

SERGINANDO LAUDENIR RAMIN

AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA E MORFOLÓGICA DA CETAMINA
S(+) ASSOCIADA À CARDIOPLEGIA SANGÜÍNEA EM CORAÇÃO
ISOLADO DE COELHO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em
Anestesiologia. Área de Concentração em
“Qualidade e Segurança em Anestesiologia”

Orientador: Prof. Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna

Botucatu

2008

Este trabalho foi realizado na Divisão de Pesquisa do Departamento de Cirurgia Experimental e do Biotério do Campus da Faculdade de Medicina de Botucatu.

*Aos meus pais,
Mário, paradigma de trabalhador
e Nadir, sempre presente nas horas mais difíceis.*

*À companheira que soube me entender em
todos os momentos e na minha ausência, Luciana.*

Ao meu companheiro e adorável filho, Thiago.

À minha filha, Natália.

Aos meus irmãos Sérgio, Júnior e Alessandra.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, cientista por excelência, verdadeiro mestre, que desde os bancos acadêmicos despertou-me pela anestesiologia, com o espírito científico. Minha estima e eterna gratidão, Prof. Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Ao exímio professor, médico, amigo, quem admiro e respeito por ser conselheiro. Seria impossível enumerar as contribuições, orientações de análises estatísticas e revisões para que eu chegasse a este momento grandioso de minha vida profissional, Prof. Livre Docente Moacir Fernandes de Godoy do Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

Ao professor e cientista, pela paciência e ajuda na análise morfológica, sem a quais este estudo não teria sido realizado, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga do Departamento de Biologia da UNESP, Campus de São José do Rio Preto.

Ao incansável cientista, que com calma e sabedoria elaborou modelo experimental baseado no método de coração isolado, culminando neste estudo, Prof. Dr. Antonio Sérgio Martins do Departamento de Cirurgia da FMB-UNESP.

Aos amigos do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP, em especial às Profas. Titulares Yara Machado Marcondes Castiglia e Norma Sueli Pinheiro Módulo pela ajuda e incentivo.

Ao Prof. MSc. Renato Braz de Araujo da UNESP de São José do Rio Preto, pela amizade, tradução do resumo para o inglês e importantes discussões sobre esta pesquisa.

Aos Técnicos Antonio Bardella, Luis Roberto Falleiros e Sebastião Policarpo Rodrigues, pelos inestimáveis trabalhos realizados, os quais permitiram a condução correta do experimento.

A bibliotecária Zélia Cristina Regis da FAMERP, pela prontidão e atualização da referência bibliográfica.

Às empresas Cristália Farmacêutica e Braile Biomédica que colaboraram com os medicamentos utilizados nesse experimento.

Aos amigos da Disciplina de Anestesiologia do Departamento de Especialidades Cirúrgicas da FAMERP.

*“Eu aprendi que para se crescer como pessoa
é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu”.*

(William Shakespeare)

*“É impossível haver progresso sem mudanças.
Quem não consegue mudar a si mesmo, não muda coisa alguma”.*

(Bernard Shaw)

“Para evitar críticas, não faça nada, não diga nada, não seja nada”.

(Elbert Hubbard)

LISTA DE FIGURAS

	pag
Figura 1 – Sistema de Langendorff – modificado.....	25
Figura 2 – Esquema de delineamento experiemetal.....	35
Figura 3 – Animal suporte preparado.....	36
Figura 4 – Animal doador preparado.....	37
Figura 5 – Cânula de perfusão e cânula e balão intraventricular	38
Figura 6 – Cânula de balão intraventricular com aorta canulada.....	39
Figura 7 – Sistema de perfusão e balão intraventricular.....	40
Figura 8 – Corte histológicos transversais de cardiócitos.....	50
Figura 9 – Eletromiografia do ventrículo esquerdo de coelhos dos Grupos Controle e Parada anóxica.....	52
Figura 10 – Eletromiografia do ventrículo esquerdo de coelhos do Grupo Cardioplegia e Grupo Cetamina S(+) + cardioplegia.....	54

LISTA DE TABELAS

	pag
Tabela 1 – Médias e desvios-padrão dos valores de PDes cardioplegia, PDes cetamina S(+) e PDes anóxica; pré e pós tratamento.....	42
Tabela 2 – Média e desvios-padrão dos valores de dP/dt + cardioplegia, dP/dt+ cetamina S(+) e dP/dt + anóxica; pré e pós tratamento.....	43
Tabela 3 – Médias e desvios-padrão dos valores de dP/dt- cardioplegia, dP/dt- cetamina S(+) e dP/dt- anóxica; pré e pós tratamento.....	44
Tabela 4 – Núcleos Degenerados e Íntegros – Cardiopleia x Anóxica.....	46
Tabela 5 – Núcleos Degenerados e Íntegros – Cetamina S(+) x Cardioplegia.....	47
Tabela 6 – Núcleos degeneraados e Íntegros – Cetamina S(+) x Anóxica.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS:

Ce = Célula endotelial

cm = Centímetro

dP/dt + = Primeira Derivada Temporal da Pressão intraventricular, Deflexão Positiva

dP/dt - = Primeira Derivada Temporal da Pressão Intraventricular, Deflexão Negativa

epm = Estímulos por Minuto

fig = Figura

g = Grama

GABA = Ácido Gama-Aminobutírico

GC = Grupo cardioplegia

GCC = Grupo cetamina S(+) + cardioplegia

Gct = Grupo controle

GPA = Grupo parada cardíaca anóxica

H = Hora

i.v. = Intravenoso

ICC = Insuficiência Cardíaca Congestiva

kg = Kilograma

min = Minuto

Mf = Miofibrila

mg = Miligrama

Mi = Mitocôndria

mEq = Miliequivalente

mL = Mililitro

MM = Milimol

mmHg = Milímetro de Mercúrio

ms = Milisegundos

Nd = Núcleo degenerado

Ni = Núcleo íntegro

NMDA = *N*-methyl-D-Aspartato

PCP = 1-(1-phenylcyclohexyl) piperidine HCL

Pdes = Pressão Desenvolvida

Pdiast = Pressão Diastólica

pH = Logarítmo Negativo de Base Decimal da Concentração de Íons Hidrogênio

PVC = Polyvinyl Chloride (Cloreto de Polivinila)

RS = Retículo Sarcoplasmático

SNA = Sistema Nervoso Autônomo

UI = Unidade Internacional

V = Volt

VE = Ventrículo Esquerdo

VS = Vaso sangüíneo

V0 = Volume Introduzido no Balão Intraventricular para Obtenção de Pressão
Diastólica de Zero mmHg

V30 = Volume Introduzido no Balão Intraventricular para Obtenção de Pressão
Diastólica maior ou igual a 30 mmHg

SÍMBOLOS:

H_2O = água

% = Por Cento

$^{\circ}\text{C}$ = Grau Celsius

ΔV = Variação de volume

$p < 0,05$ = Estatisticamente significativo

$p > 0,05$ = Estatisticamente não significativo

Ramin, SL. Avaliação hemodinâmica e morfológica da cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea em coração isolado de coelho. Botucatu, 2008, 86 p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) - Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Resumo

Foi realizado estudo experimental em coração isolado de coelhos, perfundido pelo método de Langendorff, para avaliar o efeito da cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea, durante e na manutenção por 30 minutos de parada cardíaca, conforme critérios hemodinâmicos e morfológicos. Foram utilizados 50 coelhos da linhagem Norfolk-2000, pesando 1850 a 2350 g, divididos em três grupos de corações isolados: Grupo C (n=10) cardioplegia sangüínea; Grupo CC (n=10) cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea e, Grupo PA (n=5) parada cardíaca anóxica. A função ventricular foi analisada pela técnica de balão intraventricular. Fragmentos de um único ventrículo esquerdo foram analisados como padrão de normalidade histopatológica. A análise estrutural e ultra-estrutural de fragmentos do ventrículo esquerdo após a parada cardíaca imediata por cardioplegia ou anóxica, seguida por período de manutenção. Foram obtidos os seguintes resultados: 1. Avaliação hemodinâmica. Pressão desenvolvida intraventricular (PDes): grupo C ($76,39 \pm 17,69$ mmHg e $62,08 \pm 32,13$ mmHg) $p < 0,05$; grupo CC ($89,26 \pm 16,37$ mmHg e $52,62 \pm 24,91$ mmHg) $p < 0,05$; grupo PA ($77,96 \pm 12,67$ mmHg e $60,81 \pm 29,68$ mmHg), pré e pós-tratamento, respectivamente. Primeira derivada temporal da pressão ventricular na sua deflexão positiva (dP/dt+): grupo C ($1236 \pm 181,15$ mmHg/seg e $1150,20 \pm 174,44$ mmHg/seg); grupo CC ($1372,61 \pm 214,19$ mmHg/seg e $1058,52 \pm 255,10$ mmHg/seg) $p < 0,05$; grupo PA ($1252,39 \pm 99,76$ mmHg/seg e $1115,10 \pm 73,07$ mmHg/seg), pré e pós-tratamento, respectivamente. Primeira derivada temporal em sua deflexão negativa (dP/dt-): grupo C ($856,01 \pm 132,26$ mmHg/seg e $783,62 \pm 177,54$ mmHg/seg); grupo CC ($948,11 \pm 106,34$ mmHg/seg e $760,28 \pm 219,37$ mmHg/seg); grupo PA ($911,02 \pm 74,53$ mmHg/seg e $818,95 \pm 219,09$ mmHg/seg), pré e pós-tratamento, respectivamente. 2. Avaliação morfológica. Análise percentual de núcleos de cardiócitos degenerados e íntegros, comparativamente entre grupos: C e PA ($p = 0,536$), CC e PA ($p < 0,005$), CC e C ($p < 0,05$). Análise estrutural do grupo parada anóxica mostrou sinais de

degeneração celular, como heterogeneidade na coloração citoplasmática, característica da isquemia. Avaliação estrutural do grupo CC revelou proteção miocárdica comparada ao grupo C. Avaliação ultra-estrutural dos grupos controle e parada anóxica foram contrastadas pela integridade celular dos cardiócitos do grupo controle. A proteção celular foi evidenciada pela integridade capilar, regularidade de parede, diminuição de vesículas de pinocitose e de cavéolas nos grupos C e CC. Entretanto, a integridade e regularidade endotelial foram mais uniforme no grupo CC, demonstrando melhor adaptação vascular ao sistema isolado. Concluiu-se que a cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea foi menos eficiente na preservação da função hemodinâmica que os demais grupos, porém, na avaliação morfológica estrutural e ultra-estrutural, o grupo cetamina S(+) apresentou maior integridade celular (integridade nuclear, mitocondrial, citoesqueleto, disco intercalar) sugerindo efeito protetor miocárdico quando comparado aos outros grupos, no período estudado.

Palavras-chave:

Cetamina S(+); cardioplegia sangüínea; hemodinâmica; morfologia; coração isolado.

Ramin, SL. Hemodynamic and morphological evaluation of S(+) ketamine associated with blood cardioplegia in isolated heart rabbit. Botucatu, 2008, 86 p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) - Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Abstract

An experimental study in isolated heart of rabbits, perfused by the Langendorff system, to evaluate the effect of S(+) ketamine associated with blood cardioplegia during and in the maintenance during 30 minutes of the cardiac arrest according to hemodynamic and morphological criteria. A total of 50 Norfolk-2000 rabbits, weighting 1850 to 2350 g, were divided into three groups of isolated hearts: blood cardioplegia-BC (n=10); S(+) ketamine associated with blood cardioplegia-K (n=10), and anoxic cardiac arrest-CA (n=5). The ventricular function was analyzed by the intra-ventricular balloon technique. The structural and ultrastructural analysis of fragments of the left ventricle after immediate cardiac arrest by cardioplegia or anoxic arrest, followed by maintenance period. The fragments of the left ventricle were analyzed as pattern of histopathological normality. The following results were obtained: 1. Hemodynamic evaluation. Intra-ventricular developed pressure (IVDP) was: group BC (76.39 ± 17.69 mmHg and 62.08 ± 32.13 mmHg) $p < 0.05$; group K (89.26 ± 16.37 mmHg and 52.62 ± 24.91 mmHg) $p < 0.05$; group CA (77.96 ± 12.67 mmHg and 60.81 ± 29.68 mmHg), pre and posttreatment, respectively. First derivative of intra-ventricular pressure in its positive deflection (dP/dt+) was: group BC (1236 ± 181.15 mmHg/sec and 1150.20 ± 174.44 mmHg/sec); K (1372.61 ± 214.19 mmHg/sec and 1058.52 ± 255.10 mmHg/sec) $p < 0.05$; CA (1252.39 ± 99.76 mmHg/sec and 1115.10 ± 73.07 mmHg/sec), pre and posttreatment, respectively. First derivative pressure in its negative deflection (dP/dt-) was: group BC (856.01 ± 132.26 mmHg/sec and 783.62 ± 177.54 mmHg/sec); K (948.11 ± 106.34 mmHg/sec and 760.28 ± 219.37 mmHg/sec); CA (911.02 ± 74.53 mmHg/sec and 818.95 ± 219.09 mmHg/sec) pre and posttreatment, respectively. 2. Morphological evaluation. Percentual assessment of nuclei of degenerated and intact cardiac cells, comparatively among groups: BC and CA ($p = 0.536$); K and CA ($p < 0.005$); K and BC ($p < 0.05$). Structural analysis of group CA showed signs of cell degeneration such as heterogeneity in the cytoplasmic color, typical of the ischemia. Structural assessment of the group K revealed greater

protection when compared to the group BC and both demonstrated cellular protection to the ischemic response. Ultrastructural evaluation of the control and anoxic arrest groups was contrasted by the cellular integrity of the cardiac cells of the control group. The cell protection was evidenced by the capilar integrity, regularity of wall, decrease of pinocytic vesicles and caveolas in the groups BC and K. However, the endothelial integrity and regularity were more uniform in the group K, demonstrating better vascular adaptation to the isolated system. Concluding, the S(+) ketamine associated with blood cardioplegia was less efficient in the preservation of hemodynamic function than the other groups. However, in the morphological evaluation, the S(+) ketamine group showed greater cellular integrity (nuclear and mitochondrial integrity, cytoskeleton, intercalated disk) suggesting myocardial protector effect when compared to the others groups in the studied period.

Key-words:

S(+) ketamine; blood cardioplegia; hemodynamics; morphology; isolated heart.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVO.....	24
3. MATERIAL E MÉTODO.....	26
3.1. Animais utilizados.....	26
3.2. Delineamento experimental.....	26
3.3. Grupos experimentais.....	27
3.3.1. Grupo cardioplegia sangüínea.....	27
3.3.2. Grupo cetamina S(+) + cardioplegia sangüínea.....	27
3.3.3. Grupo parada cardíaca anóxica.....	27
3.3.4. Coração isolado controle.....	27
3.4. Estabilização hemodinâmica.....	28
3.5. Solução de cardioplegia sangüínea.....	28
3.6. Solução de cetamina S(+).....	28
3.7. Seqüência dos tempos experimentais.....	28
3.7.1. Anestesia.....	28
3.7.2. Heparinização.....	29
3.7.3. Assistência ventilatória.....	29
3.8. Para animal suporte.....	29

3.9. Para animal doador.....	30
3.10. Coração isolado.....	30
3.11. Procedimentos cirúrgicos.....	30
3.11.1. No animal doador.....	30
3.11.2. No animal suporte.....	31
3.12. Técnicas utilizadas.....	31
3.12.1. Sistema de perfusão sangüínea.....	31
3.12.2. Coração isolado.....	31
3.12.3. Balão intraventricular.....	31
3.12.4. Estimulação elétrica.....	32
3.13. Critérios de exclusão.....	32
3.14. Variáveis avaliadas.....	32
3.15. Avaliação morfológica.....	33
3.15.1. Microscopia de luz.....	33
3.15.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	33
3.16. Equipamentos utilizados.....	34
3.17. Métodos estatísticos.....	34
4. RESULTADO.....	41
5. DISCUSSÃO.....	55
5.1. Modelo experimental.....	55
5.1.1. Animal de experimentação.....	55
5.1.2. Modelo utilizado.....	56
5.2. Variáveis hemodinâmicas.....	57
5.2.1. Pressão desenvolvida.....	59
5.2.2. Primeira derivada temporal em sua deflexão positiva.....	60

5.2.3. Primeira derivad temporal em sua deflexão negativa.....	60
5.3. Avaliação morfológica.....	61
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS.....	65
8.ANEXO.....	83

1- INTRODUÇÃO

Há vários métodos para avaliação da função cardíaca, seja funcional, estrutural ou ultra-estrutural. O modelo de coração isolado foi desenvolvido por Langendorff (1895), e por simplicidade, ganhou rápida e ampla difusão no meio científico. Neste modelo de Langendorff modificado, apenas o leito coronário é perfundido com solução nutriente ou sangue; o ventrículo contrai-se, porém não ejeta. Desde 1900 há estudos e padronizações de soluções nutrientes para corações isolados de diversas espécies (Heymans & Kockman, 1904; Martins, 1996).

A utilização de sangue como nutriente apresenta vantagens, tais como, fluxos próximos aos fisiológicos *in situ*, melhor distribuição de oxigênio e menor edema após período de reperfusão (Rand et al, 1979; Murashita et al, 1990; Doring, 1990; Qiu et al, 1992; Shandu et al, 1993).

A comparação em corações isolados de coelhos, perfundidos com solução nutriente e sangue, por Qiu & Hearse, 1992, mostrou que a perfusão de corações maiores, como os de coelhos, foi perfeitamente viável com o uso de soluções nutrientes. Porém, houve superioridade da perfusão com sangue quanto à maior resistência à isquemia e ao menor conteúdo de água.

Após experiência anterior com corações isolados de coelhos, mostrando efeitos na função cardíaca com cetamina S(+) (Ramin, 2002) foi avaliada, nesse sistema de Langendorff modificado e nutrido com sangue, a proteção miocárdica com cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea.

A cirurgia cardíaca é facilitada pelo clampeamento da aorta ascendente, pois interrompe ao fluxo de sangue para as artérias coronárias, do que resulta um coração imóvel, relaxado e exangue. Isso resulta em interrupção do fornecimento de oxigênio, o que altera as atividades elétrica e mecânica do miocárdio. A isquemia por longos períodos não é bem tolerada pelo miocárdio. Dependendo do estado funcional do miocárdio e duração da isquemia, pode produzir alterações significativas nos miócitos. Isquemia por período menor que 15 - 20 minutos causa lesões bioquímicas e metabólicas reversíveis que não comprometem a função do miocárdio; porém, quando a isquemia for prolongada, há o desenvolvimento de lesão irreversível, que é tanto mais extensa quanto mais prolongada for a isquemia (Souza & Elias, 2006).

Apesar dos resultados contemporâneos da cirurgia cardíaca ser excepcionais, recentes modificações na tendência das populações de risco tem resultado no aumento do número de cirurgias cardíacas eletivas de alto risco e a crescente morbidade pós-operatória incluindo a síndrome de baixo débito (Martins et al., 2007). Muitas técnicas têm sido propostas para proteção do miocárdio, mas os resultados são difíceis de ser interpretados.

A proteção do miocárdio durante a cirurgia cardíaca, ainda é controversa e, sob certos aspectos, polêmica. Há concordância geral sobre a necessidade de proteger o miocárdio contra lesões da isquemia. Os métodos usados com essa finalidade são múltiplos e variados e, em muitos casos, baseados em dados empíricos. Os métodos e as técnicas destinados à proteção miocárdica têm acompanhado a evolução da cirurgia cardíaca (Levitsky & Feimberg, 1975).

A parada imediata dos batimentos cardíacos pode ser obtida com soluções cardioplégicas cristalóides ou sangüíneas (Cressoni et al., 2007). O agente que leva o coração à parada pode ser o potássio, o magnésio, a procaína ou mesmo os quelantes e os bloqueadores de cálcio, associados entre si ou não e contanto com adição da hipotermia ou não (Souza & Elias, 2006).

A cardioplegia química induzida pela infusão de potássio, na raiz da aorta, foi proposta por Melrose (1955) e vem sendo muito estudada (Hearse et al., 1978; Buckberg, 1979; Martins et al., 2007). Em nosso meio Braile (1992) difundiu as vantagens da cardioplegia química definindo suas principais características: a cardioplegia química busca eliminar as conseqüências da isquemia pela criação de um ambiente no qual, o consumo de energia possa ser diminuído, ao mesmo tempo em que se consiga aumentar a sua produção para suprir a demanda básica. A solução cardioplégica deve proteger o coração ao invés de lesá-lo, pelos seus próprios componentes; distribuir-se homogeneamente por todo o miocárdio, em quantidades suficientes para produzir o efeito desejado; ter o seu efeito mantido pelo tempo em que durar o clampeamento aórtico (Braile, 1992).

Existem inúmeras composições para soluções cardioplégicas cristalóides. Todas estas soluções usam como agente causador da parada do coração, o cloreto de potássio; algumas acrescentam o magnésio. A hipercalemia extracelular causa assistolia prolongada, pela despolarização das membranas celulares, que é mantida, enquanto a concentração de potássio extracelular permanecer elevada. A concentração exata de potássio que uma solução de cardioplegia necessita não é

conhecida, as soluções em uso têm o potássio em quantidades que variam entre 16 e 25 mEq/L (Souza & Elias, 2006). Os veículos mais comuns de soluções cardioplégicas incluem Ringer®, soro glicosado a 5% e outras soluções com baixo teor de sódio, principalmente. A solução mais popular é a solução de St. Thomas número 2, desenvolvida por Brainbridge et al (1977).

A introdução da cardioplegia sangüínea seguiu a demonstração de que o miocárdio, mesmo parado e hipotérmico, mantinham as atividades celulares, cujas necessidades poderiam ser atendidas, com a oferta de oxigênio durante a administração das soluções (Braile et al, 1991, Godoy & Braile, 1994). O sangue do perfusato é o veículo mais adequado à infusão dos agentes cardioplégicos. O perfusato cede oxigênio aos tecidos e transporta o dióxido de carbono, tem sistemas tampão naturais, nas concentrações desejáveis para manter o pH ideal, pressões coloido-osmóticas adequadas, concentração adequada dos diversos íons importantes para a função celular, substratos nutritivos e removedores naturais de radicais livres (Souza & Elias, 2006). Segundo Braile (1992) existem indicadores que demonstram a superioridade da cardioplegia sangüínea sobre a cardioplegia cristalóide, em determinadas circunstâncias, tais como: a) tempo de parada cardíaca prolongada; b) proteção do miocárdio infantil; c) proteção do miocárdio hipertrofiado; d) disfunção ventricular grave; e) isquemia recente.

A cardioplegia sangüínea consiste de perfusato modificado pela adição de diversos componentes, eletrólitos, aminoácidos, bicarbonato de sódio e um agente quelante de cálcio, além de vasodilatadores. Algumas composições são adicionadas de insulina simples (Buckberg, 1979).

Nos períodos de clampeamento aórtico mais curtos, abaixo de 30 ou 40 minutos, ou na correção das doenças que afetam pouco a dinâmica cardíaca, é difícil demonstrar a superioridade de um tipo sobre o outro, especialmente se a cardioplegia cristalóide for oxigenada. Durante a cardioplegia, para que a diástole seja mantida, é necessário que o cálcio intracelular responsável pela contração seja ativamente bombeado para dentro do retículo sarcoplasmático (RS). O cálcio intracelular residual é o responsável pela tensão da parede. Deve ser lembrado que o mecanismo de seqüestro do cálcio é ativo, depende da sua concentração intracelular e implica em gasto de energia, que deve ser economizada durante a parada cardíaca (Braunwald & Little, 1997).

O anestésico venoso cetamina, tem no seu mecanismo de ação estreito relacionamento com o cálcio. Estudos recentes, em pacientes submetidos à cirurgia do miocárdio e anestesiados com cetamina e propofol mostraram necessidade do uso de agentes inotrópicos, tempo de extubação traqueal e ocorrência de infarto do miocárdio menor em relação aos pacientes anestesiados com fentanil e enflurano (Botero et al., 2000); a utilização de cetamina e propofol foi, também, realizada (Golden, 2001) durante a anestesia em recém-nascidos portadores de doenças, mostrando boa estabilidade hemodinâmica. A administração da cetamina antes da indução com propofol preservou a estabilidade hemodinâmica quando comparada com o propofol isoladamente (Furuya et al., 2001).

A comparação entre cetamina e isoflurano em operações cardíacas realizadas em crianças com tetralogia de Fallot (Tugrul et al., 2000) mostrou que a cetamina é recomendada como alternativa na manutenção da anestesia para a correção cirúrgica, quando foram comparadas: pressão arterial média, frequência cardíaca, saturação arterial de oxigênio, tensão arterial de dióxido de carbono, pH arterial e excesso de base, porém, Zickmann et al. (2000) concluíram que não houve maiores diferenças nos perfis hemodinâmicos da cetamina S(+) em relação à mistura racêmica e que a cetamina S(+) não proporcionou vantagens hemodinâmicas sendo que o uso de ambas seria limitado a situações clínicas em que os pacientes tivessem reserva coronariana.

A cetamina foi sintetizada em 1963 (Murray, 1994) e a farmacologia inicial foi investigada por McCarthy et al. (1965). Esse anestésico ocupa lugar de destaque na prática clínica. Desde sua liberação para o uso clínico (Domino et al., 1965), têm surgido inúmeros trabalhos clínicos e experimentais, na busca do anestésico intravenoso “ideal”. A cetamina interage com diversos receptores como N-methyl-D-aspartato (NMDA), opióides, monoaminérgicos, muscarínicos e canais de cálcio voltagem-sensível (Hirota & Lambert, 1996). Trata-se de um potente analgésico em concentrações subanestésicas e seus efeitos analgésicos e anestésicos podem ser mediados por diferentes mecanismos. Ao contrário dos demais anestésicos venosos, não interage com receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) (Stoelting, 1999).

Os efeitos hemodinâmicos da cetamina são complexos, incluindo-se ação cardíaca direta e ativação do sistema nervoso autônomo (Tweed et al., 1972; Ivankovich et al., 1974). Seus efeitos cardiovasculares têm amplo espectro, agindo como fármaco inotrópico positivo e negativo. Desse modo, nos pacientes que fazem

uso da cetamina são observados: aumento do débito cardíaco, da pressão arterial sanguínea e da frequência cardíaca, estimulação cardíaca (Traber et al, 1968); atividade antiarrítmica (Goldberg et al., 1970; Dowdy & Kaya, 1967; Hamilton & Bryson, 1974) e depressão miocárdica (Goldberg et al., 1970; Ramin, 2002).

Em estudo realizado por Konsayreepong et al (1993), a cetamina diminuiu a concentração de Ca^{++} intracelular, mas, não alterou a sensibilidade miofibrilar ao Ca^{++} e diminuiu o influxo transsarcolêmico do mesmo, causando, com isso efeito inotrópico negativo. Esse anestésico induziu o bloqueio tônico dos canais de sódio cardíaco com diminuição na velocidade máxima do início do potencial de ação rápido e da velocidade de condução (Hara et al., 1994); diminuiu a corrente de potássio retificadora para dentro da célula e a corrente retificadora retardada em miócitos ventriculares (Seagusa et al., 1986; Baum, 1993). Nesses, a cetamina inibiu o influxo de íons Ca^{++} através dos canais de cálcio, voltagem-dependentes em concentrações usadas na clínica (Baum & Tecson, 1991; Baum et al., 1994). Em corações isolados a cetamina induziu bradicardia, diminuiu a condução ventricular longitudinal e transversal de maneira dose-dependente. Prolongou o período refratário efetivo ventricular, sem alterar a dispersão da refratariedade (Aya et al., 1997).

A ação direta da cetamina no coração de ratos apresenta efeitos inotrópicos positivos no músculo papilar e no átrio esquerdo (Riou et al., 1989; Endou et al., 1992). Estudos realizados em diferentes condições experimentais, em preparações comuns, utilizando corações isolados (Dowdy & Kaya, 1967; Stowe et al., 1992; Graf et al., 1995), animais intactos (Pagel et al., 1992) e em humanos (Waxman et al., 1980) mostraram que a cetamina racêmica deprime a contratilidade miocárdica, quando comparada ao seu isômero S(+), em todos os casos, inclusive em operações de revascularização do miocárdio, e na função cardíaca em coração isolado de coelhos (Ramin, 2002).

Visto que há resultados conflitantes na literatura e considerando que cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea exigem a parada imediata do batimento cardíaco, que pode ser obtida com soluções cardioplégicas sanguíneas, justifica-se a realização do presente estudo experimental, pois resultados obtidos pela cardioplegia podem reduzir danos isquêmicos e, conseqüentemente, minimizar lesões provocadas ao músculo cardíaco, o que permitiria transferir para os pacientes da espécie humana melhor proteção ao miocárdio. Além disso, não foram

encontrados trabalhos sobre efeito da cetamina S(+) associada à solução de cardioplegia sangüínea na proteção miocárdica de corações isolados de coelho.

2- OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar, sob parâmetros hemodinâmicos e morfológicos, os efeitos da associação da cetamina S(+) à solução de cardioplegia sangüínea na proteção miocárdica em sistema de coração isolado de coelho.

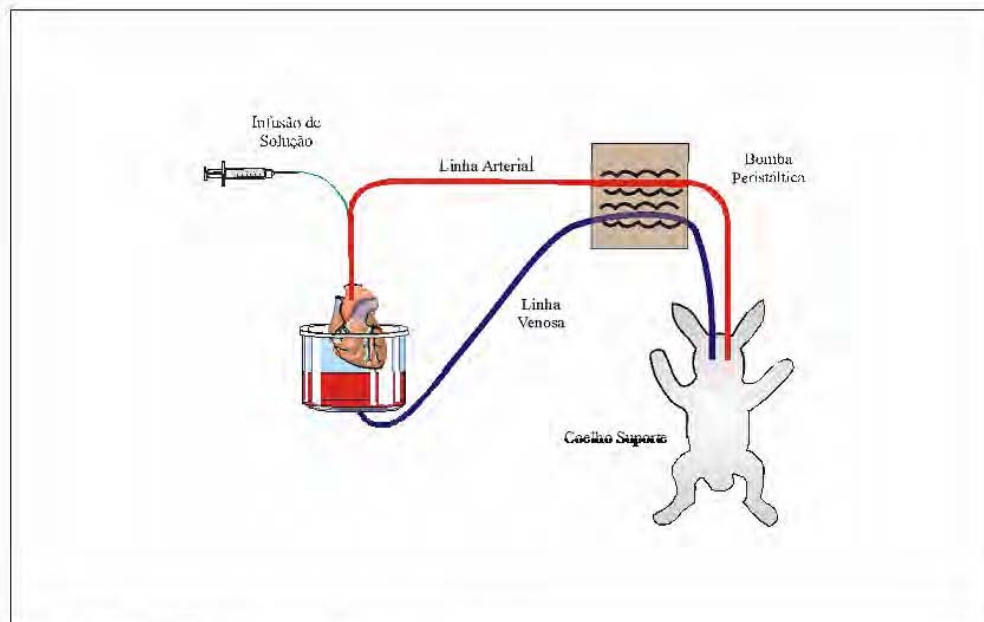


Figura 1 - Sistema de Langendorff (modificado), Ramin, 2002

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizados 50 coelhos adultos, da raça Norfolk-2000, variante Botucatu, de ambos os sexos, com peso médio de $2.955 \pm 212,1$ gramas, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu-UNESP. Os experimentos realizados estão de acordo com o COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram avaliados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob o Protocolo No. 469 (Anexo).

3.2. Delineamento experimental

Utilizou-se um animal, dito doador, por experimento, que forneceu o coração isolado, e outro animal, denominado suporte, que forneceu o sangue nutriente para o coração isolado. A distribuição dos animais, nos diversos grupos experimentais, realizou-se mediante sorteio.

Os corações foram submetidos à cardioplegia com solução cardioplégica de indução (velocidade de 60 mL.h^{-1} , 90 mL.h^{-1} , ou 120 mL.h^{-1} , até a parada dos batimentos cardíacos) e mantidos com solução cardioplégica de manutenção (60 mL.h^{-1} , 90 mL.h^{-1} ou 120 mL.h^{-1}). As soluções anestésicas A (solução de cardioplegia sangüínea + solução fisiológica) e solução B (composta por cetamina S (+) + cardioplegia sangüínea), foram infundidas continuamente, na velocidade constante de $0,4 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, as quais foram diluídas por uma bioquímica, sendo colocadas em tubos iguais denominados tubos A e B. Os grupos A e B receberam soluções mediante randomização. A avaliação da função ventricular foi realizada em duas etapas: (1) antes da administração da cardioplegia, após 20 minutos para a estabilização hemodinâmica e (2) após período 30 minutos de cardioplegia (pós-cardioplegia), após período de estabilidade hemodinâmica. No terceiro grupo (parada cardíaca anóxica), os corações isolados foram mantidos em anóxia por período de 30 minutos. Para uma melhor compreensão do delineamento experimental construiu-se um diagrama com os principais passos dos procedimentos (Figura 2).

Após 20 minutos de estabilização da preparação, iniciou-se o protocolo de leituras para obtenção de variáveis hemodinâmicas mediante aumento do volume do balão intraventricular. Foram registradas leituras pré e pós-experimento.

3.3. Grupos experimentais

Para entendimento dos procedimentos experimentais e do manuseio dos corações isolados, as principais etapas do procedimento experimental estão ilustradas nas Figuras 3, 4, 5, 6 e 7.

3.3.1. Grupo cardioplegia sangüínea (GC)

Constituído de 10 corações isolados de coelhos, submetidos à infusão da solução A, com parada cardíaca induzida e mantida com cardioplegia, sem cetaminaS(+), durante 30 minutos.

3.3.2. Grupo cetamina S(+) + cardioplegia sangüínea (GCC)

Constituído de 10 corações isolados de coelhos, submetidos à infusão da solução B, com parada cardíaca induzida e mantida com cardioplegia, associada a cetamina S(+), durante 30 minutos.

3.3.3. Grupo parada cardíaca anóxica (PA)

Grupo controle de 5 corações isolados de coelhos, iniciados e mantidos em anóxia, por 30 minutos.

3.3.4. Coração isolado controle (CIC)

Coração isolado foi retirado de coelho com as características biométricas e de idade semelhantes aos grupos experimentais e coletados fragmentos do ventrículo esquerdo (VE) para exames histológicos e ultra-estruturais padrão, chamado de coração isolado controle.

3.4. Estabilização hemodinâmica

Os corações foram perfundidos continuamente com sangue do animal suporte pela raiz da aorta, à pressão constante de 70 mmHg, banhados em solução de Ringer Lactato® com temperatura ao redor de 37°C. Após o início da perfusão nesse sistema, aguardou-se período de 20 minutos para a estabilização hemodinâmica. A seguir, procederam-se as elevações seqüenciais do volume do balão intraventricular, até obter-se Pdiast de 30 mmHg.

3.5. Soluções de cardioplegia sangüínea

A solução de cardioplegia de indução foi composta de cloreto de potássio (75 mEq), cloreto de magnésio (40 mEq), glutamato monossódico (30 mM) e aspartato monossódico (30 mM).

A solução de cardioplegia de manutenção foi composta de cloreto de potássio (25 mEq), cloreto de magnésio (15 mEq), glutamato monossódico (15 mM) e aspartato monossódico (15 mM).

3.6. Solução de cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea

A solução B composta por cetamina S (+), na concentração de 0,25% (2,5 mg/mL), o que correspondeu a 1 mg.kg⁻¹.h⁻¹, associada às cardioplegias sangüíneas de indução e manutenção, foi infundida na velocidade de 0,4 mL.kg⁻¹.h⁻¹, até o final do experimento. A solução foi administrada, em Y conectado ao cateter de perfusão sangüínea da aorta, utilizando-se uma bomba de infusão eletroeletrônica produzida pela Samtronic®, modelo 680 - Brasil.

3.7. Seqüência dos tempos experimentais

3.7.1. Anestesia

A anestesia foi realizada com pentobarbital sódico (30 mg.kg⁻¹ i.v.) aplicada lentamente pela veia auricular direita. Antes da esternotomia, quando necessário,

aplicou-se mais 7,5 mg/kg, i.v. em bolus e foram administradas doses de reforço (15 mg.kg⁻¹ i.v.) de pentobarbital sódico, a cada 60 minutos.

3.7.2. Heparinização

Administrou-se heparina intravenosa na dose de 5000 UI i.v., em bolus, para os animais doadores, a qual foi realizada juntamente com a anestesia, na veia auricular direita.

Para os animais suportes, após a dissecação da veia jugular direita, administrou-se uma dose de 5000 UI i.v. de heparina e doses de reforço (2500 UI i.v.) a cada 45 minutos.

3.7.3. Assistência ventilatória

Utilizou-se sistema descrito por Martins (1996) com enriquecimento de oxigênio.

3.8. Para animal suporte

Indução anestésica com pentobarbital sódico (30 mg.kg⁻¹) i.v.; tricotomia em região anterior do tórax; colocação do animal em goteira de Claude Bernard, com aquecimento térmico por convecção; dissecação da veia jugular externa direita e canulação da mesma com cateter de polivinil; heparinização (5000 UI) i.v.; dissecação da artéria carótida direita e canulação da mesma com cânula de PVC de tamanho apropriado; dissecação da traquéia e canulação da mesma com cânula apropriada; colocação em assistência ventilatória, sob anestesia de manutenção (15 mg.kg⁻¹) i.v. de pentobarbital sódico, a cada 60 minutos; conexão com tubos da bomba peristáltica dupla, Harvard Apparatus®, modelo 1250 A – USA (Figura 1).

Foi realizada a hidratação com Ringer lactato acrescido de sangue retirado do doador, bicarbonato de sódio (8,4%) e cálcio (5 mL de bicarbonato de cálcio a 10% e 10 mL gluconato de cálcio), em infusão contínua, para manter a homeostasia do coelho suporte.

3.9. Para animal doador

A indução anestésica foi realizada com pentobarbital sódico (30 mg.kg-1i.v.); tricotomia em região anterior do tórax; heparinização (5000) UI i.v.; toracotomia médio-esternal; dissecação romba do timo; pinçamento da aorta; abertura do saco pericárdico; retirada rápida do coração; excisão dos restos pulmonares; abertura da artéria pulmonar; abertura da aorta; canulação da aorta com cânula apropriada Braile®; atriotomia esquerda ampla; colocação do balão intraventricular esquerdo; início da perfusão com retirada de ar do sistema arterial, colocado o coração numa cuba contendo sangue e Ringer lactato, aquecidos a 37 °C (Figura 4).

3.10. Coração isolado

Imediata condução dos corações para o sistema de perfusão de Langendorff (modificado); conexão na linha de perfusão do aparelho; perfusão segundo princípios de Langendorff, modificado por Heimans & Kockman (1904) com pressão constante de 70 mmHg; período de estabilização de 20 minutos; estimulação elétrica cardíaca com 150 estímulos por minuto; determinação da pressão diastólica intraventricular igual zero (V0) e da pressão diastólica intraventricular igual 30 mmHg (V30); verificação do volume final do balão; separação do ventrículo do esquerdo (Figura 5).

3.11. Procedimentos cirúrgicos

3.11.1. No animal doador

Incisão de 10 cm, interessando a pele e subcutâneo, com lâmina 11, iniciada em região cervical e terminada no apêndice xifóide; secção longitudinal do osso esterno com tesoura de Mayo; colocação de afastador ortostático; divulsões rombas das pleuras; incisão longitudinal no pericárdio com Lexter; reparo da aorta com fio de algodão 2-0; pinçamento da aorta com pinça de Halsted; incisão na aorta com lâmina 11; canulação da aorta com cânula polivinil.

3.11.2. No animal suporte

Incisão de 3,5 cm, interessando pele e subcutâneo; dissecação, com Lexter, da veia jugular direita e ligadura com fios de algodão 2-0; canulação da mesma com cateter de polivinil; heparinização; dissecação, com Lexter, da artéria carótida direita, ligadura com fios de algodão 2-0 e canulação da mesma com tubo de polivinil; colocação da cânula traqueal e iniciado assistência ventilatória; conexão com linhas venosa e arterial da bomba peristáltica.

3.12. Técnicas utilizadas

3.12.1. Sistema de perfusão sangüínea

O sistema de perfusão sangüínea constituiu-se de: (1) circuito arterial, que mediante bomba peristáltica, retirava-se o sangue do animal suporte e injetava na raiz da aorta do coração isolado e, (2) circuito venoso, que continha sangue coletado na cuba, após infusão de sangue na aorta do coração isolado; esse sangue venoso foi devolvido para o coelho suporte por bomba peristáltica em velocidade semelhante à da infusão sangüínea na aorta do coração isolado.

3.12.2. Coração isolado

Canulada a aorta, o coração foi removido para a cuba coletora e, então, iniciou-se a perfusão sangüínea. O átrio esquerdo foi aberto para permitir a drenagem do VE. O eletrodo do termômetro do aparelho Sistema Biopac S100 é colocado dentro da cuba coletora, para manter a temperatura ao redor de 37°C.

3.12.3. Balão intraventricular

De padronização do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Clínica Médica da FMB - UNESP (Matsubara, 1993; Martins, 1996), utilizando-se transdutor de pressão do sistema Biopac® MP100, o balão intraventricular é colocado no VE, através da válvula mitral e fixado em parede atrial com algodão 2-0. Por meio de seringa de 1 mL, determinou-se qual o maior volume que não elevasse a pressão diastólica acima de zero, denominou-se de V0; realizaram-se incrementos

sucessivos de volume de 0,1 mL, até obter-se a pressão diastólica de 30 mmHg, a qual foi denominada-se volume máximo (V30).

3.12.4. Estimulação elétrica

Estimulou-se eletricamente por meio de eletrodo do aparelho Braille Biomédica (modelo ES com 5 V de saída e 1,5 ms de largura de pulso) em 150 estímulos por minuto, posicionada externamente e em contato com a parede do VE.

3.13. Critérios de exclusão

Utilizou-se no presente estudo os seguintes critérios de exclusão para os animais e sistemas de coração isolado: 1. Quaisquer sinais de infecção de vias aéreas após a anestesia; 2. tempo entre retirada do órgão e início da perfusão maior que 2 minutos; 3. arritmia grave, caracterizada por fibrilação ventricular; 4. extrassístoles ventriculares ($> 10/\text{min}$); 5. arritmia atrial com alta resposta ventricular (>150), após período de estabilização; 6. ao final do experimento, volume obtido no balão menor que o infundido; 7. deslocamento do balão.

Para os animais suporte utilizaram-se os critérios de exclusão como falência do animal suporte: sinais de hipotensão ou acidemia grave que compromettesse homeostasia dos animais ou dos corações isolados e morte do suporte.

3.14. Variáveis avaliadas

Utilizou-se a variável biométrica de peso corporal dos coelhos doador e suporte, e as variáveis hemodinâmicas como pressão desenvolvida (Pdes), primeira derivada temporal da pressão intraventricular em sua deflexão positiva ($dP/dt+$) e primeira derivada temporal da pressão intraventricular em sua deflexão negativa ($dP/dt-$).

A pressão desenvolvida (Pdes) para avaliação da função sistólica foi obtida pela subtração da pressão intraventricular em relação pressão diastólica (Buckberg, 1979); $dP/dt+$ para avaliação da função sistólica (Feinberg, 1968; Chen et al., 1993; Ezzaher et al., 1994; Bolling et al., 1994); $dP/dt-$ para análise da função ventricular diastólica, em especial na sua fase ativa.

3.15. Avaliação morfológica

3.15.1. Microscopia de luz

Os fragmentos do ventrículo esquerdo de aproximadamente 3 mm³ foram fixados por imersão em solução fixadora Karnovsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2 - 0,1M) por 24 horas, lavados em água destilada, desidratados em série crescente de etanol, incluídos em historresina (Leica historesin embedding kit). Após a devida polimerização, foram feitos cortes de 3 µm com navalha de vidro em microtótomo automático Leica. Os cortes foram coletados em lâminas histológicas e foram procedidas as colorações de rotina pelo método da hematoxilina-eosina.

3.15.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos do ventrículo esquerdo de aproximadamente 1 mm³ foram fixados em solução de glutaraldeído a 3% diluído em tampão Milloning a pH 7,3 acrescido de ácido tânico a 0,25% durante 24 horas segundo Cotta-Pereira et al. (1976). Após lavagem no tampão diluidor, o material foi pós-fixado em solução a 1% de tetróxido de ósmio por 2 horas, no mesmo tampão, lavado novamente em água destilada, desidratado em série crescente de acetona e incluído em moldes de silicone em resina Araldite. A polimerização da resina se deu em estufa a 60 °C por 36 horas. Os cortes semifinos e ultrafinos foram feitos respectivamente em navalha de vidro e de diamante, em ultramicrotomo LKB. As telas de cobre com 200 mesh, contendo os cortes ultrafinos foram contrastadas com solução de acetato de uranila a 2% (20 min), lavadas em água bidestilada, mergulhadas em solução de citrato de chumbo a 2% (10 min). As observações e obtenção de negativos micrográficos foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão LEO-Zeiss 906 operado em 80 kV.

3.16. Equipamentos utilizados

Utilizou-se, para obtenção das variáveis hemodinâmicas, o Sistema Analisador Biopac® S100; para o estabelecimento do circuito extracorpóreo entre animal suporte e coração isolado, foi utilizado bomba peristáltica Harvard Apparatus®, modelo 1250 A – USA; soluções anestésicas foram administraram-se utilizando bomba Samtronic®, Modelo 980 – Brasil; a manutenção da temperatura do animal suporte foi realizada com sistema de aquecedor por convecção e campos cirúrgicos; água aquecida na cuba coletora foi circulada com unidade termocirculadora para cardioplegia da Macchi® - Brasil; para verificação da temperatura nos corações isolados, utilizou-se termômetro próprio do Sistema Biopac® S100, e temperatura do animal suporte, utilizou-se termômetro de massa com escala variando de 25 a 42°C; circuito extracorpóreo entre animal suporte e coração isolado, utilizou-se tubos de equipo de PVC.

3.17. Métodos Estatísticos

As variáveis quantitativas quando apresentaram distribuição gaussiana e igualdade de desvio padrão entre grupos foram analisadas com auxílio do teste t de Student pareado ou análise de variância. As variáveis qualitativas nominais foram analisadas com teste exato de Fisher. Admitiu-se erro α de 5%, sendo considerado significativo os valores de $P \leq 0.05$.

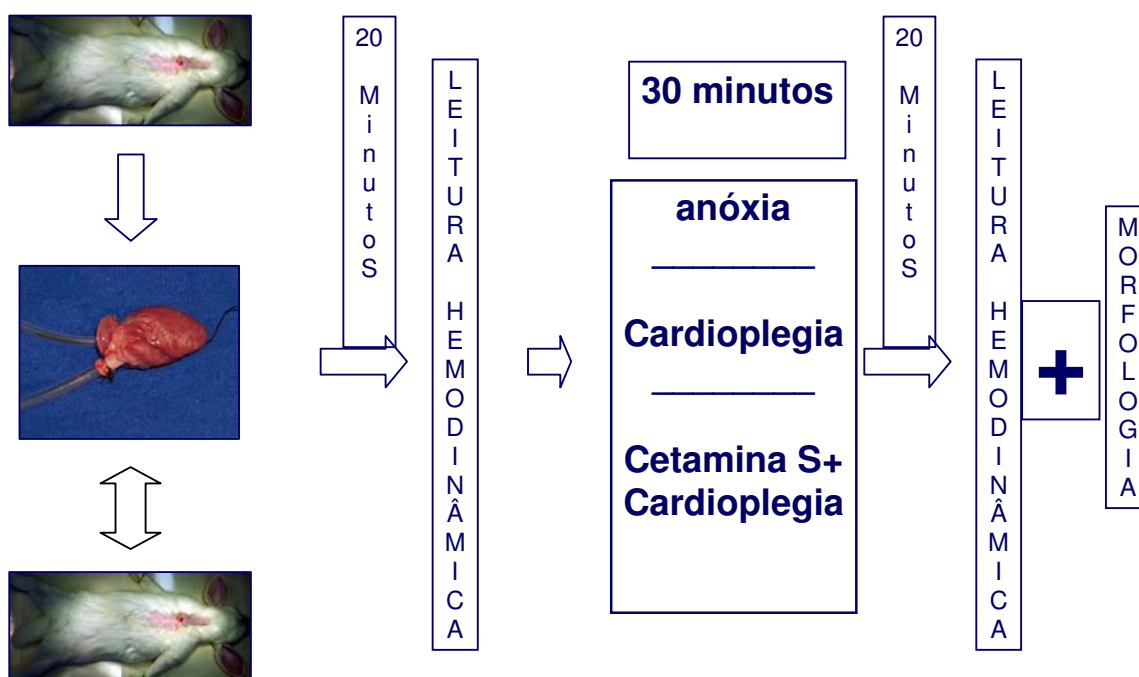


Figura 2 – Esquema de delineamento experimental

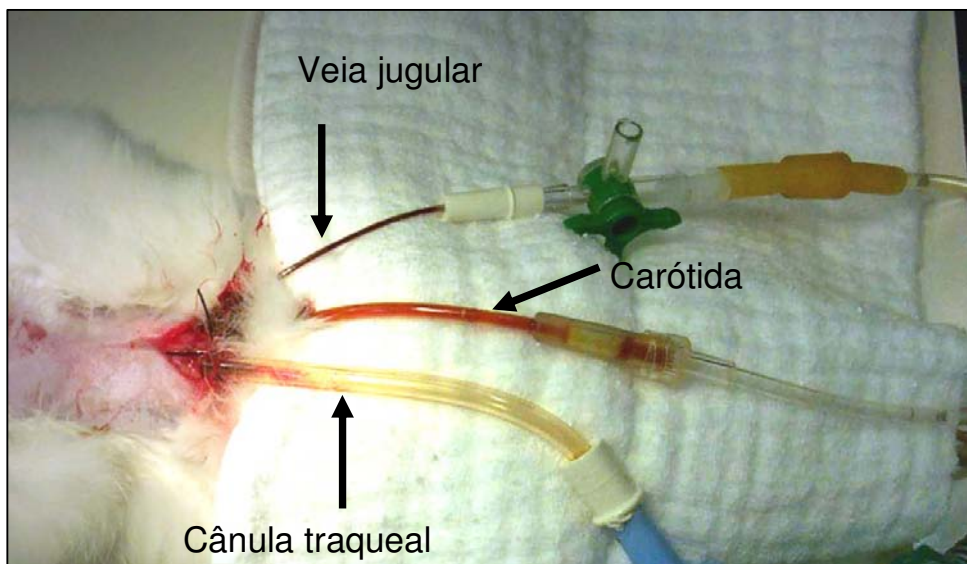


Figura 3 – Animal suporte preparado



Figura 4 – Animal doador preparado

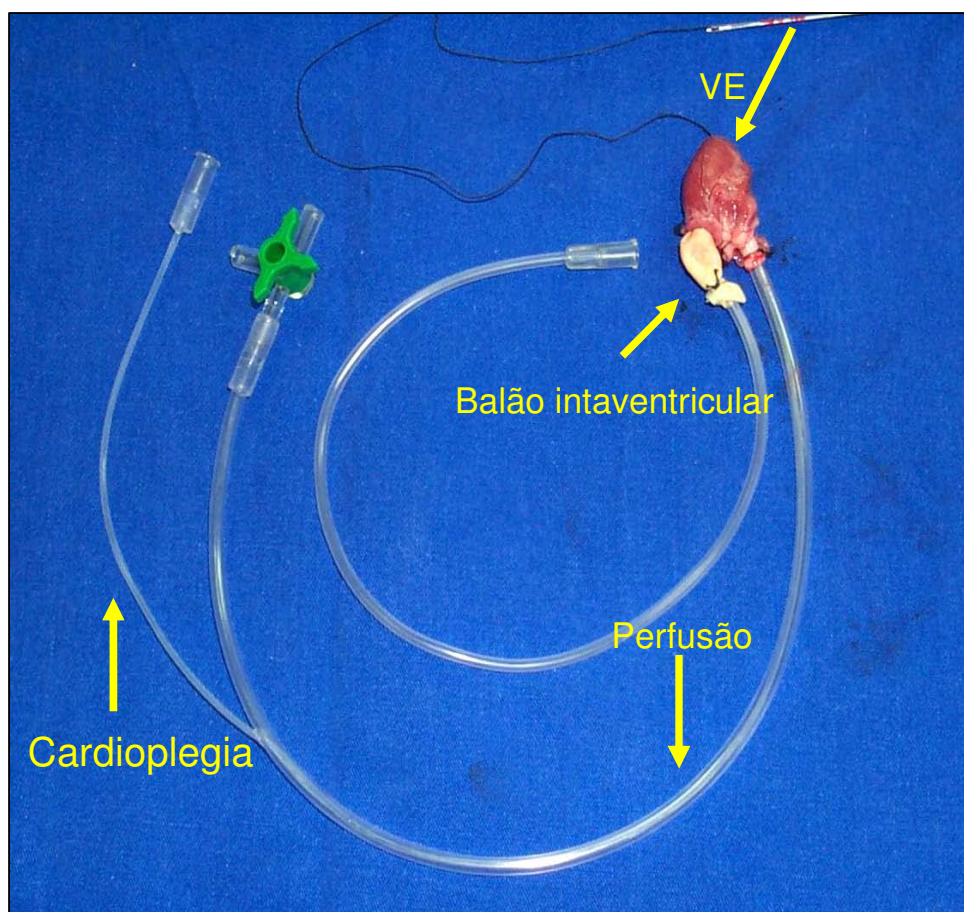


Figura 5 – Cânula de perfusão e cânula de balão intraventricular

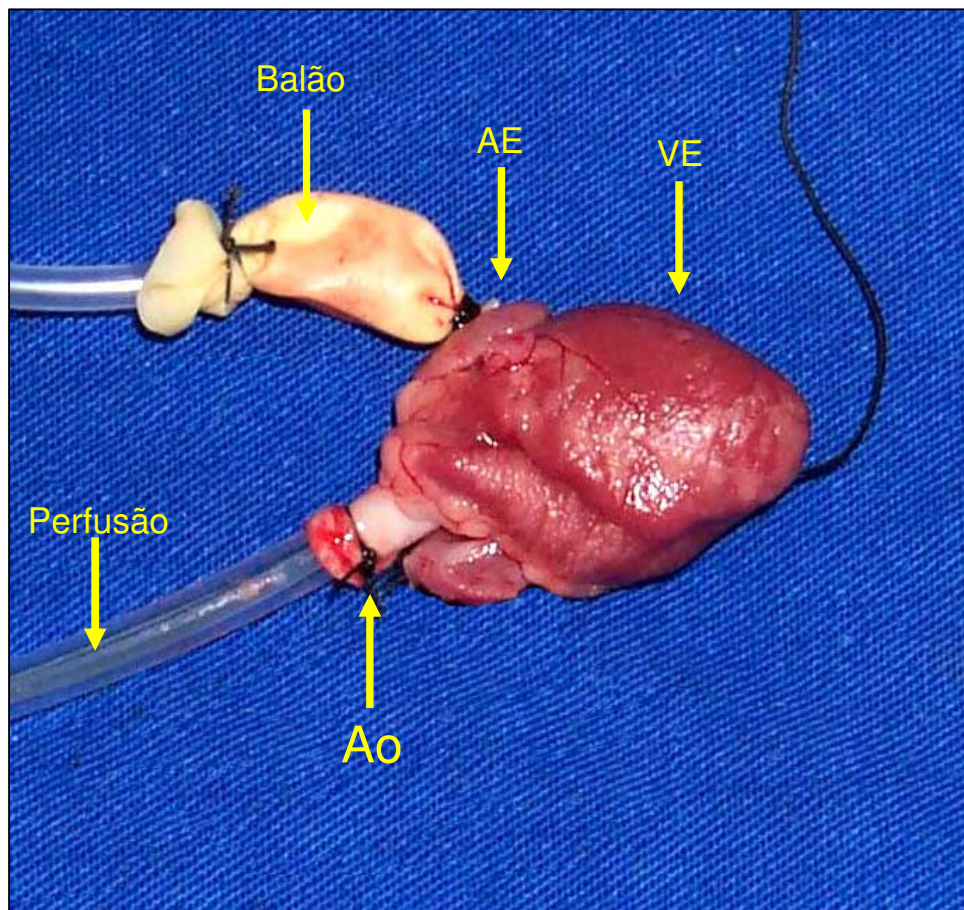


Figura 6 – Cânula de balão intraventricular e aorta canulada

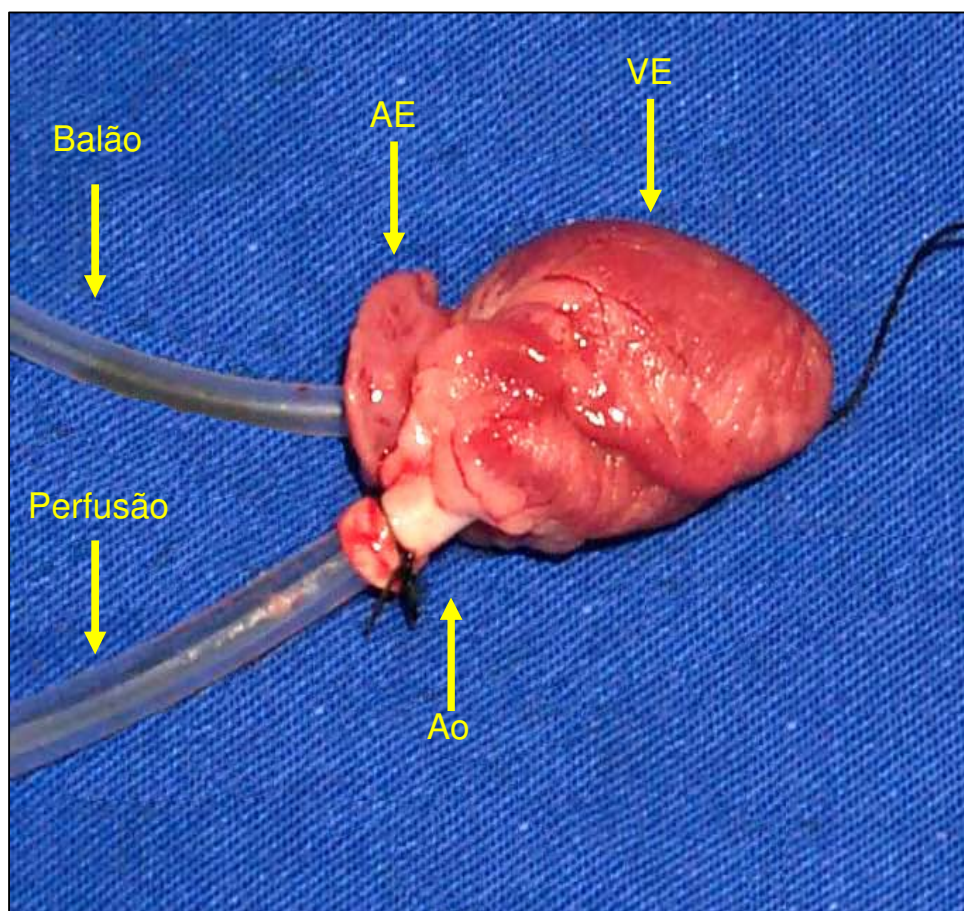


Figura 7 – Sistema de perfusão e balão intraventricular

4. RESULTADOS

A análise dos resultados revelou importantes diferenças hemodinâmicas, nos momentos antes e após parada cardíaca, e morfológicas (estruturais e ultra-estruturais) quando comparados os grupos experimentais: controle, cardioplegia sangüínea (GC), cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea (GCC) e parada anóxica (GPA).

A análise dos resultados de pressão desenvolvida e primeira derivada temporal da pressão intraventricular em sua deflexão positiva revelou importantes diferenças: redução estatisticamente significante entre as pressões desenvolvidas ($P = 0,026$) pré e pós-tratamento, ambas do grupo cardioplegia (Tabela 1). Redução pressões desenvolvidas ($P = 0,0144$) pré e pós-tratamento e derivadas positivas ($P = 0,013$) pré e pós-tratamento, no grupo cetamina S(+) associada à cardioplegia (Tabelas 1 e 2). Não houve diferenças significativas entre as pressões da primeira derivada temporal em sua deflexão negativa (Tabela 3).

Os valores dos parâmetros quantitativos aqui avaliados estão dispostos em tabelas que apresentam os dados em forma de valores médios e desvios-padrão (Tabelas 1 a 3).

Tabela 1 – Média e desvio-padrão dos valores de PDes cardioplegia, PDes cetamina S(+) + cardioplegia e PDes anóxica (mmHg)

Grupos	Pré	Pós	P
PDes cardioplegia	76,39 ± 17,69	62,08 ± 23,13	0,026
PDes cetamina S(+)	89,26 ± 16,37	52,62 ± 24,91	0,0144
PDes anóxica	77,96 ± 12,67	60,81 ± 29,68	0,3393
Teste t de Student			

Tabela 2 – Média e desvio-padrão dos valores de dP/dt+ cardioplegia, dP/dt+ Cetamina S(+) + cardioplegia e dP/dt+ anóxica (mmHg/s)

Grupos	Pré	Pós	P
dP/dt+ cardioplegia	1236,73 ± 181,15	1150,20 ± 174,44	0,0882
dP/dt+ cetamina S(+)	1372,61 ± 214,19	1058,52 ± 255,10	0,013
dP/dt+ anóxica	1252,39 ± 99,76	1115,10 ± 173,07	0,3225
Teste t de Student			

Tabela 3 – Média e desvio-padrão dos valores de dP/dt- cardioplegia, dP/dt- Cetamina S(+) + cardioplegia e dP/dt- anóxica (mmHg/s)

Grupos	Pré	Pós	P
dP/dt- cardioplegia	856,01 ± 132,26	783,62 ± 177,54	0,3023
dP/dt- cetamina S(+)	948,11 ± 106,34	760,28 ± 219,37	0,0519
dP/dt- anóxica	911,02 ± 74,53	818,95 ± 219,09	0,491
Teste t de student			

A avaliação do percentual de núcleos de cardiócitos degenerados e íntegros comparativamente entre os grupos experimentais, utilizando-se de avaliação não paramétrica, não revelou diferenças significativas entre GC e GPA ($P = 0,536$), contudo essas diferenças puderam ser detectadas nas comparações entre GCC e GPA ($P=0,0026$) e entre GCC e GC ($P=0,0345$) como demonstrado nas Tabelas 4 a 6. Esses dados indicam, portanto que a cetamina S(+) teve um papel eminentemente protetor em termos de degeneração nuclear nos cardiócitos.

A análise histológica comparativa dos ventrículos esquerdos nos diferentes grupos experimentais revelou que no Gct as fibras musculares estriadas cardíacas apresentaram dentro do padrão de normalidade histopatológica, núcleos alongados com nucléolos pouco evidentes, e grande quantidade de discos intercalares íntegros visíveis nos preparados histológicos com aspectos escalariforme. O GPA apresentou sinais claros de degeneração celular, tais como: irregularidade no padrão de condensação da cromatina, e heterogeneidade na coloração citoplasmática, caracterizada por uma acidofilia intensa, que é característica da isquemia. No GC foi observada nítida diminuição da acidofilia citoplasmática o que demonstra uma proteção celular à resposta isquêmica, entretanto alguns núcleos apresentaram-se com características de degeneração. A avaliação histopatológica do GCC revelou uma proteção maior comparado ao GC, e as figuras histológicas das fibras estriadas cardíacas se aproximaram mais às do Cct (Figura 3).

A avaliação ultra-estrutural dos grupos Gct e GPA contrasta a integridade celular dos cardiócitos no Gct e revela sinais importantes de degeneração no GPA (Figura 4). A proteção celular é muito bem evidenciada nos grupos experimentais GC e GCC. A Figura 5 contrasta a integridade celular do cardiócito e de suas estruturas, tais como as miofibrilas e os discos intercalares.

Outro sinal importante de proteção cardioplégica nos grupos GC e GCC é a integridade dos capilares, pois a comparação com o GPA revela que nesse último os vasos estão com a parede irregular e com diminuição de cavéolas e vesículas de pinocitose (Figura 4). O aumento das vesículas de pinocitose e de cavéolas pode ser sinal de aumento da atividade de transporte de nutrientes para o tecido cardíaco nos grupos GC e GCC (Figura 5). Há que se ressaltar que no GCC a integridade e regularidade do contorno endotelial são mais uniforme o que demonstra uma melhor adaptação vascular ao sistema isolado (Figura 5).

Tabela 4 – Núcleos Degenerados e Íntegros

Grupos	Degenerados	Íntegros	Total
Cardioplegia	42	73	115
Parada anóxica	67	99	166
Total	109	172	281

Teste de Fisher. P = 0,5358

Tabela 5 – Núcleos Degenerados e Íntegros

Grupos	Degenerados	Íntegros	Total
CetaminaS(+) cardioplegia	30	98	128
Cardioplegia	42	73	115
Total	72	171	243

Teste de Fisher. P = 0,0345

Tabela 6 – Núcleos Degenerados e Íntegros

Grupos	Degenerados	Íntegros	Total
CetaminaS(+) Cardioplegia	30	98	128
Anóxica	67	99	166
Total	97	197	294
Teste de Fisher. P = 0,0026			

Figura 8 – Cortes histológicos transversais de cardiócitos do ventrículo esquerdo dos diferentes grupos experimentais corados pela Hematoxilina-Eosina. No controle, observa-se uma uniformidade tintorial nuclear e citoplasmática. Núcleos íntegros (Ni), degenerados (Nd), vasos sangüíneos (VS) estão devidamente indicados. No grupo parada anóxica, uma heterogeneidade no padrão tintorial citoplasmático é evidenciada pela eosinofilia citoplasmática (*), Núcleos íntegros (Ni), degenerados (Nd), vasos sangüíneos (VS). Nos grupos cardioplegia e cardioplegia + cetamina S(+), uma evidente diminuição das áreas de eosinofilia citoplasmática é evidenciada (*).

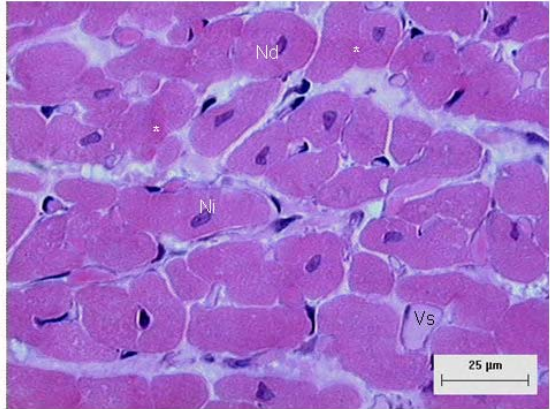
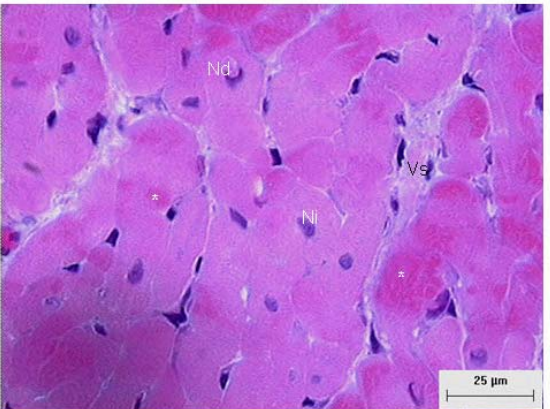
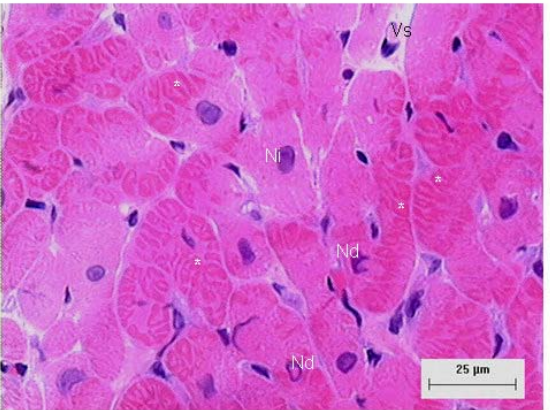
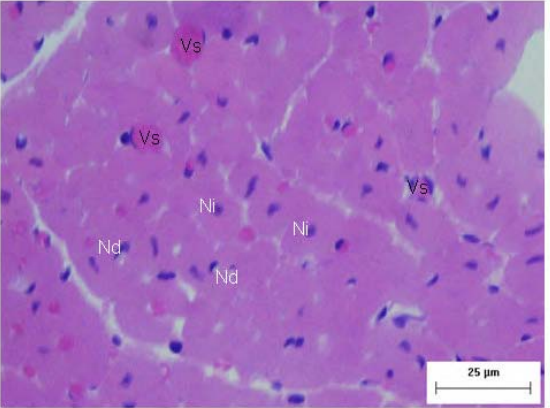
Cetamina S+ Cardioplegia	Cardioplegia	Anóxia	Controle
			

Figura 9 – Eletromiografias de ventrículo esquerdo de coelhos do Grupo Controle (esquerda) e Parada Anóxica (direita). No grupo controle o núcleo está dentro do padrão de normalidade cromatínica com pequenas regiões de nucléolos centralizados. As miofibrilas (Mf) são vistas intercaladas às mitocôndrias (Mi). Os discos intercalares (setas espessas) apresentam-se sinuosamente característicos e dispostos em forma de escada. (Mf) miofibrilas, (Mi) mitocôndrias, (cabeça de seta) sarcolema. Os capilares sanguíneos (VS) são do tipo contínuo, com células endoteliais periféricas (Ce) e apresentam o contorno liso e distendido. A isquemia leva às importantes alterações ultra-estruturais, dentre elas, aumento do exsudato intracelular (*), aumento do volume mitocondrial (Mi) e conseqüente diminuição de sua eletrodensidade. As miofibrilas (Mf) estão em evidente processo de contratura e as mitocôndrias se posicionam na periferia do sarcolema (cabeça de seta) que se projetam em pregueações. Grandes áreas de edema são observadas na região perimitochondrial (*) que leva a uma desagregação do disco intercalar (seta espessa). Os capilares (VS) estão sinuosos, com grande quantidade de vesículas de pinocitose (cavéolas) e as células endoteliais (Ce) apresentam o núcleo com cromatina mais condensada.

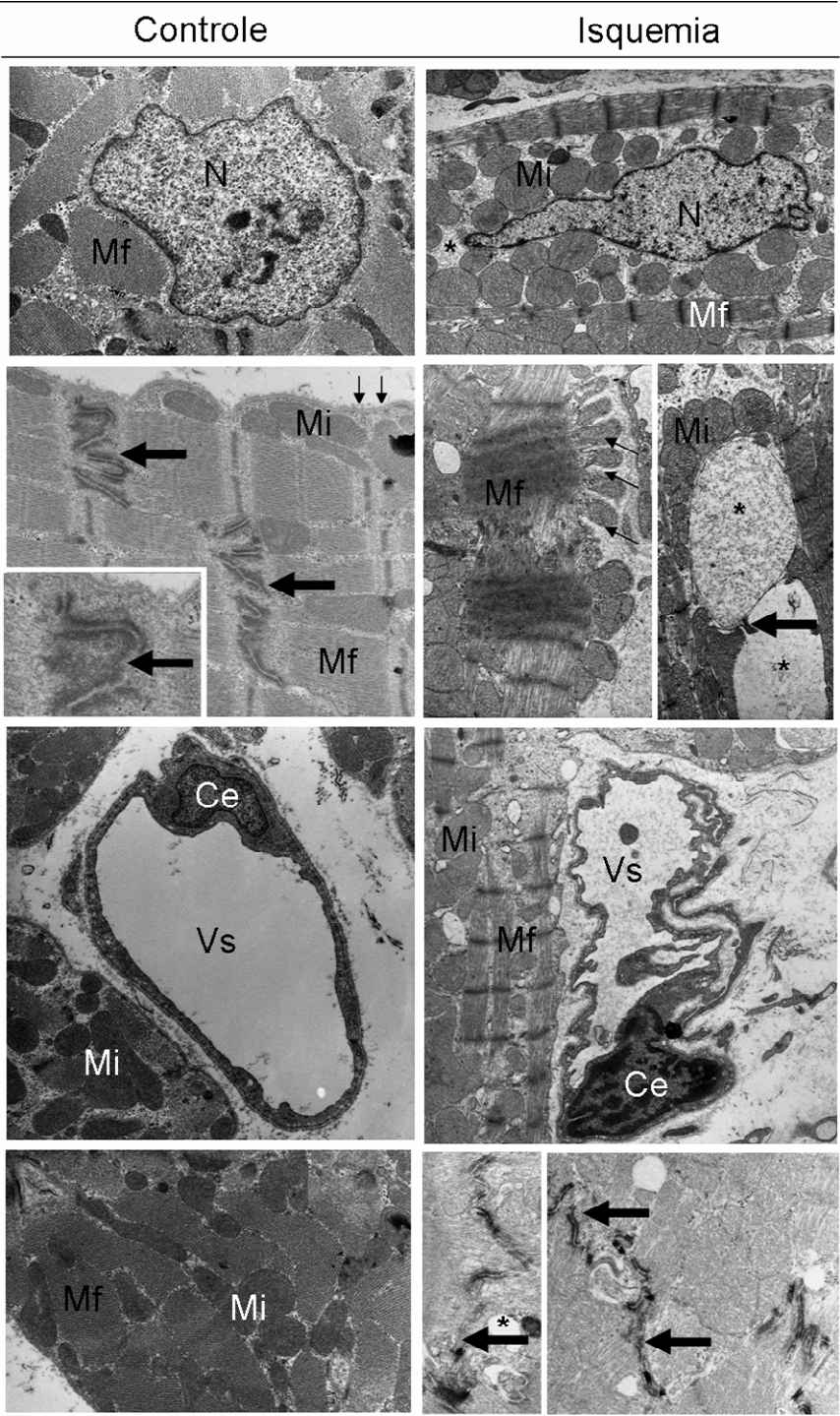
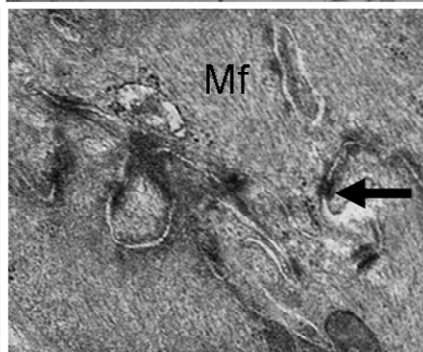
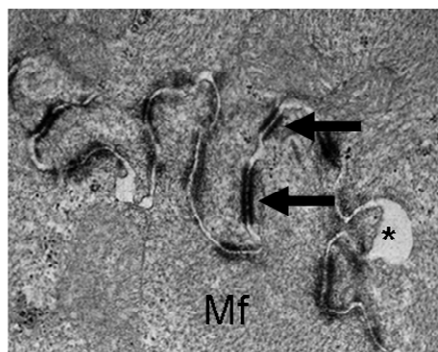
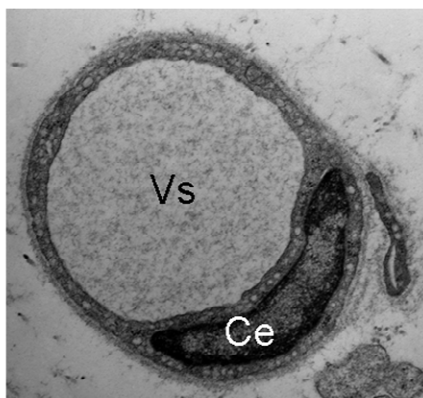
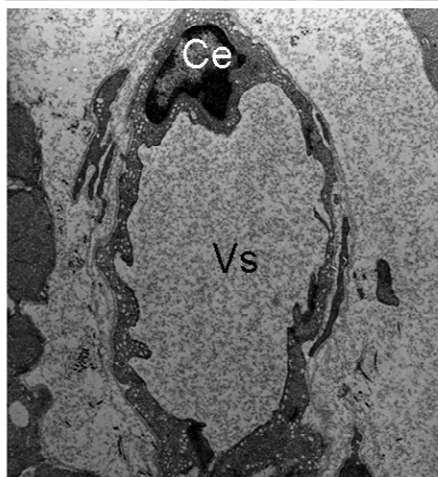
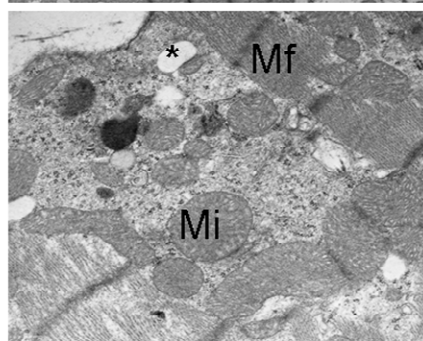
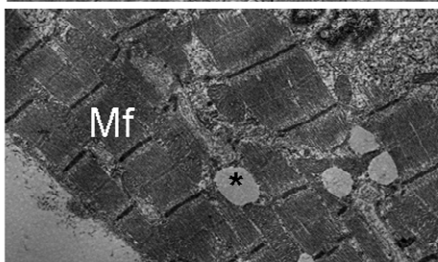
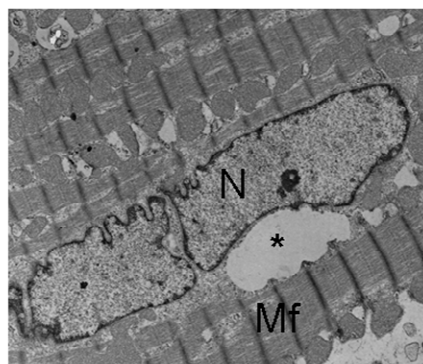
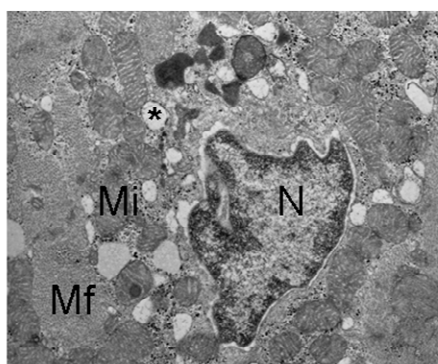


Figura 10 - Eletromiografias de ventrículo esquerdo de coelhos do Grupo Cardioplegia (esquerda) e Cardioplegia + Cetamina S(+) (direita). Sinais claros de proteção miocárdica são observados ao nível ultra-estrutural nos dois grupos em análise. No grupo cardioplegia, algumas células apresentam núcleos em degeneração (N) com áreas de edema (*) e corpos residuais autofágicos e lisossomais (L); as mitocôndrias (Mi) e miofibrilas (Mf) estão em padrão dentro da normalidade. Os vasos sanguíneos (VS) são de contorno próximo ao normal no grupo cardioplegia, mas sinais de proteção mais eficaz são visualizados no grupo cardioplegia + cetamina S(+). Embora os padrões ultra-estruturais do disco intercalar não estejam dentro da normalidade (ausência do padrão escalariforme), os mesmos desenhos arquitetônicos são visualizados nas duas situações experimentais.

Cardioplegia

Cardioplegia +
Cetamina S+

5. DISCUSSÃO

Neste capítulo será discutido modelo experimental, atributos hemodinâmicos (pressão desenvolvida, primeira derivada temporal pressão intraventricular em suas deflexões positiva e negativa), parâmetros estrutural e ultra-estrutural.

5.1. Modelo experimental

5.1.1. Animal de experimentação

A aplicabilidade de modelos experimentais para a interpretação de parâmetros clínicos encontra amparo na facilitação de padronização de raça, idade, peso e sexo. O coelho, como animal de experimentação, permite fácil manipulação do coração. Esses animais têm sido utilizados em ligaduras de ramos coronários (Harken et al., 1981); transplante coração-pulmão (Campbell et al., 1986); estudos sobre auto-regulação coronariana e papel do endotélio; emprego de fármacos que atuam na vasomotricidade coronariana (Saeed et al., 1986; Schror et al., 1991; Smith et al., 1992; Mouren et al., 1994); estudos sobre eletrofisiologia, cronotropismo e arritmias (Nolte et al., 1987); estudos bioquímicos e metabólicos, avaliando o desempenho hemodinâmico, o consumo de oxigênio, o metabolismo glicolítico e a produção de fosfatos energéticos (Baron et al., 1990); estudos sobre proteção miocárdica (Torraca et al., 1996; Lawton et al., 1996; Barbe et al., 1997; Friehrs et al., 1997; LI et al., 1998).

Galiñanes & Hearse (1990) demonstraram diferenças entre as várias espécies de animais de pequeno porte utilizados em laboratório, sendo o coelho o que apresentou menor variabilidade biológica. Estudo sobre músculos papilares, comparando diversas espécies, tais como: o coelho (jovem e adulto), o rato e seres humanos (músculo papilar obtido em cirurgias de troca de válvula mitral), foram encontrados distintos comportamentos, em diferentes situações, de acordo com a idade (Akita et al., 1995).

Nesta pesquisa, optou-se pelo coelho como animal experimental porque o mesmo foi utilizado em pesquisas anteriores (Martins, 1996, 1998, 2007; Ramin, 2002; Lima-Oliveria et al., 2003 e Cressoni et al., 2007) sendo o animal de escolha

do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) para experimentos com coração isolado. Além disso, esse modelo poderá facilitar a comparação com dados anteriormente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (Lima-Oliveira et al., 2003; Cressoni et al., 2007; Martins, 2007)

5.1.2. Modelo utilizado

Existem vários métodos utilizados na avaliação cardíaca funcional, metabólica ou ultra-estrutural.

O modelo de coração isolado foi desenvolvido por Langendorff, em 1895, e devido à simplicidade, ganhou rápida e ampla difusão no meio científico. No modelo de Langendorff modificado, apenas o leito coronário é perfundido com solução nutriente ou sangue; o ventrículo contrai-se, porém não ejeta. Desde 1900 há estudos e padronizações de soluções nutrientes para corações isolados de diversas espécies (Martins, 1998). Em 1904, Heymans & Kockman publicaram o modelo de coração isolado, nutrido por animal suporte, utilizando o cão como animal de experimentação. O método, apesar de mais fisiológico, não ganhou popularidade devido à trombose, ocasionados pela falta de anticoagulação eficiente.

A utilização de sangue como nutriente apresenta vantagens como fluxo próximo ao fisiológico *in situ*, melhor distribuição de oxigênio e menor edema após período de reperfusão (Rand et al., 1979; Murashita et al., 1990; Doring, 1990; Qiu et al., 1992; Sandhu et al., 1993).

A comparação em corações isolados de coelhos, perfundidos com solução nutriente e sangue, por Qiu & Hearse (1992) mostrou que a perfusão de corações maiores, como os de coelhos, foi perfeitamente viável com o uso de soluções nutrientes. Porém, houve superioridade da perfusão com sangue quanto maior resistência à isquemia e ao menor conteúdo de água.

O uso de soluções nutrientes também apresenta vantagens como fácil padronização de pH e eletrólitos, conferindo constância à preparação; fácil reprodutibilidade; menor custo, pois se economiza o animal suporte, além do uso de tais soluções ser mais aceitável do ponto de vista ético (Clark, 1996).

A técnica de Langendorff tem sido amplamente empregada em vários animais como rato (Nydahl et al., 1992; Hearse et al., 1978; Matsubara, 1993; Mouren et al., 1994); cobaia (Boban et al., 1992; Galiñanes & Hearse, 1990; Bunger & Mallet,

1993); coelho (Sage & Gavin, 1986; Galiñanes & Hearse, 1990; Eberli et al., 1991; Heinemann, 1992; Smith et al., 1992; Chen et al., 1993; Kohman & Veit LJ, 1994; Palmisano et al., 1995; Martins, 1996); gato (Morgenstein et al., 1973; Vogel et al., 1979); cão (Osher, 1953; Weber & Janicki, 1978; Tucci, 1980; Andrade, 1983; Cannon et al., 1994); porco (Asciuto et al., 1990; Downing & Chen, 1990).

Considerando esses fatores e somando-se à experiência em laboratório com o método, optou-se pelo modelo de Langendorff com sangue.

Para avaliação da função ventricular cardíaca, utilizou-se o método do balão intraventricular (Covell et al., 1969; Burkhoff et al., 1985; Doring, 1990). Goto et al. (1988) testando a eficácia do método em refletir o exato volume intraventricular, por meio da avaliação do espaço residual, constataram que esse é confiável. No presente estudo, alguns cuidados foram tomados para evitar-se a distorção da geometria ventricular como uso de látex apropriado e balão bastante distensível, para não haver falsas leituras (Martins et al, 2007).

5.2. Variáveis hemodinâmicas

A proteção miocárdica contra o dano isquêmico durante cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea iniciou-se em 1955, com a solução desenvolvida por Melrose. Atualmente, esta sendo desenvolvidas técnicas de proteção miocárdica como: pinçamento intermitente da aorta (Shumway et al., 1959).

A cetamina, sintetizada em 1961, e utilizada em pacientes em 1965 (Domino, et al.) têm sido apontada como fármaco para utilização em anestesia. Doses terapêuticas desse agente anestésico mostraram aumentar a frequência cardíaca e a pressão arterial em cão (McCarthy et al., 1965; Kreuscher & Gauch, 1967; Virtue et al., 1967; Dowdy & Kaya, 1967; Traber et al., 1970); rato (Riou et al., 1989) e em humano (Domino et al., 1965; Corssen et al., 1968; Stanley et al., 1968). Esse aumento da pressão arterial estava associado ao aumento do débito cardíaco (Traber et al., 1970; Stanley et al., 1968), mas sem alterações do volume sistólico (Virtue et al., 1967; Traber et al., 1970).

Além disso, a cetamina não apresenta efeito cronotrópico e inotrópico cardíaco direto, mas age indiretamente através do sistema nervoso autônomo (SNA) (Dowdy & Kaya, 1967; Traber et al., 1970, 1969; Johnstone, 1976; Cook et al., 1991).

Aumento na pressão arterial e débito cardíaco têm sido considerados eficazes em pacientes de alto risco (Corssen et al., 1972), porém, mostraram efeito positivo indireto e mediado por catecolaminas. Cuidado deveria ser necessário em pacientes que apresenta reserva cardíaca diminuída, como insuficiência cardíaca congestiva (ICC). (Tweed et al., 1972; Urthaler et al., 1976)

Adams et al. (1977) estudando preparações atriais suínas, mostraram um efeito inotrópico positivo seletivo independentemente do SNA, o que não foi constatado neste trabalho.

Vários outros autores têm atribuído efeitos negativos da função cardíaca com o uso de cetamina. Estudos em cão (Schwartz & Horwitz, 1975; Diaz et al., 1976); rato (Altura et al., 1980); Hamster (Riou et al., 1990); coelho (Dowdy & Kaya, 1967; Rusy et al., 1990); porco (Baum & Tecson, 1991); rã (Kongsayreepong et al., 1993) e em humanos (Waxman et al., 1980) mostraram efeito inotrópico cardíaco negativo.

As possíveis causas desses efeitos inotrópicos e cronotrópicos cardíacos seriam a inibição da recaptação neuronal e extraneuronal de catecolaminas e relacionadas aos canais de cálcio da membrana celular ou disfunção do retículo sarcoplasmático intracelular (Lundy et al., 1985)

O fármaco utilizado na presente investigação, ou seja, o isômero S(+) da cetamina atua nos canais de cálcio, alterando a contração muscular cardíaca. O papel do cálcio na contração e relaxamento das fibras miocárdicas é fundamental. A hipótese, geralmente aceita, está baseada no papel crítico da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) (Fabiato, 1983). Pequenas quantidades de íons cálcio entram e saem da célula durante cada ciclo cardíaco, ao passo que grandes quantidades movem para dentro e para fora do RS. A teoria da liberação de íons cálcio induzida pelo cálcio, que apresenta a proposta básica é que o RS libera relativamente grandes quantidades de íons cálcio para o citosol em resposta da pequena quantidade que entra na fibra muscular cardíaca a cada onda de despolarização (Bouchard et al., 1995). Este processo eleva cerca de 10 vezes a concentração de íons cálcio no citosol (Gibbons & Zygmunt, 1992).

As variáveis hemodinâmicas estimam a função cardiovascular predominantemente pela avaliação do desempenho do ventrículo esquerdo, utilizando o método do balão intraventricular (Matsubara, 1993; Martins, 1996, 2007; Ramin, 2002).

A frequência e ritmo cardíaco influenciam o estado contrátil do miocárdio, pelo influxo de íons sódio através da membrana celular, o que contribui para elevação da concentração intracelular de cálcio (Lakatta, 2004). Foi optado por estabelecer a frequência cardíaca fixada em 150 estímulos por minutos (Martins et al., 2007).

5.2.1. Pressão desenvolvida

A capacidade contrátil muscular pode ser medida pela determinação da força desenvolvida máxima durante a contração. A pressão desenvolvida ventricular máxima (Pdes) é frequentemente utilizada em preparações ventriculares isovolumétricas como índice da função contrátil miocárdica, assumindo que corretamente reflete força de parede desenvolvida máxima (maximal developed wall stress – δ_{max}) durante a contração (Murad & Tucci, 1999). Por isso, é utilizada na avaliação da função sistólica, sendo aceita como indicador de contratilidade miocárdica (Martins, 1996, 2007; Ramin, 2002). É, contudo, variável dependente da pressão ventricular e é definida como a pressão ventricular esquerda menos a pressão diastólica final. A pressão desenvolvida calculada durante o período pré e após o experimento foi calculada com a pressão diastólica igual a 0 mmHg.

O efeito inotrópico cardíaco negativo relatado por Schwartz & Horwitz (1975); Diaz et al. (1976); Altura et al. (1980); Riou et al. (1990); Dowdy & Kaya (1967); Rusy et al. (1990); Baum et al. (1991); Kongsayreepong et al. (1993) e Waxman et al. (1980) foi observado nos grupos GC e GCC, nos quais ocorreu queda significativa da Pdes ($p = 0,026$ e $p = 0,0144$), respectivamente, e os valores dessas pressões ficaram muito abaixo dos valores pré-experimentos, mostrando significativa diminuição da recuperação em relação aos dados pré. No grupo GPA, houve redução estatisticamente não significativa ($p = 0,3393$). Essas alterações demonstram queda da contratilidade miocárdica, mesmo com possível proteção cardíaca proporcionada pela cardioplegia, tanto sangüínea como cardioplegia associada com cetamina S(+), contrariando a literatura (Dowdy & Kaya (1967); Traber et al.). (1969, 1970); Johnstone (1976); Adams et al. (1977); Cook et al. (1991)), que mostra um aumento no inotropismo do miocárdio.

5.2.2. Primeira derivada temporal da Pressão Intraventricular em sua deflexão positiva (dP/dt +)

A primeira derivada temporal da pressão intraventricular (dP/dt) é altamente sensível às alterações agudas da contratilidade. Seu valor máximo aumenta em resposta aos fármacos vasoativos, aumentando também a pressão do ventrículo esquerdo sem alterar o volume do VE.

A resposta da dP/dt+ em relação à administração de dextran está aumentada devido ao aumento do volume diastólico sem alterar a pressão do VE. Isso demonstra a sensibilidade da dP/dt+ em ambas a contratilidade e pré-carga (Little, 1985).

Em condições normais a dP/dt+ ocorre antes da abertura da válvula aórtica e pode ser considerada independente da pós-carga. Visto isso, alteração da dP/dt+ sem alteração da pré-carga indica comprometimento da contratilidade.

Com base nessas considerações iniciais, utiliza-se esse parâmetro em coração isolado e perfundido, no qual não há interferência da pré e pós-carga.

A função sistólica avaliada pela dP/dt+ mostrou-se diminuída após os experimentos no grupo GCC ($p = 0,013$) em relação ao controle (pré). Isso demonstra que houve diminuição na função cardíaca, mesmo, com a utilização da cardioplegia, associada ou não a cetamina S(+), o que não ocorreu nos grupos GC e GPA. Pelos resultados serem contraditórios, a dP/dt+ é um índice limitado, por sofrer várias influências como pré-carga, pós-carga, inotropismo cardíaco e variação da pressão diastólica (Buckberg et al., 2006). Isso, provavelmente, ocorreu por alterações da entrada de Ca^{++} através dos canais de cálcio e da saída de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático intracelular (Fabiato, 1983; Bouchard et al., 1995; Gibbons & Zygmunt, 1992).

5.2.3. Primeira derivada temporal da Pressão Intraventricular em sua deflexão negativa (dP/dt-)

A primeira derivada temporal da pressão ventricular em sua deflexão negativa é um índice muito utilizado para a análise da função ventricular diastólica, em especial na sua fase ativa. Para que ocorra o relaxamento do músculo cardíaco é necessário que o íon cálcio citozóico seja ativamente seqüestrado para dentro do

retículo sarcoplasmático ou retirado da célula. Outra via de retirada de íons cálcio se faz pela troca com íons sódio na membrana celular (Nayler & Willians, 1978; Burt & Langer, 1982).

A ausência da movimentação dos íons cálcio citoplasmático durante a diástole faz com que haja um acúmulo desse íon durante a sístole e permanecendo este ligado a troponina, impedindo o relaxamento normal. Tal mecanismo explica uma disfunção diastólica sem prejuízo na capacidade de contração do músculo. Provavelmente, isso deve ter acontecido durante o relaxamento muscular quando foi utilizada a cetamina racêmica, pois a dP/dt estava diminuída durante a fase de administração contínua (Ramin, 2002), não houve queda significativa com a utilização de cardioplegia, associada ou não à cetamina S(+) e no grupo parada anóxica. Essa semelhança entre os grupos protegidos e o grupo com isquemia é descrito na literatura e poderia ser explicada pelo curto tempo de isquemia, chamada pré-condicionamento isquêmico miocárdico (Pego-Fernandes et al., 2000).

5.3. Avaliação morfológica

Avaliação dos parâmetros estrutural e ultra-estrutural do coração isolado em coelho foi dirigida, principalmente, para as estruturas nucleares, mitocondriais, elementos do citoesqueleto contrátil (contraturas das miofibrilas), condensação da cromatina, coloração citoplasmática das células miocárdicas e das células endoteliais, bem como a integridade celular e do disco intercalar.

A cardioplegia sem proteção obtida pela parada anóxica produziu lesões graves, tanto no miocárdio quanto nas células endoteliais em comparação com as cardioplegias sangüíneas associadas ou não a cetamina S(+). Alterações morfológicas observadas foram indicativas de lesões reversíveis e/ou irreversíveis, e células oncóticas como relatado por Takashi & Ashaf (2000). Das principais lesões apresentadas pelas células do ventrículo esquerdo, ressalta-se que a eosinofilia citoplasmática associada à degeneração nuclear sejam as mais importantes, e que certamente levariam à morte, seja por oncoses (Takashi & Ashaf, 2000) ou por necrose (Lima-Oliveira, 2003 e Cressoni, 2006).

O coração, em repouso, consome mais de 7% do consumo de oxigênio, apesar de representar menos de 0,5% do peso corpóreo. Durante a parada anóxica,

a célula cardíaca fica privada de oxigênio e de substrato, uma vez que consome aproximadamente 8 mL de O_2 por 100 g de miocárdio por minuto em indivíduo normal em repouso, fazendo com que o metabolismo fique prejudicado e os danos celulares sejam inexoráveis (Lima-Oliveira et al., 2003).

Os sinais de danos reversíveis, tais como vacuolização, alterações na morfologia mitocondrial e perda das estriações características das fibras musculares, foram mais evidenciados nas células miocárdicas de corações isolados parados por anóxia; contudo, não diferiram estatisticamente dos corações protegidos por cardioplegia sangüínea, contrariando os achados de Lima-Oliveira et al. (2003). Isso talvez seja explicável pelo fato de, naquele momento do estudo, os métodos de avaliação utilizados eram ainda preliminares, e as amostras obtidas ainda apresentavam irregularidades e certa variabilidade nas respostas histopatológicas, fato que certamente contribuíram para a significância estatística dos resultados daqueles autores.

Nossos resultados sugerem haver menor dano celular quando os corações foram protegidos pela cardioplegia sangüínea associada a cetamina S(+), resultando em melhor proteção das células cardíacas. Esse efeito poderia ser causado pelos efeitos da cetamina que reduz a influência transsarcolemal de Ca^{++} , envolvida na ativação da atividade contrátil dos miócitos. Rusy et al. (1990) examinaram a contração em músculos papilares de coelho e encontraram que a cetamina exerce efeito inotrópico negativo; e sugerem que esse efeito resulta numa diminuída entrada de Ca^{++} anterior à liberação desse íon do retículo sarcoplasmático, uma vez que o Ca^{++} transsarcolêmico é importante na ativação miocárdica. Baum & Tecson (1991) documentaram efeito inibitório da cetamina na entrada transsarcolêmico de Ca^{++} para célula em miócitos ventriculares de cobaia (Guinea pig).

Nossos resultados são indicativos de que o efeito inotrópico negativo da cetamina no miocárdio, tanto em animais como em humanos depende da relativa importância de mecanismos de liberação de Ca^{++} intracelular (liberação de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático e entrada de Ca^{++} através da membrana), atuando num menor consumo de oxigênio durante o período de parada cardíaca pela cardioplegia sangüínea associada à cetamina S(+), porém estudos adicionais para avaliação da proteção miocárdica, investigando qual concentração de cetamina deveria ser adicionada à cardioplegia para obter proteção miocárdica próxima ao fisiológico são necessários.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

- 6.1. O grupo cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea apresentou efeito depressor na função sistólica em relação aos grupos cardioplegia sangüínea e parada cardíaca anóxica;
- 6.2. Em relação aos demais grupos, a cetamina S(+) associada à cardioplegia sangüínea apresentou efeitos protetores da morfologia celular como integridade nuclear, contratura das miofibrilas e disco intercalar.

7. REFERÊ

Adams HF

chronotrop

201(1): 17

Barbe CC, Diemont FF, Bonnet PM. Cardioplegia preserves hypoxic response in isolated arteries but not in isolated heart. *Ann Thorac Surg* 1997; 63(5): 1303-8.

Baron JF, Vicaud E, Hou X, Duvelleroy M. Independent role of arteial O₂ tension in local control of coronary blood flow. *Am J Physiol* 1990; 258(5): 1388-94.

Baum VC & Tecson ME. Ketamine inhibits transsarcolemmal calcium entry in guinea pig myocardium: direct evidence by single cell voltage clamp. *Anesth Analg* 1991; 73: 804-7.

Baum VC. Distinctive effects of three intravenous anesthetics on the inward rectifier (IK1) and the delayed (IK) potassium currents in myocardium: implications for the mechanism of action. *Anesth Analg* 1993; 76: 18-23.

Baum VC, Wetzel GT, Klitzner TS. Effects of halothane and ketamine on activation and inactivation of myocardium calcium current. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23(5): 799-805.

Boban M, Stowe DF, Buljubasic N, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Direct comparative effects of isoflurane and desflurane in isolated guinea pig hearts. *Anesthesiology* 1992; 76(5): 775-80.

Botero CA, Smith CE, Holbrook C, Chavez AM, Snow NJ Hagen JF et al. Total endovenous anesthesia with a propofol-ketamine combination during coronary artery surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2000; 14: 409-15.

Bouchard RA, Clark RB, Giles WR. Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements. *Circ Res* 1995; 76(5): 790-801.

Braile DM, Ardito RV, Thevenard GHP, Ramin SL, Silva EM. Cardioplegia sangüínea normotérmica na revascularização cirúrgica do miocárdio. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1991; 1(1): 26-37.

Braile DM. Como eu faço: cardioplegia sangüínea isotérmica retrógrado de baixo volume. *Rer Brás Cir Cardiovasc* 1992; 7: 221-9.

Brainbridge MV, Chayen J, Hearse DJ, Jynge P, Cankovic-Darracott S. Cold cardioplegia or continuous perfusion? Report on preliminary assessed cytochemically. *J Thorac Surg* 1977; 74(6): 900-6.

Braunwald E & Little WC. Assessment of Cardiac Function. in: Braunwal E. HEART DISEASE: A Text Book of Cardiovascular Medicine. 5^a Ed. WB Saunders Company; 1997. p. 421-44

Buckberg GD. A proposed "solution" to the cardioplegic controversy. *J Thorac. Cardiovasc Surg* 1979; 77(6): 803-15.

Buckberg GD, Castellá M, Gharib M, Saleh S. Active myocyte shortening during the isovolume phase of diastolic is responsible for ventricular suction: systolic ventricular filling. *Eur J cardioth* 2006; 29S1: S98-106.

Bunger R & Mallet RT. Mitochondrial pyruvate transport in working guinea pig heart. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1151(2): 223-36.

Burkhoff D, Van der Velde E, Kass D, Baan J, Maughan WL, Sagawa K. Accuracy of volume measurements by conductance catheter in isolated, ejecting canine hearts. *Circulation* 1985; 72(2): 440-7.

Burt JM & Langer GA. Ca^{++} distribution after Na^{+} pump inhibition in cultured neonatal rat myocardial cells. *Cir Res* 1982; 51(5): 543-50.

Campbell C, Tadros N, Heimbecker RO. Heterotopic heart-lung transplantation: a new experimental model. *J Heart Transplant* 1986; 5: 465-70

Cannon MB, Vine AJ, Kantor HL, Lahorra JA, Nickell SA, Hahn C et al. Warm and cold cardioplegia: comparison of myocardial function and metabolism using ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *Circulation* 1994; 90(5): 328-38.

Chen CC, Morishige N, Masuda M, Lin W, Wieland W, Thoné F et al. R56865, a Na^{+} and Ca^{++} overload inhibitor, reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in blood perfused rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25(12): 1445-59.

Clark JD. Guide for the care and use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington DC, 1996. p.125.

Cook DJ, Carton EG, Housmans PR. Mechanism of the positive inotropic effect of ketamine in isolated ferret ventricular papillary muscle. *Anesthesiology* 1991; 74: 880-8.

Corssen G, Myasaka M, Domino EF. Changing concepts in pain during surgery: dissociative anesthesia with CI-581. *Anesth Analg* 1968; 47(6): 746-58.

Corssen G, Gutierrez J, Reves JG, Huber FC Jr. Ketamine in the anesthetic management of asthmatic patients. *Anesth Analg* 1972; 51: 588-96.

Covell JW, Fuhrer JS, Boerth RC, Ross J Jr. Production of isotonic contractions in the intact canine left ventricle. *J Appl Physiol* 1969; 27(4): 577- 81.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic-related fibers. *Stain Technol.* 1976; 51(1): 7-11.

Cressoni ES, Avanci LE, Braile DM, Lima-Oliveira APM, Taboga SR, Martins AS et al. Efeitos das cardioplegias sangüínea e cristalóide no miocárdico hipertrófico de coelho: avaliação estrutural e ultra-estrutural. *Bras J Cardiovasc Surg* 2007; 22: 24-32.

Diaz FA, Bianco JA, Beer N, Velard H, Izquierdo JP, Jaen R. Effects of Ketamine on canine cardiovascular function. *Br J Anaesth* 1976; 48: 941-6.

Domino EF, Chodoff P, Corssen G. Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man. *Clinic. Pharmac. Ther* 1965; 6: 279-91.

Doring HJ. The isolated perfused heart to Langendorff technique – function – application. *Physiol Bohemoslov* 1990; 39(6): 481-504.

Dowdy EG & Kaya K. Studies of the mechanism of cardiovascular responses to CI-581. *Anesthesiology* 1967; 29: 931-43.

Downing SE & Chen V. Myocardial hibernation in the ischemic neonatal heart. *Circ Res* 1990; 66(3): 763-7.

Eberli FR, Weinberg EO, Grice WN, Horowitz GL, Apstein CS. Protective effect of increased glycolytic substrate against systolic and diastolic dysfunction and increased coronary resistance from prolonged global underperfusion and reperfusion in isolated rabbit hearts with erythrocyte suspensions. *Circ Res* 1991; 68(2): 466-81.

Endou M, Hattori Y, Nakaya H, Gotoh Y, Kanno M. Electrophysiologic mechanisms responsible for inotropic responses to ketamine in guinea pig and rat myocardium. *Anesthesiology* 1992; 76: 409-18.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 285(1): C1-C14.

Friebs I, Cao-Danh H, Takahashi S, Buenaventura P, Glynn P, McGowan FX, del Nido PJ. Adenosine prevents protein kinase C activation during hypothermic ischemia. *Circulation* 1997; 4(S9):II2210-15.

Furuya A, Matsukawa T, Ozaki M, Nishiyama T, Kume M, Kumazawa T.. Intravenous ketamine attenuates arterial pressure changes during the induction of anesthesia with propofol. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18(2): 88-92.

Galiñanes M & Hearse DJ. Species differences in susceptibility to ischemia injury and responsiveness to myocardial protection. *Cardioscience* 1990; 1(2): 127-43.

Gibbons WR & Zygmunt AC. Excitation coupling in heart. In: Fozzard, H.A. et al. *The heart and cardiovascular system*. 2nd ed. New York, Raven press, 1992, p.1249-79.

Goldberg AH, Keane PW, Phear WPC. Effects of ketamine on contractile performance and excitability of isolated heart muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1970; 175: 388-94.

Golden S. Combination propofol-ketamine anaesthesia in sick neonates. *Paediatr Anaesth* 2001; 11(1): 119-22.

Godoy MF & Braile DM. Cardioplegia: exegese. Arq Bras Cardiol 1994; 62: 277-8.

Goto Y, Slinker BK, LeWinter MM. Accuracy of volume measurement of rabbit left ventricle by ballon metod. Am J Physiol 1988; 255(2): H394-6.

Graf BM, Vicenzi MN, Martin E, Bosnjak ZJ Store DF. Ketamine has stereospecific effects in the isolated perfused guinea pig heart. Anesthesiology 1995; 82: 1426-37.

Hamilton JT & Bryson JS. The effects of ketamine on transmembrane potentials of purkingé fibres of the pig heart. Br J Anaesth 1974; 46: 636-42.

Hara Y, Tamagawa M, Nakaya H. The effects of ketamine on conduction velocity and maximum rate of rise of action potential upstroke in guinea pig papillary muscles: comparison with quinidine. Anest Analg 1994; 79: 687-93.

Harken AH, Simson MB, Haselgrove J, Harden WR3rd, Barlow CH. Early ischemia after complete coronary ligation in the rabbit, dog, pig and monkey. Am J Physiol 1981; 241: H202-10.

Hearse DJ, Humphrey SM, Boink AB, Ruigrok TJ. The calcium paradox: metabolic, eletrophysiological, contractile and ultrastructural characteristics in four species. Eur J Cardiol 1978; 7(4): 437-50.

Heinemann FW. Myocardial oxygenation in the isolated working rabbit heart as a function of work. *Am J Physio* 1992; 262: H255-67.

Heymans JF, Kochmans M. Une nouvelle methode de circulation artificielle a travers de cover isole de maniere. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1904; 13: 379-86.

Hirota K & Lambert DG. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *Br J Anaesth* 1996; 77: 441-444.

Ivankovich AD, Miletich DJ, Reimann C, Albrecht RF, Zahed B. Cardiovascular effects of centrally administered ketamine in goats. *Anesth Analg* 1974; 53: 924-33.

Johnstone M. The cardiovascular effects of ketamine in man. *Anaesth* 1976; 31: 873-82.

Kohman LJ & Veit LJ. Single dose versus multidose cardioplegia in neonatal hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107: 1512-8.

Kongsayreepong O, Cook DJ, Housmans PR. Mechanism of the direct, negative inotropic effect of ketamine in isolated ferret and frog ventricular myocardium. *Anesthesiology* 1993; 79: 313-22.

Kreuscher H & Gauch H. The effect on the phencyclidine derivative ketamine (CI-581) on the human vascular system. *Anaesthesist* 1967; 16: 229-308.

Langendorff O. Untersuchungen am überleben sängethierherzen. Pfügers Arch Ges Physiol 1985; 291-320.

Lakatta V. Beyond Bowditch: the convergence of cardiac chronotropy and inotopy. Cell Calc 2004; 629-42.

Lawton JS, Sepic JD, Allen CT, Hsia PW, Damiano RJ Jr. Myocardial protection with k⁺ channel openers is as effective as St. Thomas's solution in the rabbit heart. Ann Thorac Surg 1996; 62: 31-8.

Levitsky S & Feinberg H. Biochemical changes of ischemia. NIH Symposium on Intraoperative Protection of the Myocardium. Ann Thorac Surgery 1975; 20: 21-25.

Li G, Sullivan JA, You JM, Hall RI. Effect of pressure on myocardial function after 6 hour preservation with blood cardioplegia. Ann. Thorac. Surg 1998; 65(1): 115-24.

Lima-Oliveira APM, Azeredo-Oliveira MTV, Taboga SR, Godoy MF, Braile. Cardioplegia using low volumic cardioplegic agents: morphological study in isolated rabbit hearts. Rev Bras Cir Cardiovasc 2003; 18(3): 227-34.

Little WC. The left dP/dt max –end-diastolic volume relation in close chest dogs. Circ Res 1985; 56: 808-12.

Lundy P, Gverzdys S, Frew R. Ketamine: evidence of tissue specific inhibition of neuronal and extraneuronal catecholamine uptake process. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 298-303.

McCarthy EC, Mencio GA, Walker LA, Green NE. Ketamine sedation for the reduction of children's fractures in the emergency department. *J Bone Joint Surg Am* 1965; 82-A(7): 912-8.

Martins AS. Modelo experimental de coração suportado em coelhos. Padronização e análise de variáveis hemodinâmicas, laboratoriais e anatomopatológicas. Botucatu, 1996, 236p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, UNESP.

Martins AS. Análise comparativa entre dois métodos de proteção miocárdica: cardioplegia cristalóide, intermitente e fria e cardioplegia sangüínea, contínua e tépida. Estudo experimental em coelhos. Botucatu, 1998, 170p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina, UNESP.

Martins AS, Silva MAM, Padovani CR, Matsubara B, Braile DM, Catâneo AJM. Myocardium protection by continuous, blood, anterograde-retrograde cardioplegia in rabbits. *Acta Cir Bras* 2007; 22: 43-46.

Matsubara BB. Papel da matriz colágena miocárdica intersticial na função diastólica ventricular. Estudo em ratos submetidos a infusão de glutathione-oxidada. Botucatu, 1993, 137p. Tese (doutorado), Faculdade de Medicina, UNESP.

Melrose DG, Dreyer B, Bental HH, Baker JB. Elective cardiac arrest: preliminary communication. *Lancet* 1955; 269: 21-22.

McCarthy DA, Chen G, Kaump DH, Ensor. General anesthetic and other pharmacological properties of 2-(O-chlorophenyl)-2-methylaminocyclohexanone HCl (CI-581). *J New Drugs* 1965; 28: 21-33.

Morgenstern C, Höljes U, Arnold G, Lochner W. The influence of coronary pressure and coronary flow on intracoronary blood volume and geometry of the left ventricle. *Pflügers Arch Ger Physiol* 1973; 340(2): 101-8.

Mouren S, Baron JF, Albo C, Szekely B, Arthaud M, Viars P. Effects of propofol and thiopental on coronary blood flow and myocardial performance in an isolated rabbit heart. *Anesthesiology* 1994; 80: 634-41.

Murad N & Tucci PJF. Developed pressure data may provide misinformation when used alone to evaluate systolic function in isovolumetric left ventricle preparations. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 773-6.

Murashita T, Kempsford RD, Hearse DJ. Age-dependent changes in the tolerance of rabbit heart to ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg* 1990; 4(9): 497-8.

Murray TF. Basic Pharmacology of Ketamine, in: Bowdle TA, Horita A, Kharasch ED. The Pharmacologic Basis of Anesthesiology, 1STEd, New York: Churchill Livingstone; 1994. p 337-350.

Nayler WG & Williams A. Relaxation in heart muscle: some morphological and biochemical considerations. Eur J Cardiol 1978; 7: 35-50

Nolte S, Döring HJ, Frey A. Mechanically induced ventricular extrassístoles in the isolated perfused guinea-pig heart. Arzneimittelforschung 1987; 37(9): 1025-9.

Nydhal S, Frebelius S, Swedenborg J. Thrombin inactivation and the effects of antithrombin and heparin in a recirculating Langendorff preparation. Thromb Res 1992; 65: 367-76.

Osher WJ. Pressure-Flow relational the coronary system. Am J Physiol 1953; 172: 403-16.

Pagel PS, Schmeling WT, Kampine JP, Warltier DC. Alteration of canine left ventricular diastolic function by intravenous anesthetics in vivo. Anesthesiology 1992; 76: 419-25.

Palmisano BW, Mehner RW, Baker JE, Stowe DF, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Direct effects of halothane and isoflurane in infant rabbit hearts with right

ventricular hypertrophy secondary to chronic hypoxemia. *Anesth Analg* 1995; 80: 1122-8.

Pego-Fernandes PM, Jatene FB, Coelho FF, Gentil AF, Kawasnicka KL, Stolf NG et al. Evolução hemodinâmica da revascularização do miocárdio com dois métodos de proteção miocárdica. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000; 15(3): 212-8.

Qiu Y, Galiñanes M, Ferrari R, Cargnoni A, Ezrin A, Hearse DJ. PEG-SOD improves postischemic functional recovery and antioxidant status in blood-perfused rabbits hearts. *Am J Physiol* 1992; 263(4): H1243-9.

Qiu Y & Hearse DJ. Comparison of ischemia vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid perfused versus blood-perfused hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103: 960-8.

Ramin SL. Efeitos cardiovasculares da Cetamina Isomérica S(+) e Cetamina Racêmica, em Modelo de Coração Isolado de Coelho. Botucatu, 2002, 115p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, UNESP.

Rand PW, Nelson CV, Lacombe EH, Barker ND, Pirone LA. Application of an isolated heart model to investigate blood-oxygen delivery. *Am J Physiol* 1979; 273(3): H348-52.

Riou B, Viars P, Lecarpantier Y. Inotropic effect of ketamine on rat cardiac papillary muscle. *Anesthesiology* 1989; 71: 116-25.

Riou B, Viars P, Lecarpantier Y. Effects of ketamine on the cardiac papillary muscle of normal Hamsters and those with cardiomyopathy. *Anesthesiology* 1990; 73: 910-18.

Rusy BF, Amuzu JK, Bosscher HA, Redon D, Komai H. Negative inotropic effect of ketamine in rabbit ventricular muscle. *Anesth Analg* 1990; 71: 275-8.

Sage MD & Gavin JB. Microvascular function at the margins of early experimental myocardial infarcts in isolated rabbit hearts. *Heart – Vessels* 1986; 2: 81-6.

Saeed M, Schmidli J, Metz M, Bing RJ. Perfused rabbit heart: endothelium-derived relaxing factor in coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8(2): 257-61.

Schorr K, Woditsch I, Strobach H, Schröder H., K. et al. Interactions between nitric oxide and prostacyclin in myocardial ischemia and endothelial cell cultures. *Basic Res Cardiol* 1991; 86(2): 117-25.

Schwartz DA & Horwitz L. Effects of ketamine on left ventricular performance. *J Pharm Exp Ther* 1975; 194: 410-14.

Seagusa K, Furukawa Y, Ogiwara Y, Chiba. Pharmacologic analysis of ketamine-induced cardiac actions in isolated, blood-perfused canine atria. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8(2): 414-9.

Shandu R, Diaz RJ, Wilson G. Comparison of ischemia preconditioning in blood perfused and buffer perfused isolated heart models. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 602-7.

Shumway NE, Lower RR, Stofer RC. Selective hypothermia of the heart in anoxic cardiac arrest. *Surg Gynecol Obstet* 1959; 109: 750-4.

Smith RE, Palmer RM, Bucknall CA, Moncada S. Role of nitric oxide synthesis in the regulation of coronary vascular tone in the isolated perfused rabbit heart. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 508-12.

Souza MHL & Elias DO. *Fundamentos da Circulação Extracorpórea*. 2006; 317-35.

Stanley V, Hunt J, Willis KW, Stephen CR. Cardiovascular and respiratory function with CI-581. *Anesth Analg* 1968; 47(6): 760-7.

Stoelting RK. Nonbarbiturate induction drugs. In: Stoelting RK. *Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*, Third Edition, Philadelphia: Lippincott-Raven publishers; 1999. p. 140-57.

Stowe DF, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Comparison of etomidate, ketamine, propofol, and thiopental on function and metabolism of isolated hearts. *Anesth Analg* 1992; 74: 547-58.

Takashi E & Ashaf M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markes, J Mol Cell Cardiol 2000; 32: 209-24.

Torraca L et al. Continuous versus intermittent warm blood cardioplegia: functional and energetics changes. Ann Thorac Surg 1996; 62: 1172-9.

Traber DL, Wilson RD, Priano LL. Differentiation of Cardiovascular Effects of Cl-581. Anesth Analg 1968; 47(6): 769-77.

Traber DL, Wilson RD. Involvement of the sympathetic nervous systems in the pressor response to ketamine. Anesth Analg 1969; 48: 248-52.

Traber DL, Wilson RD, Priano LL. The effect of beta-blockade on the cardiovascular response to ketamine. Aneth Analg 1970; 49: 604-13.

Tucci PJF. As bases do mecanismo de FRANK STARLING. Estudos em corações isolados de cães. Botucatu, 1980. Loop Tese (Livre-Docência), Faculdade de Medicina, UNESP.

Tugrul M, Camci E, Pembeci K, Telci L, Akpir K. Ketamine infusion versus isoflurane for the maintenance of anesthesia in the prebypass period in children with tetralogy of Fallot. J Cardiothorac Vasc Anesth 2000; 14: 557-61.

Tweed WA, Minuck M, Mymin D. Circulatory responses to ketamine anesthesia. *Anesthesiol* 1972; 37(6): 613-19.

Virtue RW, Alanis JM, Mori M, Lafargue RT, Vogel JH, Metcalf DR., R. et al. An anesthetic agent: 2-orthochlorophenyl, 2-methylamino cyclohexano HCL (CI-581). *Anesthesiology* 1967; 28(5): 823-33.

Vogel WM, Lum D, Lucchesi BR. Methylprednisolone sodium succinate treatment in global ischemia of cat isolated heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1979; 1(1): 53-8.

Zickmann B, Kling D, Quis S. S(+) ketamine versus ketamine racemic mixture: hemodynamic studies. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther* 2000; 35(5): 333-9.

Waxman K, Shoemaker WC Lippmann M. Cardiovascular effects of anesthetic induction with ketamine. *Anesth Analg* 1980; 59: 355-8.

Weber KT & Janick JS. Interdependence of cardiac function, coronary flow and oxygen extraction. *Am J Physiol* 1978; 235: H704-12.