

# Artículos originales

## Aumento de la protección miocárdica y reducción de las arritmias de reperfusión en cirugía cardíaca por el uso de agentes antioxidantes

RICARDO FERREIRA\*, MARIO BURGOS\*\*, SUSANA LLESUY\*\*\*, LUIS MOLTENI\*,  
BEATRIZ GONZALEZ FLECHA\*\*\*, JOSE MILEI\*\*\*\*, CARLOS DE PALMA\*,  
HECTOR HOURQUEBIE\*, ALBERTO BOVERIS\*\*\*

\* Departamento de Cirugía Cardiovascular, ECAVI, Buenos Aires. \*\* Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UNC, CONICEP, Mendoza. \*\*\* Facultad de Físicoquímica, UBA. \*\*\*\* Hospital Fernández, Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 9/88. Aceptado: 10/88

Dirección para separatas: Arenales 2463, 3° "A", Buenos Aires, Argentina

*Se estudia la participación de los radicales libres del oxígeno (RL) en el mecanismo isquemia/reperfusión miocárdica y la acción protectora del manitol como agente antioxidante. Material y método: A 40 pacientes sometidos a cirugía de bypass aortocoronario se los dividió en grupo I o control (20 pacientes), que recibieron como protección miocárdica intraoperatoria 500 cc de solución cardiopléjica tipo Saint Thomas, y grupo II (20 pacientes), que recibieron solución cardiopléjica con manitol, 60 mM. Se obtuvieron en ambos grupos biopsias de punta de ventrículo izquierdo, antes de la isquemia y a los 10 minutos de reperfusión, que fueron procesadas para detección indirecta de RL por método de quimioluminiscencia y para estudio de ultraestructura con microscopía electrónica. Se registró además la incidencia de arritmias en las primeras 24 horas del postoperatorio. Resultados: En el G I, siete pacientes (35%) tuvieron los siguientes tipos de arritmias: fibrilación auricular: 3; extrasistolia ventricular: 2; supraventricular: 1, y bloqueo AV:1, y en el G II, un paciente (5%), bloqueo AV ( $p < 0,05$ ). La quimioluminiscencia para las biopsias preisquemia del G I mostró una fotoemisión de  $37,6 \pm 4, \times 10^{-3}$  cpm/mg prot, y para las biopsias reperfusión de  $75 \pm 16, \times 10^{-3}$  cpm/mg prot ( $p < 0,05$ ). En el G II los valores (en iguales unidades) fueron  $37,7 \pm 4$  y  $40 \pm 6$  respectivamente, con una relación  $p$ : NS. El análisis de lesión mitocondrial mostró en el G I un aumento significativo en las biopsias de reperfusión*

*del estadio 4 de lesión (mayor daño sobre una clasificación 1 a 4). En el G II esta diferencia no se produjo y además se observó una adecuada preservación de la ultraestructura. Conclusiones: El manitol reveló una acción protectora miocárdica expresada en la reducción de incidencia de arritmias y mayor preservación de la ultraestructura miocárdica. Este mecanismo se debería a la acción antioxidante o atrapadora ("scavenger") de RL que posee el manitol, como se demostró por la disminución de la fotoemisión (quimioluminiscencia) por menor lipoperoxidación de las membranas celulares. Esta es la primera demostración en la literatura médica de la acción protectora antioxidante del manitol en cirugía cardíaca.*

Es indiscutida la acción protectora que se ha logrado sobre el corazón con los avances en el conocimiento del metabolismo celular. Por ello las técnicas actuales de protección miocárdica en cirugía cardíaca, fundamentalmente la cardioplejía con sangre o cristalóide, han erradicado la entidad denominada *stone heart* y han contribuido a reducir en forma considerable la morbilidad y mortalidad del postoperatorio.

Sin embargo no es infrecuente observar en el postoperatorio arritmias de diverso tipo y también síndrome de bajo volumen minuto, condicionados ambos por el llamado corazón atontado (*stunned heart*). Estos fenómenos se acentúan en las siguientes situaciones: a) período de isquemia prolongado, b) miocardio

hipertrófico y c) fracción de eyección comprometida.

En los últimos años se han acumulado pruebas que responsabilizan en gran parte a los radicales libres del oxígeno (RL) del fenómeno conocido como isquemia/reperfusión.<sup>1-6</sup> Nosotros<sup>7</sup> hemos demostrado recientemente la existencia de *stress* oxidativo miocárdico generado por estos metabolitos en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. También ha sido demostrado en experimentos en animales que diversos antioxidantes o *scavengers* son capaces de reducir el daño del mecanismo isquemia/reperfusión<sup>8-12</sup> así como las arritmias del postoperatorio.<sup>13-16</sup> En forma inversa, el agregado de sustancias o fármacos generadores de RL produjo efectos arritmógenos en otra serie de investigaciones.<sup>17</sup>

En este trabajo nos proponemos evaluar la hipótesis de que el manitol, como agente antioxidante del RL hidroxilo (HO<sup>-</sup>), puede disminuir la incidencia de arritmias postoperatorias y el daño miocárdico. La actividad de los RL se determinó por quimioluminiscencia y el daño miocárdico por estudios de ultraestructura.

## MATERIAL Y METODO

Se estudiaron en forma prospectiva 40 pacientes sometidos a cirugía de bypass aortocoronaria entre el 1º de setiembre de 1987 y el 1º de febrero de 1988. Con el objeto de disponer de un grupo homogéneo, se ingresó al grupo de estudio los pacientes que poseían las siguientes características:

- Fracción de eyección > 45%.
- Ausencia de infarto de miocardio reciente (menos de cuatro semanas).

Tabla 1  
Características del grupo de estudio

	Grupo I (control)	Grupo II (manitol)
Número de pacientes	20	20
Edad	52,4 ± 2	53,8 ± 2
Fracción de eyección	53,0 ± 2	53,2 ± 3
Tiempo de isquemia (min)	48,2 ± 3	53,8 ± 2
Número de puentes	2,8 ± 0,2	3 ± 0,2

Los valores se hallan expresados como media ± error estándar de la media.

c) Revascularización completa o satisfactoria.

La edad, fracción de eyección, tiempo de isquemia y número de arterias revascularizadas fueron similares en ambos grupos. Estos valores se hallan expuestos en la Tabla 1. Se obtuvo consentimiento escrito de aquellos pacientes seleccionados para biopsia.

La circulación extracorpórea se efectuó con hipotermia general de 28°C. Se empleó hipotermia local con solución salina entre 2°C y 4°C. En base a la solución cardiopléjica administrada, los pacientes fueron divididos en dos grupos: los primeros 20 enfermos (Grupo I) recibieron 500 cc de solución cardiopléjica del tipo Saint Thomas y los 20 enfermos restantes recibieron una solución que contenía manitol 60 mM. La composición de la misma (Laboratorios FADA, Buenos Aires) es la siguiente: dextrosa, 28 mM; NaCl, 90,7 mM; KCl, 33 mM; CaCl, 0,54 mM; manitol, 60 mM; glicina, 49 mM; pH, 7,8 (a 5°C); osmolaridad, 364 mOsm.

En ambos grupos la solución respectiva fue

Tabla 2  
Lesión mitocondrial

		Porcentaje de grado mitocondrial					Nº mitocondrias evaluadas
		0	1	2	3	4	
Grupo I (n = 6)	(A)	60 ± 9	16 ± 5	13 ± 3	6 ± 2	5 ± 2	209 ± 17
	(B)	36 ± 7	17 ± 2	16 ± 3	16 ± 5	15 ± 2	194 ± 8
p		< 0,05	NS	NS	< 0,02	< 0,01	NS
Grupo II (n = 6)	(A)	69 ± 12	12 ± 3	9 ± 4	5 ± 3	5 ± 2	231 ± 16
	(B)	60 ± 4	16 ± 2	11 ± 4	6 ± 1	7 ± 1	202 ± 17
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS

(A): Muestras de preisquemia. (B): Muestras luego de 10 minutos de reperfusión. p: Probabilidad. NS: No significativo. Los valores se hallan expresados como media ± error estándar de la media.



administrada en la aorta ascendente a 4°C y a una presión entre 80 y 100 mmHg. Se registró la temperatura del septum con un transductor (YSI) y se la mantuvo aproximadamente a 18°C.

Seis pacientes de cada grupo fueron seleccionados al azar para biopsias miocárdicas que se obtuvieron de acuerdo con el siguiente protocolo: previo al clampeo aórtico se tomaron dos biopsias de punta de ventrículo izquierdo (aguja de biopsias Travenol Thru-Cut). La muestra para quimioluminiscencia fue sumergida en solución salina isotónica y congelada de inmediato. La muestra para microscopía electrónica fue sumergida en glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato 0,1M a 6°C (pH 7,4). Ambas fueron designadas muestras preisquémicas. Una vez finalizada la anastomosis distal, se retiró el clamp de aorta y se desfibriló el corazón a una temperatura entre 30°C y 33°C mediante una corriente de 50 Joules. Luego de transcurridos 10 minutos de reperfusión y con el paciente a temperatura de 35°C-37°C se obtuvieron dos nuevas biopsias con el mismo procedimiento que las anteriores. Se las designó biopsias de reperfusión.

#### *Estudio de arritmias*

Ingresaron en el protocolo aquellos pacientes con trastornos del ritmo que requirieron tratamiento y ocurrieron dentro de las primeras 24 horas del postoperatorio. Se consideraron a tal efecto las siguientes arritmias: 1) fibrilación y/o aleteo auricular; 2) taquicardia supraventricular definida como seis o más complejos supraventriculares prematuros con una frecuencia de 100 o más latidos por minuto; 3) taquicardia ventricular, definida como seis o más complejos ventriculares prematuros con una frecuencia de 100 o más latidos por minuto; 4) extrasístoles ventriculares frecuentes, definidas como más de 30 complejos ventriculares prematuros por hora; 5) bloqueo auriculoventricular de segundo y/o tercer grado. Se instruyó especialmente al personal de la unidad de recuperación postoperatoria para que registrara por monitor telemétrico las arritmias. Durante la cirugía, se registró el número de electroshocks necesarios para desfibrilar el corazón luego de la reperfusión.

#### *Quimioluminiscencia*

Las biopsias congeladas en solución salina con un peso aproximado de 40 mg fueron luego homogeneizadas en un recipiente homogeneizador Potter Elvehjem de teflón en KCl 120 mM y

buffer fosfato 30 mM (pH 7,5 a 0°C). El homogeneizado fue calentado a 30°C, agregándosele hidroperóxido de tert-butilo y se determinó la quimioluminiscencia en un contador de centelleo Packard Tri-Carb, modelo 3320 (Packard Instrument Co., Santa Ana, Ca, USA)<sup>18, 19</sup> con el circuito de coincidencia desconectado. Las proteínas del homogenato fueron determinadas por el método de Lowry y colaboradores<sup>20</sup> y la quimioluminiscencia expresada como cuentas por minuto (cpm/mg) de proteína homogeneizada.

#### *Microscopía electrónica*

Las muestras para microscopía electrónica fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato 0,1 M (pH 7,4) y a 5°C. Se efectuó una segunda fijación en tetróxido de osmio 1% y se las deshidrató y embebió en Epon. Se cortaron secciones de un micrómetro de espesor que se tiñeron con borax-toluidina y se examinaron en microscopía óptica a los efectos de seleccionar áreas apropiadas para cortes finos. Los cortes ultrafinos fueron montados en grillas de cobre, teñidos con acetato de uranilo y examinados con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1A. Se obtuvieron en forma sistemática micrografías electrónicas a 2.500 y 10.000 aumentos para evaluación comparativa de las muestras preisquémicas y de reperfusión en ambos grupos. Las micrografías fueron evaluadas por dos observadores en doble ciego. Siguiendo los criterios de Kloner y colaboradores<sup>21</sup> de lesión mitocondrial, se adoptó la clasificación de dicho autor basada en el grado de edema mitocondrial de 0 a 4 de la siguiente manera:

0 = Mitocondria normal.

1 = Edema discreto que se manifiesta por separación de la cresta y clarificación de la densidad de la matriz.

2 = Edema más marcado que en 1.

3 = Edema masivo con desarreglo de la arquitectura.

4 = Los hallazgos de 3, más rotura de las membranas externa e interna de la mitocondria.

Cuando un punto de la grilla coincidía con una mitocondria, se le asignaba a la misma un valor numérico dentro de la escala de 0 a 4 de lesión mitocondrial. Fueron evaluadas por este método aproximadamente 200 mitocondrias por micrografía.

#### *Metodología estadística*

Se utilizó el test de t de Student para deter-

minar significación estadística de las diferencias obtenidas por promedios; los valores se expresaron como media aritmética y error estándar de la media. Se aplicó el chi cuadrado para comparar la incidencia de arritmias en ambos grupos.

## RESULTADOS

### Aspectos clínicos

Todos los pacientes se recobraron en forma satisfactoria de la cirugía. No se detectó infarto perioperatorio (presencia de nuevas ondas Q en el ECG y elevación significativa de CPK-MB). Cuatro pacientes del Grupo I y 3 del Grupo II requirieron apoyo inotrópico entre 3 y 18 horas luego de la cirugía. En ninguna circunstancia se requirieron dosis significativas de dopamina (más de  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ). La mortalidad hospitalaria fue del 2,5% a causa de un paciente del Grupo I que presentó un cuadro de hemorragia gastrointestinal que no pudo controlarse con tratamiento médico ni quirúrgico. Este enfermo falleció en el decimotercer día del postoperatorio.

### Arritmias

En el Grupo I el número de electroshocks requeridos para desfibrilar el corazón en el momento de la reperfusión fue de  $1,7 \pm 0,4$ . En el Grupo II fue de  $1,0 \pm 0,27$  ( $p < 0,02$ ). Siete pacientes (35%) del Grupo I desarrollaron arritmias que se clasificaron en los siguientes tipos: fibrilación auricular, 3 pacientes; extrasistolia ventricular, 2 pacientes; extrasistolia supraventricular, un paciente y bloqueo AV, un paciente. En el Grupo II, solamente un enfermo (5%) desarrolló arritmias (bloqueo AV). En todos los casos mencionados se requirieron medidas terapéuticas del tipo de drogas antiarrítmicas o marcapaseo externo transitorio. La diferencia en la incidencia de arritmias entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

### Quimioluminiscencia iniciada por hidropéroxidos

Los valores de quimioluminiscencia para las biopsias preisquémicas en los seis casos del Grupo I fueron de  $(37,6 \pm 3,5) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot y para las biopsias de reperfusión fueron de  $(74,8 \pm 16) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot ( $p < 0,05$ ). En el Grupo II el conteo de fotoemisión para las biopsias preisquémicas fue de  $(37,3 \pm 3) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot y para las de reperfusión fue de  $(40 \pm 6) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot ( $p$ : NS).

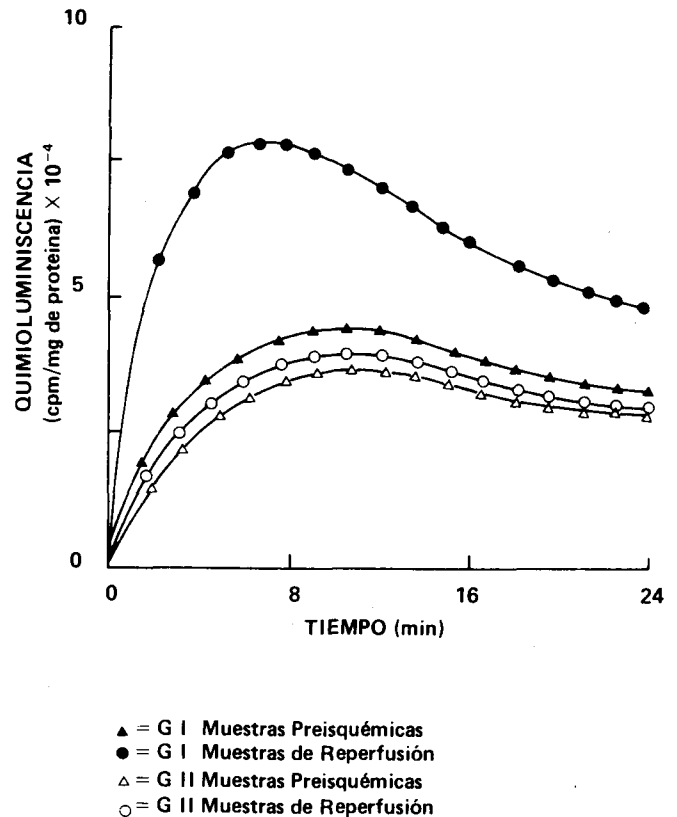


Fig. 1. Curva de quimioluminiscencia iniciada por hidropéroxidos de las muestras de preischemia y de reperfusión en los pacientes del Grupo I (GI) y del Grupo II (GII). La curva de reperfusión del manitol (GII) es prácticamente similar a la curva preisquémica.

La relación preischemia/reperfusión en el Grupo I fue  $2,3 \pm 0,6$  y en el Grupo II fue  $1,25 \pm 0,2$  ( $p < 0,02$ ). La Figura 1 muestra una curva sensiblemente elevada correspondiente a las muestras de reperfusión del Grupo I comparada con la de reperfusión del Grupo II.

### Microscopía electrónica

*Análisis cualitativo:* Las muestras preisquémicas de los grupos I y II mostraron preservación del disco intercalar, ordenamiento mitocondrial uniforme y morfología conservada. El filamento citoplásmico, glucógeno y sarcolema estaban bien preservados (Fig. 2). Los cambios morfológicos en las muestras de reperfusión del Grupo I evidenciaron áreas de desorganización miofibrilar focal con miocitólisis y vacuolización sarcoplásmica. Las mitocondrias presentaban edema leve a moderado en algunas áreas (Fig. 3) y con edema masivo y destrucción de la cresta en otras áreas (Fig. 4). En las



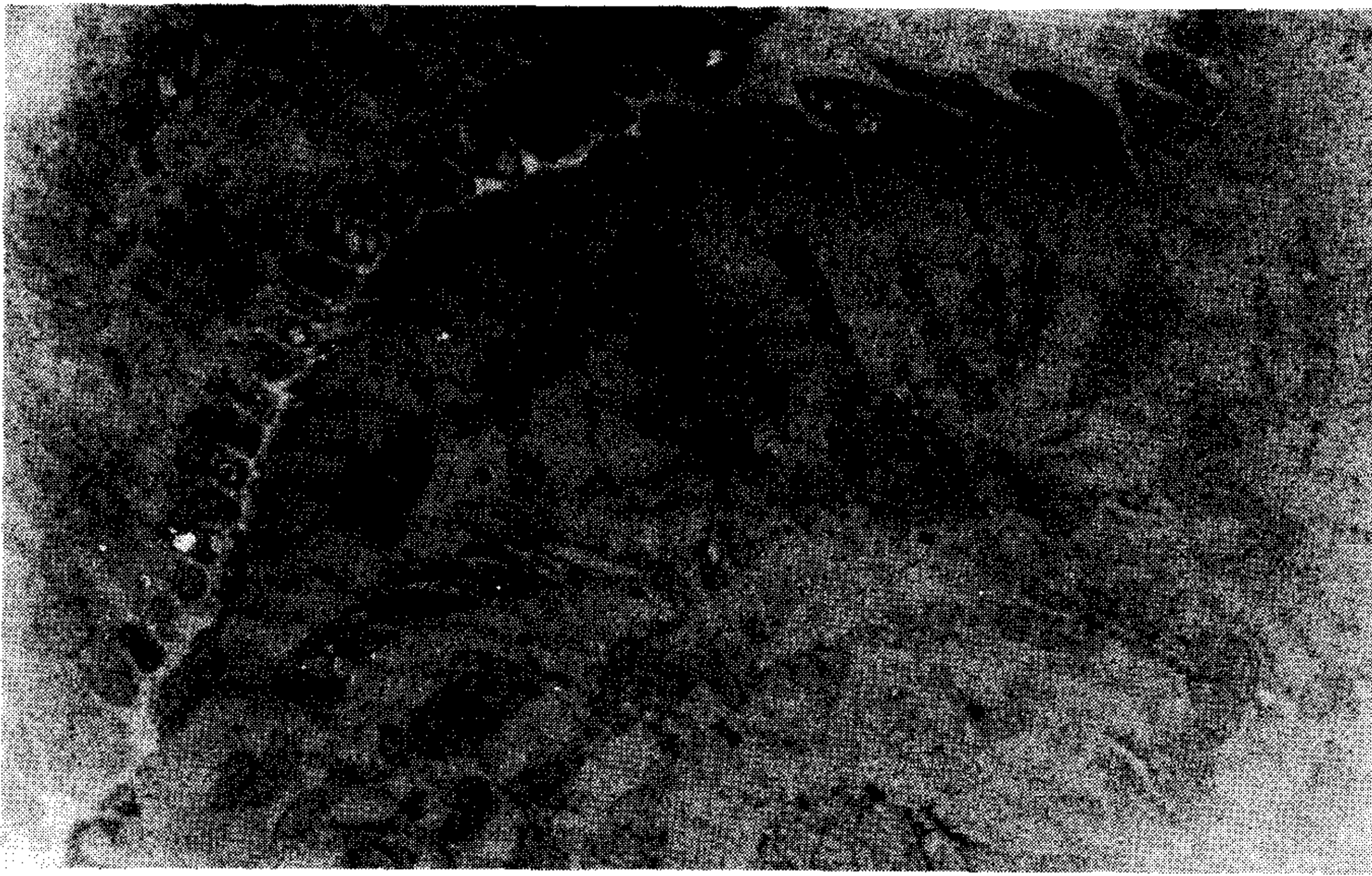


Fig. 2. Biopsia de preisquemia. La micrografía muestra preservación de la arquitectura del sarcómero. Las mitocondrias muestran membranas intactas y normal disposición de las crestas (2.500 x).

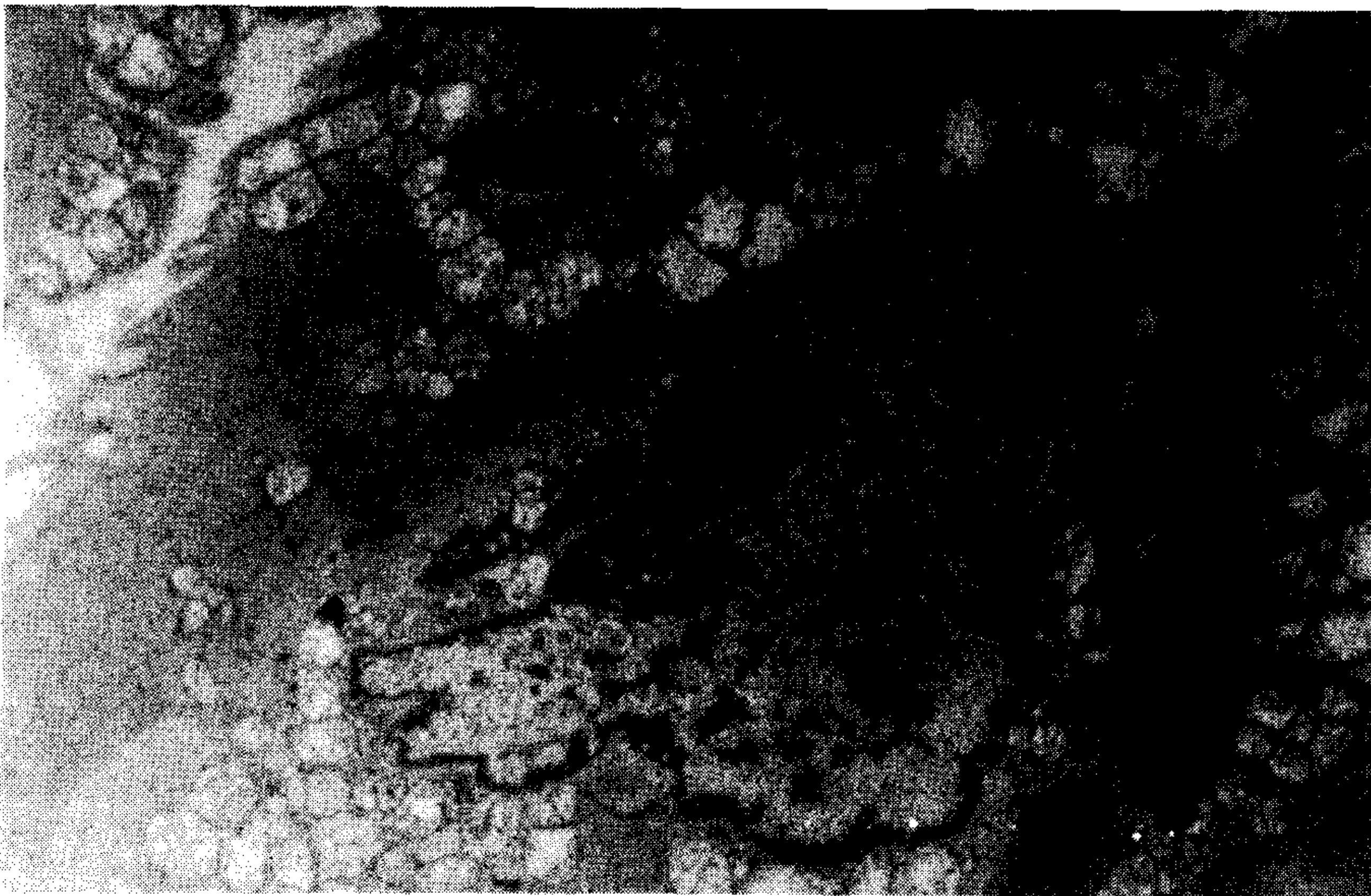


Fig. 3. Biopsia de reperfusión de un paciente en G1. Se observa desorganización miofibrilar focal con miocitólisis. Las mitocondrias presentan edema leve o moderado en algunas áreas y edema masivo en otras áreas (2.500 x).

biopsias de reperfusión del Grupo II, la mayoría de las micrografías electrónicas revelaron que las mitocondrias presentaban una arquitectura preservada, con las crestas densas y grisáceas. En algunas áreas se observó edema discreto con aclaramiento de la densidad de la matriz y cierto grado de separación entre las crestas. La presencia de mitocondrias severamente dañadas era muy poco frecuente (Fig. 5).

*Análisis cuantitativo:* En el Grupo I, para las biopsias preisquémicas los porcentajes de grados

3 y 4 fueron de  $6 \pm 2$  y  $5 \pm 2$  respectivamente y para las de reperfusión dichos porcentajes fueron de  $16 \pm 5$  y  $15 \pm 2$  respectivamente. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa para el grado 4 ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2). Los valores para el grado 0 también fueron significativos cuando se compararon las biopsias preisquémicas con las de reperfusión ( $p < 0,05$ ). En el Grupo II no se obtuvieron diferencias significativas en ningún grado entre las muestras de preisquemia y de reperfusión (Tabla 2).



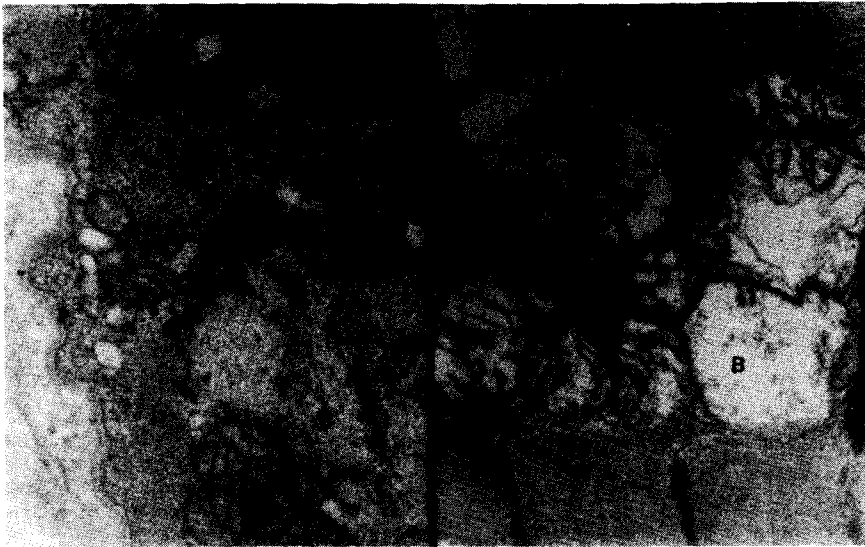


Fig. 4. Biopsia de reperfusión de un paciente del GI. Panel izquierdo: detalle de un área donde pueden observarse mitocondrias con edema moderado (10.000 x). Panel derecho: sector de mitocondrias con edema severo (A) que llega en algunos casos a ruptura de la membrana (B) (20.000 x).

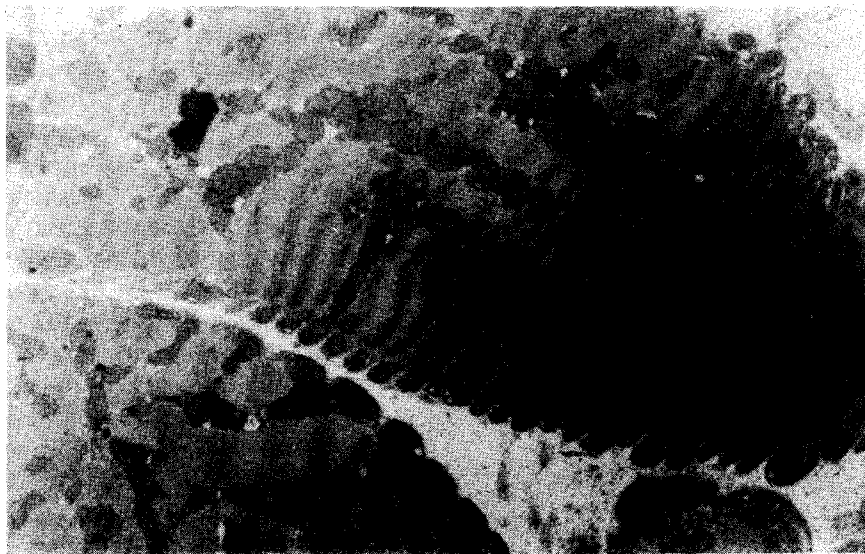


Fig. 5. Biopsia de reperfusión de un paciente del GI. Se observa preservación adecuada de la arquitectura celular. El ordenamiento mitocondrial es similar a las muestras de preischemia (2.500 x).

## DISCUSION

El empleo conjunto de las distintas técnicas de protección miocárdica, y entre ellas fundamentalmente el de las soluciones cardiopléjicas, ha producido una reducción franca de la morbilidad en cirugía cardíaca. Sin embargo persiste el síndrome de bajo volumen minuto y la presencia de arritmias en el postoperatorio inmediato. La incidencia de estas complicaciones aumenta cuando el período de isquemia es prolongado y cuando el paciente presentaba

deterioro previo de la función ventricular. Warner y colaboradores<sup>22</sup> demostraron la incapacidad de una solución cardiopléjica para ofrecer adecuada protección miocárdica en el ventrículo hipertrófico. Diversos autores<sup>23-25</sup> han demostrado la persistencia de actividad eléctrica en el miocardio con las técnicas corrientes de cardioplejía. También es sabido que la aurícula derecha se enfría en menor proporción que las otras cavidades, particularmente cuando se utiliza un tubo único de drenaje.<sup>26, 27</sup>

En esta década ha surgido considerable interés referente al rol de los RL en el daño de perfusión sobre el miocardio.<sup>1-12</sup> Varios investigadores han enfocado su interés sobre esta área tratando de evaluar la participación de los radicales libres en la génesis de las arritmias de perfusión.<sup>13-17</sup> Estos autores han demostrado las propiedades arritmogénicas que posee un sistema generador de RL como el Cl Fe difosfato de adenosina<sup>14</sup> y la purina<sup>17</sup> en el corazón perfundido aislado. También mostraron<sup>13-16</sup> que el agregado de agentes antioxidantes como la superoxidodismutasa, catalasa, manitol, glutatión o desferoxamina a las soluciones cardiopléjicas reducía la incidencia de arritmias del postoperatorio en el modelo de corazón aislado sometido al mecanismo isquemia/reperfusión.

Desde el punto de vista de los RL se consideran dos alternativas en la génesis del fenómeno isquemia/reperfusión. La primera hipótesis sostiene que durante la isquemia la ruptura de enlaces fosfato de alta energía aumenta la concentración de hipoxantina. Concomitantemente, el desequilibrio iónico del  $\text{Ca}^{++}$  inicia el mecanismo de conversión de la xantino-deshidrogenasa a xantino-oxidasa. Esta enzima cataliza la generación de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) a partir de la acumulación de hipoxantina.<sup>1, 6, 28, 29</sup> Como consecuencia de la isquemia, las enzimas antioxidantes del miocito se encuentran inactivas y por lo tanto incapaces de controlar la producción explosiva de RL que se generan en la reperfusión con el ingreso del oxígeno molecular. El  $\text{OH}^-$  se generaría a través de la reacción de Haber-Weiss. La limitación de esta teoría radica en el hecho de que la célula miocárdica es una de las más pobres en cuanto a la concentración de xantino-oxidasa.

La hipótesis alternativa sugiere que durante la reperfusión el oxígeno encuentra la cadena respiratoria mitocondrial altamente reducida. Esta condición desencadenaría una producción elevada de  $\text{O}_2^-$  en la matriz mitocondrial y como resultado de las misma se generaría  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual al difundir fuera del citosol reaccionaría con la mioglobina y produciría el  $\text{HO}^-$ .<sup>31, 32</sup>

El  $\text{HO}^-$  ataca las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados así como otras macromoléculas tales como proteínas y ADN.<sup>29</sup> Dado que las membranas celulares son ricas en estas cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, dichas estructuras se transforman en el blanco ideal de las reacciones de los RL. Se establece así una reacción autocatalítica denominada lipoperoxidación.<sup>33, 34</sup> Varios de los productos

finales de la lipoperoxidación, fundamentalmente grupos carbonilos y el oxígeno excitado u oxígeno singlete se descomponen liberando energía en forma de luz (fotones); a este fenómeno se lo conoce como quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia constituye un método sensible dentro de las distintas técnicas indirectas actualmente en vigencia para detectar el *stress* oxidativo causado por la actividad de los RL.<sup>20, 33, 34</sup> Se lo considera de mayor especificidad que el dosaje de malondialdehído.<sup>33, 34</sup> En experiencias previas la quimioluminiscencia ha sido utilizada para determinar niveles reducidos de antioxidantes endógenos de hígado de rata tratado con etanol,<sup>35</sup> o con lesiones tumorales.<sup>36</sup> También en los homogenatos de corazón de conejo y de ratón tratados con adriamicina.<sup>37, 38</sup>

En un trabajo previo<sup>7</sup> demostramos que en los pacientes sometidos a revascularización miocárdica se generaban RL en forma significativa durante los primeros minutos de reperfusión. Este fenómeno lo detectamos por la elevación de la curva de quimioluminiscencia en las muestras de reperfusión y aparentemente generaba lesión en el tejido cardíaco. Esta se evidenciaba por el dosaje de succínico deshidrogenasa cuya actividad estaba sensiblemente disminuida en dichas muestras. Igualmente se detectó mayor daño en la ultraestructura celular.

Estimulados por estos resultados, decidimos analizar si el manitol, agregado a una solución cardiopléjica, poseía capacidad para reducir las arritmias del postoperatorio inmediato y ofrecer además una mayor protección miocárdica.

El manitol demostró que mejora la función ventricular luego de un período de isquemia.<sup>39, 40</sup> Uno de sus mecanismos estaría relacionado con su actividad osmótica, disminuyendo el edema celular al crear un medio extracelular hiperosmótico.<sup>41</sup> Sin embargo recientemente han aparecido trabajos que demuestran que el manitol es un agente antioxidante del  $\text{HO}^-$  mediante su combinación con este RL formando un radical manitol ( $\text{MH} + \text{HO}^- \rightarrow \text{MH}^- + \text{H}_2\text{O}$ ) que se dimeriza.<sup>42-45</sup> Quedaría por explicar en qué forma el manitol, que por su estructura molecular no puede ingresar a la célula, podría afectar el  $\text{HO}^-$  generado dentro de la misma.

Este trabajo muestra que el agregado de manitol a una solución cardiopléjica produce una disminución significativa de las arritmias de reperfusión en pacientes sometidos a cirugía de bypass aortocoronario. También demuestra

que el manitol reduce el *stress* oxidativo de la reperfusión, como lo demuestra la caída de la curva de quimioluminiscencia en las biopsias del grupo que recibió manitol. Esto determinaría un menor daño miocárdico, como se demostró en las micrográficas electrónicas de ese mismo grupo de pacientes. Esta constituye la primera demostración en la literatura médica de la citada acción protectora del manitol en humanos.

## SUMMARY

*In 40 consecutive patients undergoing coronary artery bypass surgery, one of two solutions for cardioplegia were used. Group I, received Saint Thomas-type cardioplegic solution and Group II received a solution containing 60 mM mannitol. Rhythm disturbances which occurred within the first 24 postoperative hours and required treatment were considered for the study. In 6 patients of each group myocardial biopsies were obtained before ischemia and at the time of reperfusion. Samples were assessed for hydroperoxide-initiated chemiluminescence to determine free radicals activity, and for electron microscopy studies. Rhythm disturbances were present in 7 patients (35%) in Group I, and in one patient (5%) in Group II ( $p < 0.05$ ). Biopsies assessed for chemiluminescence in Group I, showed a photoemission of  $(37.6 \pm 3.5) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot, for the preischemic samples and  $(74.8 \pm 16) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot, for the reperfusion samples ( $p < 0.05$ ). In Group II values of chemiluminescence were  $(37.7 \pm 3.4) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot for the preischemic biopsies and  $(40 \pm 6) \times 10^{-3}$  cpm/mg prot for the reperfusion samples ( $p$ : NS). Electron microscopy for the reperfusion biopsies compared to preischemic biopsies, being grade 4 statistically significant ( $p < 0.01$ ). In Group II this rise in damaged mitochondria was not statistically significant. These results support the hypothesis that mannitol administered in cardioplegic solutions at the time of ischemia significantly reduces reperfusion-induced arrhythmias in patients undergoing open-heart surgery. It also indicates that this protective effect is, at least in part, secondary to the antioxidant property of mannitol. Through this mechanism, mannitol also reduces myocardial damage induced by free radicals as demonstrated by ultrastructural studies and chemiluminescence.*

## BIBLIOGRAFIA

- Hess ML, Mannson NH, Okabe E: The role of free radicals in the pathophysiology of ischemic heart disease. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 1382, 1982.
- Shlafer M, Kane PF, Wiggins VY, Kirsh MM: Possible role of cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. *Circulation* 66: 185, 1982.
- McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159, 1985.
- Thompson JR, Hess ML: The oxygen free radicals system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Progress Cardiovasc Disease* 28: 449, 1986.
- Ferreira R, Llesuy S, Milei J et al: Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. *Am Heart J* 115: 307, 1988.
- Stewart JR, Blackwell MS, Crute SL et al: Inhibition of surgically induced ischemia/reperfusion injury by oxygen free radical scavengers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 86: 262, 1983.
- Shlafer M, Kane PF, Kirsh MM: Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic reperfused heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83: 830, 1982.
- Menasche P, Grousset C, Gauduel Y, Piwnica A: A comparative study of free radical scavengers in cardioplegic solution. Improved protection with peroxidase. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 264, 1986.
- Manning AS, Coltart DJ, Hearse DJ: Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res* 55: 545, 1984.
- Bernier M, Hearse DJ, Manning AS: Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free-radical generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 58: 331, 1986.
- Hearse DJ, Tosaki A: Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ Res* 60: 375, 1987.
- Woodward B, Zakaria M: Effects of some free radical scavengers on reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 17: 485, 1985.
- Pallandi RT, Perry MA, Campbell TJ: Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: a possible cause of reperfusion-induced arrhythmias. *Circ Res* 61: 50, 1987.
- Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 62: 527, 1979.
- Boveris A, Fraga CG, Varsavski AI, Kooch OR: Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 227: 534, 1983.
- Lowry OH, Rosenbrough AL, Farr AL, Randall RI: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265, 1951.
- Kloner RA, Fishbein MC, Braunwald E, Maroko PR: Effect of propranolol on mitochondrial morphology during acute myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 41: 881, 1978.
- Brandt B, Richardson JV, O'Bryan P, Ehernhaft JL: Intramyocardial electrical and metabolic activity during hypothermia and potassium cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 31: 117, 1981.
- Magilligan DJ Jr, Deepak V, Peper W et al: Failure of standard cardioplegic techniques to protect the conducting system. *Ann Thorac Surg* 39: 403, 1985.
- Tchervenkov CI, Wynands JE, Symes JF: Persistent atrial activity during cardioplegic arrest: a possible factor in the etiology of postoperative supraventricular tachyarrhythmias. *Ann Thorac Surg* 36: 437, 1983.
- Boveris A, Cadenas E: Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insen-



- sitive respiration. *LEBS Lett* 54: 31, 1975.
22. Yusa K, Shanama K: Oxidation of oxymyoglobin to metamyoglobin with hydrogen peroxide: Involved of ferryl intermediate. *Biochemistry* 26: 684, 1987.
  23. Whitburn KD: Interaction of oxymyoglobin with hydrogen peroxide: The formation of ferrylmyoglobin at moderate excess of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys* 253: 419, 1987.
  24. Boveris A, Cadenas E, Chance B: Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Fed Proc* 40: 23, 1981.
  25. Boveris A, Cadenas E, Reiter R et al: Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 347, 1980.
  26. Cadenas E, Varsavsky A, Boveris A, Chance B: Oxygen of organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. *Biochem J* 198: 645, 1981.
  27. Boveris A, Llesuy SF, Fraga CG: Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *J Free Radicals Biol Med* 1: 131, 1985.
  28. Llesuy SF, Milei J, Molina H et al: Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71: 241, 1985.
  29. Milei J, Boveris A, Llesuy S et al: Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J* 111: 95, 1986.
  30. Ouriel K, Ginsburg ME, Patti CS et al: Preservation of myocardial function with mannitol reperfusate. *Circulation* 72 (Suppl II): II-254, 1985.
  31. England MD, Cavarocchi NC, O'Brien JF et al: Influence of antioxidants (mannitol and allopurinol) on oxygen free radical generation during and after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 74 (Suppl III): III-134, 1986.
  32. Vander Heide RS, Sobotka PA, Ganote CE: Effects of the free radical scavenger DMTU and mannitol on the oxygen paradox in perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 19: 615, 1987.
  33. Boveris A, Cadenas E, Chance B: Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Fed Proc* 40: 23, 1981.
  34. Boveris A, Cadenas E, Reiter R, Filipowsky M, Nakase Y, Chance B: Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 347, 1989.
  35. Cadenas E, Varsavsky A, Boveris A, Chance B: Oxygen of organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. *Biochem J* 198: 645, 1981.
  36. Boveris A, Llesuy SF, Fraga CG: Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *J Free Radicals Biol Med* 1: 131, 1985.
  37. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S: Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71: 241, 1985.
  38. Milei J, Boveris A, Llesuy S, Molina A, Storino R, Ortega D, Milei SE: Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J* 111: 95, 1986.
  39. Willerson JT, Powell J, Gruney TC, Stark JJ, Sanders LA, Leaf A: Improvement in myocardial function and coronary blood flow in ischemic myocardium after mannitol. *J Clin Invest* 51: 2989, 1972.
  40. Schaff HV, Goddman RA, Bulkley BH, Gott VL, Flaberty JT: Hyperosmolar reperfusion following ischemic arrest: critical importance of the timing of mannitol administration on preservation of myocardial structure and function. *Surgery* 89: 141, 1981.
  41. Leaf A: On the mechanism of fluid exchange of tissue in vitro. *Biochemistry* 62: 241, 1956.
  42. Delmaestro FR, Thaw HH, Björk J, Planker M, Arfors KE: Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 492 (Suppl I): 43, 1980.
  43. Ouriel K, Ginsburg ME, Patti CS, Pearce FJ, Hicks GL: Preservation of myocardial function with mannitol reperfusate. *Circulation* 72 (Suppl II): II-254, 1985.
  44. England MD, Cavarocchi NC, O'Brien JF, Solis E, Pluth JR, Orszulak TA, Kaye MP, Schaff HV: Influence of antioxidants (mannitol and allopurinol) on oxygen free radical generation during and after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 74 (Suppl III): III-134, 1986.
  45. Vander Heide RS, Sobotka PA, Ganote CE: Effects of the free radical scavenger DMTU and mannitol on the oxygen paradox in perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 19: 615, 1987.