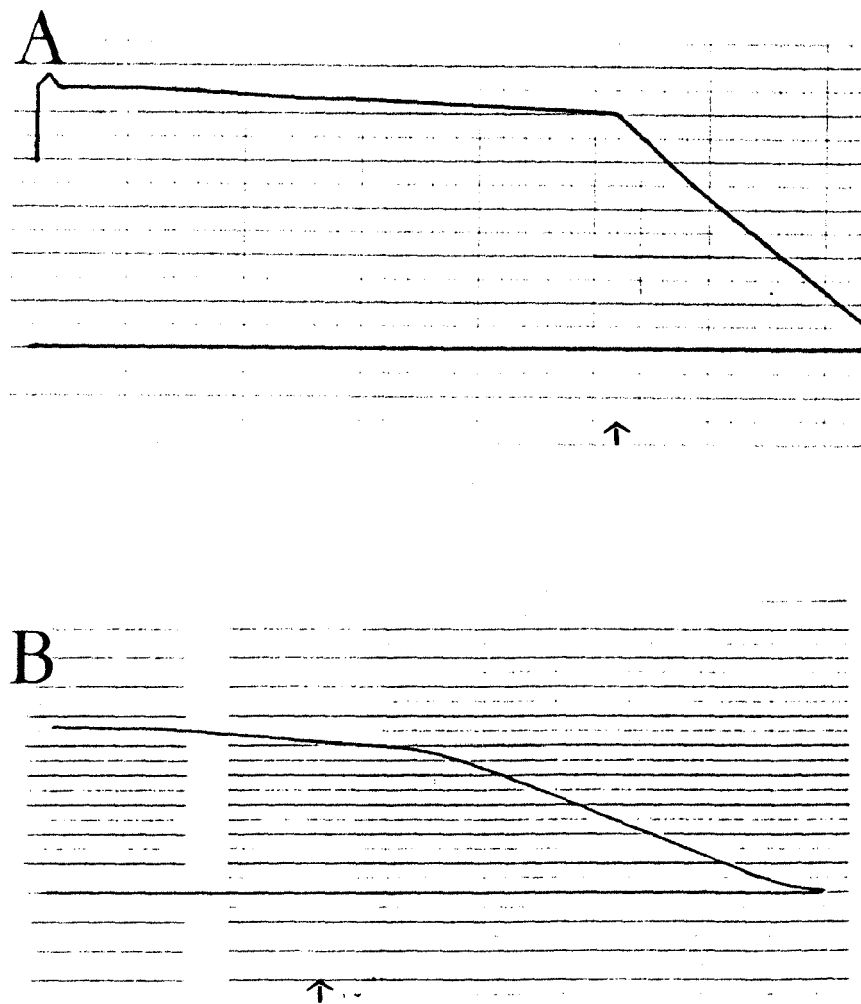


Figura 21B - Registros típicos do consumo de oxigênio dos animais do grupo trolox 2 mM (A) e trolox 2 mM + H₂O₂ (B). As setas indicam o momento da adição do t-BOOH.

TABELA 21 - Medidas do consumo de oxigênio (nmol/min/mgprot) de homogeneizados de coração, comparando os grupos trolox 2mM, H₂O₂ e trolox 2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	CONSUMO DE O ₂ (nmol/min.mgprot.)
TROLOX 2 mM (n=6)	0,44 ± 0,15
H ₂ O ₂ (n=6)	3,21 ± 0,80*
TROLOX 2 mM+H ₂ O ₂ (n=6)	0,51 ± 0,07#

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa com relação ao grupo trolox 2 mM (p < 0,05).

diferença significativa com relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

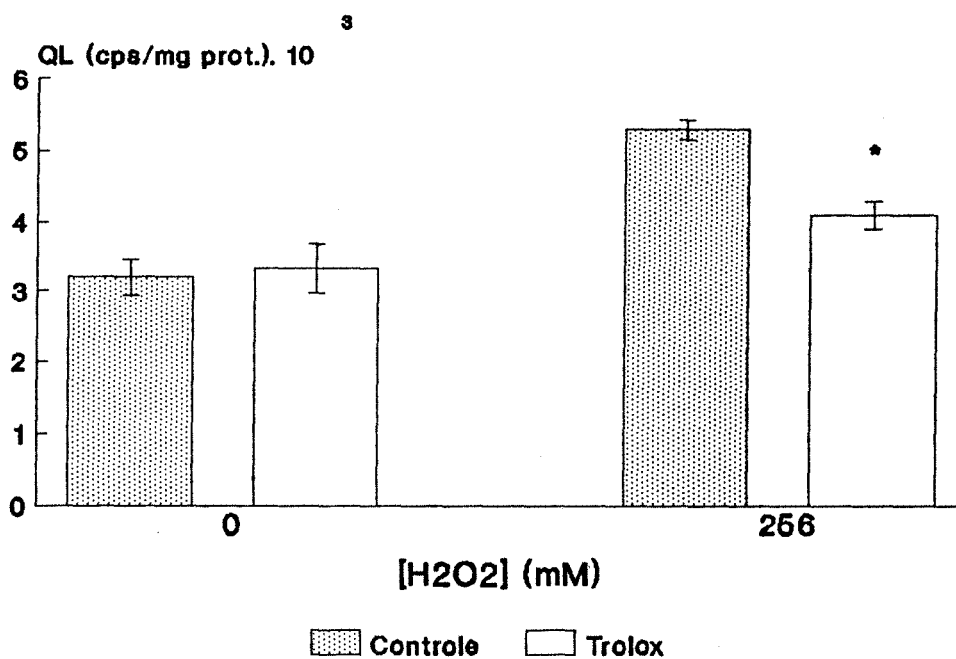


Figura 22A - Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 6; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox: n= 6; grupo trolox 2 mM + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).

+

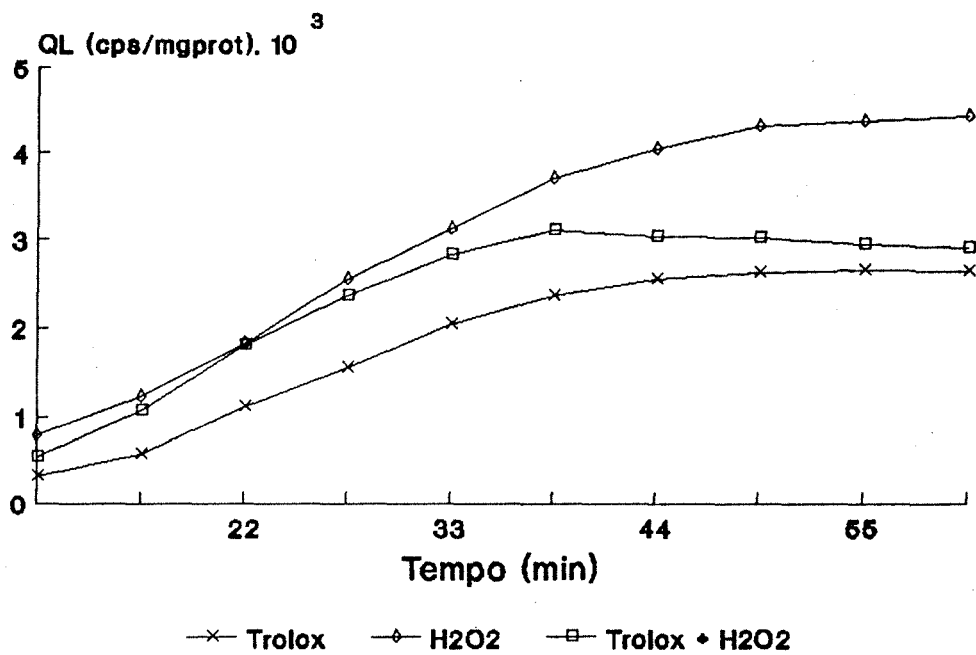


Figura 22B - Perfil da cinética da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados cardíacos dos animais dos grupos H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂.

TABELA 22 - Medidas da QL iniciada por t-BOOH (cps/mg prot.) em homogeneizados de coração, comparando os grupos controle, trolox 2 mM, H₂O₂ e trolox 2 mM + H₂O₂.

GRUPOS	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (cps/mgprot.)
CONTROLE (n=6)	3.199 ± 259
TROLOX 2 mM (n=6)	3.324 ± 358
H ₂ O ₂ (n=6)	5.304 ± 133*
TROLOX 2 mM+H ₂ O ₂ (n=6)	4.098 ± 531*#

Os valores estão expressos como média ± E.P.M..

* diferença significativa com relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa com relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

3.4 EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA FORÇA DE CONTRAÇÃO: AÇÃO DA VITAMINA A E DO TROLOX

A perfusão com H_2O_2 reduz a força de contração do coração de rato isolado e perfundido. A força de contração do grupo H_2O_2 foi reduzida significativamente em relação ao grupo controle nos tempos 5, 10 e 15 minutos através do teste t (Tabela 23, Figura 23). A ANOVA revelou diferença significativa no tempo 10 ($F_{cal} = 5,10$), não havendo significância nos tempos 15 ($F_{cal} = 4,47$) e 20 ($F_{cal} = 0,85$). Registros típicos da força de contração do grupo controle e do grupo H_2O_2 podem ser vistos na figura 1B.

A variação percentual da força de contração dos grupos vitamina A e vitamina A + H_2O_2 pode ser vista na tabela 24 e na figura 24. As diferenças nas variações percentuais entre o grupo controle e o grupo vitamina A não foram significativas. Isto significa que, no grupo vitamina A, a queda na força de contração com o passar do tempo de perfusão é proporcional à do grupo controle. No grupo vitamina A + H_2O_2 não houve diferença significativa na força de contração, quando comparado com o grupo H_2O_2 (Tabela 24, Figura 24). Estas diferenças foram consideradas não significativas nos tempos 10, 15 e 20 minutos. A ANOVA não detectou diferença significativa entre os grupos no vigésimo minuto de perfusão ($F_{cal} = 0,41$). Ou seja, a adição de vitamina A ao líquido perfusor não impediu a redução da força de contração

induzida pelo H_2O_2 . Registros típicos da força de contração dos grupos vitamina A e vitamina A + H_2O_2 podem ser vistos na figura 7B.

Os corações perfundidos com trolox 0,2 mM apresentaram uma variação percentual da força de contração que pode ser vista na tabela 25 e na figura 25. As diferenças entre grupo controle e grupo trolox 0,2 mM não foram consideradas significativas (Tabela 25B). A ANOVA também não detectou diferença significativa ($F_{cal} = 0,01$). Portanto, o trolox não impediu a queda de força de contração com o passar do tempo. Entre os grupos trolox 0,2 mM + H_2O_2 e trolox 0,2 mM não se observou diferença significativa na força de contração, senão no vigésimo minuto (Tabela 25). Comparando o grupo trolox 0,2 mM + H_2O_2 com o grupo H_2O_2 , observou-se diferença significativa, confirmada pela ANOVA ($F_{cal} = 7,29$). A adição de trolox (0,2 mM) ao líquido de perfusão impediu a queda da força de contração induzida pelo H_2O_2 . Registros típicos da força de contração dos grupos trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H_2O_2 podem ser vistos na figura 13B.

A variação percentual da força inicial dos grupos trolox 2 mM e trolox 2 mM + H_2O_2 pode ser vista na tabela 26 e na figura 26. As diferenças percentuais entre grupo controle e grupo trolox 2 mM não foram consideradas significativas. A ANOVA não detectou diferença entre estes dois grupos ($F_{cal} = 0,18$). O grupo trolox 2 mM + H_2O_2 não apresentou diferença significativa da força de

contração em relação ao grupo H_2O_2 . ^{mes. tempo 5 e 25} Portanto, o trolox na concentração de 2 mM não impediu a queda da força de contração induzida pelo H_2O_2 . O grupo trolox 2 mM + H_2O_2 apresentou uma redução significativa da força de contração em relação ao grupo H_2O_2 . ^{tempo 10 e 15} Esta diferença foi confirmada pela ANOVA ($F_{cal} = 29,85$). Registros típicos da força de contração dos grupos trolox 2 mM e trolox 2 mM + H_2O_2 podem ser vistos na figura 14B.

Em resumo, o H_2O_2 provocou uma queda na força de contração (efeito inotrópico negativo), efeito este que foi reduzido pelo trolox 0,2 mM, porém não o foi pela vitamina A e pelo trolox 2 mM.

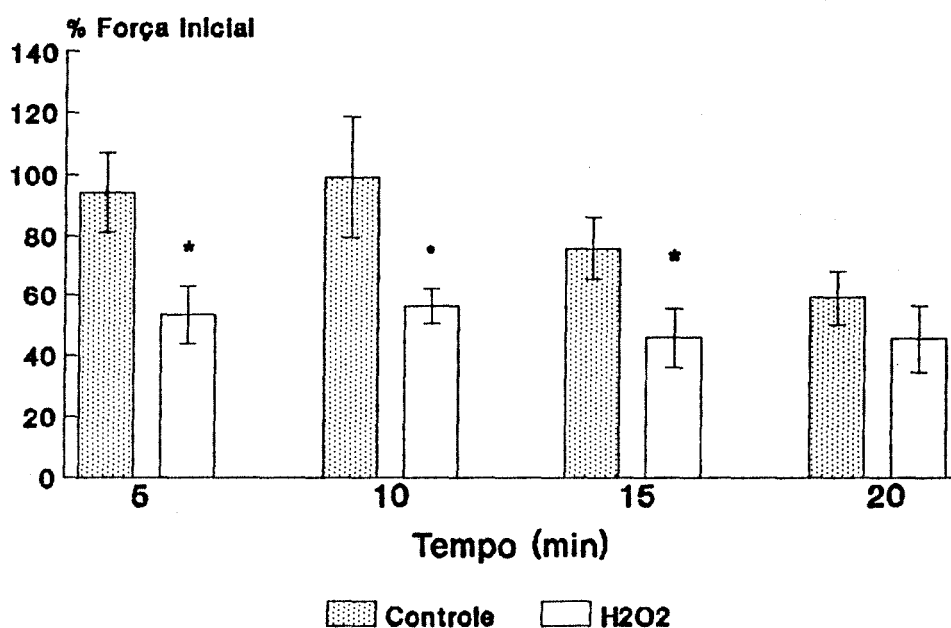


Figura 23 - Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

TABELA 23 - Medidas da variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle (0 mM) e grupo H₂O₂ (256 mM).

% FORÇA DE CONTRAÇÃO

TEMPO (min)	CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ (mM)	
	0 (n=5)	256 (n=6)
5	93,03 ± 13,01	53,49 ± 09,76*
10	99,11 ± 19,78	56,28 ± 05,78*
15	75,71 ± 10,34	45,91 ± 09,56*
20	59,05 ± 09,17	45,41 ± 10,95

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (0 mM) (p < 0,05).

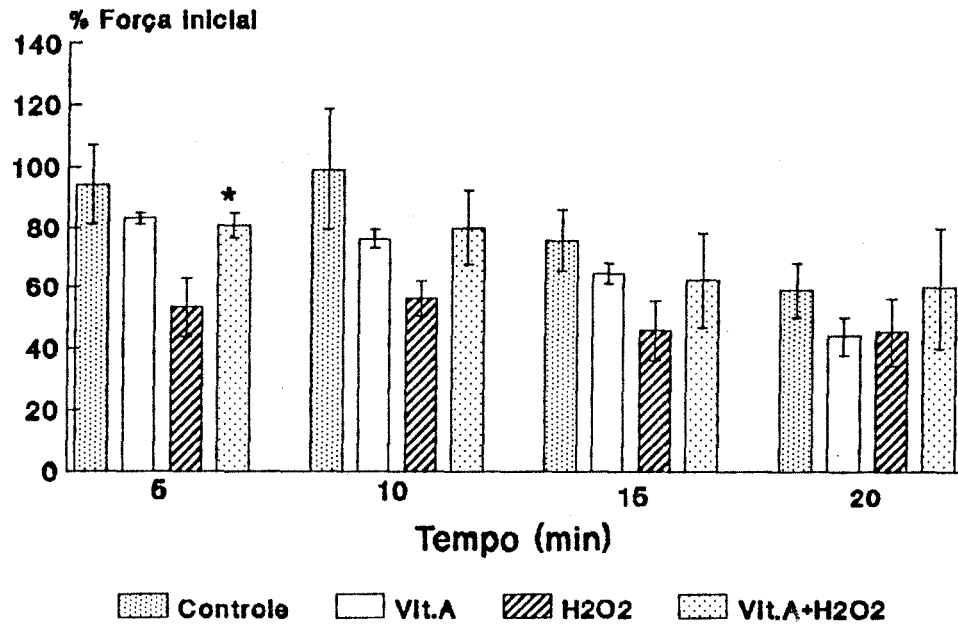


Figura 24 - Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo vitamina A: n= 6; grupo vitamina A + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

TABELA 24 - Medidas da variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo vitamina A, grupo H₂O₂ e grupo vitamina A + H₂O₂.

§ FORÇA DE CONTRAÇÃO

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	VIT.A	H ₂ O ₂	VIT.A+H ₂ O ₂
5	93,03 ± 13,01	82,95 ± 2,07	53,49 ± 9,76	80,69 ± 4,08*
10	99,11 ± 19,78	76,06 ± 3,13	56,28 ± 5,78	79,97 ± 12,40
15	75,71 ± 10,34	64,80 ± 3,58	45,91 ± 9,56	62,53 ± 15,71
20	59,05 ± 9,17	44,01 ± 6,14	45,41 ± 10,95	59,91 ± 19,98

* diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p < 0,05).

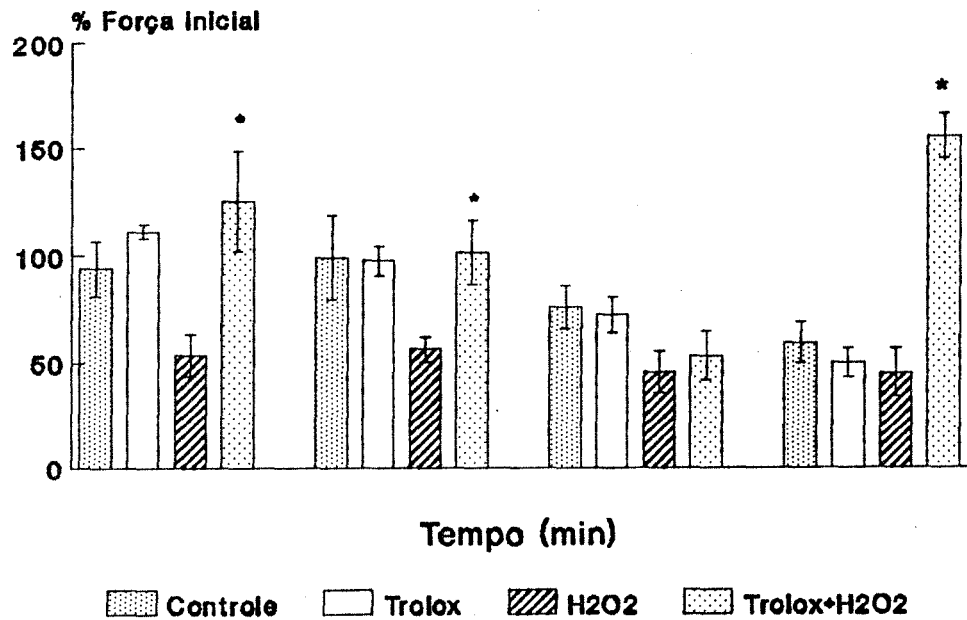


Figura 25 - Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 0,2 mM: n= 5; grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

TABELA 25 - Medidas da variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂.

% FORÇA DE CONTRAÇÃO

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	TROLOX	H ₂ O ₂	TROLOX+H ₂ O ₂
5	93,03 ± 13,01	111,12 ± 3,24	53,49 ± 9,76	115,62 ± 23,30*
10	99,11 ± 19,78	97,60 ± 6,71	56,28 ± 5,78	101,55 ± 16,46*
15	75,71 ± 10,34	71,96 ± 8,30	45,91 ± 9,56	52,99 ± 12,05
20	59,05 ± 09,17	50,03 ± 6,56	45,41 ± 10,95	155,53 ± 10,64*

* diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p < 0,05).

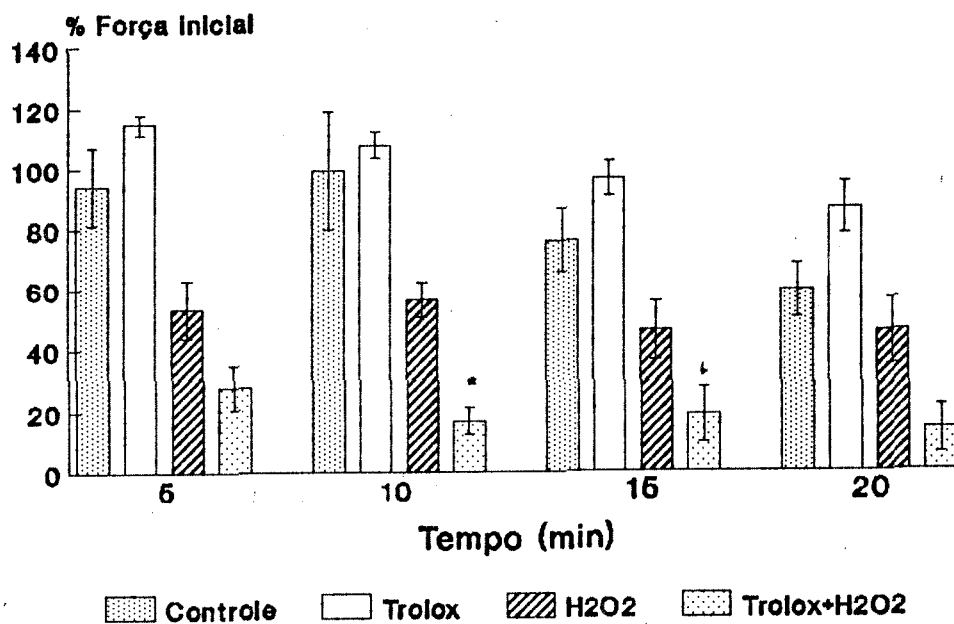


Figura 26 - Variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 2 mM: n= 5; grupo trolox 2 mM + H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p< 0,05).

TABELA 26 - Medidas da variação percentual da força de contração inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 2 mM + H₂O₂.

 % FORÇA DE CONTRAÇÃO

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	TROLOX	H ₂ O ₂	TROLOX+H ₂ O ₂
5	93,03 ± 13,01	114,96 ± 3,64	53,49 ± 9,76	27,82 ± 7,31
10	99,11 ± 19,78	107,67 ± 4,34	56,28 ± 5,78	16,69 ± 4,37*
15	75,71 ± 10,34	96,15 ± 5,69	45,91 ± 9,56	18,41 ± 9,04*
20	59,05 ± 09,17	86,25 ± 8,63	45,41 ± 10,95	13,36 ± 7,81

 * diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p < 0,05).

3.5 EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA FREQUÊNCIA CARDÍACA: AÇÃO DA VITAMINA A E DO TROLOX

A frequência cardíaca foi significativamente reduzida após a perfusão com H_2O_2 (Tabela 27, Figura 27). As diferenças percentuais foram consideradas significativas em todos os tempos estudados. A ANOVA revelou diferença significativa entre grupo controle e grupo H_2O_2 ($F_{cal} = 29,10$). As frequências cardíacas características dos grupos controle e H_2O_2 pode ser observadas na figura 1B.

O grupo vitamina A + H_2O_2 apresentou uma redução significativa na frequência quando comparado com o grupo vitamina A ($F_{cal} = 45,02$) (Tabela 28). O grupo vitamina A apresentou um aumento significativo da frequência cardíaca aos 5 e 10 minutos em comparação com o grupo controle (Tabela 28, Figura 28). A ANOVA não detectou diferença significativa entre estes dois grupos ao vigésimo minuto ($F_{cal} = 1,94$). Aos 10 e 15 minutos, observaram-se aumentos significativos da frequência no grupo vitamina A + H_2O_2 em relação ao grupo H_2O_2 . Ao vigésimo minuto, não se observou diferença significativa entre os dois grupos ($F_{cal} = 2,98$). As frequências cardíacas características dos grupos vitamina A e vitamina A + H_2O_2 podem ser observadas na figura 7B.

No grupo trolox 0,2 mM + H_2O_2 observou-se uma redução significativa da frequência cardíaca em relação ao grupo trolox

0,2 mM (Tabela 29, Figura 29). A ANOVA confirmou esta diferença (Fcal = 42,77). O grupo trolox 0,2 mM apresentou um aumento significativo da frequência em relação ao grupo controle em todos os tempos de estudo. Esta diferença foi confirmada pela ANOVA (Fcal = 11,39). No entanto, não se observou diferença significativa entre os grupos H_2O_2 e trolox 0,2 mM + H_2O_2 (Fcal = 2,86). As frequências cardíacas características dos grupos trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H_2O_2 podem ser observadas na figura 13B.

No grupo trolox 2 mM + H_2O_2 observou-se uma redução significativa da frequência quando comparado com o grupo trolox 2 mM, a partir do décimo quinto minuto (Tabela 30, Figura 30). Pela ANOVA, esta diferença foi confirmada (Fcal = 28,42). O grupo trolox 2 mM apresentou um aumento significativo da frequência em relação ao grupo controle. A ANOVA detectou esta diferença (Fcal = 21,5). O grupo trolox 2 mM + H_2O_2 também apresentou maior frequência cardíaca do que o grupo H_2O_2 (Fcal = 8,07). Estes resultados indicam que a perfusão prévia com trolox 2 mM impediu a redução de frequência induzida pelo H_2O_2 . As frequências cardíacas características dos grupos trolox 2 mM e trolox 2 mM + H_2O_2 podem ser observadas na figura 14B.

Resumindo, o H_2O_2 provocou uma redução da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo). A vitamina A e o trolox, em alguns tempos de estudo, reduziram este efeito do H_2O_2 .

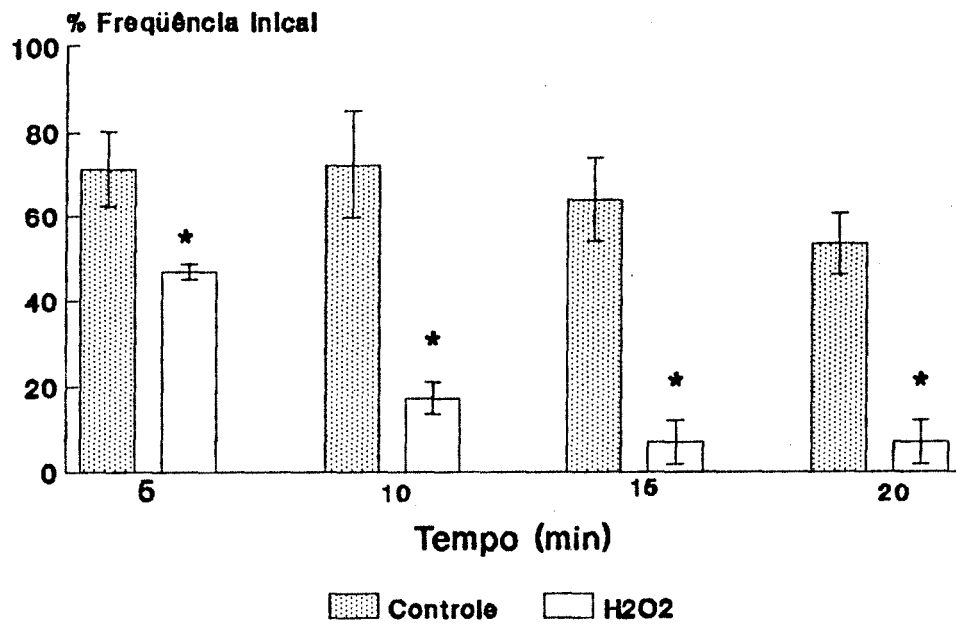


Figura 27 - Variação percentual da freqüência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

TABELA 27 - Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle (0 mM) e grupo H₂O₂ (256 mM).

% FREQUÊNCIA CARDÍACA

TEMPO (min)	CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ (mM)	
	0 (n=5)	256 (n=6)
5	71,30 ± 08,96	46,82 ± 1,77*
10	72,41 ± 12,68	17,27 ± 3,64*
15	63,93 ± 10,05	6,98 ± 5,08*
20	53,32 ± 07,20	6,98 ± 5,08*

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (0 mM) (p < 0,05).

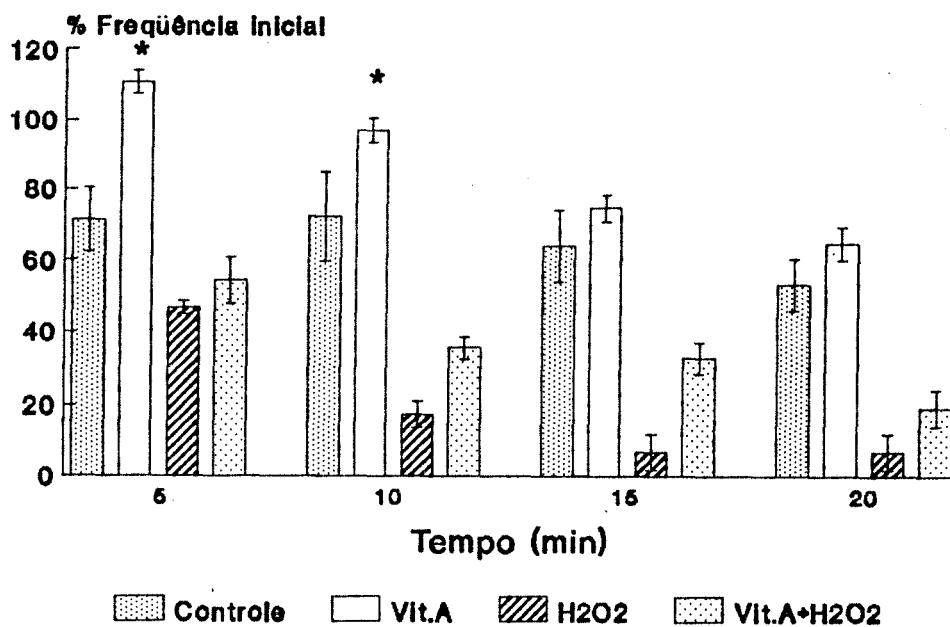


Figura 28 - Variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo vitamina A: n= 6; grupo vitamina A + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

TABELA 28 - Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo vitamina A, grupo H₂O₂ e grupo vitamina A + H₂O₂.

% FREQUÊNCIA CARDÍACA

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	VIT.A	H ₂ O ₂	VIT.A+H ₂ O ₂
5	71,30 ± 8,96	110,83 ± 3,10*	46,82 ± 1,77	54,36 ± 6,31
10	72,41 ± 12,68	97,10 ± 3,51	17,27 ± 3,64	35,61 ± 3,13#
15	63,93 ± 10,05	74,69 ± 3,76	6,98 ± 5,08	32,97 ± 4,34#
20	53,32 ± 7,20	64,85 ± 4,65	6,98 ± 5,08	19,23 ± 4,96

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p < 0,05).

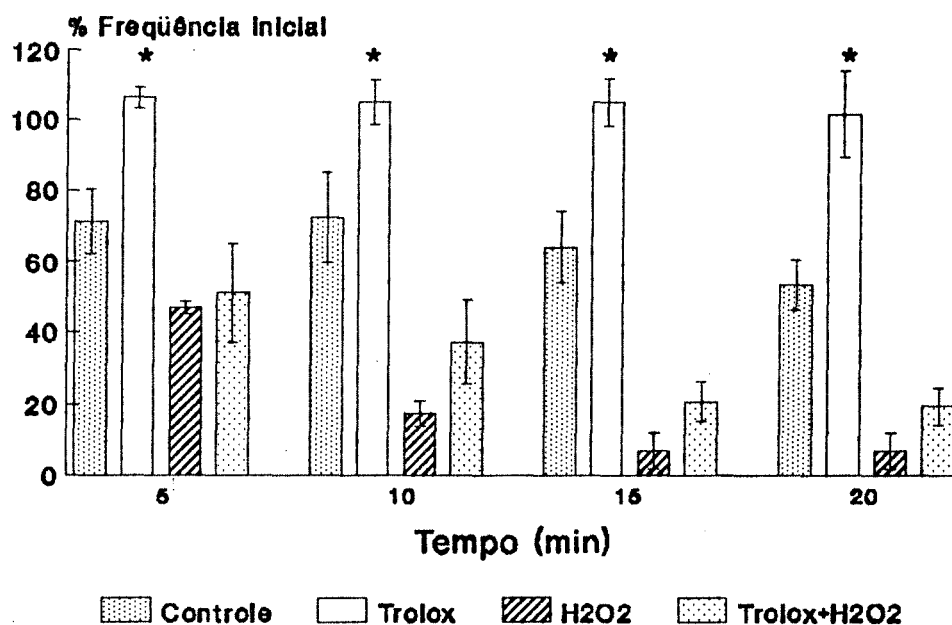


Figura 29 - Variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 2 mM: n= 5; grupo trolox 2 mM + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p< 0,05).

TABELA 29 - Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂.

% FREQUÊNCIA CARDÍACA

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	TROLOX	H ₂ O ₂	TROLOX+H ₂ O ₂
5	71,30 ± 8,96	106,32 ± 2,98*	46,82 ± 1,77	51,17 ± 19,49
10	72,41 ± 12,68	105,04 ± 6,34*	17,27 ± 3,64	37,16 ± 11,67
15	63,93 ± 10,05	105,06 ± 6,70*	6,98 ± 5,08	20,69 ± 5,66
20	53,32 ± 7,20	101,59 ± 12,36*	6,98 ± 5,08	19,34 ± 5,25

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (p < 0,05).

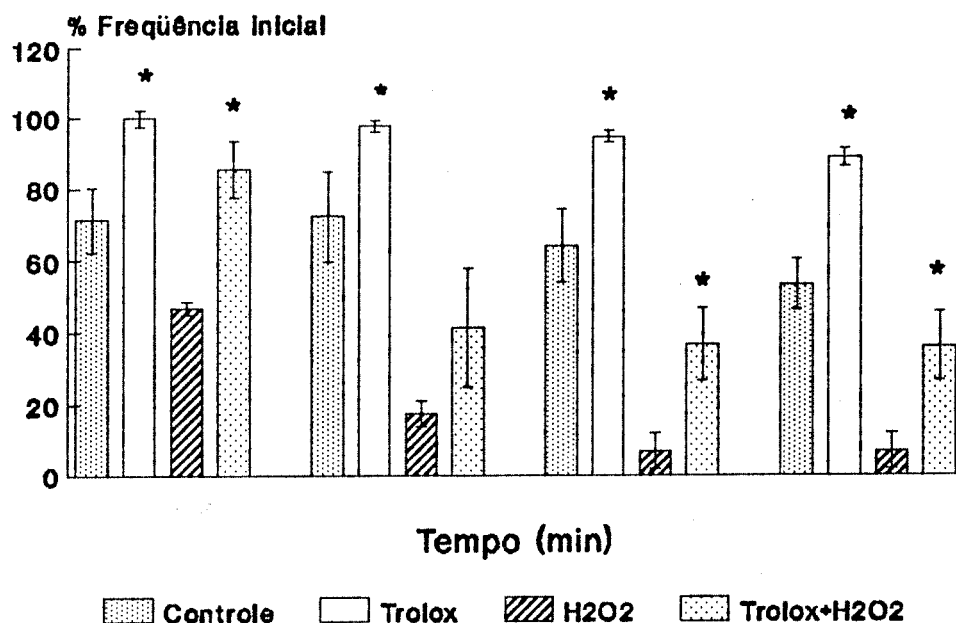


Figura 30 - Variação percentual da freqüência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 2 mM: n= 5; grupo trolox 2 mM + H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p< 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p< 0,05).

TABELA 30 - Medidas da variação percentual da frequência cardíaca inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 2 mM + H₂O₂.

 % FREQUÊNCIA CARDÍACA

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	TROLOX	H ₂ O ₂	TROLOX+H ₂ O ₂
5	71,30 ± 8,96	99,85 ± 2,21*	46,82 ± 1,77	85,55 ± 8,14#
10	72,41 ± 12,68	97,71 ± 1,66	17,27 ± 3,64	41,44 ± 16,65
15	63,93 ± 10,05	94,80 ± 1,54*	6,98 ± 5,08	36,81 ± 10,03#
20	53,32 ± 7,20	88,88 ± 2,64*	6,98 ± 5,08	36,16 ± 9,53#

 * diferença significativa em comparação com o grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p < 0,05).

3.6 EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO FLUXO CORONARIANO: AÇÃO DA VITAMINA A E DO TROLOX

A perfusão com H_2O_2 reduziu significativamente o fluxo coronariano em relação ao grupo controle em todos os tempos de estudo (Tabela 31, Figura 31). A ANOVA detectou diferença significativa entre estes dois grupos ($F_{cal} = 19,26$).

O fluxo coronariano do grupo vitamina A + H_2O_2 foi significativamente menor do que o do grupo vitamina A (Tabela 32, Figura 32). A ANOVA detectou diferença significativa entre os dois grupos ($F_{cal} = 11,88$). O fluxo do grupo vitamina A foi significativamente maior do que o do grupo controle no quinto e décimo minutos. A ANOVA não demonstrou diferença significativa entre estes dois grupos no vigésimo minuto ($F_{cal} = 0,28$). Da mesma forma, a diferença percentual do fluxo entre os grupos H_2O_2 e vitamina A + H_2O_2 não foi considerada significativa, senão ao quinto minuto. A ANOVA, aplicada ao vigésimo minuto, não demonstrou diferença significativa ($F_{cal} = 0,04$).

O fluxo foi significativamente reduzido no grupo trolox 0,2 mM + H_2O_2 em comparação com o grupo trolox 0,2 mM (Tabela 33, Figura 33). A ANOVA confirmou esta diferença ($F_{cal} = 193,38$). A perfusão prévia com trolox 0,2 mM aumentou significativamente o fluxo em comparação com o grupo controle. Esta diferença foi

considerada significativa pela ANOVA ($F_{cal} = 13,71$). No entanto, no grupo trolox 0,2 mM + H_2O_2 não se observou diferença significativa em relação ao grupo H_2O_2 ($F_{cal} = 2,26$). Isto significa que o trolox 0,2 mM impede a queda do fluxo coronariano em relação ao controle, mas não previne a queda do fluxo induzida pelo H_2O_2 .

Com relação à perfusão com trolox 2 mM, foram observados efeitos semelhantes. Houve redução significativa do fluxo no grupo trolox 2 mM + H_2O_2 em comparação com o grupo trolox 2 mM ($F_{cal} = 21,77$) (Tabela 34, Figura 34). A perfusão com trolox 2 mM aumentou significativamente o fluxo em relação ao grupo controle ($F_{cal} = 11,73$). Porém não se observou diferença significativa no fluxo entre os grupos trolox 2 mM + H_2O_2 e H_2O_2 ($F_{cal} = 2,95$).

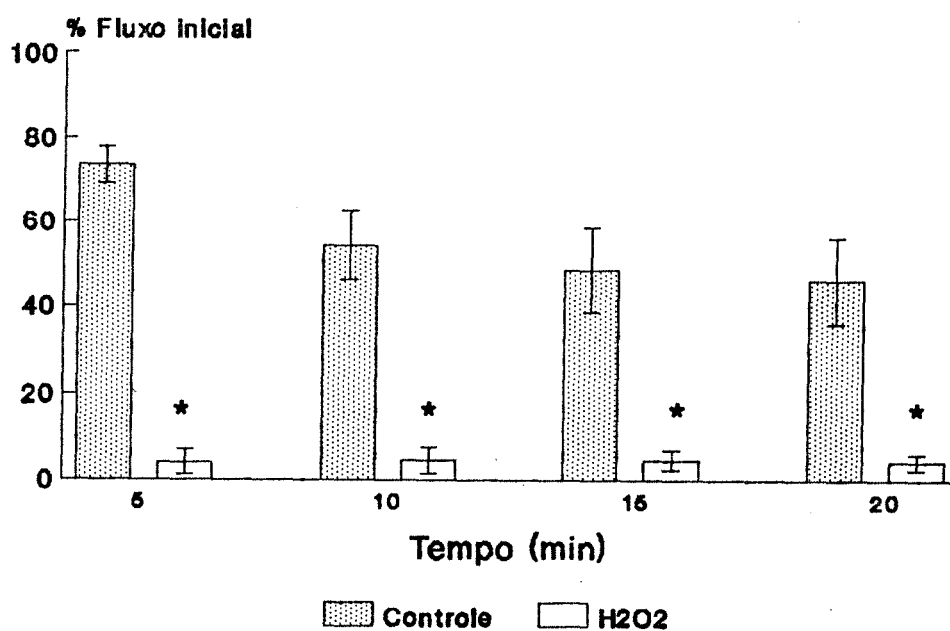


Figura 31 - Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle e H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

TABELA 31 - Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle (0 mM) e grupo H₂O₂ (256 mM).

% FLUXO CORONARIANO

TEMPO (min)	CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ (mM)	
	0 (n=5)	256 (n=6)
5	73,66 ± 4,39	4,12 ± 2,75**
10	54,44 ± 8,22	4,62 ± 2,92**
15	48,72 ± 9,96	4,73 ± 2,20**
20	46,26 ± 10,26	4,24 ± 1,79**

** diferença significativa em comparação com o grupo controle (0 mM) (p < 0,01).

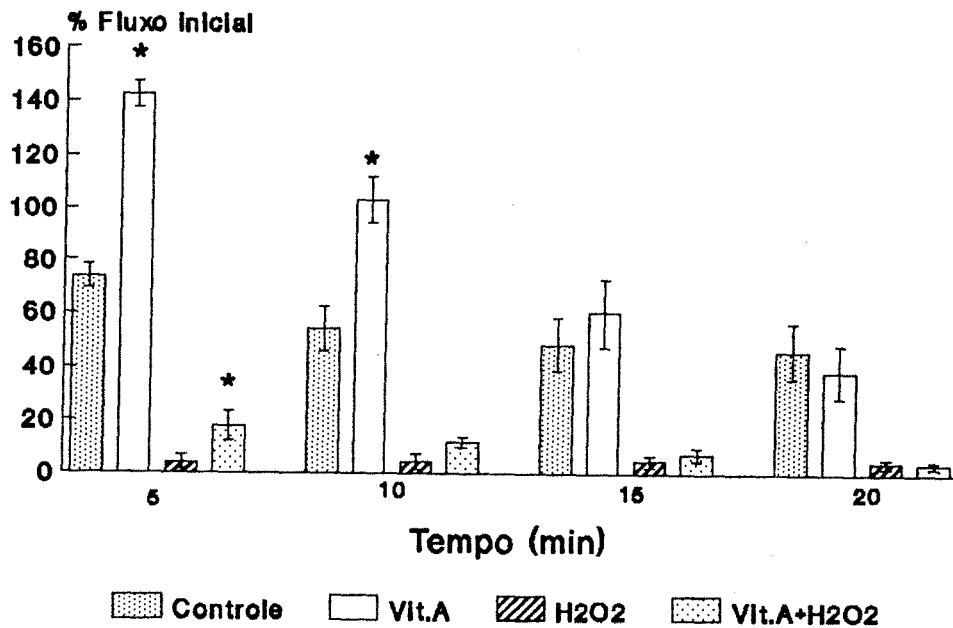


Figura 32 - Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, vitamina A e vitamina A + H₂O₂. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo vitamina A: n= 6; grupo vitamina A + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p < 0,05).

TABELA 32 - Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo vitamina A, grupo H₂O₂ e grupo vitamina A + H₂O₂.

§ FLUXO CORONARIANO

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	VIT.A	H ₂ O ₂	VIT.A+H ₂ O ₂
5	73,66 ± 4,39	142,49 ± 4,83*	4,12 ± 2,75	17,64 ± 5,28#
10	54,44 ± 8,22	103,36 ± 8,92*	4,62 ± 2,92	11,74 ± 2,06
15	48,72 ± 9,96	60,32 ± 12,53	4,73 ± 2,20	7,27 ± 2,40
20	46,26 ± 10,26	38,67 ± 10,05	4,24 ± 1,79	3,84 ± 1,07

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (p< 0,05).

diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p< 0,05).

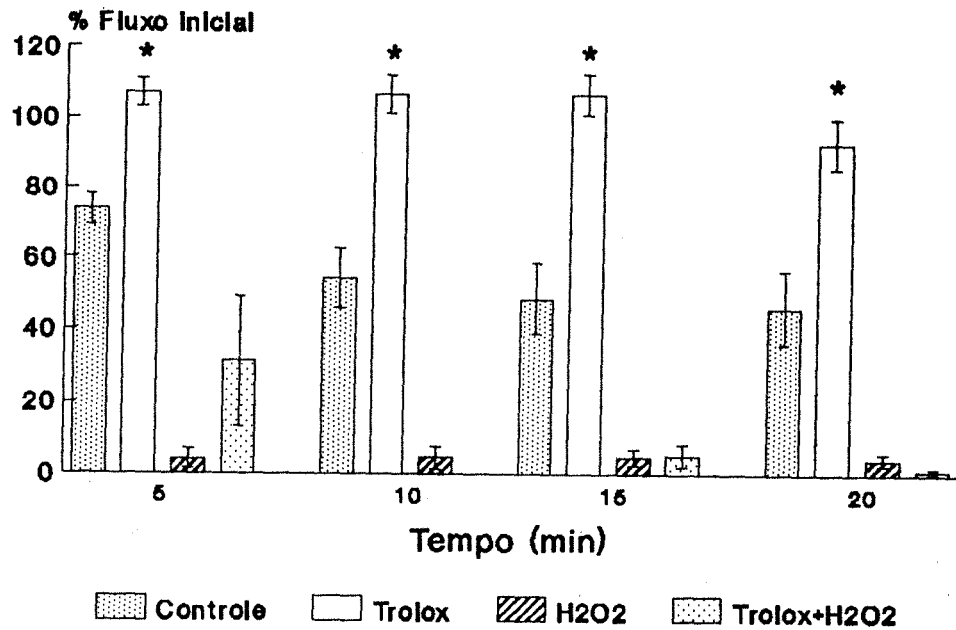


Figura 33 - Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 0,2 mM e trolox 0,2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 2 mM: n= 5; grupo trolox 2 mM + H₂O₂: n= 6.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

TABELA 33 - Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 0,2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 0,2 mM + H₂O₂.

% FLUXO CORONARIANO

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	TROLOX	H ₂ O ₂	TROLOX+H ₂ O ₂
5	73,66 ± 4,39	107,37 ± 3,95*	4,12 ± 2,75	31,20 ± 18,09
10	54,44 ± 8,22	106,86 ± 5,27*	4,62 ± 2,92	-
15	48,72 ± 9,96	106,94 ± 5,72*	4,73 ± 2,20	5,24 ± 3,10
20	46,26 ± 10,26	92,71 ± 7,22*	4,24 ± 1,79	1,31 ± 0,77

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (p < 0,05).

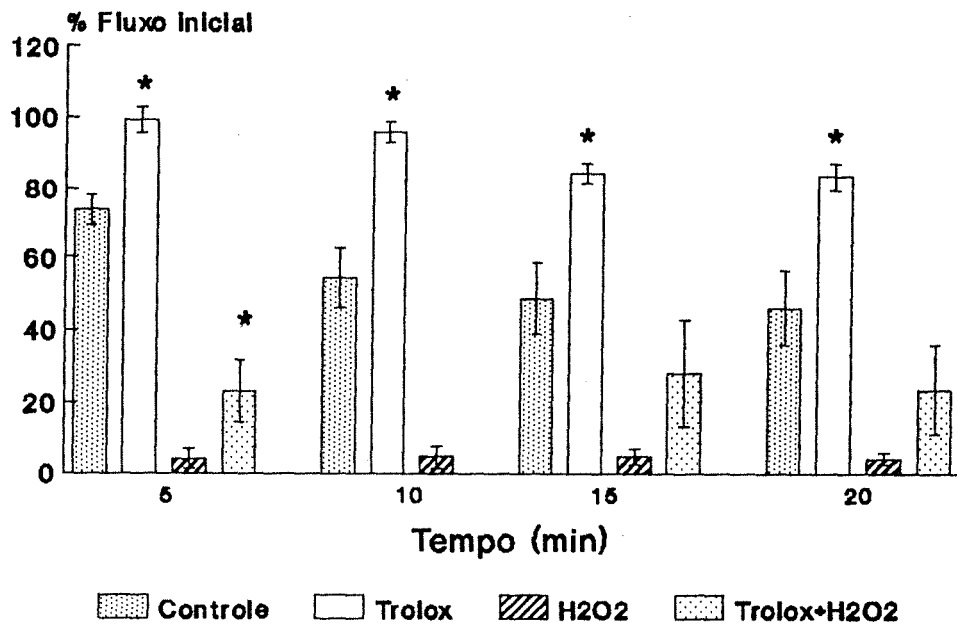


Figura 34 - Variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, dos grupos controle, H₂O₂, trolox 2 mM e trolox 2 mM + H₂O₂. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.. Grupo controle: n= 5; grupo H₂O₂: n= 6; grupo trolox 2 mM: n= 5; grupo trolox 2 mM + H₂O₂: n= 5.

* diferença significativa em relação ao grupo controle (p< 0,05).

diferença significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p< 0,05).

TABELA 34 - Medidas da variação percentual do fluxo coronariano inicial, nos distintos tempos de estudo, comparando grupo controle, grupo trolox 2 mM, grupo H₂O₂ e grupo trolox 2 mM + H₂O₂.

% FLUXO CORONARIANO

TEMPO (min)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CONTROLE	TROLOX	H ₂ O ₂	TROLOX+H ₂ O ₂
5	73,66 ± 4,39	99,17 ± 3,62*	4,12 ± 2,75	23,02 ± 8,58#
10	54,44 ± 8,22	95,95 ± 2,89*	4,62 ± 2,92	-
15	48,72 ± 9,96	84,60 ± 2,96*	4,73 ± 2,20	28,15 ± 14,79
20	46,26 ± 10,26	83,78 ± 3,84*	4,24 ± 1,79	23,61 ± 12,31

* diferença significativa em comparação com o grupo controle (p < 0,05).

diferença significativa em comparação com o grupo H₂O₂ (p < 0,05).

4. DISCUSSÃO

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a função contrátil do miocárdio submetido à perfusão com H_2O_2 . Muitos autores têm se preocupado com o estudo do *stress* oxidativo no coração. A maioria deles, se ocupa da investigação dos processos bioquímicos que ocorrem nesta situação produzida *in vitro* (MAGNER-WRÓBEL et al., 1990; MASSEY & BURTON, 1990; PUPPO et al., 1990; LE et al., 1992; CECONI et al., 1992). Muitos outros, se detém no estudo das alterações fisiológicas que ocorrem nos quadros isquêmicos (LEE & ALLEN, 1992; DU TOIT & OPIE, 1992). No entanto, há um volume relativamente pequeno de trabalhos que relacionam estes dois aspectos: os processos bioquímicos que determinam alterações fisiológicas nas situações de *stress* oxidativo *in vivo*. Este trabalho tem o intuito de fazer esta relação.

Em estudos prévios, demonstrou-se o aparecimento de contraturas cardíacas após injeções de H_2O_2 , a partir da concentração 128 mM (BELLÓ & BELLÓ, 1988). Neste modelo, havia a

dificuldade de determinar a concentração de H_2O_2 que atingia o coração, já que a injeção era diluída no líquido perfusor. Com o objetivo de se evitar este problema, assim como a variação da pressão de perfusão no momento da injeção, passou-se a perfundir os corações com H_2O_2 (OLIVEIRA, 1993). Neste modelo, também se observaram contraturas cardíacas significativas a partir da concentração 128 mM. Optou-se pela concentração de 256 mM, já que esta produzia alterações contráteis bem evidentes. Para estudar o efeito do H_2O_2 na contratilidade cardíaca utilizamos o método de Langendorff (1895) para a perfusão do coração e manutenção de suas propriedades funcionais. Este método, apesar de muito antigo, continua a ser muito utilizado e permitiu alcançar os objetivos deste trabalho. Tomou-se a precaução de padronizar a tensão diastólica utilizando-se, em todos os experimentos, um estiramento próximo à $L_{máx}$ (pico de tensão ativa, ou seja, o ponto ótimo de estiramento dos sarcômeros). A calibração foi mantida igual em todos os experimentos e confirmada pela calibração interna do miógrafo que foi acionado ao final de cada experimento. Como se aplicou apenas uma concentração de H_2O_2 , cada coração (no tempo zero) serviu como controle de si mesmo.

Observaram-se alterações na força de contração, na frequência cardíaca e no fluxo coronariano durante a perfusão com H_2O_2 . Uma das alterações mais evidentes observadas foi o aparecimento da contratura cardíaca, ou seja, a falta do relaxamento cardíaco (ver figura 1B). Este fenômeno é conhecido

na clínica como "stone heart" (coração de pedra) e pode ocorrer no infarto agudo do miocárdio após arterioplastia, no transplante de coração ou em qualquer situação em que o coração fique submetido a ciclos de isquemia-reperfusão, como a colocação de ponte de safena (COOLEY et al., 1972; WUKASCH et al., 1972; BAROLDI et al., 1974). Esta denominação se originou do fato de o coração apresentar-se, à palpação, num estado de rigidez semelhante à contração tetânica do músculo esquelético. Este quadro foi também observado por Hearse e colaboradores (1977) ao submeterem corações perfundidos de rato à isquemia-reperfusão. Nesta época, os autores sugeriram que este fenômeno era devido à depleção de energia e a distúrbios na homeostasia do cálcio. No entanto, o "coração de pedra" continuava a ser um desafio para os bioquímicos (KATZ & TADA, 1972). Alguns anos mais tarde, Jolly e colaboradores (1984) sugeriram que as contraturas isquêmicas eram devidas às EAO geradas nesta situação. Atualmente, sabe-se que as EAO formadas durante a isquemia-reperfusão do miocárdio provém de diversas fontes. A mitocôndria contribui para a formação de EAO porque os transportadores de elétrons permanecem em sua forma reduzida, como resultado da baixa pressão de oxigênio. Isto causa a redução monoelétrica do oxigênio, gerando EAO ($\cdot O_2^-$, H_2O_2 e \odot OH). A enzima xantina oxidase é também fonte de EAO. A xantina desidrogenase, presente no miocárdio, sofre proteólise durante a isquemia, convertendo-se a sua forma oxidase. Também durante a isquemia, o ATP (trifosfato de adenosina) é degradado à

hipoxantina, fornecendo, assim, o substrato para a enzima atuar na reperfusão, produzindo radical superóxido. Vários estudos confirmam que a isquemia resulta, também, em migração de neutrófilos ao miocárdio. Eles se aderem ao endotélio vascular lesado. Níveis excessivos de catecolaminas podem ser liberados durante a isquemia-reperfusão do miocárdio e contribuem para formação de EAO, a partir de sua oxidação (HÄGGENDAL et al., 1987; BAST et al., 1991). As fontes de EAO durante a isquemia-reperfusão, assim como os mecanismos que geram o dano celular estão resumidos na figura XII.

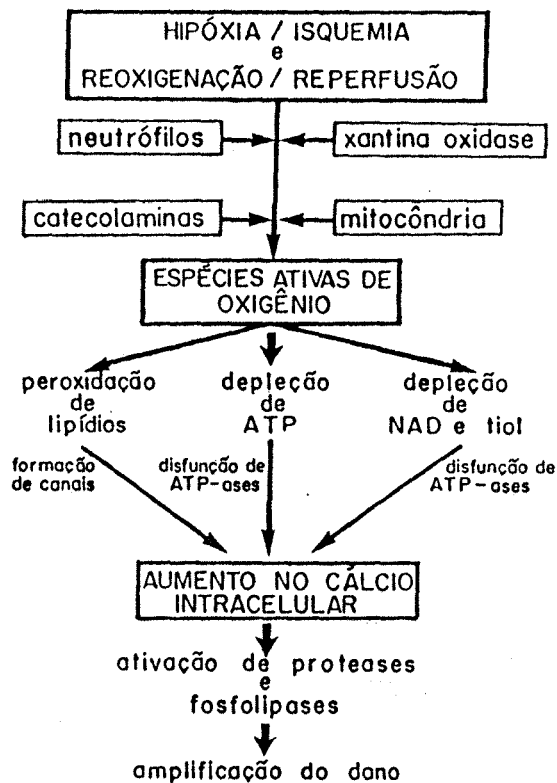


FIGURA XII - Mecanismos geradores do dano celular mediado por EAO durante o processo de isquemia-reperfusão (BAST et al., 1991).

Neste modelo de estudo, os neutrófilos não teriam participação já que a perfusão foi feita com um líquido artificial que lava o coração de seus elementos figurados. As catecolaminas também teriam pouca influência devido à maneira de sacrificar o animal. Todas as hipóteses sugeridas para explicar os danos observados na reperfusão do miocárdio isquêmico apontam para a produção de H_2O_2 . O achado que o H_2O_2 provoca contratura cardíaca (BELLÓ & BELLÓ, 1988) as confirma. A comprovação deste fato nos levou a formular hipóteses para explicá-lo. Uma hipótese bastante provável é que a contratura observada se deva ao excesso de cálcio no interior da célula cardíaca. É uma experiência muito antiga a perfusão do miocárdio de rã com excesso de cálcio. Nessa situação, observa-se que o coração relaxa-se cada vez menos até que se mantém numa contração estável. Este fenômeno é conhecido como rigor cálcico, rigidez pelo cálcio ou contratura provocada pelo cálcio (MAZZELLA, 1968).

Quando há sobrecarga intracelular de cálcio, pode haver ativação das fosfolipases cálcio-dependentes com subsequente liberação de ácidos graxos das membranas e ativação da cascata do ácido araquidônico (AA). O AA pode produzir efeitos tóxicos diretos sobre o coração e pode produzir as prostaglandinas (PG) que, por sua vez, aceleram a sobrecarga intramitocondrial de cálcio (KARMAZYN et al., 1979). As PG estão, portanto, envolvidas na movimentação de cálcio, favorecendo o seu acúmulo intracelular, podendo produzir contraturas. Num experimento

prévio, demonstramos que o uso de um inibidor da cicloxigenase e, portanto, da síntese de PG, a indometacina, reduz significativamente as contraturas cardíacas induzidas pelo H_2O_2 (BELLÓ & BELLÓ, 1989b).

Segundo Braunwald (1982), existem sete mecanismos que controlam a concentração mioplasmática de cálcio:

(1) o sarcolema possui uma Ca^{+2} - ATPase que coloca cálcio para fora da célula, num mecanismo dependente de energia;

(2) na membrana do retículo sarcoplasmático existe uma Mg^{+2} - ATPase que transporta cálcio, num processo dependente de energia;

(3) o cálcio pode ser captado e liberado pela mitocôndria;

(4) sistema de troca bi-direcional Na^{+}/Ca^{+2} , preponderante no coração;

(5) o cálcio se movimenta através do sarcolema, seguindo seu gradiente de concentração, através dos canais de cálcio;

(6) ionóforos podem movimentar o cálcio diretamente através da membrana;

(7) tamponamento do cálcio por proteínas intracelulares, tais como calmodulina, troponina C e cadeias leves da miosina-fosforilase também regulam a concentração intracelular deste íon.

Nos itens 1 e 2 é citada a importância das "bombas de cálcio". Nota-se, portanto, que o processo é dependente de energia. O relaxamento muscular depende da volta dos níveis de cálcio aos valores de repouso e isto só ocorre se houver a presença de ATP. A contratatura cardíaca pode, portanto, ser devida à falta de ATP. No nosso modelo, a depleção do ATP poderia ser provocada pela presença do H_2O_2 ou seus derivados. Foi demonstrado que o H_2O_2 pode ativar uma enzima nuclear, a poli (ADP-ribose) polimerase, que utiliza NAD (adenina dinucleotídeo) como substrato. A ativação desta enzima causa uma diminuição na concentração de NAD, seguida por depleção de ATP (SCHRAUFSTATTER et al., 1986). Num trabalho mais recente, comprovou-se que o H_2O_2 , por si só, pode promover a depleção de ATP e fosfocreatina em cardiomiócitos de mamíferos (JANERO et al., 1993). Foi também sugerido que o H_2O_2 ou seus derivados poderiam provocar a inibição da enzima Ca^{+2} - ATPase sarcolemal (KANEKO et al., 1989). Tem-se notícia da inibição e degradação por EAO da $(Na^+ - K^+)$ ATPase, uma enzima que mantém os gradientes iônicos normais através da membrana celular (THOMAS & REED, 1990; HUANG et al., 1992). A inibição ou destruição de tais enzimas pode interferir na homeostasia do cálcio, o que representaria uma hipótese alternativa para explicar o dano observado no nosso modelo.

Há, também, uma proteína celular, o fosfolamba, que, quando fosforilada, aumenta a recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Quanto maior a fosforilação do fosfolamba, maior

o relaxamento do miocárdio. Se o ATP está depletado, isto não ocorre e o relaxamento fica prejudicado (BRAUNWALD, 1982).

O ATP é necessário para a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, a bomba de cálcio do sarcolema e o transporte mitocondrial de cálcio (KÜBLER & KATZ, 1977). Portanto, com a depleção do ATP, pode haver a liberação de cálcio da mitocôndria (cerca de 1 a 2 nmoles/mg prot.) (RICHTER & FREI, 1988).

Por outro lado, Koretsune & Marban (1989) comprovaram que uma redução de 50% no ATP não é capaz de induzir rigidez das pontes cruzadas. Além disso, Corretti e colaboradores (1991) encontraram um lacuna de aproximadamente 10 minutos entre a depleção das reservas de ATP e o surgimento da contratura. Isto leva a crer que a depleção de ATP não é o principal evento determinante da contratura.

Um dos metabólitos das prostaglandinas (PG), o tromboxano A₂, pode atuar como ionóforo de cálcio e, por isso, pode movimentar este íon diretamente através da membrana (GERRARD et al., 1976).

O mecanismo que parece ser o mais abrangente e determinante do aumento de cálcio intracelular é a lipoperoxidação (LPO). Este processo consiste na oxidação dos componentes lipídicos das membranas, transformando-os em lipoperóxidos. Dependendo do grau de severidade, a LPO pode produzir desde a perda da fluidez das

membranas, das funções secretórias e dos gradientes iônicos transmembrana até a morte celular (SOUTHORN & POWIS, 1988). A transformação dos lipídios em lipoperóxidos, altera totalmente a estrutura da membrana, formando "buracos" ou "poros" hidrofílicos na barreira hidrofóbica da membrana (BLOKHA et al., 1972). A permeabilidade fica alterada, permitindo a entrada descontrolada de íons, inclusive de cálcio. Como a LPO atinge todas as membranas celulares, pode haver liberação de cálcio de organelas celulares e do meio extracelular. Através dos "poros" passam também as enzimas lisossômicas e fosfolipases que atuam sobre proteínas e lipídios, acelerando a destruição das membranas. Assim, a LPO, com conseqüente invasão de cálcio intracelular, seria outra hipótese para explicar as contraturas observadas no nosso modelo.

Em resumo, as contraturas induzidas por H_2O_2 podem ser resultado da depleção de energia e da LPO, que levam a um excesso de cálcio intracelular. Em nossas condições experimentais, observou-se que bloqueadores de canais de cálcio como o verapamil e a nifedipina (BRUNETTO, 1988) reduzem os efeitos provocados pelo H_2O_2 no miocárdio, inclusive a contratura (BELLÓ & BELLÓ, 1989a).

A hipótese da depleção do ATP não foi testada, no entanto, utilizou-se, como medida do estado energético do tecido, a concentração de glicogênio. Observamos que o H_2O_2 promoveu uma

depleção dos estoques de glicogênio cardíaco (ver figura 2). Sabe-se que o glicogênio, substrato para a produção anaeróbia de ATP, é rapidamente depletado durante a isquemia cardíaca (HEARSE & CHAIN, 1972). E, em corações depletados de glicogênio, a contratatura isquêmica se instala mais rapidamente (HEARSE et al., 1977). Portanto, o glicogênio parece ser uma importante fonte energética para o miocárdio durante a privação de oxigênio. Em condições aeróbias, no entanto, os ácidos graxos são a principal fonte de energia do coração, sendo extraídos do suprimento coronariano preferencialmente em relação aos carboidratos. No nosso caso, o coração é mantido funcionando mediante perfusão com líquido nutritivo oxigenado e contendo glicose. Esta glicose pode ser quebrada (glicólise) para produção de energia sob a forma de ATP. Sabe-se que o H_2O_2 pode inibir a glicólise (CORRETTI et al., 1991). Assim, se a via glicolítica fica inibida, o glicogênio pode estar sendo utilizado como fonte de energia, através de glicogenólise.

A outra hipótese a ser testada era se a perfusão com H_2O_2 estava gerando aumento da LPO. Sabe-se que, durante o stress oxidativo, pode haver dano tecidual e há muitos indícios da ocorrência de aumento da LPO nesta situação (POST, 1988). Muitos procedimentos têm sido sugeridos e utilizados para medir LPO. Podemos classificá-los em três grandes grupos, de acordo com os princípios em que se baseiam: métodos que determinam produtos finais da LPO (MDA, alcanos); medida dos produtos secundários da

reação em cadeia (GSSG) e métodos que determinam a emissão luminosa de espécies excitadas (quimioluminescência) formadas nas etapas de terminação (Tabela III). Todos estes métodos tratam de medidas indiretas e nenhum deles reúne todos os critérios necessários, tais como sensibilidade, seletividade e praticabilidade. Não há um procedimento perfeito para se quantificar LPO. Entretanto, Halliwell & Gutteridge (1989) aconselham a usar dois ou mais métodos; se os resultados forem concordantes, considera-se que houve uma resposta positiva. Neste trabalho, foram utilizados três métodos bioquímicos e, além disso, foi estabelecida concordância com um fenômeno fisiológico.

Tabela III - Métodos de detecção de *stress* oxidativo.

MÉTODO	AMOSTRA	SENSIBILIDADE
Detecção de alcanos	ar expirado	10^{-2} - 10^{-4}
Liberção de GSSG	eritrócitos, fígado e bile	10^{-2}
Produção de TBA-RS	homogeneizados de tecidos e fluidos biológicos	10^{-1} - 10^{-2}
QL espontânea	órgãos intactos	10^{-10} - 10^{-12}
QL iniciada por hidroperóxidos	biópsias de tecidos, fluidos biológicos e eritrócitos	10^{-10}

A técnica de determinação de hidrocarbonetos voláteis no ar expirado produzidos durante a LPO, como o etano ou o pentano, carece de especificidade já que informa sobre o organismo total e não sobre o órgão em estudo e, além disso, está sujeita a interferências. Sua utilização em humanos exigiria condições muito controladas, por isso não é um método aplicável a estudos de rotina.

A medida da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) liberada pelos tecidos parece estar restrita a glóbulos vermelhos e fígado ou bile. Neste último caso, se requer cirurgia experimental, com o que se limita a sua aplicabilidade.

A medida colorimétrica de TBA-RS, pela formação de um cromógeno cor de rosa com o ácido tiobarbitúrico, é o método mais comum devido à simplicidade. Contudo, são reconhecidos a falta de especificidade e os artefatos que podem ser gerados durante o processo (SLATER, 1984; CECONI et al., 1992). O método do TBA não é específico, ou seja, várias substâncias formadas durante a LPO podem reagir com o ácido tiobarbitúrico, não só o malondialdeído (MDA) como se acreditava. A autooxidação do ácido linoleico, por exemplo, gera, no mínimo, nove produtos de quebra que reagem com o TBA (GUTTERIDGE et al., 1974). O MDA é um produto de quebra de lipídios hidroperóxidos com três ou mais duplas ligações (Figura XIII).

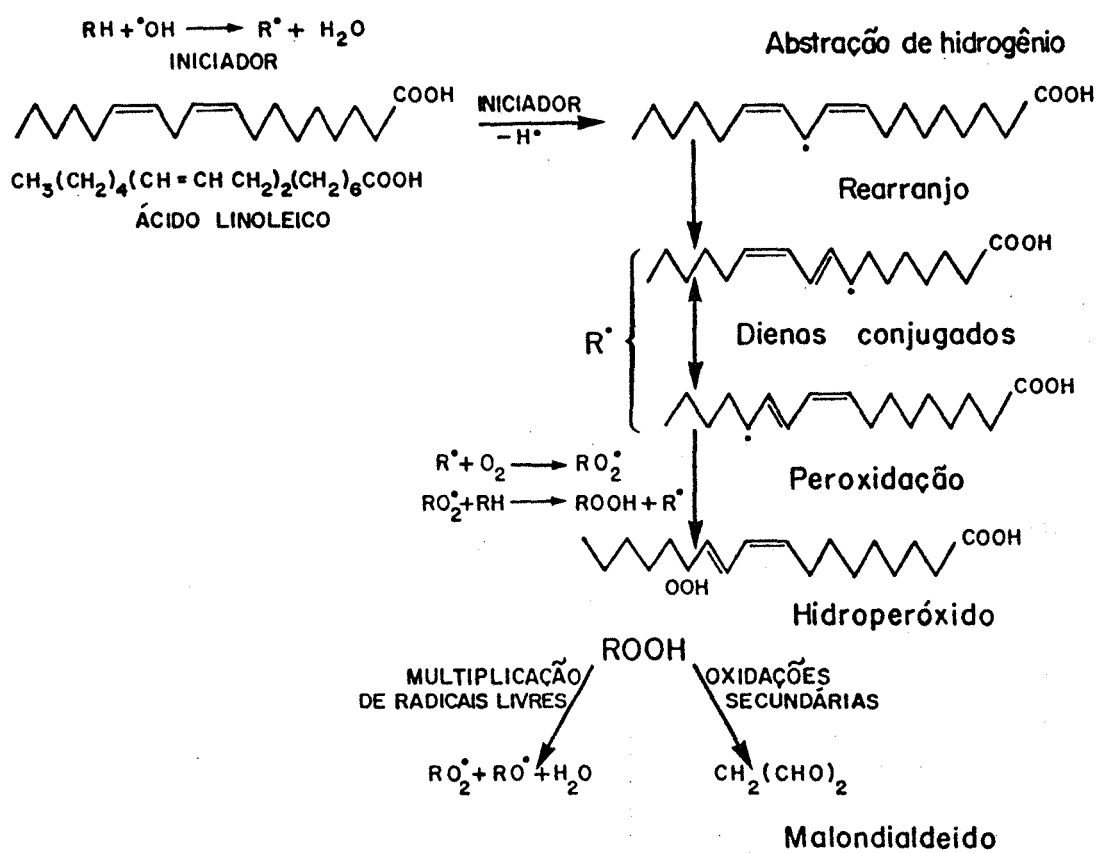


FIGURA XIII - Reações em cadeia da LPO, levando à formação de MDA (ROSENBLUM et al., 1989).

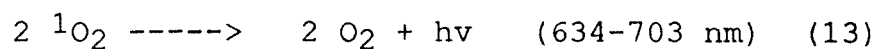
Outras substâncias que reagem com o TBA são conhecidas como "MDA-like", dentre elas estão o ácido siálico, glicoconjugados, açúcares e aldeídos em geral (JANERO, 1990). Portanto, o método colorimétrico leva a uma superestimação da LPO. Por isso, técnicas mais sofisticadas e específicas têm sido desenvolvidas para a quantificação de TBA-RS. Uma delas é o teste do TBA-RS ensaiado por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão). Através deste ensaio, pode-se obter a quantificação direta de MDA livre. O teste do TBA-RS por HPLC tem se mostrado útil para a quantificação da LPO em vários trabalhos recentes (CECONI et al., 1992; CHAKRABARTY et al., 1992; TAVAZZI et al., 1992; CABRÉ et al., 1993; NODA et al., 1993).

Neste trabalho, nós utilizamos o método colorimétrico para a quantificação de TBA-RS que, apesar de não representar precisamente o conteúdo de MDA do tecido, pode ser visto como um índice significativo de LPO em sistemas biológicos e continua a ser muito empregado como tal. Como exemplo disso, podemos citar alguns trabalhos onde distintas situações de stress oxidativo foram detectadas mediante o teste colorimétrico do TBA: tratamento com adriamicina (LLESUY et al., 1985); tratamento crônico com hidralazina (MAGNER-WRÓBEL et al., 1990); exposição de microssomas, lipossomas e DNA à bleomicina e fenantrolina (CECCHINI et al., 1990); exposição de microssomas de fígado de rato a t-BOOH (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991); exposição de microssomas de fígado de rato a azobis-isobutironitrilo, um

radical iniciador de LPO (PALOZZA & KRINSKY, 1991); exposição do coração de rato a cumeno hidroperóxido (LE et al., 1992); isquemia-reperfusão em corações de ratos e humanos (JANSSEN et al., 1993). Nós observamos um incremento significativo na produção de TBA-RS após a perfusão com H₂O₂ (ver figuras 3 e 4).

A LPO é um processo onde se consome oxigênio, na formação dos radicais peroxil. Portanto, a medida do consumo de oxigênio tecidual pode ser utilizada como um índice de LPO. No nosso modelo experimental, observamos que os corações submetidos à perfusão com H₂O₂ consumiam uma quantidade significativamente maior de oxigênio que o controle (ver figura 5). Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Gonzalez-Flecha e colaboradores (1991) que relataram um aumento significativo do consumo de oxigênio em microssomas de fígado de rato tratados com t-BOOH. No nosso caso, foi considerado apenas o consumo de oxigênio basal, já que a adição de t-BOOH nos corações que já haviam sofrido stress pelo H₂O₂ não determinava um aumento significativo na LPO.

As medidas da fotoemissão associada à LPO podem ser realizadas em modelos in vivo e in vitro. A determinação da QL espontânea, de órgãos in situ (BOVERIS et al., 1980; BOVERIS et al., 1981) se baseia na emissão associada à transição ao estado fundamental de espécies excitadas produzidas nas etapas de terminação da LPO (reações 13 e 14).





A QL espontânea é um ensaio órgão-específico e não destrutivo, mas implica na exposição do órgão, o que o torna de difícil aplicação clínica, exceto nos locais que possam ser atingidos pelas aberturas naturais do corpo humano (estômago por via esofágica ou pulmão pela via traqueal). Quando o órgão ou tecido não for acessível diretamente, é necessário realizar cirurgia.

A QL iniciada por t-BOOH é um método sensível que tem sido aplicado para detectar a existência de stress oxidativo associado a situações patológicas experimentais tais como tratamento crônico com etanol em ratos (BOVERIS et al., 1983), tratamento com barbital em camundongos (FRAGA et al., 1984), camundongos portadores de tumores (BOVERIS et al., 1985) e cardiotoxicidade induzida por adriamicina em ratos, camundongos e coelhos (MILEI et al., 1986; LLESUY et al., 1990). A QL iniciada por t-BOOH é facilmente detectada com um contador de cintilação com o circuito de coincidência desconectado ou operando como um luminômetro, dependendo do instrumento. Os contadores têm, usualmente, fototubos sensíveis a emissões na faixa de 380-620 nm. Neste método, a alta concentração de t-BOOH adicionada reage com as hemoproteínas oxidadas do tecido. Um homogeneizado de tecido mostra, normalmente, os citocromos mitocondriais e do retículo endoplasmático em seu estado oxidado. Assim, o t-BOOH

acrescentado em excesso reage com as hemoproteínas oxidadas como, por exemplo, o citocromo c mitocondrial (CADENAS et al., 1980) ou o citocromo P₄₅₀ microsomal (CADENAS & SIES, 1982), dando, por clivagem heterolítica, um radical peroxil (Figura XIV). O t-BOOH pode também reagir com ferro (Fe⁺²), dando um radical alcoxil. A produção de ambos radicais, peroxil ou alcoxil, é capaz de iniciar as reações em cadeia sobre os fosfolipídios insaturados das membranas (RH). As etapas de terminação da LPO levam à produção de espécies excitadas como o oxigênio *singlet* e compostos contendo grupos carbonila em estado excitado (RUSSEL, 1957) (reações 13 e 14). A fotoemissão detectada está relacionada com a desexcitação destes dois compostos. Antioxidantes endógenos (AH, na figura XIV) como a glutathiona, o tocoferol, o retinol, etc., podem atuar como bloqueadores das reações em cadeia da LPO (*chain breakers*). Utilizando este método, observamos um aumento significativo na fotoemissão após a perfusão do coração com H₂O₂ (ver figura 6).

Os resultados do teste do TBA-RS, do consumo de oxigênio e da QL iniciada por t-BOOH indicam haver um aumento significativo da LPO após a perfusão com H₂O₂. Portanto, a perfusão com H₂O₂ constitui-se num importante método de estudo da LPO, semelhante à isquemia-reperfusão.

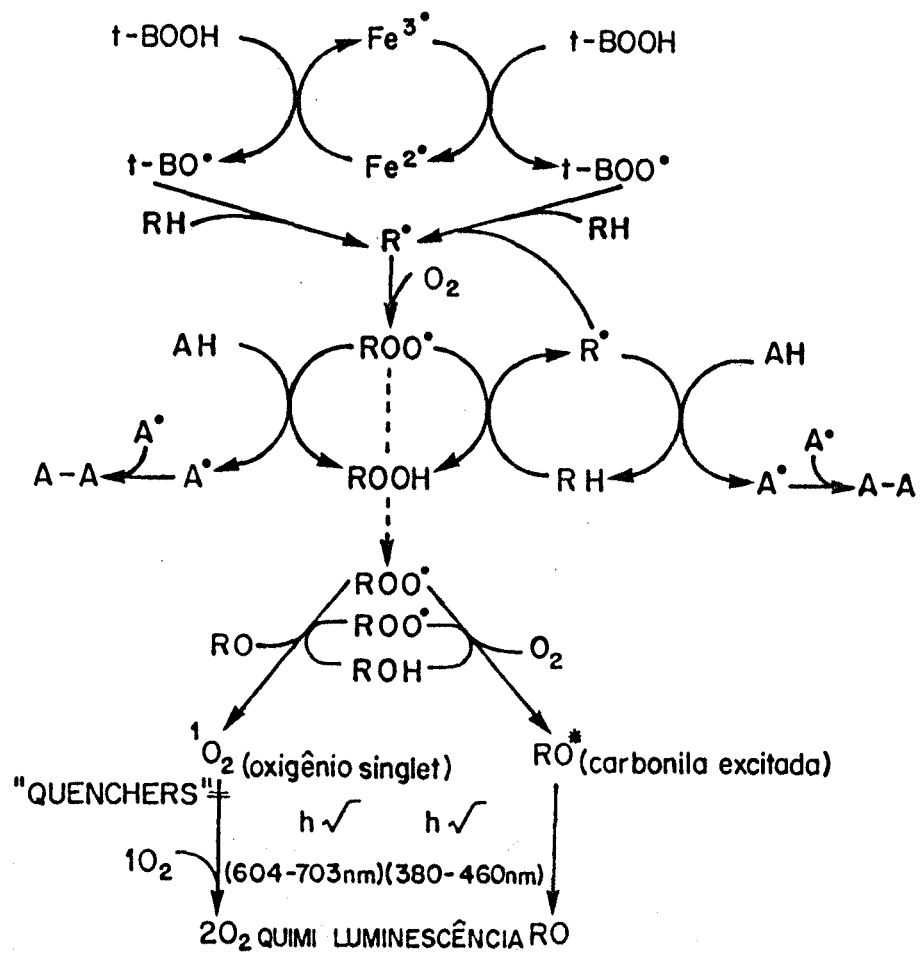


FIGURA XIV - Reações envolvidas na QL iniciada por t-BOOH de homogeneizados de tecido (LLESUY et al., 1990).

Outro importante objetivo deste trabalho foi verificar se o uso de antioxidantes poderia bloquear a LPO e, assim, reduzir as contraturas induzidas pelo H_2O_2 . O termo antioxidante é normalmente aplicado aos inibidores das reações em cadeia da LPO, como a vitamina E. Mas existem definições mais abrangentes que consideram antioxidante qualquer substância que retarda ou diminui significativamente a oxidação de um substrato oxidável (HALLIWELL, 1991). Neste caso, poderia ser incluída a vitamina A, que é considerada "um tipo incomum de antioxidante" (BURTON & INGOLD, 1984). Foram escolhidas as vitaminas A e E por serem consideradas antioxidantes naturais que podem ser obtidos através da dieta. Optou-se por perfundir os corações com as vitaminas ao invés de tratar os animais, na tentativa de se observar efeitos agudos, durante a ocorrência do stress oxidativo. Para podermos realizar a perfusão com vitaminas estas necessitavam ser hidrossolúveis a fim de se misturarem com o Tyrode. Então, foram usados uma vitamina A hidrossolúvel e um análogo hidrossolúvel da vitamina E, o trolox. Há várias referências na literatura da ação do trolox como scavenger e *quencher* de EAO (DAVIES et al., 1988; MASSEY & BURTON, 1990; WU et al., 1990; LE et al., 1992). As concentrações de trolox utilizadas neste trabalho basearam-se nos trabalhos de Massey & Burton (1990) e de Le et al. (1992). A concentração de vitamina A foi baseada no trabalho de Ferreira et al. (1991). Não há relatos de que as concentrações de vitamina utilizadas possam produzir efeitos tóxicos.

Perfundindo-se previamente os corações com vitamina A, observou-se uma redução significativa das contraturas cardíacas induzidas por H_2O_2 (ver figura 7). Tem-se notícia de proteção por vitamina A contra várias situações de stress oxidativo (LLESUY et al., 1985; MILEI et al., 1986; MAGNER-WRÓBEL et al., 1990; FERREIRA et al., 1991). A ação protetora da vitamina A no nosso modelo pode residir no relaxamento muscular e na vasodilatação observados quando se administra esta substância. Esta hipótese será melhor discutida adiante. Outra hipótese pode ser fornecida avaliando o papel da vitamina A sobre o conteúdo de glicogênio cardíaco. A vitamina A parece reduzir o efeito de inibição da glicólise produzido pelo H_2O_2 . Tanto que os corações previamente perfundidos com vitamina A que receberam H_2O_2 apresentaram conteúdos de glicogênio aproximadamente iguais aos dos que só receberam vitamina (ver figura 8). No entanto, os corações perfundidos apenas com vitamina A apresentaram menor quantidade de glicogênio cardíaco que os corações controle. Este fato pode ser explicado em termos do aumento da atividade cardíaca promovido pela vitamina (aumento da frequência que será discutido mais adiante), o que determinaria um gasto maior de glicogênio. Para se evitar esta interferência seria necessário a utilização de estimulação elétrica para a manutenção da frequência (coração paced). Outra hipótese provável para explicar a redução, pela vitamina A, da contratura produzida pelo H_2O_2 seria pela redução da LPO. A vitamina A apresenta ação de *quencher* de oxigênio

singlet (FOOTE & DENNY, 1968). Durante a LPO, há a formação de $^1\text{O}_2$, que acelera o processo. Por neutralizar esta espécie excitada, a vitamina A pode reduzir a LPO. Neste trabalho, observamos que o grupo vitamina A + H_2O_2 apresentou uma redução significativa da formação de TBA-RS no perfusado com relação ao grupo H_2O_2 (ver figura 10). No homogeneizado não se observou redução da formação de TBA-RS (ver figura 9). No entanto, a QL iniciada por t-BOOH se mostrou reduzida (figura 11), assim como o consumo de oxigênio (figura 12). Portanto, a perfusão com vitamina A reduziu a LPO e pode ser este um fator importante para a redução da contratatura cardíaca observada. Este resultado é bastante interessante, em vista do curto tempo de tratamento com a vitamina (apenas 10 minutos) e da alta concentração de H_2O_2 utilizada num tempo duas vezes maior (20 minutos). Apesar disto, observou-se uma proteção evidente contra o stress oxidativo induzido pelo H_2O_2 .

A perfusão prévia dos corações com trolox, nas duas concentrações utilizadas, não reduziu significativamente as contrataturas induzidas pelo H_2O_2 (ver figuras 13 e 14). Há inúmeros trabalhos na literatura que relatam um efeito protetor da vitamina E ou alfa tocoferol contra situações de stress oxidativo (TAPPEL et al., 1960; GUARNIERI et al., 1978; LLESUY et al., 1985; MILEI et al., 1986; MASSEY & BURTON, 1989; DILLARD et al., 1990; MASSEY & BURTON, 1990; SATO et al., 1990; GONZALEZ-FLECHA et al., 1991a; FERREIRA et al., 1991; KLEIJNEN et al.,

1989; SIES & MURPHY, 1991; NOVELLI et al., 1991; PALOZZA & KRINSKY, 1991). Alguns autores relatam que o trolox teria uma ação de scavenger de radicais peroxil oito vezes maior que o alfa-tocoferol (WU et al., 1991). No entanto, Massey & Burton (1990) observaram que o trolox e o fitol, utilizados nas mesmas concentrações que o alfa-tocoferol, não foram tão efetivos quanto este último na proteção contra o stress oxidativo produzido pelo sistema xantina oxidase em cardiomiócitos. O fato de não havermos encontrado proteção utilizando o trolox pode ser devido à estrutura da molécula. O trolox não é a vitamina E toda, é a parte polar (a cabeça) da molécula. Esta porção parece ser a responsável pela atividade antioxidante da molécula e a cauda (ou fitol) tem efeito estabilizador da mesma. O fitol ancora a molécula à membrana plasmática, ficando o trolox voltado para a superfície da membrana (MASSEY & BURTON, 1990). Sem a possibilidade de se intercalar aos lipídios da membrana, o trolox perfundido ficaria apenas "lavando" o tecido. Quanto à concentração de glicogênio, a resposta do trolox foi semelhante à da vitamina A (ver figuras 15 e 16). Assim, o trolox parece também reduzir a inibição da glicólise induzida por H_2O_2 e aumentar o consumo de glicogênio nos corações perfundidos apenas com o trolox pelos mesmos motivos explicados anteriormente. Em termos de LPO, observa-se que o trolox reduziu a formação de TBA-RS no homogeneizado e no perfusado (ver figuras 17, 18, 19 e 20), a QL iniciada por t-BOOH (figura 21) e o consumo de oxigênio

(figura 22) comparativamente ao grupo H_2O_2 . Estes resultados são coerentes com a literatura que descreve uma ação de bloqueador das etapas de propagação da LPO para o trolox. No entanto, apesar da LPO estar reduzida, não se observa redução da contratatura. Este resultado pode significar o envolvimento de algum outro mecanismo, além da LPO, no processo de contratatura. No entanto, o que parece mais provável é que a proteção antioxidante oferecida não foi adequada ao aumento do H_2O_2 ou que o trolox não conseguiu penetrar adequadamente no tecido. A vitamina A reduziu a LPO e reduziu as contraturas. No entanto, a vitamina A, por si só, promoveu relaxamento do músculo cardíaco, o que não se observou com o trolox. A vitamina A, ao interagir com o 1O_2 forma um carotenóide *triplet* que dissipa sua energia de excitação numa etapa posterior, através de interações rotacionais e translacionais com o solvente (KRINSKY, 1989). Essa energia liberada pelo carotenóide *triplet* poderia, de alguma forma, ser utilizada no relaxamento dos miofilamentos.

Além da contratatura cardíaca, que é o efeito mais notável, o H_2O_2 promoveu outras alterações na atividade contrátil. Uma delas foi a redução na força de contração, ou seja, o H_2O_2 provocou um efeito inotrópico negativo sobre o coração isolado (ver figura 23). Este efeito pode ser uma resposta à progressiva perda da função diastólica (contratatura). À medida que o músculo vai contraturando, o comprimento das fibras diminui e, segundo a lei de Frank-Starling (auto-regulação heterométrica da atividade

cardíaca), quanto menor o comprimento das fibras menor a força de contração muscular. Oliveira (1993) observou uma correlação negativa ($r = -0,84$) entre contratura e força de contração. A queda da força de contração pode ser, também, devida à depleção de energia. Se o miocárdio não tem energia suficiente para relaxar (aparecendo a contratura), da mesma forma, não há energia para a contração. O grupo vitamina A + H₂O₂ não apresenta diferença significativa do grupo H₂O₂ em termos de queda percentual de força (ver figura 24). No entanto, a força do grupo vitamina A + H₂O₂ não diferiu da do grupo vitamina A. Ou seja, no grupo previamente perfundido com vitamina A, o H₂O₂ não provocou uma queda significativa da força de contração. Da mesma forma, a contratura cardíaca se mostrou reduzida neste grupo. O trolox na concentração 0,2 mM, reduziu a queda de força induzida pelo H₂O₂ (ver figura 25). Este efeito não foi observado no grupo trolox 2 mM. De fato, se compararmos os grupos trolox 0,2 e 2 mM, observaremos que o último apresenta uma tendência maior à contratura, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Estes dados requerem estudos adicionais para que possam ser melhor esclarecidos.

O H₂O₂ tem, também, um efeito cronotrópico negativo sobre o coração, ou seja, reduz a frequência cardíaca (ver figura 27). Este achado está de acordo com Bianchini e colaboradores (1988). O fato pode ser explicado em termos da inibição, pelo H₂O₂, dos potenciais de ação das células marcapasso. Esta sugestão baseia-

se no trabalho de Pooler & Valenzano (1981), onde se observou um bloqueio dos canais de sódio e potássio por EAO, em axônios gigantes de lagosta. Também foi observado que o H_2O_2 pode reduzir ou abolir, dependendo da concentração utilizada, os potenciais de ação de nervos vagos de cão e de sapo (BELLÓ & BELLÓ, 1989a e 1989b). A inibição da Na^+-K^+ ATPase poderia, da mesma forma, inibir a geração dos potenciais de ação no miocárdio. As vitaminas promoveram um aumento da frequência cardíaca quando comparada aos valores do grupo controle (ver figuras 28, 29 e 30). A queda na frequência após a perfusão com H_2O_2 foi reduzida apenas no grupo trolox 2 mM + H_2O_2 (ver figura 30). O fato pode ser explicado através da neutralização das EAO pelo trolox, reduzindo o bloqueio dos canais iônicos.

O H_2O_2 promoveu uma redução muito evidente do fluxo coronariano, ou seja, esta EAO é um potente vasoconstritor coronariano (ver figura 31). Esta fantástica vasoconstrição observada pode ser devida à ação do H_2O_2 sobre o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Foi sugerido por Freeman & Crapo (1982) que o H_2O_2 , pela reação de Fenton ou Haber-Weiss, poderia formar $\cdot OH$ e, este, inativaria o EDRF. Foi também comprovado que o EDRF pode ser inativado pelo $\cdot O_2^-$ (GRYGLEWSKI et al., 1986). Em 1987, foi sugerido que o EDRF é o óxido nítrico (NO). O NO ativa a guanilato ciclase que, então, forma o cGMP (guanosina monofosfato cíclico). O cGMP promove o relaxamento dos vasos (BAST et al., 1991) (ver figura XV). O $\cdot O_2^-$ é formado no

endotélio dos vasos e regula o tônus da musculatura lisa vascular por sua interação com o NO (LAURINDO et al., 1991). O H_2O_2 está, também, envolvido na síntese de PG, como o tromboxano A_2 , que induz agregação plaquetária e vasoconstrição (PIPER & VANE, 1969).

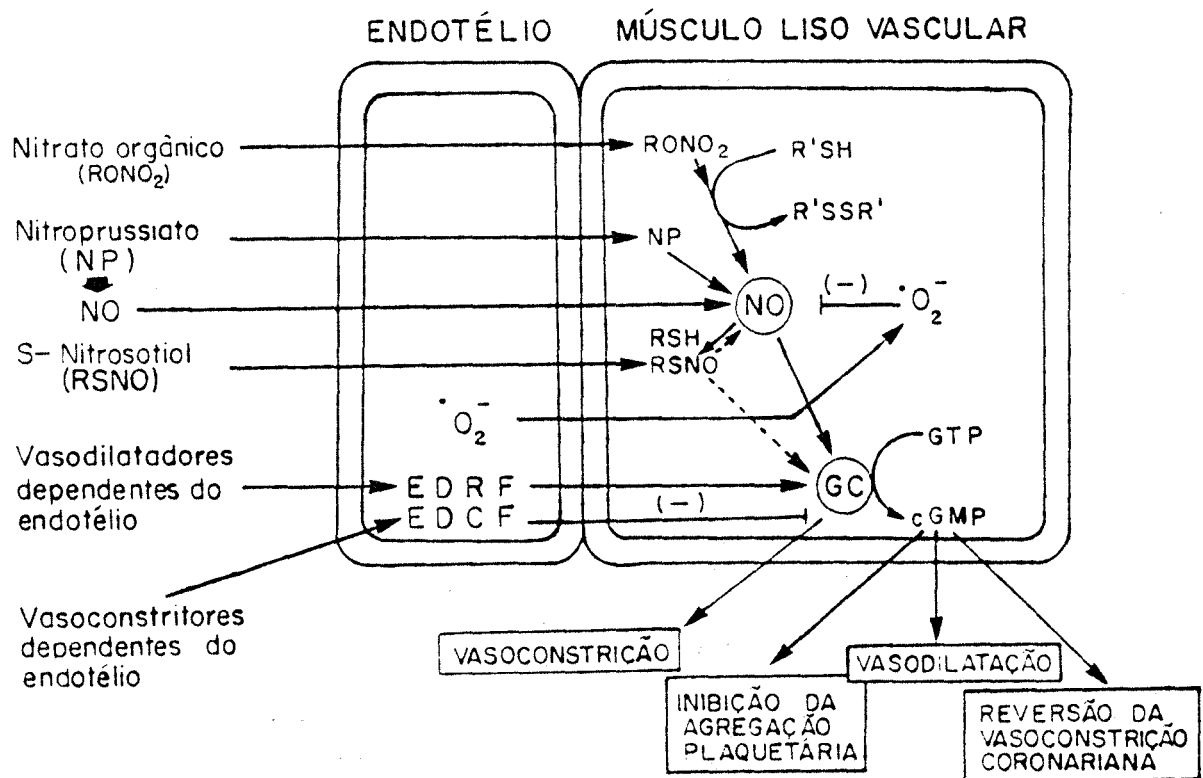


FIGURA XV - Regulação do tônus vascular (adaptado de ABRAMS, 1991).

Estudos mais recentes apontam para a existência de um fator constrictor derivado do endotélio (EDCF) cicloxigenase-dependente. A liberação deste fator reduziria o relaxamento (ver figura XV). Foi sugerido que este fator seria a prostaciclina (PGI₂) (PAGANO et al., 1991).

Observou-se uma alteração na atividade da cicloxigenase em ratos espontaneamente hipertensos, levando a uma maior liberação de EDCF, dificultando o relaxamento dos vasos (IWAMA et al., 1992). Esta alteração na cicloxigenase poderia ser devida a um aumento na LPO, já que esses animais apresentavam menor conteúdo de vitamina E e maior conteúdo de MDA na membrana do músculo cardíaco (JANERO et al., 1989).

Assim, o H₂O₂ administrado ao coração pode estar inativando o EDRF e/ou ativando o EDCF dependente da cicloxigenase, determinando a vasoconstrição observada. Ainda, a concentração de H₂O₂ empregada poderia estar lesando o endotélio e, assim, provocar o efeito observado.

Neste modelo de estudo, a vasoconstrição induzida pelo H₂O₂ pode ser um fator envolvido no fenômeno da contratura. Isto porque a contratura é significativa somente a partir do décimo quinto minuto de perfusão com H₂O₂. No entanto, em experimentos prévios, observou-se o surgimento instantâneo de contratura cardíaca, ao injetar H₂O₂ em bolus em corações isolados e perfundidos de rato (BELLÓ & BELLÓ, 1988). Com este experimento,

fica evidente que a contratatura induzida pelo H_2O_2 não é devida à redução do fluxo coronariano.

No presente trabalho, a vasoconstrição pode estar amplificando o efeito do stress induzido pelo H_2O_2 . As vitaminas aumentaram o fluxo coronariano em relação ao controle. Este fato pode ser devido a alguma ativação enzimática ou à redução das EAO, levando a uma maior liberação do EDRF. No entanto, as vitaminas não conseguiram reduzir a vasoconstrição induzida pelo H_2O_2 . Neste caso, a produção de EAO foi maior do que o aumento das defesas antioxidantes, não podendo ser evitado o stress oxidativo.

Todos estes achados merecem estudos adicionais para que os mecanismos de ação destes fenômenos possam ser elucidados.

O modelo da contratatura cardíaca induzida pelo H_2O_2 confirma as hipóteses que sugerem a participação das EAO nos danos observados no miocárdio isquêmico e reperfundido. Este modelo tem se mostrado útil para o estudo das alterações fisiológicas e bioquímicas decorrentes do stress oxidativo no coração. Neste trabalho, foram implantadas, em nosso laboratório, técnicas de medida do stress oxidativo através da LPO que podem ser utilizadas em diversas situações experimentais. Os resultados positivos do uso da terapia antioxidante no miocárdio podem servir de base para investigações futuras, podendo, esta, ser

aplicada como proteção em distintas situações de stress oxidativo.

5 CONCLUSÕES

5.1 A perfusão com H_2O_2 (256 mM) à pressão constante provoca contratura no coração isolado de rato.

O H_2O_2 promove uma redução significativa do conteúdo de glicogênio.

O H_2O_2 aumenta significativamente a LPO, como foi demonstrado pelo aumento da produção de TBA-RS, pelo aumento do consumo de oxigênio e pelo aumento da QL iniciada por t-BOOH.

Este modelo de estudo produz efeitos semelhantes à isquemia-reperfusão e pode ser utilizado como um método de pesquisa para a compreensão dos processos envolvidos neste fenômeno.

5.2 A perfusão prévia do coração com vitamina A (50 U.I./ml), por 10 minutos, reduz a contratura provocada pelo H_2O_2 .

A vitamina A impede a redução no conteúdo de glicogênio.

A vitamina A reduz a LPO induzida pelo H_2O_2 , o que foi demonstrado pelo teste do TBA-RS, pelo consumo de oxigênio e pela QL iniciada por t-BOOH.

5.3 A perfusão prévia do coração com trolox (0,2 ou 2 mM) não reduz significativamente a contratura provocada pelo H_2O_2 .

O trolox impede a redução no conteúdo de glicogênio.

O trolox reduz a LPO induzida pelo H_2O_2 , como foi demonstrado pelo teste do TBA-RS, pelo consumo de oxigênio e pela QL iniciada por t-BOOH.

5.4 A perfusão com H_2O_2 promove um efeito inotrópico negativo no coração isolado.

O trolox 2 mM não impede a queda de força promovida pelo H_2O_2 .

A vitamina A e o trolox 0,2 mM protegem o miocárdio contra o inotropismo negativo induzido pelo H_2O_2 .

5.5 A perfusão com H_2O_2 provoca um efeito cronotrópico negativo no coração isolado.

O trolox 2 M reduz o efeito cronotrópico negativo induzido pelo H_2O_2 .

5.6 A perfusão com H_2O_2 promoveu vasoconstrição coronariana evidente.

A vitamina A ou o trolox aumentam o fluxo coronariano em relação ao grupo controle, ou seja, estas vitaminas provocam vasodilatação. Este resultado é muito interessante e abre novas perspectivas de investigação.

A perfusão com vitamina A ou trolox, nas concentrações empregadas, não impede a vasoconstrição induzida pelo H_2O_2 .

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001.ABRAMS, J. Interactions between organic nitrates and thiol groups. *Am. J. Med.* 91(3C): 106S-112S, 1991.
- 002.ARUOMA, O.I.; EVANS, P.J.; KAUR, H.; SUTCLIFFE, L. & HALLIWELL, B. An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of Trolox C, vitamin E and probucol. *Free Rad. Res. Comms.* 10 (3): 143-157, 1990.
- 003.BABIOR, B.M. The enzymatic basis for \dot{O}_2^- production by human neutrophils. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1353-1358, 1982.
- 004.BAROLDI, G.; MILAM, J.D.; WUKASCH, D.C.; SANDIFORD, F.M.; ROMAGNOLI, A. & COOLEY, D.A. Myocardial cell damage in "stone hearts". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 6: 395-399, 1974.
- 005.BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M. & DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.* 91 (3C): 2-13, 1991.
- 006.BELLÓ, A.A & BELLÓ, A.R. Estudo comparativo dos efeitos do peróxido de hidrogênio sobre nervos isolados. In: ENCONTRO ANUAL DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 18, 1989, Porto Alegre. Anais do XVIII Encontro Anual de Ciências Fisiológicas, Sociedade de Fisiologia do Rio Grande do Sul, 1989, p. 40.
- 007.BELLÓ, A.A. & BELLÓ, A.R. Efeito do peróxido de hidrogênio sobre o nervo vago isolado de cão. In: ENCONTRO ANUAL DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 18, 1989, Porto Alegre. Anais do XVIII Encontro Anual de Ciências Fisiológicas, Sociedade de Fisiologia do Rio Grande do Sul, 1989, p. 41.

008. BELLÓ, A.R. & BELLÓ, A.A. Cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Med. Sci. Res.* 16: 1149-1150, 1988 .
009. BELLÓ, A.R. & BELLÓ, A.A. Effect of nifedipine on cardiac contractures induced by hydrogen peroxide. *Med. Sci. Res.* 17: 237-238, 1989a.
010. BELLÓ, A.R. & BELLÓ, A.A. Indomethacin antagonizes cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Med. Sci. Res.* 17: 627-628, 1989b.
011. BERT, P. in: *Barometric Pressure Researches in Experimental Pathology*. Traduzido por Hitchcock, F.A. College Book Co. Columbus. Ohio, 1878.
012. BIANCHINI, A. & BELLÓ, A.A. Hydrogen peroxide effects on the contractile force and coronary flow of the rat isolated heart. *Med. Sci. Res.* 16: 1265-1266, 1988.
013. BIERI, J.G. & TOLLIVER, T.J. Altered metabolism of alpha-tocopherol by low dietary levels of retinoic acid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 393: 387-388, 1982.
014. BISBY, R.H. Interactions of vitamin E with free radicals and membranes. *Free Rad. Res. Comms.* 8: 4-6, 1990.
015. BLOEM, M.W.; WEDEL, M.; VAN AGTMAAL, E.J.; SPEEK, A.J.; SAOWAKONTHA, S. & SCHREURS, W.H.P. Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 76-79, 1990.
016. BLOCKHA, V.V.; KAGAN, V.Y.; SITKOVSKI, M.V.; DANILOV, V.S.; KOLS, O.R. & KOSLOV, Y.P. Peroxidation of lipids and conduction of excitation in frog muscles. *Biofisika* 17 (3): 549-551, 1972.
017. BOVERIS, A. & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134: 707-716, 1973.
018. BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; FILIPOWSKY, M.; NAKASE, Y. & CHANCE, B. Organ chemiluminescence: non-invasive assay for oxidative radical reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 347-351, 1980.

019. BOVERIS, A.; CADENAS, E. & CHANCE, B. Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Fed. Proc.* 40: 23-26, 1981.
020. BOVERIS, A. & CADENAS, E. en: Superóxido dismutase. (Oberley, L.W. ed.) CRC Boca Ratón Vol. II: 15-30, 1982.
021. BOVERIS, A.; FRAGA, C.; VARSAVSKY, A. & KOCH, O. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 534-541, 1983.
022. BOVERIS, A.; LLESUY, S.F. & FRAGA, C.G. Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *Free Rad. Biol. Med.* 1: 131-138, 1985.
023. BRAUNWALD, D.E. Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *New Engl. J. Med.* 307: 1618-1627, 1982.
024. BRUNETTO, A.F. Participação do cálcio nos efeitos do peróxido de hidrogênio sobre o coração isolado de rato. Porto Alegre: UFRGS, 1988. 132 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1988.
025. BUEGE, J.A. & AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52: 302-309, 1978.
026. BURTON, G.W. & INGOLD, K.U. Beta-Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569-573, 1984.
027. BURTON, G.W. & INGOLD, K.U. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 7: 7-21, 1989.
028. CADENAS, E.; BOVERIS, A. & CHANCE, B. Low-level chemiluminescence of hydroperoxide-supplemented cytochrome c. *Biochem. J.* 187: 131-140, 1980.
029. CADENAS, E. & SIES, H. Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. *Eur. J. Biochem.* 124: 349-356, 1982.
030. CABRÉ, M.; JOVEN, J. & CAMPS, J. Specificity of the thiobarbituric acid determination in CCl₄ - induced hepatic injury in rats. *Med. Sci. Res.* 21: 55-57, 1993.

031. CAVAROCCHI, N.C.; ENGLAND, M.D.; Ó BRIEN, J.F.; SOLIS, E.; RUSSO, P.; SCHAFF, H.V.; ORSZULAK, T.A.; PLUTH, J.R. & KAYE, M.P. Superoxide generation during cardiopulmonary bypass: is there a role for vitamin E? *J. Surg. Res.* 40: 519-527, 1986.
032. CECCHINI, R.; ARUOMA, O.I. & HALLIWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes, liposomes or from DNA damaged by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Rad. Res. Comms.* 10 (4-5): 245-258, 1990.
033. CECONI, C.; CARGNONI, A.; PASINI, E.; CONDORELLI, E.; CURELLO, S. & FERRARI, R. Lipid peroxidation during myocardial reperfusion. *Mol. Cel. Biochem.* 111: 49-54, 1992.
034. CHAKRABARTY, S.; NANDI, A.; MUKHOPADHYAY, C.K. & CHATTERJEE, I.B. Protective role of ascorbic acid against lipid peroxidation and myocardial injury. *Mol. Cel. Biochem.* 111: 41-47, 1992.
035. CHAMBERS, D.E.; PARKS, D.A.; PATTERSON, J.; ROY, R.; MC CORD, J.M.; YOSHIDA, S.; PARMLEY, L.F. & DOWNEY, J.M. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardium ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17: 145-152, 1985.
036. CHANCE, B.; SIES, H. & BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59 (3): 527-605, 1979.
037. CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. & Med.* 11: 215-232, 1991.
038. COOLEY, D.A.; REUL, G.J. & WUKASCH, D.C. Ischemic contracture of the heart: "stone heart". *Am. J. Cardiol.* 29: 575-577, 1972.
039. CORRETTI, M.; KORETSUNE, Y.; KUSUOKA, H.; ZWEIER, J.L. & MARBAN, E. Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences of exogenously generated free radicals in rabbit hearts. *J. Clin. Invest.* 88: 1014-1025, 1991.
040. DAVIES, M.J.; FORNI, L.G. & WILSON, R.L. Vitamin E analogue trolox C. E.S.R. and pulse-radiolysis studies of free radicals reactions. *Biochem. J.* 255: 513-522, 1988.

- 041.DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 492: 153-168, 1980.
- 042.DI MASCIO, P.; MURPHY, M.E. & SIES, H. Antioxidant defense systems: the rolle of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 194S-200S, 1991.
- 043.DILLARD, C.J.; LITOR, R.E.; SAVIN, W.M.; DUMELIN, E.E. & TAPPEL, A.L. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* 45: 927-932, 1978.
- 044.DIPLOCK, A.T. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 189S-193S, 1991.
- 045.DORMANDY, T.L. Biological rancidification. *Lancet* 2: 684-688, 1969.
- 046.DREVON, C.A. Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Rad. Res. Comms.* 14(4): 229-246, 1991.
- 047.DU TOIT, E.F. & OPIE, L.H. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ. Res.* 70: 960-967, 1992.
- 048.ESTABROOK, R.W. *Methods. Enzymol.* 10: 41-47, 1967.
- 049.ESTERBAEUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H.; OBERREITHER, S.; ROTHENEDER, M.; EL-SAADANI, M. & JURGENS, G. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* : 254-267, 1989.
- 050.FENTON, H.J. *J. Chem. Soc.* 65: 899, 1894.
- 051.FERREIRA, R.; LLESUY, S.; MILEI, J.; SCORDO, D.; HOURQUEBIE, H.; MOLTENI, L.; DE PALMA, C. & BOVERIS, A. Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. *Am. Heart J.* 115 (2): 307-312, 1988.
- 052.FERREIRA, R.; MILEI, J.; LLESUY, S.; GONZALEZ FLECHA, B.; HOURQUEBIE, H.; MOLTENI, L.; DE PALMA, C.; PAGANINI, A.; SCERVINO, L. & BOVERIS, A. Antioxidant action of vitamins A and E in patients submitted to coronary artery bypass surgery. *Vasc. Surg.*: 191-195, 1991.

053. FISHER, A.B. Intracellular production of oxygen - derived free radicals. Proceedings of a Brook Lodge Symposium, Augusta, Apr. 27-29, pp. 99 -104, 1988.
054. FOOTE, C.S. & DENNY, R.W. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 6233-6235, 1968.
055. FRAGA, C.; LLESUY, S.F. & BOVERIS, A. Increased carbon tetrachloride-stimulated chemiluminescence in the in situ liver of barbital treated mice. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 34: 143-150, 1984.
056. FREEMAN, B.A. & CRAPO, J.D. *Lab. Invest.* 47: 412-426, 1982.
057. FRIDOVICH, I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. in: *Free radicals in Biology* (Pryor, W.A. ed.) pp. 239-277, Academic Press, New York, 1976.
058. GALARIS, D.; EDDY, L.; ARDUINI, A.; CADENAS, E. & HOCHSTEIN, P. Mechanisms of reoxygenation injury in myocardial infarction: implications of a myoglobin redox cycle. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 160 (3): 1162-1168, 1989.
059. GALARIS, D.; SEVANI, A.; CADENAS, E. & HOCHSTEIN, P. Ferrylmyoglobin-catalyzed linoleic acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 281(1): 163-169, 1990.
060. GANOTE, C.E. & NAYLER, W.G. Contracture and the calcium paradox. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17: 733-745, 1985.
061. GERRARD, J.M.; PETERSON, D.; TOWNSEND, D. & WHITE, J.G. Prostaglandins and platelet contraction. *Circulation* 54 (suppl. II): 196, 1976.
062. GERSCHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE, S.W.; DWYER, P. & FENN, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626, 1954.
063. GONZALEZ-FLECHA, B.; REPETTO, M.; EVELSON, P. & BOVERIS, A. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by alpha-tocopherol and alpha-tocopherol acetate. *Xenobiotica* 21(8): 1013-1022, 1991.
064. GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S. & BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* 10: 93-100, 1991.

- 065.GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-456, 1986.
- 066.GUARNIERI, C.; FERRARI, R.; VISIOLI, O.; CALDARERA, C.M. & NAYLER, W.G. Effect of alpha-tocopherol on hypoxic perfused and reoxygenated rabbit heart muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 893-906, 1978.
- 067.GUTTERIDGE, J.M.C.; STOCKS, T.L. & DORMANDY, T.L. Thiobarbituric acid reacting substances derived from autooxidizing linoleic and linolenic acids. *Anal Acta* 70(1): 107-111, 1974.
- 068.HABER, F. & WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc.Roy.Soc., Ser.A* 147: 332, 1934.
- 069.HÄGGENDAL, J. et.al. Catecholamine-induced free radicals in myocardial cell necrosis on experimental stress in pigs. *Acta Physiol.Scand.* 131: 447-452, 1987.
- 070.HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.C. Free radicals in Biology and Medicine. 2th edition. Clarendon Press. Oxford, 1989
- 071.HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91(3C): 14-22, 1991.
- 072.HEARSE, D.J.; GARLICK, P.B. & HUMPHREY, S.M. Ischemic contracture of the miocardium: mechanism and prevention. *Am. J. Cardiol.* 39: 986-993, 1977.
- 073.HEARSE, D.J. & CHAIN, E.B. The role of glucose in the survival and "recovery" of the anoxic isolated perfused rat heart. *Biochem. J.*128: 1125-1133, 1972.
- 074.HEARSE, D.J; HUMPHREY, S.M. & BULLOCK, G.R. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 641-668, 1978.
- 075.HUANG, W.H.; WANG, Y. & ASKARI, A. (Na⁺ + K⁺) - ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals. *Int. J. Biochem.* 24 (4): 621-626, 1992.

076. ITO, Y.; OCHIAI, J.; SASAKI, R.; SUZUKI, S.; KUSUHARA, Y.; MORIMITSU, Y.; OTANI, M. & AOKI, K. Serum concentrations of carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in healthy persons determined by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* 194: 131-144, 1990.
077. IWAMA, Y.; KATO, T.; MURAMATSU, M.; ASANO, H.; SHIMIZU, K.; TOKI, Y.; MIYASAKI, Y.; OKUMURA, K.; HASHIMOTO, H.; ITO, T. & SATAKE, T. Correlation with blood pressure of the acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 19: 326-332, 1992.
078. JANERO, D.R. & BURGHARDT, B. Cardiac membrane vitamin E and malondialdehyde levels in heart muscle of normotensive and spontaneously-hypertensive rats. *Lipids* 24: 33-38, 1989.
079. JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 515-540, 1990.
080. JANSSEN, M.; KOSTER, J.F.; BOS, E. & DE JONG, J.W. Malondialdehyde and glutathione production in isolated perfused human and rat hearts. *Circ. Res.* 73: 681-688, 1993.
081. JOLLY, S.R.; KANE, W.J.; BAILIE, M.B.; ABRANS, G.D. & LUCCHESI, B.R. Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ. Res.* 54: 277-285, 1984.
082. JONES, D.P. in: *Oxidative Stress*, Academic Press. San Diego. P. 151-189, 1985.
083. KAGAN, V.E. Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* : 121-135, 1989.
084. KAISER, S.; DI MASCIO, P.; MURPHY, M. & SIES, H. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys.* 277(1): 101-108, 1990.
085. KANEKO, M.; BEAMISH, R.E. & DHALLA, N. Depression of heart sarcolemmal Ca^{+2} - pump activity by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* 256: H368-H374, 1989.

- 086.KANNER, J. & HAREL,S. Iniciation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 237(2): 314-321, 1985.
- 087.KARMAZYN, M.; LEUNG, C.K.H. & DHALLA, N.S. Prostaglandin actions and interactions on isolated perfused rat hearts. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 1275-1282, 1979.
- 088.KATZ, A.M. & TADA, M. The "stone heart": a challenge to the biochemist. *Am. J. Cardiol.* 29: 578-580, 1972.
- 089.KELLOGG, E.W. & FRIDOVICH, I. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250(22): 8812-8817, 1985.
- 090.KLEIJNEN, J.; KNIPSCHILD, P. & TER RIET, G. Vitamin E and cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 37: 541-544, 1989.
- 091.KORETSUNE, Y. & MARBAN, E. Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of $[Ca^{2+}]_i$ elevation and ATP depletion. *Am. J. Physiol.* 258: H9-H16, 1989.
- 092.KORNBRUST, D.J. & MAVIS, R.D. Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: correlation with vitamin E content. *Lipids* 15(5): 315-321, 1986.
- 093.KORTHUIS, R.J. & GRANGER, D.N. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Am. Physiol. Soc.:* 217-249, 1986.
- 094.KOSOWER, N.S. & KOSOWER, E.M. *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-125, 1976.
- 095.KRINSKY, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. & Med.* 7: 617-635, 1989.
- 096.KÜBLER, W. & KATZ, A.M. Mechanism of early "pump" failure of the ischemic heart: possible role of adenosine triphosphate depletion and inorganic phosphate accumulation. *Am. J. Cardiol.* 40: 467-471, 1977.
- 097.LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebenden saugtierherzen. *Plfüegers Arch. ges Physiol.* 61: 291-332, 1895.

- 098.LASTER, S.B.; BECKER, L.C., AMBROSIO, G. & JACOBUS, W.E.
Reduced aerobic metabolic efficiency in the globally
stunned myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21: 419-426,
1989.
- 099.LAURINDO, F.R.M.; LUZ, P.L.; UINT, L.; ROCHA, T.; JAEGER,
R.G. & LOPES, E.A. Evidence for superoxide radical-
dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact
dogs. *Circulation* 83: 1705-1715, 1991.
- 100.LAVOISIER, A.L. *Memories de Médecine et de Physique Médicale.*
Vol.5 Paris, Soc.Roy. de Medicine, p. 569, 1783.
- 101.LE, C.T.; HOLLAAR, L.; VAN DER VALK, E.J.M. & VAN DER LARRSE,
A. Effects of glucose, Trolox C, and glutathione
disulphide on lipid peroxidation and cell death induced by
oxidant stress in rat heart. *Cardiovasc. Res.* 26: 133-142,
1992.
- 102.LEE, J.A. & ALLEN, D.G. Changes in intracellular free calcium
concentration during long exposures to stimulated ischemia
in isolated mammalian ventricular muscle. *Circ. Res.* 71
(1): 58-69, 1992.
- 103.LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A. & MILEI, S.
Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage
induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*
71: 241-249, 1985.
- 104.LLESUY, S.; MILEI, J.; GONZALEZ FLECHA, B.S. & BOVERIS, A.
Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-
initiated chemiluminescence and morphology. *Free Rad. Biol.*
& *Med.* 8: 259-264, 1990.
- 105.LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, M.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J.
Protein measurement with the foline reagent. *J. Biol. Chem.*
193: 265, 1951.
- 106.LUCY, J.A. Functional and structural aspects of biological
membranes: a suggested structural role for vitamin E in
the control of membrane permeability and stability. *Ann. N.*
Y. Acad. Sci. 203: 4-11, 1972.
- 107.MACHLIN, L.J. & BENDICH, A. Free radical tissue damage:
protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1: 441-
445, 1987.

- 108.MAGNER-WRÓBEL, K.; JENDRYCZKO, A. & DRÓZDZ, M. Myocardial lipid peroxidation in rats treated chronically with hydralazine and its amelioration by vitamin A. *Cor Vasa* 32(5): 414-420, 1990.
- 109.MARKLUND, S.L. Role of toxic effects of oxygen in reperfusion damage. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20 (2): 23-30, 1988.
- 110.MASSEY, K.D. & BURTON, K.P. Alpha-tocopherol attenuates myocardial membrane-related alterations resulting from ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* 256 (4Pt2): H1192-1199, 1989.
- 111.MASSEY, K.D. & BURTON, K.P. Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: effects of alpha-tocopherol, Trolox, and phytol. *Free Rad. Biol. & Med.* 8: 449-458, 1989.
- 112.MAZZELLA, H. Fisiologia cardiovascular. seg. edicion, p.41, Oficina del Libro, 1968.
- 113.MAZZELLA, H.; FIANDRA, C.; PELUFFO, C. & SPERA, E. Oxygen availability of the human myocardium recorded by chronically implanted electrodes. *Arq. Bras. Card.* 24: 33-34, 1971.
- 114.MAZZELLA, H.; CASTRO, J.A.; BERTRAND, I.R.O. & BELLÓ, A.A. Acción del peróxido de hidrógeno sobre el inotropismo cardíaco. *Sistole (Uruguay)* 30: 29-35, 1980.
- 115.MC CAY, P.B. Evidence that alpha-tocopherol functions cyclically to quench free radicals in hepatic microsomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570: 32-45, 1989.
- 116.MC CORD, J.M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055, 1969.
- 117.MC CORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic injury. *New Engl. J. Med.* 312 (3): 159-163, 1985.
- 118.MEERSON, F.Z.; KAGAN, V.E.; KOZLOV, Y.P.; BELKINA, L.M. & ARKIPENKO, Y.V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res. Cardiol.* 77: 465-485, 1982.

- 119.MENEZHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 5(6): 57-62,, 1987.
- 120.MILEI, J.; BOVERIS, A.; LLESUY, S.; MOLINA, H., STORINO, R.; ORTEGA, D. & MILEI, S. Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am. Heart J.* 111 (1): 95-102, 1986.
- 121.MILLS, G.C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229: 189-197, 1957.
- 122.MILLS, G.C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 86: 1-5, 1960.
- 123.MOBARHAN, S.; HUPERT, J. & FRIEDMAN, H. Effects of aging on beta-carotene and vitamin A status. *Symposium Aging and Nutrition*, 5 Oct., N.Y., p. 13-16, 1990.
- 124.MYERS, C.L.; WEISS, S.J.; KIRSH, M.M. & SHLAFER, M. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the "oxygen paradox": reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not superoxide dismutase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17: 675-684, 1985.
- 125.NEUBAUER, S. & INGWALL, J. Verapamil attenuates ATP depletion during hypoxia: ³¹P NMR studies of the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21: 1163-1178, 1989.
- 126.NODA, Y.; OGURA, M.; WATANABE, S. & MORI, A. Inhibitory effect of taurocholic acid on lipid peroxidation. *Med. Sci. Res.* 21: 61-62, 1993.
- 127.NOVELLI, G.P.; BRACCIOTTI, G. & FALSINI, S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue im mice. *Free Rad. Biol. & Med.* 8(1): 9-13, 1990.
- 128.OLIVEIRA, A.R. Efeitos do estresse oxidativo em corações isolados de ratos sedentários e treinados. Porto Alegre: UFRGS, 1993. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993.

129. PAGANO, P.J.; LIN, L.; SESSA, W.C. & NASJLETTI, A. Arachidonic acid elicits endothelium-dependent release from the rabbit aorta of a constrictor prostanoid resembling prostaglandin endoperoxides. *Circ. Res.* 69: 396-405, 1991.
130. PALOZZA, P. & KRINSKY, N.I. The inhibition of radical-initiated peroxidation of microsomal lipids by both -tocopherol and -carotene. *Free Rad. Biol. & Med.* 11(4): 407-414, 1991.
131. PANGANAMALA, R.V.; SHARMA, H.M.; SPRECHER, H.; GEER, J.C. & CORNWELL, D.G. A suggested role for hydrogen peroxide in the biosynthesis of prostaglandins. *Prostaglandins* 8(1): 3-11, 1974.
132. PAWSON, B.A. A historical introduction to the chemistry of vitamin A and its analogs (retinoids). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 359: 1-9, 1981.
133. PIPER, P.J. & VANE, J.R. Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature* 223: 29-35, 1969.
134. POOLER, J.P. & VALENZANO, D.P. Dye-sensitized photodynamic inactivation of cells. *Med. Phys.* 6: 614-618, 1981 .
135. POST, J.A.; RUIGROK, T.J.C. & VERKLEIJ, A.J. Phospholipid reorganization and bilayer destabilization during myocardial ischemia and reperfusion: a hypothesis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20(2): 107-111, 1988.
136. PRIESTLEY, J. in: The discovery of oxygen, Part 1. Alembic Club Reprints, n 7, London, Simpkin, Marshall, Hamilton and Kent, 1984.
137. PRYOR, W.A. Free radicals in Biology (Pryor, W.A. ed.) Academic Press. New York. Vol. I, 1976.
138. PUPPO, A.; CECCHINI, R.; ARUOMA, O.I.; BOLLI, R. & HALLIWELL, B. Scavenging of hypochlorous acid and of myoglobin-derived oxidants by the cardioprotective agent mercaptopropionylglycine. *Free Rad. Res. Commms.* 10 (6): 371-381, 1990.
139. RICHTER, C. & FREI, B. Ca^{+2} release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Rad. Biol. & Med.* 4: 365-375, 1988.

140. ROSENBLUM, E.R.; GAVALER, J.S. & VAN THIEL, D.H. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 569-577, 1989.
141. RUSSEL, G.A. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3871-3880, 1957.
142. SATO, K.; NIKI, E. & SHIMASAKI, H. Free radical - mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and C. *Arch. Biochem. Biophys.* 279 (2): 402-405, 1990.
143. SCHRAUFSTATTER, I.; HYSLOP, P.A.; HINSHAW, D.B.; SPAGG, R.G.; SKLAR, L.A. & COCHRANE, C.G. Hydrogen peroxide induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 4908-4912, 1986.
144. SCOTT, M.L. Advances in our understanding of vitamin E. *Fed. Proc.* 39(10): 2736-2739, 1980.
145. SHLAFER, M.; KANE, P.F. & WIGGINS, V.Y. Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. *Circulation* 66(1): 85-92, 1982.
146. SIES, H. & MURPHY, M.E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 8: 211-224, 1991.
147. SIMPSON, P.J.; FANTONE, J.C. & LUCCHESI, B.R. Myocardial ischemia and reperfusion injury: oxygen radicals and the role of the neutrophil. *Proceedings of a Book Lodge Symposium, Augusta, Apr. 27-29, pp.63-77, 1987.*
148. SINGAL, P.K.; KAPUR, N.; DHILLON, K.S.; BEAMISH, R.E. & DHALLA, N.S. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1390-1397, 1982.
149. SLATER, T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 105: 283-293, 1984.
150. SOUTHORN, P.A. & POWIS, G. Free radicals in Medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin. Proc.* 63: 381-389, 1988.

151. TAPPEL, A.L.; ZALKIN, H. & KNAPP, F.W. Function of vitamin E in mitochondria and microsomes. *Fed. Proc.* 19 (I): 419, 1960.
152. TAVAZZI, B.; LAZZARINO, G.; DI PIERRO, D. & GIARDINA, B. Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the reperfusion of the isolated postischemic rat heart. *Free Rad. Biol. & Med.* 13: 75-78, 1992.
153. THOMAS, C.E. & REED, D.J. Radical-induced inactivation of kidney Na^+, K^+ - ATPase: sensitivity to membrane lipid peroxidation and the protective effect of vitamin E. *Arch. Biochem. Biophys.* 281(1): 96-105, 1990.
154. VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small soft tissue. *Anal. Biochem.* 11: 256-265, 1965.
155. VATASSERY, G.T.; BRIN, M.F.; FAHN, S.; KAYDEN, H.J. & TRABER, M.G. Effect of high doses of dietary vitamin E on the concentrations of vitamin E in several brain regions, plasma, liver, and adipose tissue of rats. *J. Neurochem.* 51: 621-623, 1988.
156. WERNS, S.W. & LUCCHESI, B.R. Free radicals and ischemic tissue injury. *TIPS* 11: 161-166, 1990.
157. WILSON, R. in: Oxidative stress. (Sies, H., ed.) Academic Press. San Diego. p. 41-71, 1985.
158. WOODWARD, B. & ZAKARIA, M.N. Effect of some free radical scavengers on reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17: 485-493, 1985.
159. WU, T.W.; HASHIMOTO, N.; AU, J.X.; WU, J.; MICKLE, D.A.G. & CAREY, D. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* 13: 575-580, 1991.
160. WUKASCH, D.C.; REUL, G.J.; MILAM, J.D.; HALLMAN, G.L. & COOLEY, D.A. The "stone heart" syndrome. *Surgery* 72(6): 1071-1080, 1972.
161. ZAFIRIOU, O.C. Is sea water a radical solution? *Nature* 325(5): 481-482, 1987.