

Influência do Acréscimo de Manitol à Solução Nutriente no Desempenho Mecânico e no Grau de Edema Miocárdico de Corações Isolados de Ratos

Leonardo Antonio Mamede Zornoff, Sergio Alberto Rupp de Paiva,
Maria Terezinha Trovanelli Tornero, Mauro Sergio Stateri Carvalho, Paulo José Ferreira Tucci
Botucatu, SP

Objetivo - Analisar a influência da adição de manitol à solução de Krebs-Henseleit (KH) sobre o grau de edema miocárdico, e sobre as propriedades sistólicas e diastólicas de corações isolados de ratos.

Métodos - Corações isolados de ratos, mantidos em contrações isovolumétricas, foram perfundidos pela técnica de Langendorff, sob fluxo constante, durante 90min. A cada 15min foram registradas: pressão de perfusão coronária (Pp), pressão diastólica (Pd) e pressão sistólica (Ps). Após o procedimento, era avaliado o teor de água (TA) do miocárdio. Foram analisadas 9 preparações perfundidas com solução de KH (grupo I) e outras 8 (grupo II) com solução de KH acrescida de manitol (8mM). O TA foi avaliado, também, em outros 9 corações-controles (C), não submetidos à perfusão.

Resultados - O TA das preparações do grupo I ($80,7 \pm 1,3\%$) foi superior aos do grupo C ($75,5 \pm 0,5\%$) e grupo II ($78,1 \pm 0,7\%$). Desde o início da perfusão, as preparações do grupo II tiveram Ps ($86,2 \pm 11,5\text{mmHg}$) superior às do grupo I ($72,7 \pm 21,1\text{mmHg}$). O melhor desempenho sistólico manteve-se até o final do período de perfusão. Não foram verificadas diferenças entre as Pd dos 2 grupos; em ambos, a Pd elevou-se desde o início da perfusão. Sob perfusão, a elevação da Pp verificada nas preparações do grupo II foi inferior às do grupo I.

Conclusão - O manitol não previne, porém atenua, o edema miocárdico de preparações de corações isolados, perfundidos por solução nutriente.

Palavras-chave: manitol, edema-miocárdico

Influence of Mannitol Added to the Perfusion Solution on Mechanical Properties and Myocardial Edema of Isolated Rat Hearts

Purpose - To analyse the influence of mannitol added to Krebs-Henseleit (KH) solution on the myocardium edema and myocardial function.

Methods - Isolated rat heart under isovolumetric contractions studied according to Langendorff's technique were perfused with KH solution at constant flow during 90min. The coronary perfusion pressure, diastolic and systolic pressures were recorded at every 15min. At the end of the experiment, myocardium water content was measured in hearts perfused with KH solution (group I, n=9) and in hearts perfused with KH solution plus 8mM mannitol (group II, n=8). These results were compared to non-perfused control heart (n=9).

Results - Myocardial water content was statistically higher in group I ($80.8 \pm 1.3\%$) compared to group II ($78.1 \pm 0.7\%$) and control group ($75.5 \pm 0.5\%$). Systolic arterial pressure was statistically higher in group I ($86.2 \pm 11.5\text{mmHg}$) compared to group II ($72.7 \pm 21.1\text{mmHg}$). There was no difference in the diastolic pressure between the two groups. Coronary perfusion pressure (Pp) increased progressively during the experiment in both groups. However, Pp was lower in group II than in group I.

Conclusion - Mannitol added to KH solution significantly attenuates the myocardium edema in the isolated perfused rat heart.

Key-words: mannitol, myocardial-edema

Arq Bras Cardiol, volume 64 (nº 3), 225-229, 1995

Entre os diversos métodos disponíveis para o estudo do desempenho mecânico do coração destacam-se, pela

facilidade no seu manuseio, as preparações com coração isolado¹. A mais divulgada das técnicas é a de Langendorff, que consiste na perfusão retrógrada do coração com solução nutriente, através de cânula inserida na aorta ascendente.

Várias são as soluções nutrientes utilizadas^{2,3}, cada qual com diferentes composições. A escolha de uma ou outra, freqüentemente, é empírica e se baseia na tentativa de reproduzir condições mais fisiológicas, que assegure

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Correspondência: Leonardo A. Mamede Zornoff -
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - Depto de Clínica Médica
CEP 18618-000 - Botucatu, SP
Recebido para publicação em 25/10/94
Aceito em 19/12/94

menor dano miocárdico. Quando comparados os efeitos de diversas soluções nutrientes ³, os resultados revelam que, após 1h de perfusão, ocorre edema miocárdico com todas as soluções. Uma manobra que tem sido utilizada para atenuar o edema cardíaco é o uso de soluções nutrientes hiperosmolares. Entretanto, existem dados conflitantes sobre o efeito de diferentes soluções na formação de edema; Woo-Ming e col ³ demonstraram que o aumento progressivo da osmolaridade, pela adição de soro plasmático não reduziu o grau de edema. Em 1987, Bouchard e col ⁴ encontraram diminuição de edema com o uso de manitol.

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do acréscimo de manitol à solução nutriente no grau de edema e nas repercussões funcionais de corações isolados de ratos.

Métodos

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 250-350g. Por via subcutânea foram injetadas 2.500U de heparina e, após 15min, os animais eram decapitados. O tórax era aberto, o coração rapidamente removido e perfundido de acordo com a técnica de Langendorff. O átrio esquerdo era aberto e o ápice do ventrículo esquerdo (VE) puncionado com agulha, de modo a drenar a cavidade ventricular, para evitar acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de borracha atado a tudo rígido de duplo lúmen era colocado na cavidade do VE. Uma das comunicações do tubo rígido era conectada a um transdutor de pressão e a outra, a uma seringa de 1ml. O ajuste do volume de líquido mantido dentro do balão, permitia o controle da pressão diastólica do VE.

A musculatura atrial direita, compreendendo a região do nódulo sino-atrial, era extirpada e eletrodos de marca-passo artificial eram implantados no miocárdio do ventrículo direito (VD) para se manter, artificialmente, a frequência cardíaca constante em 180bpm. Em preparações assim instaladas que operam em condições isovolumétricas, o desempenho ventricular é analisado, utilizando-se, como indicador da capacidade contrátil, a pressão sistólica durante as contrações, e a pressão de repouso como indicador das propriedades diastólicas.

Os animais foram divididos em 2 grupos. Os ratos do grupo I (n=9) tiveram seus corações isolados e perfundidos durante 90min, com solução modificada de Krebs-Henseleit (NaCl 115mM; KCl 5,4mM; MgSO₄ 1,2mM; CaCl₂ 1,25mM; NaH₂PO₄ 1,15mM; NaHCO₃ 25mM; glicose 11mM e insulina 10U/l), chamada de solução I. Os animais do grupo II (n=8) foram submetidos ao mesmo procedimento, com a mesma solução nutriente acrescida de manitol, na concentração de 8mM (solução II). Ambas as soluções eram continuamente oxigenada com 95% de O₂ + 5% de CO₂, à temperatura de 32°C com pH de 7,2-7,4.

O método de perfusão escolhido foi o de fluxo constante, para obtenção de pressão de perfusão inicial de 75mmHg.

Estudou-se o comportamento da pressão de perfusão

(Pp), pressão diastólica (Pd) e pressão sistólica (Ps) durante os 90min, com registros a cada 15min. Após o experimento, eram retirados os átrios, artéria pulmonar e aorta. O tecido restante, compreendendo os VD e VE, era pesado e colocado em estufa à temperatura de 100°C. Após 24h os ventrículos eram novamente pesados para a determinação do teor de água do miocárdio, segundo a fórmula:

$$\% \text{ água} = \frac{\text{peso úmido} - \text{peso seco}}{\text{peso úmido}} \times 100$$

Para comparação da porcentagem do teor de água, foram estudados outros 9 ratos (grupo controle) em que os animais tiveram o teor de água miocárdico determinado imediatamente após decapitação e remoção dos corações, não sendo, assim, submetidos a nenhum procedimento de perfusão.

Foram calculados os valores médios e os desvios-padrão de cada parâmetro mecânico, em cada unidade de tempo, e da porcentagem de teor de água dos grupos estudados. Para comparação entre as porcentagens de teor de água das preparações controle, solução I e II, foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis e o de diferenças mínimas ⁵. Procurou-se verificar a existência de correlação entre as variáveis mecânicas estudadas, tendo-se calculado e registrado o valor do coeficiente "r".

As pressões foram analisadas conjuntamente, em cada tempo, comparando os grupos por meio de análise de variância multivariada e intervalo de confiança simultâneo de 95% de Bonferroni ⁶.

A análise do comportamento das variâncias das pressões conduziu ao ajuste das curvas, usando, como variável independente, "1/tempo" e variável dependente "pressão/tempo". Foram realizados ajustes quadráticos individualmente e calculados coeficientes de determinação ajustado (R_{aj}²) ⁷. Os 3 coeficientes referentes a cada pressão foram comparados nas situações solução I e II, por meio de análise de variância multivariada e intervalo de confiança simultâneo de 95% de Bonferroni ⁶.

As curvas obtidas pela evolução das pressões no tempo, baseadas nas médias dos coeficientes, foram analisadas, considerando um componente linear e outro hiperbólico. Para todas as pressões estudadas, o segmento inicial representa o componente hiperbólico enquanto o distal, o linear.

Os cálculos da análise multivariada foram executados pelo software SAS. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Os resultados do teor de água dos corações isolados dos 2 grupos de tratamento e os do grupo controle estão na figura 1. Verificou-se maior (p<0,05) teor de água nos corações isolados quando perfundidos com a solução sem o manitol (80,79±1,31%) em relação ao grupo controle (75,49±0,53%) e ao grupo II (78,12±0,67%). Por outro

Tabela I - Parâmetros mecânicos observados						
T (min)	Grupo I			Grupo II		
	Pp	Pd	Ps	Pp	Pd	Ps
0	75,0±1,0	4,3±1,0	72,7±21,1	75,7±1,4	5,5±1,5	86,2±11,5
15	83,9±7,9	5,1±1,7	72,1±18,5	80,4±6,8	6,6±2,7	92,4±17,0
30	99,2±16,6	8,4±5,0	69,8±19,6	88,7±9,2	8,7±5,1	98,1±13,4
45	115,3±26,3	13,4±8,7	70,7±22,7	99,0±12,2	13,4±12,3	100,0±10,7
60	134,8±39,0	23,4±14,8	69,2±25,4	108,2±11,5	19,2±13,4	96,4±14,3
75	156,1±47,6	29,7±16,8	61,0±25,6	117,1±12,9	24,6±15,1	92,4±18,9
90	172,8±52,7	34,7±16,0	59,4±24,0	125,9±17,0	29,0±17,2	87,1±20,0

T- tempo decorrido após período de estabilização de 15min de retirada do coração; Pp- pressão de perfusão; Pd- pressão diastólica; Ps- pressão sistólica.

Tabela II - Valores de F observados de Snedecor e probabilidades de valores superiores, resultante das análises multivariadas nos parâmetros: pressão diastólica, pressão de perfusão e pressão sistólica, nas situações com e sem manitol, conforme tempo de avaliação		
Tempo (min)	F obtido	p [F>F ob]
0	6,2692	0,0073
15	7,0822	0,0046
30	4,4893	0,0226
45	3,6548	0,0415
60	2,3885	0,1160
75	2,7678	0,0839
90	2,7872	0,826

* graus de liberdade: (numerador) 3, (denominador) 13

lado, a diferença entre o grupo controle e o grupo perfundido com manitol não mostrou significância estatística.

Na tabela I, estão resumidos, sob forma de médias ± desvios-padrão, os resultados obtidos de todas as preparações em relação aos parâmetros analisados, onde se verifica que os resultados de Pp e Pd mostram grande variabilidade, e esta variação está relacionada com o tempo decorrido após a retirada do coração. Como as medidas das variáveis mecânicas foram simultâneas e as análises de correlação foram fortes (Pp x Pd: r=0,86 para a solução I e r=0,76 para a solução II), realizou-se análise multivariada com as variáveis Pp, Pd e Ps nas situações com e sem manitol (tab. II).

A análise, em conjunto, das pressões, permite verificar (tab. II) que, até o tempo 45min da retirada do coração, ocorre diferença (p<0,05) entre as situações de perfusão com e sem manitol, embora não seja possível identificar particular variável como a responsável por essa diferença. Após 45min, não se observa diferença estatística entre as situações quanto ao conjunto das pressões.

Para determinar o comportamento de cada parâmetro mecânico do coração, foi utilizado o intervalo de confiança 95% simultâneo de Bonferroni para a diferença entre as médias das situações (fig. 2). Nesta análise, a significância estatística fica configurada quando os intervalos de confiança não incluem o valor zero. Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa, apenas para a Ps.

Para analisar como evoluiu durante o tempo de expe-

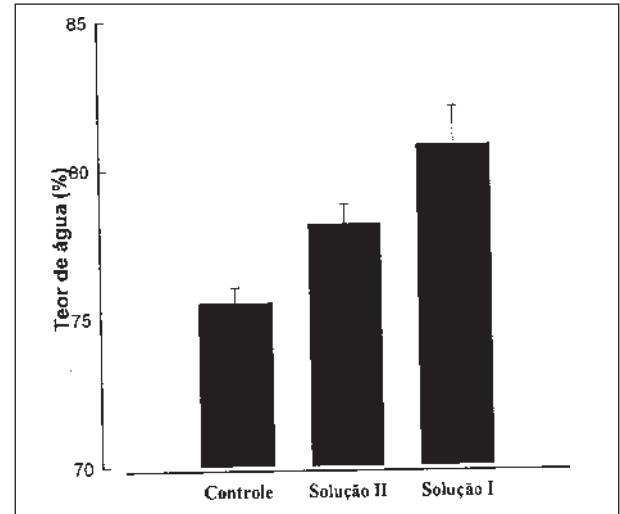


Fig. 1 - Valores em médias e desvios-padrão do teor de água dos grupos de corações isolados: controle, perfundidos com solução nutriente I (sem manitol) e solução nutriente II (com manitol). Foi verificada diferença significativa entre os grupos solução I x solução II e solução I x controle.

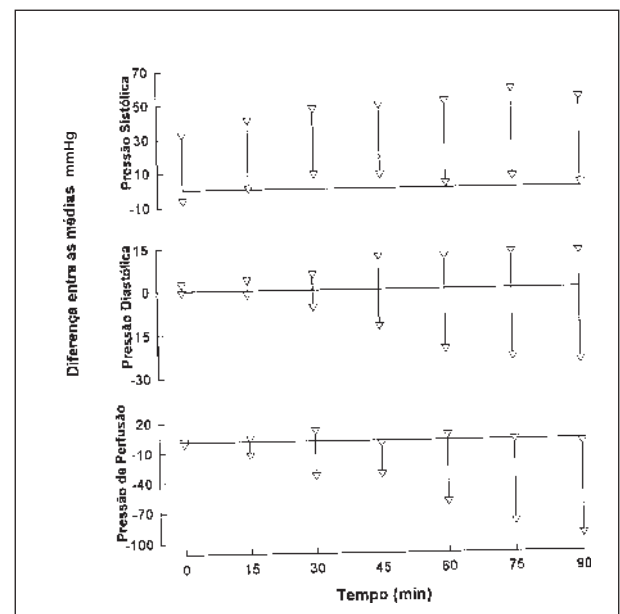


Fig. 2 - Intervalo de confiança 95% simultâneo de Bonferroni para as diferenças entre as médias da solução II - solução I para as pressões sistólica, de perfusão e diastólica. A linha sólida horizontal indica o "zero".

rimentação, o conjunto das variáveis, foram ajustadas curvas quadráticas individuais das variáveis pressão/tempo em função do inverso do tempo. Os coeficientes estudados em conjunto, por análise de variância multivariada, permitiram comparar as soluções I e II (fig. 3 a 5). Assim, pela análise multivariada, verificou-se que houve diferença entre as curvas de Ps (fig. 3). Não ficou evidenciada diferença nas análises das curvas de Pp (fig. 4) e de Pd (fig. 5). No entanto, a comparação com intervalos de confiança simultâneos de Bonferroni, permite verificar a diferença do componente linear da Pp (fig. 4).

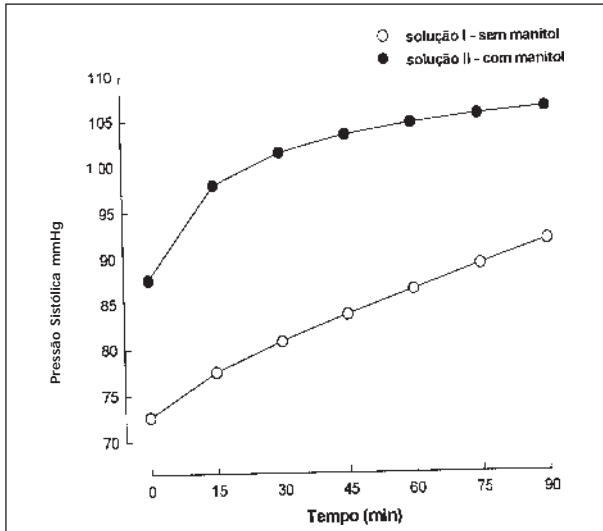


Fig. 3 - Representação gráfica das curvas médias da pressão sistólica, das soluções I e II, obtidas por meio dos coeficientes médios de curvas quadráticas individuais. $p=0,0107$.

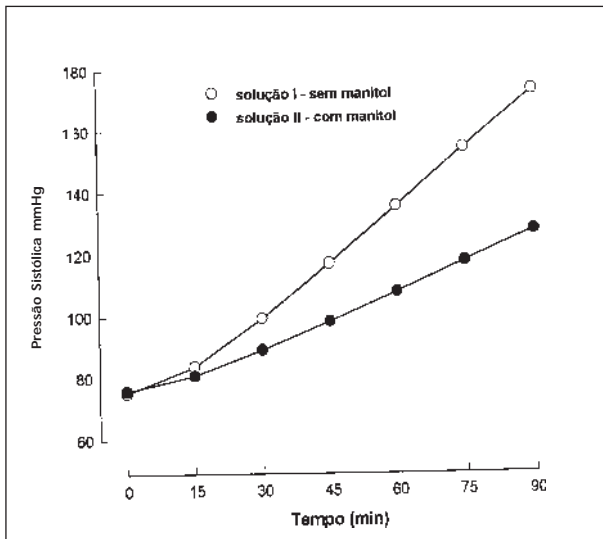


Fig. 4 - Representação gráfica das curvas médias da pressão de perfusão das soluções I e II, obtidas por meio dos coeficientes médios de curvas quadráticas individuais ($p=0,184$).

Discussão

Estes resultados evidenciaram o efeito benéfico do manitol. As variações da Pp tornam claro que, desde o início do experimento, houve elevação da resistência vascular coronária, sendo aceito que este fenômeno, neste tipo de preparação, deve-se a edema miocárdico¹. O uso da solução II foi acompanhado de maior preservação da preparação, pois houve tendência de Pp ser menor nos corações do grupo II, caracterizada pela diferença do componente linear das curvas dos grupos I e II.

Quanto ao comportamento da Ps, fica evidente que os corações perfundidos com a solução II apresentaram melhor capacidade contrátil. Visto que o manitol, na dose utilizada, não apresenta efeito inotrópico positivo⁸, pode-

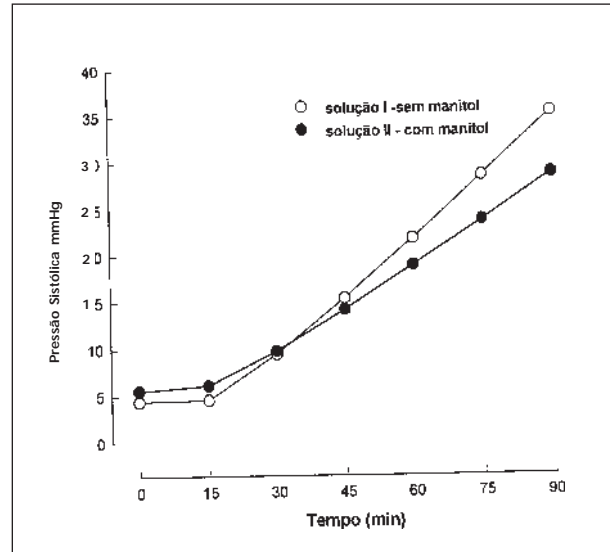


Fig. 5 - Representação gráfica das curvas médias da pressão diastólica, das soluções I e II, obtidas por meio dos coeficientes médios de curvas quadráticas individuais ($p=0,365$).

se admitir que o melhor desempenho mecânico refletiu menor dano miocárdico.

Em relação à Pd, houve elevação progressiva nos 2 grupos estudados. Como o volume do balão permaneceu constante durante todo o experimento, este comportamento reflete modificação da complacência ventricular causada por edema¹, porém, sem diferenças significantes entre os 2 grupos.

As variáveis mecânicas analisadas evidenciaram benefício com o manitol nos primeiros 45min de perfusão e os parâmetros que melhor refletiram diferenças entre os grupos foram, em ordem decrescentes a Ps e Pp.

Por fim, a determinação do teor de água confirma o menor edema miocárdico com o uso da solução II. O conjunto destes resultados permite admitir que o manitol não previne, porém atenua, o edema miocárdico de preparações de coração isolado perfundidos por solução nutriente.

Assim, baseados nestes resultados, o manitol poderia ser usado rotineiramente nestas preparações, assegurando maior preservação miocárdica, particularmente em experimentos de curta duração. Apesar de aceito que o efeito benéfico do manitol ocorre por influência da osmolaridade, Magovern e col⁹, usando corações isolados de ratos submetidos a parada cardíaca hipotérmica, confrontaram os efeitos da reperfusão com manitol e com solução hiperosmolar, contendo glicose. Os resultados mostraram melhora da função ventricular e do fluxo coronário dos animais tratados com manitol, em comparação com a solução de glicose. Resultados semelhantes foram encontrados por Ouriel e col¹⁰, que compararam os efeitos do manitol e de solução salina hiperosmolar, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos no fenômeno de preservação miocárdica, exercido pelo manitol. A ativação da bomba de Na-H⁸ e a neutralização de radicais livres de

oxigênio¹¹ são aceitos como mecanismos potenciais.

Ainda hoje, os mecanismos responsáveis pelo efeito benéfico do manitol não estão completamente esclarecidos, bem como permanece em aberto a escolha da solução nutriente mais fisiológica para preparações de coração isolado.

Agradecimentos

À Marina Politi Okoshi, Luiz Shiguero Matsubara e Rosane J. G. Laperuta, pela colaboração prestada.

Referências

1. Tucci PJF, Maciel RH - Estabilidade funcional do coração isolado de cobaia contraindo isovolumetricamente. *Arq Bras Cardiol* 1977; 30: 423-7.
2. Zhou HZ, Malhotra D, Shapiro JI - Contractile dysfunction during metabolic acidosis: role of impaired energy metabolism. *Am J Physiol* 1991; 261: H1481-6.
3. Woo-Ming M, Wu NM, Lester JL, Malinin TI - Water content of hearts perfused with crystalloid and nutrient solutions. *J Mol Cell Cardiol* 1980; 12: 371-86.
4. Bouchard A, Watters TA, Wu S et al - Effects of altered coronary perfusion pressure on function and metabolism of normal and cardiomyopathic hamster hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 1011-23.
5. Campos H - Estatística Experimental Não-Paramétrica. 4ª ed. Piracicaba, ESALQ 1983; 349.
6. Morrison DF - Multivariate Statistical Methods. 3ª ed. New York, McGraw-Hill 1990; 495.
7. Draper N, Smith H - Applied Regression Analysis. 2ª ed. New York, John Wiley & Sons 1981; 709.
8. Watters TA, Wendland MF, Parmley WW et al - Factors influencing myocardial response to metabolic acidosis in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 1987; 253: H1261-70.
9. Magovern GJ, Bolling SF, Casale AS, Bulkley BH, Gardner TJ - The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity of hydroxyl scavenger? *Circulation* 1984; 70(suppl I): 191-6.
10. Ouriel K, Ginsburg ME, Patti CS, Pearce FJ, Hicks GL - Preservation of myocardial function with mannitol reperfusate. *Circulation* 1984; 70(suppl II): II1254-8.
11. Yeatman M, Bernier M, Hearse DJ - Mannitol and reperfusion-induced arrhythmias: possible mechanisms of action in the isolated rat heart. *Can J Cardiol* 1988; 4: 287-94.