

Matheus Fécchio Pinotti

**Efeitos da mistura enantiomérica da bupivacaína (S75/R25),
da bupivacaína racêmica e da ropivacaína
sobre a função mecânica do músculo papilar isolado de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora Profa. Titular Eliana Marisa Ganem

Botucatu - SP

2013

Dedicatória

Aos meus pais, Eliane e Luiz. Exemplos de fé, sabedoria, dedicação e amor, foram os primeiros presentes de Deus em minha vida. Não têm a ciência nas veias, mas são doutores da vida. A minha primeira e melhor escola. Amo vocês.

À minha querida esposa Larissa. Agradeço a Deus todos os dias por ter cruzado nossos caminhos. Não tenho hipóteses, provas científicas, justificativas ou testes estatísticos para provar o tamanho do meu amor por você.

À minha filha Cecília, que está para chegar. Já a amo mais que a mim mesmo.

A minha Orientadora

À minha orientadora, Profa. Titular Eliana Marisa Ganen. Sua maternal acolhida e seus ensinamentos me ajudaram a ser o que sou profissional e eticamente.

Obrigado por alargar meus horizontes e tornar tudo mais claro quando a escuridão parecia tomar conta. Agradeço pela confiança em mim depositada e espero, ao concluirmos esta etapa, que eu a tenha honrado, apesar das minhas muitas imperfeições.

Agradecimentos Especiais

A Deus, por caminhar ao meu lado nos momentos de alegria, à minha frente nos momentos de incertezas e por me carregar nos braços nos momentos de dor.

Ao Dr. Antonio Carlos Cicogna, meu primeiro orientador, por me ensinar a amar e respeitar a pesquisa científica com todo o rigor que ela merece.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito desta pesquisa, em especial:

aos professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pela espetacular contribuição na minha formação como médico, anesthesiologista, cidadão e homem e por quem guardarei profundos respeito, carinho e admiração por toda a minha vida;

aos funcionários do Departamento de Anestesiologia, Joana Jacirene Costa Teixeira, Sônia Maria Martins da Silva e André Renato Passaroni, pelo auxílio em todos esses anos;

à Neli Aparecida Pavan e Tatiane de Fátima Pineiz, pelo precioso auxílio em minha pós-graduação;

aos colegas da turma de Residência Médica em Anestesiologia 2007-2010, que colaboraram para a minha participação neste programa de pós-graduação;

à acadêmica Adriana Nepner pelo valoroso auxílio na coleta dos dados desta pesquisa;

ao pós-graduando Dijon Henrique Salomé de Campos pela valoroso auxílio na realização dos experimentos e na coleta de dados desta pesquisa;

à Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho pelo precioso auxílio na análise estatística desta pesquisa;

aos meus colegas do Serviço de Anestesiologia de Araraquara-SP (SAARA-Anestesia e Analgesia) pelo incentivo e pela colaboração para a realização deste projeto;

à FAPESP, pelo suporte financeiro para a realização deste estudo (Auxílio Pesquisa, processo 2010/50638-3).

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, não sou o que irei ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

Lista de Tabelas

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm^2) nos diferentes grupos e momentos..... | 30 |
| Tabela 2 | Tensão de repouso (TR, g/mm^2) nos diferentes grupos e momentos..... | 31 |
| Tabela 3 | Velocidade máxima de variação da TD ($+dT/dt$, $\text{g/mm}^2/\text{s}$) nos diferentes grupos e momentos..... | 32 |
| Tabela 4 | Velocidade do decréscimo da TD ($-dT/dt$, $\text{g/mm}^2/\text{s}$) nos diferentes grupos e momentos..... | 33 |
| Tabela 5 | Tempo para atingir a tensão máxima desenvolvida (TPT, ms) nos diferentes grupos e momentos..... | 34 |

Lista de Figuras

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Representação esquemática da preparação com músculo papilar isolado..... | 23 |
| Figura 2 | Representação gráfica da curva de contração isométrica..... | 25 |
| Figura 3 | Tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm^2) nos diferentes grupos e momentos..... | 30 |
| Figura 4 | Tensão de repouso (TR, g/mm^2) nos diferentes grupos e momentos.. | 31 |
| Figura 5 | Velocidade máxima de variação da TD ($+dT/dt$, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$) nos diferentes grupos e momentos..... | 32 |
| Figura 6 | Velocidade máxima de variação do decréscimo TD ($-dT/dt$, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$) nos diferentes grupos e momentos..... | 33 |
| Figura 7 | Tempo para atingir a tensão máxima desenvolvida (TPT, ms) nos diferentes grupos e momentos..... | 34 |

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | |
| Abstract | |
| 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVO | 15 |
| 2 MATERIAL E MÉTODO | 20 |
| 2.1 Animais..... | 20 |
| 2.2 Grupos de estudo..... | 20 |
| 2.3 Protocolo experimental..... | 21 |
| 2.3.1 Estudo mecânico do músculo papilar..... | 21 |
| 2.3.2 Parâmetros funcionais..... | 24 |
| 2.3.3 Protocolo funcional..... | 25 |
| 2.4 Análise Estatística..... | 27 |
| 3 RESULTADOS | 28 |
| 4 DISCUSSÃO | 35 |
| 5 CONCLUSÃO | 49 |
| 6 REFERÊNCIAS | 50 |

Pinotti MF. Efeitos da mistura enantiomérica da bupivacaína (S75/R25), da bupivacaína racêmica e da ropivacaína sobre a função mecânica do músculo papilar isolado de ratos. Botucatu, 2013, 58p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Introdução e objetivo: Anestésicos locais (AL) são fármacos que promovem a interrupção temporária da transmissão dos impulsos nervosos, possibilitando a instalação de analgesia, anestesia e bloqueio motor no território de inervação onde são aplicados. Desde o advento da cocaína, houve a necessidade de sintetizar fármacos mais seguros com menos efeitos tóxicos sobre os sistemas nervoso central e cardiovascular. A cardiotoxicidade dos AL depende, entre outras, de características físico-químicas do fármaco como a isomeria. A toxicidade da bupivacaína racêmica estimulou o estudo de seus isômeros isoladamente, comprovando o maior potencial cardiotoxígeno do isômero R. A ropivacaína mostrou menor potencial cardiotoxígeno que o da bupivacaína. Entretanto, os efeitos cardiovasculares da mistura enantiomérica da bupivacaína (S75/R25) foram pouco estudados. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da mistura enantiomérica da bupivacaína (S75/R25), da bupivacaína racêmica e da ropivacaína sobre a função contrátil do miocárdio. *Material e Método:* Foram usados 46 ratos Wistar com 60 dias de idade e peso aproximado de 300g. As preparações com músculos papilares foram estudadas em situação basal e após 5, 10 e 15 min de contato com o AL (M1, M2, M3 e M4, respectivamente). Os AL utilizados foram a bupivacaína racêmica (BUP), a mistura enantiomérica da bupivacaína (S75/R25) e a ropivacaína (ROP) nas concentrações de 50 μM e 100 μM . Os parâmetros funcionais em contração isométrica analisados foram tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm^2), tensão de repouso (TR, g/mm^2), velocidade máxima de variação da TD (+dT/dt, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$), velocidade máxima de decréscimo da TD (-dT/dt, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$) e tempo para atingir o pico da TD (TPT, ms). *Resultados:* A TD foi diminuída por 100 μM de bupivacaína racêmica a partir de M2 e foi menor nos grupos BUP 100 e S75/R25 100 em comparação com ambas as concentrações de ropivacaína. A TR foi diminuída por 50 μM de bupivacaína racêmica a partir de M2. A +dT/dt foi reduzida por 100 μM de bupivacaína racêmica a partir de M2 até M4 e por 100 μM de S75/R25 em M3. A -

dT/dt foi diminuída por 100 μ M de bupivacaína racêmica e de S75/R25 a partir de M2. A ropivacaína não diminuiu a +dT/dt e a -dT/dt. O TPT não foi modificado em nenhum grupo ou momento. *Conclusão:* A mistura enantiomérica S75/R25 deprimiu a função contrátil do miocárdio de forma semelhante à bupivacaína racêmica. A ropivacaína não deprimiu a contratilidade do músculo papilar isolado de ratos quando comparada à bupivacaína racêmica.

Palavas-chave: toxicidade, contratilidade miocárdica, anestésicos locais.

Pinotti MF. Effects of the enantiomeric solution of bupivacaine (S75/R25), racemic bupivacaine and ropivacaine on the mechanical function of the rat papillary muscle. Botucatu, 2013, 58p. These (PhD degree in Anesthesiology) - Botucatu Medical School, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Introduction and objective: Local anesthetics (LA) are drugs that promote temporary interruption of the transmission of nerve impulses, enabling the installation of analgesia, anesthesia and motor blockade in the nerve territory they are applied. Since the advent of cocaine it was necessary to synthesize safer drugs with fewer toxic effects on the central nervous and cardiovascular systems. Cardiotoxicity of LA depends, among others, the physicochemical characteristics of the drugs, as isomerism. Racemic bupivacaine toxicity stimulated the study of isomers alone, providing the most cardiotoxic potential of the R isomer. Ropivacaine showed lower cardiotoxic potential than bupivacaine. However, the cardiovascular effects of the enantiomeric solution of bupivacaine (S75/R25) remain understudied. The aim of this work was to study the effects of the enantiomeric solution of bupivacaine (S75/R25), racemic bupivacaine and ropivacaine on myocardial contractile function. *Material and method:* Forty six sixty-day old male Wistar rats weighing approximately 300g were used. Preparations with papillary muscles were studied under basal conditions and after 5, 10 and 15 min of contact with the LA (M1, M2, M3 and M4, respectively). The LA used were racemic bupivacaine (BUP), enantiomeric solution of bupivacaine (S75/R25) and ropivacaine (ROP) at concentrations of 50 μM and 100 μM . Functional parameters in isometric contraction were developed tension (DT, g/mm^2), resting tension (RT, g/mm^2), maximum rate of tension development ($+\text{dT}/\text{dt}$, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$), maximum rate of tension decline ($-\text{dT}/\text{dt}$, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$) and time to peak tension (TPT, ms). *Results:* Racemic bupivacaine 100 μM decreased DT from M2 until the end of the experiment and DT was lower in BUP 100 and S75/R25 100 compared to both ropivacaine concentrations. RT was lowered with racemic bupivacaine 50 μM from M2 until the end of the experiment. $+\text{dT}/\text{dt}$ was reduced with racemic bupivacaine 100 μM from M2 to M4 and with S75/R25 100 μM in M3. $-\text{dT}/\text{dt}$ was diminished with racemic bupivacaine and

S75/R25 100 μ M from M2 to M4. Ropivacaine did not alter +dT/dt and -dT/dt. TPT was not modified in any group or moment. *Conclusion:* The enantiomeric solution S75/R25 depressed myocardial contractile function similarly to racemic bupivacaine. Ropivacaine did not depress the rat isolated papillary muscle contractility when compared to racemic bupivacaine.

Key-words: toxicity, myocardial contraction, local anesthetics.

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Anestésicos locais (AL) são fármacos que promovem a interrupção temporária da transmissão dos impulsos nervosos, possibilitando a instalação de analgesia, anestesia e bloqueio motor no território de inervação onde são aplicados¹. Os primeiros relatos do uso de produtos naturais com ação anestésica local datam de 1653, quando o jesuíta espanhol Bernabé Cobo experimentou alívio da dor dentária ao mascar folhas de coca (*Erythroxylum coca*), planta nativa das cordilheiras peruanas e bolivianas². Dois séculos se passaram até que, em 1856, o alemão Albert Niemann isolou o alcalóide responsável pelos efeitos anestésicos da coca, dando-lhe o nome de cocaína³. Os efeitos anestésicos da cocaína não despertaram interesse inicial dos pesquisadores da época que procuravam estudar o que o fármaco ocasionava no sistema nervoso central após a administração sistêmica³. Anos se passaram até que o austríaco Carl Koller, seguindo os passos de seu mentor Sigmund Freud, iniciou os estudos sobre anestesia tópica oftalmológica com cocaína⁴. Em 15 de setembro de 1884, Josef Brettauer apresentou o manuscrito do amigo Koller à comunidade científica no Congresso Oftalmológico em Heidelberg, Alemanha⁵, iniciando uma nova era na anesthesiologia, a anestesia loco-regional.

A descoberta dos efeitos anestésicos locais da cocaína possibilitou o desenvolvimento das técnicas de anestesia local e regional. Antes mesmo da divulgação dos resultados de Koller, von Anrep conseguiu anestésiar seu braço em área distal à injeção de cocaína. Entretanto, essa observação não ganhou importância até que Willian Halsted e Alfred Hall iniciaram os experimentos com cocaína injetada em troncos nervosos. Halsted e Hall obtiveram anestesia distal ao ponto de injeção de cocaína para cirurgia do antebraço e divulgaram seus resultados no final de 1884 em Nova York⁶. A

partir de então, os bloqueios do plexo braquial, dos nervos ciático, alveolar inferior e oftálmico foram realizados com solução de cocaína, com grande êxito anestésico⁷. Após as publicações de Halsted e Hall, o neurologista americano James Leonard Corning utilizou a cocaína por via peridural, iniciando o desenvolvimento de nova etapa na anestesia loco-regional: a anestesia do neuroeixo. Corning observou perda da sensibilidade de períneo e membros inferiores após injeção de cocaína entre T11 e T12 em um homem de 45 anos. Acredita-se que a via peridural tenha sido utilizada pela correlação entre a dose aplicada e o efeito clínico observado⁸. Nos últimos anos do século XIX, os alemães August Bier e Friederich von Esmarch, com o aprimoramento de agulhas e com a aplicação de cocaína no espaço subaracnóideo, contribuíram para o desenvolvimento da anestesia espinal⁹.

Além dos efeitos terapêuticos desejados da cocaína, o pequeno tempo de ação, os efeitos tóxicos e o potencial de dependência suscitaram a importância do desenvolvimento de novos fármacos. A procaína, sintetizada em 1905 por Alfred Einhorn, foi o agente mais utilizado por mais de 20 anos. Contudo, casos de intoxicação continuaram frequentes, obrigando a Associação Médica Americana a formar o Comitê para o Estudo dos Efeitos Tóxicos dos Anestésicos Locais no início da década de 1920¹⁰. Em 1932, a tetracaína foi introduzida na prática clínica como agente de duração mais prolongada¹¹. A lidocaína, sintetizada em 1948 por Torsten Gordh, apresentava baixa toxicidade e tempo intermediário de ação, sendo utilizada até hoje¹². Outros fármacos foram inseridos na prática clínica, como a cloroprocaína (1952), a mepivacaína (1957) e a bupivacaína (1963). E, apesar da síntese de novos AL, estes continuaram a apresentar efeitos clínicos indesejados, ou seja, sinais de intoxicação do sistema nervoso central (SNC) e do sistema cardiovascular (SCV).

Os sinais de intoxicação do SNC foram primeiramente atribuídos à cocaína, após a ocorrência de convulsões e falência respiratória em pacientes submetidos à anestesia regional com o fármaco¹³. Atualmente, manifestações de excitação do SNC, como distúrbios de audição, zumbidos, tonturas, gosto metálico e agitação psicomotora, são reconhecidamente sinais de alerta de intoxicação e ocorrem previamente às manifestações convulsivas e à depressão cardiovascular¹⁴. Por outro lado, não fica claro quando os sinais de toxicidade cardiovascular deixaram de ser considerados apenas efeitos colaterais, mas componentes da toxicidade sistêmica dos AL¹⁴. Somente após a divulgação de casuística de eventos cardiovasculares indesejados relacionados ao uso de bupivacaína racêmica e etidocaína, como arritmias graves e colapso cardiovascular de difícil reanimação, o interesse da comunidade científica para o potencial cardiotoxico dos AL se tornou maior¹⁵.

Sabe-se que o bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes na membrana dos axônios é o principal mecanismo farmacológico responsável pela ação terapêutica dos AL. Entretanto, em concentrações elevadas, os AL podem atuar nos canais de potássio e de cálcio, nos receptores beta-adrenérgicos, na adenil ciclase e no metabolismo energético mitocondrial, levando a alterações do funcionamento do sistema cardiovascular¹.

Além dos efeitos sobre a atividade elétrica cardíaca, os AL também modificam o desempenho mecânico do coração¹⁶⁻²¹. Estudos mostraram que a bupivacaína e a ropivacaína diminuem a contratilidade do coração isolado^{16,19}. Pesquisas em músculo papilar isolado demonstraram os efeitos inotrópicos negativos da mepivacaína e da lidocaína²⁰, da bupivacaína^{21,22}, da levobupivacaína²¹ e da ropivacaína²³.

O potencial cardiotoxíco dos AL está relacionado às características físico-químicas e à via de administração do fármaco e a fatores relativos ao paciente^{1,16,17,24-27}. Fármacos mais potentes como a bupivacaína, a ropivacaína e a levobupivacaína são mais cardiotoxícos que os menos potentes, como a lidocaína^{1,17,28,29}. A solubilidade lipídica, a maior fração livre no plasma e o tamanho da cadeia lateral são fatores que aumentam o potencial cardiotoxíco dos AL^{1,16,30}.

A isomeria também influencia a toxicidade dos AL. A reconhecida cardiotoxicidade da bupivacaína racêmica estimulou o desenvolvimento de estudos clínicos e experimentais comparando os efeitos isolados dos enantiômeros R e S da bupivacaína, a síntese de novos fármacos como a ropivacaína, que foi introduzida na clínica anestesiológica em 1992, e o estudo de misturas enantioméricas¹.

Assim, constatou-se que a R-bupivacaína inibiu o canal de sódio neuronal mais intensamente que a S-bupivacaína, porém sem diferenças no bloqueio do nervo ciático em ratos³¹. A mistura enantiomérica da bupivacaína com 75% de isômero S (S75/R25) foi mais potente que os isômeros isolados da bupivacaína no bloqueio do nervo motor em ratos³². Em pacientes submetidas à analgesia de parto, a mistura S75/R25 foi comparada à ropivacaína, mostrando analgesia, bloqueio motor e parâmetros fetais semelhantes³³.

Em relação à cardiotoxicidade, a bupivacaína racêmica foi duas vezes mais potente do que a levobupivacaína e a ropivacaína em aumentar o QRS e mostrou-se mais deletéria quanto à evolução da parada cardíco-respiratória em suínos³⁴. Foi observado que a R-bupivacaína apresenta maior afinidade pelos canais de sódio cardíacos do que o isômero S^{35,36}. O isômero R da bupivacaína provocou maior aumento dos intervalos PR e QRS quando comparado ao isômero S em coração

isolado²⁵. Estudos eletrofisiológicos mostraram que a levobupivacaína apresentou risco intermediário de desenvolver arritmias em relação à bupivacaína racêmica e à ropivacaína^{34,37}. Doses menores de bupivacaína causaram efeitos hemodinâmicos e eletrofisiológicos indesejáveis em animais vivos mais pronunciados do que as mesmas doses de ropivacaína³⁸.

Os efeitos dos diferentes enantiômeros também foram observados sobre a função contrátil do coração sob a ação dos AL. Em coração isolado de porquinhos-da-índia, a bupivacaína racêmica apresentou inotropismo negativo mais intenso que a ropivacaína³⁹. A depressão do inotropismo cardíaco pela bupivacaína foi duas a três vezes maior do que com a ropivacaína, porém sem diferenças entre os isômeros¹⁶. Por outro lado, estudo prévio mostrou que a levobupivacaína provocou maiores alterações na contração e no relaxamento do músculo papilar isolado de ratos em comparação à ropivacaína e à bupivacaína racêmica²¹.

Os efeitos cardiovasculares da mistura enantiomérica da bupivacaína S75/R25 foram pouco pesquisados. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da mistura enantiomérica da bupivacaína S75/R25, da bupivacaína racêmica e da ropivacaína sobre a função mecânica do miocárdio.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Animais

Foram utilizados 46 ratos Wistar, machos, com 60 dias de idade e peso aproximado de 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente controlado, com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de $55\% \pm 5\%$, ciclos de iluminação de 12 h, alimentados com ração balanceada comercial labina (Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi realizado de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo U.S. *National Institute of Health*, e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

2.2 Grupos de estudo

Os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos: intoxicação com bupivacaína racêmica (Neocaína®) nas concentrações de 50 μM e 100 μM (**BUP 50** e **BUP 100**), intoxicação com mistura enantiomérica da bupivacaína S75/R25 (Novabupi®) nas concentrações de 50 μM e 100 μM (**S75/R25 50** e **S75/R25 100**) e intoxicação com ropivacaína (Ropi®) nas concentrações de 50 μM e 100 μM (**ROP 50** e **ROP 100**). Os fármacos foram fornecidos por Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil.

2.3 Protocolo experimental

2.3.1 Estudo mecânico do músculo papilar

A função mecânica do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo foi avaliada conforme estabelecido no Laboratório Experimental de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP⁴⁰. Imediatamente antes do estudo, os animais foram previamente anestesiados com pentobarbital sódico 50 mg.kg⁻¹ intraperitoneal e decapitados. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit⁴¹ (118,5 mM NaCl; 4,69 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,16 mM MgSO₄; 1,18 mM KH₂PO₄; 5,5 mM glicose e 24,88 mM NaCO₃) na temperatura de 28°C e previamente oxigenada durante 10 min com mistura carbogênica de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. Após permanecer 1 min na solução, os corações foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular. Este foi dividido a fim de permitir a adequada exposição dos músculos papilares anterior e posterior do ventrículo esquerdo. O músculo papilar anterior ou posterior do ventrículo esquerdo foi cuidadosamente dissecado, mantendo-se na sua extremidade segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos foram presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 mm a 4,2 mm. A fixação dos anéis nesses fragmentos de parede ventricular teve a finalidade de evitar lesão nas extremidades dos músculos papilares.

Após fixados, os músculos papilares foram posicionados verticalmente em uma cuba contendo 50 mL de solução de Krebs-Henseleit, em temperatura controlada de 28°C por meio de banho circulante (Refrigerating/Heating -20°C to 150°C, PolyScience Division of Peston Industries, Niles, IL, USA) e continuamente oxigenada

com uma mistura carbogênica composta por 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. O anel inferior foi acoplado a um fio de aço inoxidável de 0,38 mm de diâmetro e conectado a um transdutor de força (Grass FT03 Force Displacement Transducer, GRASS Technologies, West Warwick, RI, USA). O fio atravessava uma fenda preenchida por mercúrio existente no assoalho da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo papilar foi conectada a um fio de aço semelhante ao anterior, ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica de metal, cuja relação entre os braços longo e curto era de 4:1. Sobre essa extremidade existia um micrômetro (L.S. Starrett Company, Athol, MA, USA), que controlou a extensão dos movimentos de alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo papilar (Figura 1). Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso um peso de 5,0 g, denominado pré-carga, que teve por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar.

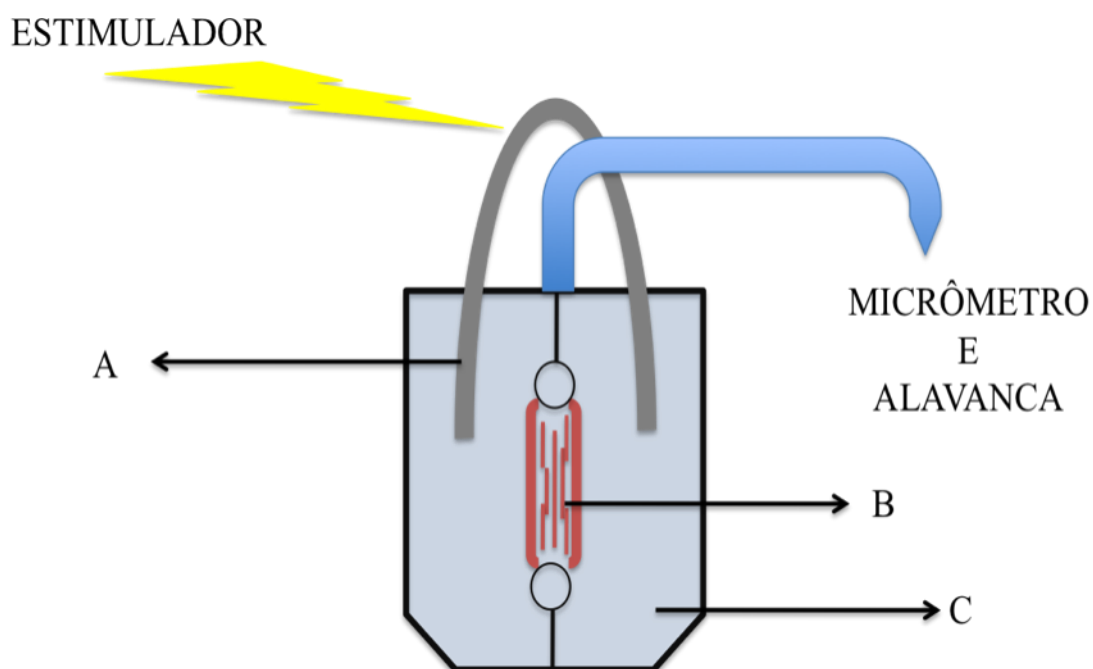


Figura 1. Representação esquemática da preparação com músculo papilar isolado. A: Eletrodo de platina. B: Músculo papilar isolado preso em suas extremidades pelos anéis de aço. C: Cuba contendo solução de Krebs-Henseleit.

Durante o período de estabilização, os músculos papilares foram estimulados a 0,2 Hz por meio de eletrodos de platina tipo agulha, posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a estimulador elétrico (Grass E8, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Comp, West Warwick, RI, USA), que emitiu estímulos em ondas retangulares de 5 ms. A voltagem utilizada foi 12 a 15 volts, aproximadamente 10% acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução permaneceu entre 7,38 e 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução oscilou entre 550 mmHg e 600 mmHg.

Após período de 60 min, durante os quais os músculos papilares contraíram contra a pré-carga sem desenvolverem força (contração isotônica), foi colocada carga adicional de 50 g, denominada pós-carga, na extremidade do braço curto da alavanca. A

carga total impediu o encurtamento muscular, passando os mesmos a desenvolver somente força (contração isométrica). O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impediu a movimentação da alavanca. Após 15 min de estabilização em contração isométrica, o músculo papilar foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado à força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, foi medido entre os anéis de aço por meio de catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, IL, USA) e denominado $L_{m\acute{a}x}$. Após atingir o $L_{m\acute{a}x}$, o músculo foi colocado novamente em contração isométrica e a frequência de estímulos elétricos foi aumentada progressivamente de 0,2 Hz até 1 Hz. O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permaneceu estável em contração isométrica por 30 min.

2.3.2 *Parâmetros funcionais*

Os seguintes parâmetros mecânicos foram analisados a partir de curvas obtidas durante contração isométrica: tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm^2), tensão de repouso (TR, g/mm^2), velocidade máxima de variação da TD ($+dT/dt$, $g/mm^2/s$), velocidade máxima de decréscimo da TD ($-dT/dt$, $g/mm^2/s$) e tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT, ms) (Figura 2).

As contrações isométricas foram registradas em sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge[®] MP100, Biopac Systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA). A análise das curvas permitiu determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, TR, $+dT/dt$, $-dT/dt$ e TPT foram divididos pela área

seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permitiu comparar o desempenho de músculos de diferentes tamanhos.

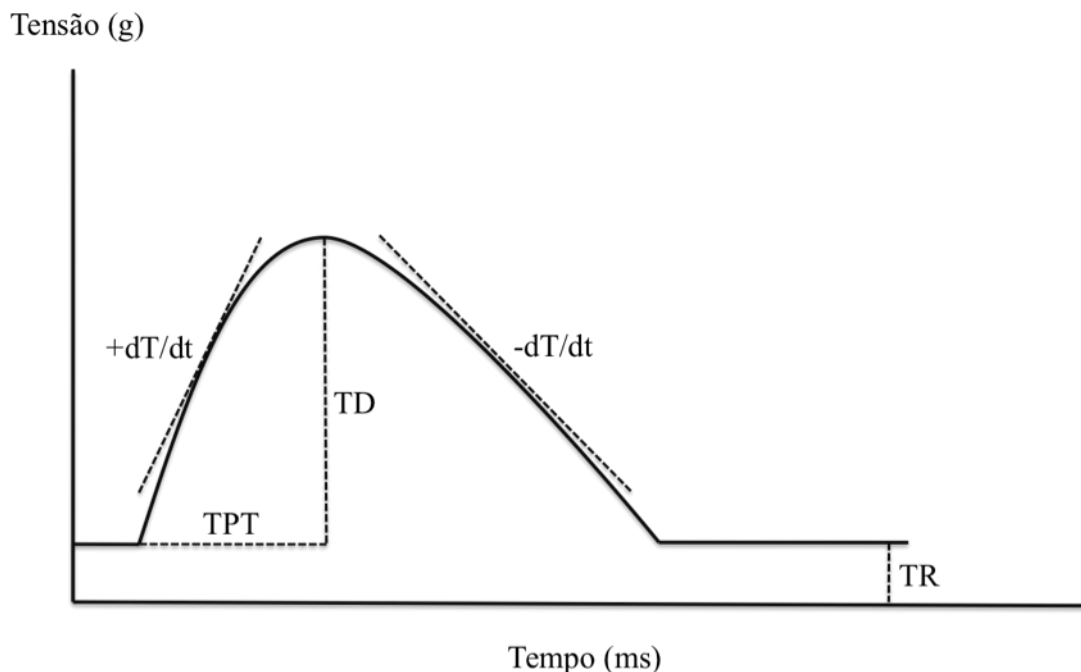


Figura 2. Representação gráfica da curva de contração isométrica.

2.3.3 Protocolo funcional

Os dados em condição basal foram obtidos com concentração de cálcio de 2,5 mM na solução de Krebs-Henseleit e a frequência de estímulo foi de 1,0 Hz, ou seja, 60 vezes por minuto por período prévio de 30 min (M1), frequência esta mantida durante a aplicação dos agentes anestésicos. Os anestésicos bupivacaína racêmica, ropivacaína e mistura enantiomérica da bupivacaína S75/R25, diluídos em água ultrapura, foram utilizados nos experimentos nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M. Os músculos papilares foram estudados nos seguintes momentos: 5 min (M2), 10 min (M3) e 15 min (M4) após a adição dos anestésicos na cuba contendo o músculo papilar e solução de Krebs-Henseleit. As variáveis TD, TR, $+dT/dt$, $-dT/dt$ e TPT foram obtidas pela média dos parâmetros registrados em períodos de aproximadamente 3 segundos.

As ações dos anestésicos locais, nas concentrações de 50 μM e 100 μM , sobre a função dos músculos papilares cardíacos foram analisadas pela depressão dos atributos que mensuram a contração isométrica do músculo papilar (TD, TR, $+dT/dt$, $-dT/dt$ e TPT)

As análises funcionais miocárdicas dos diferentes fármacos foram obtidas ao mesmo tempo em virtude de esse sistema contar com três cubas de estudo.

Após o término das manobras de avaliação mecânica, os músculos papilares foram retirados da preparação e usados para a avaliação da área seccional. O comprimento *in vitro* ($L_{\text{máx}}$) foi medido com auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico aproximadamente unitário, a área seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento determinado em $L_{\text{máx}}$.

Os músculos papilares dissecados inadequadamente ou que apresentavam comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. O desempenho mecânico foi considerado inadequado quando os valores das variáveis obtidas em contração isométrica apresentaram afastamento superior a 1,96 desvios padrão da média. Os músculos papilares que apresentaram área seccional entre 0,5 mm^2 e 1,5 mm^2 foram utilizados no experimento.

2.4 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio padrão da média. Foi utilizada a análise de variância para todas as variáveis, uma vez que houve interesse em comparar momentos e grupos, seguida pelo teste de Tuckey para comparação de médias. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Foram estudados 46 músculos papilares, 16 em contato com a bupivacaína racêmica, 16 em contato com a mistura enantiomérica (S75/R25) e 14 em contato com a ropivacaína, igualmente divididos entre as doses de 50 μM e 100 μM .

A análise estatística dos valores referentes à TD mostrou diminuição desse parâmetro somente na concentração de 100 μM de bupivacaína racêmica, resultado que se tornou evidente a partir do primeiro momento após o contato com o AL (M2) e perdurou por todo o período do estudo (Tabela 1, Figura 3). Ao se avaliar os diferentes grupos nos diversos momentos, pode-se observar que, em M2, a bupivacaína racêmica e a mistura enantiomérica S75/R25 na concentração de 100 μM apresentaram valores menores do que aqueles observados com a ropivacaína nas concentrações de 50 μM e 100 μM (Tabela 1, Figura 3). Com o transcorrer do tempo (M3 e M4), 50 μM de bupivacaína racêmica também causaram depressão da TD quando comparada com a ropivacaína na mesma dose (Tabela 1, Figura 3).

Quanto aos resultados referentes à TR, houve diminuição desse atributo com a bupivacaína racêmica na concentração de 50 μM a partir de M2 (Tabela 2, Figura 4).

Com relação à velocidade máxima de variação da TD (+dT/dt), observaram-se reduções desse atributo na concentração de 100 μM de bupivacaína racêmica a partir de M2 até M4 e com 100 μM da mistura S75/R25 somente em M3 (Tabela 3, Figura 5). Quando realizada a comparação dos diferentes anestésicos nos diferentes momentos, a concentração de 50 μM de ropivacaína mostrou valores estatisticamente superiores aos da bupivacaína racêmica e da mistura S75/R25 nas concentrações de 50 μM e 100 μM em M2. Em M3 e M4, as concentrações de 50 μM e 100 μM de ropivacaína

apresentaram valores superiores aos da bupivacaína racêmica nas doses de 50 μM e 100 μM e ao da mistura S75/R25 na concentração de 100 μM (Tabela 3, Figura 5).

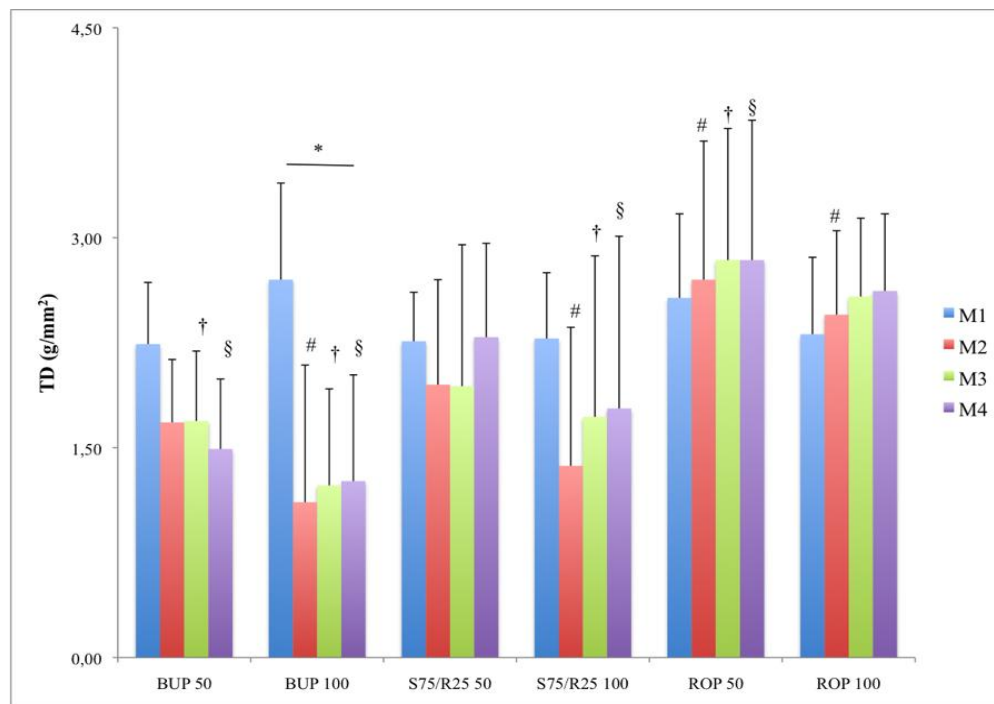
Quanto à velocidade máxima de decréscimo da TD ($-dT/dt$), observaram-se os menores valores com 100 μM de bupivacaína racêmica e da mistura enantiomérica S75/R25 a partir de M2. Ao se comparar os diferentes grupos nos diferentes momentos, constatou-se que, em M2 e M3, a ropivacaína a 50 μM apresentou valores estatisticamente superiores aos da bupivacaína racêmica e aos da mistura enantiomérica S75/R25 em ambas as concentrações. Em M4, valores referentes às concentrações de 50 μM e 100 μM de ropivacaína foram superiores aos da bupivacaína racêmica nas mesmas concentrações e, também, aos da mistura enantiomérica S75/R25 na concentração de 100 μM (Tabela 4, Figura 6).

O tempo para atingir a tensão máxima desenvolvida não foi modificado pelos anestésicos estudados em nenhum momento da pesquisa (Tabela 5, Figura 7).

Tabela 1. Tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm²) nos diferentes grupos e momentos

| | M1 | M2 | M3 | M4 |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| BUP 50 | 2,24 ± 0,44 aA | 1,68 ± 0,45 aAB | 1,69 ± 0,50 aBC | 1,49 ± 0,50 aBC |
| BUP 100 | 2,70 ± 0,69 aA | 1,11 ± 0,98 bB | 1,23 ± 0,69 bC | 1,26 ± 0,76 bC |
| S75/R25 50 | 2,26 ± 0,35 aA | 1,95 ± 0,75 aAB | 1,94 ± 1,01 aAB | 2,29 ± 0,67 aAB |
| S75/R25 100 | 2,28 ± 0,47 aA | 1,37 ± 0,99 aB | 1,72 ± 1,15 aBC | 1,78 ± 1,23 aBC |
| ROP 50 | 2,57 ± 0,60 aA | 2,70 ± 0,99 aA | 2,84 ± 0,94 aA | 2,84 ± 1,00 aA |
| ROP 100 | 2,31 ± 0,55 aA | 2,45 ± 0,60 aA | 2,58 ± 0,56 aAB | 2,62 ± 0,55 aAB |

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; letras maiúsculas comparam diferentes grupos em um dado momento e letras minúsculas comparam diferentes momentos em um mesmo grupo; ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos (p=0,003).

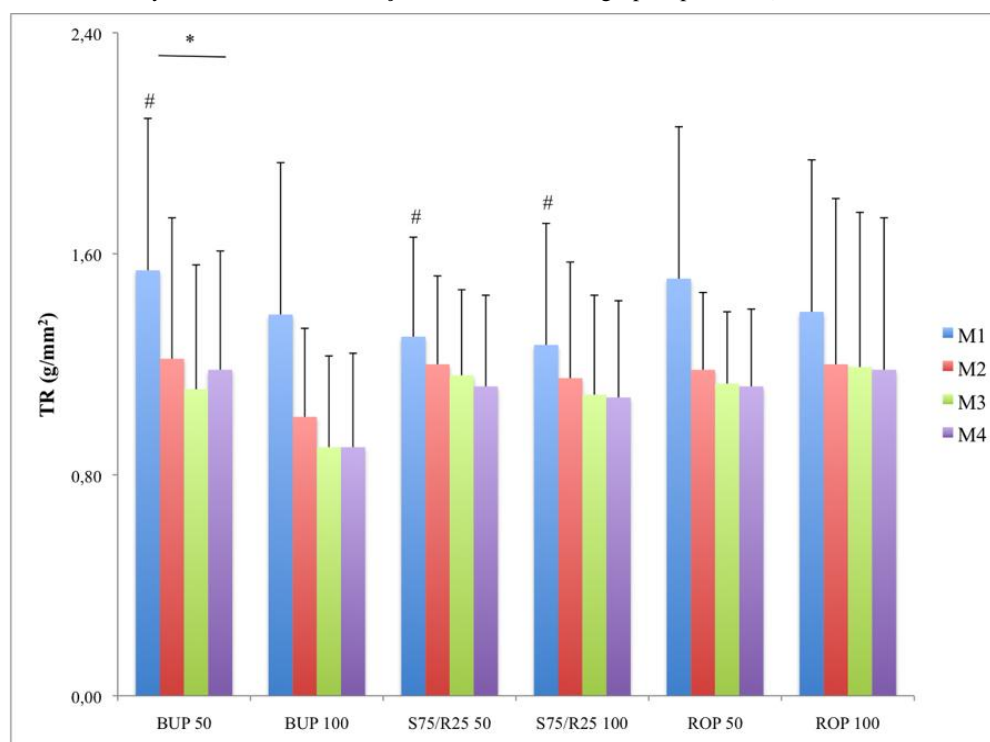
**Figura 3.** Tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm²) nos diferentes grupos e momentos.

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; M1>M2=M3=M4 em BUP 100(*); ROP 50 = ROP 100 > BUP 100 = S75/R25 100 em M2(#); ROP 50 > BUP 50 = BUP 100 = S75/R25 100 em M3(†) e M4(§); ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos (p=0,003).

Tabela 2. Tensão de repouso (TR, g/mm²) nos diferentes grupos e momentos

| | M1 | M2 | M3 | M4 |
|-------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| BUP 50 | 1,54 ± 0,55 aA | 1,22 ± 0,51 bA | 1,11 ± 0,45 bA | 1,18 ± 0,43 bA |
| BUP 100 | 1,38 ± 0,55 aAB | 1,01 ± 0,32 aA | 0,90 ± 0,33 aA | 0,90 ± 0,34 aA |
| S75/R25 50 | 1,30 ± 0,36 aB | 1,20 ± 0,32 aA | 1,16 ± 0,31 aA | 1,12 ± 0,33 aA |
| S75/R25 100 | 1,27 ± 0,44 aB | 1,15 ± 0,42 aA | 1,09 ± 0,36 aA | 1,08 ± 0,35 aA |
| ROP 50 | 1,51 ± 0,55 aAB | 1,18 ± 0,28 aA | 1,13 ± 0,26 aA | 1,12 ± 0,28 aA |
| ROP 100 | 1,39 ± 0,55 aAB | 1,20 ± 0,60 aA | 1,19 ± 0,56 aA | 1,18 ± 0,55 aA |

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; letras maiúsculas comparam diferentes grupos em um dado momento e letras minúsculas comparam diferentes momentos em um mesmo grupo; ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos (p=0,0001).

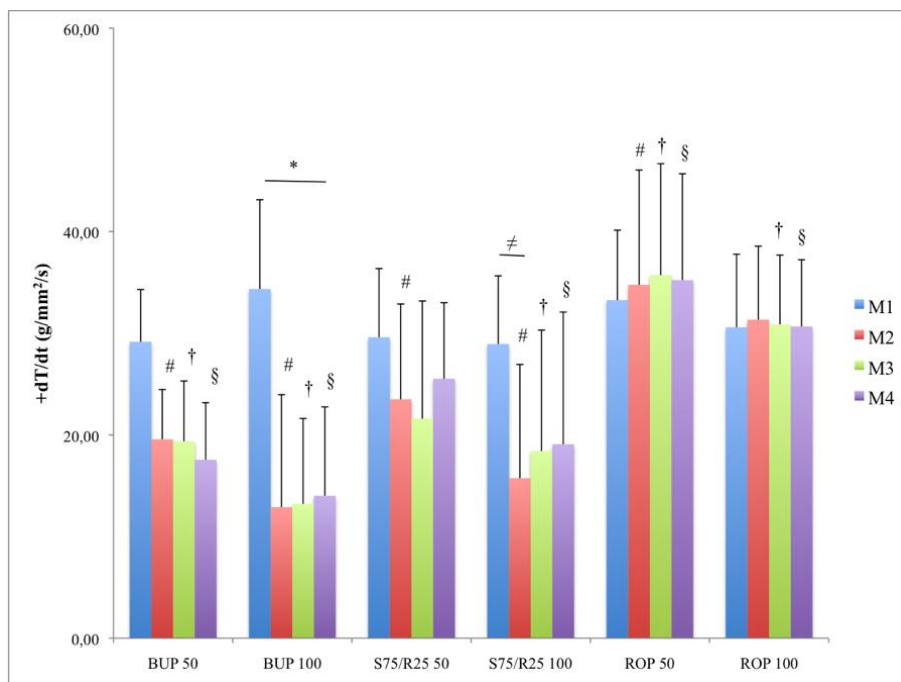
**Figura 4.** Tensão de repouso (TR, g/mm²) nos diferentes grupos e momentos.

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; M1>M2=M3=M4 em BUP 50(*); BUP 50 > S75/R25 50 = S75/R25 100 em M1(#); ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos (p=0,0001).

Tabela 3. Velocidade máxima de variação da TD ($+dT/dt$, $g/mm^2/s$) nos diferentes grupos e momentos

| | M1 | M2 | M3 | M4 |
|-------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| BUP 50 | 29,16 ± 5,14 aA | 19,56 ± 4,90 aC | 19,36 ± 5,94 aB | 17,55 ± 5,62 aB |
| BUP 100 | 34,35 ± 8,78 aA | 12,89 ± 11,06 bC | 13,21 ± 8,40 bB | 14,01 ± 8,74 bB |
| S75/R25 50 | 29,60 ± 6,76 aA | 23,50 ± 9,37 aBC | 21,60 ± 11,57 aAB | 25,52 ± 7,48 aAB |
| S75/R25 100 | 28,93 ± 6,71 aA | 15,74 ± 11,19 bC | 18,42 ± 11,89 abB | 19,08 ± 13,00 abB |
| ROP 50 | 33,25 ± 6,88 aA | 34,76 ± 11,29 aA | 35,71 ± 10,97 aA | 35,23 ± 10,45 aA |
| ROP 100 | 30,58 ± 7,19 aA | 31,33 ± 7,23 aAB | 30,86 ± 6,82 aA | 30,66 ± 6,56 aA |

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; letras maiúsculas comparam diferentes grupos em um dado momento e letras minúsculas comparam diferentes momentos em um mesmo grupo; ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos ($p < 0,0001$).

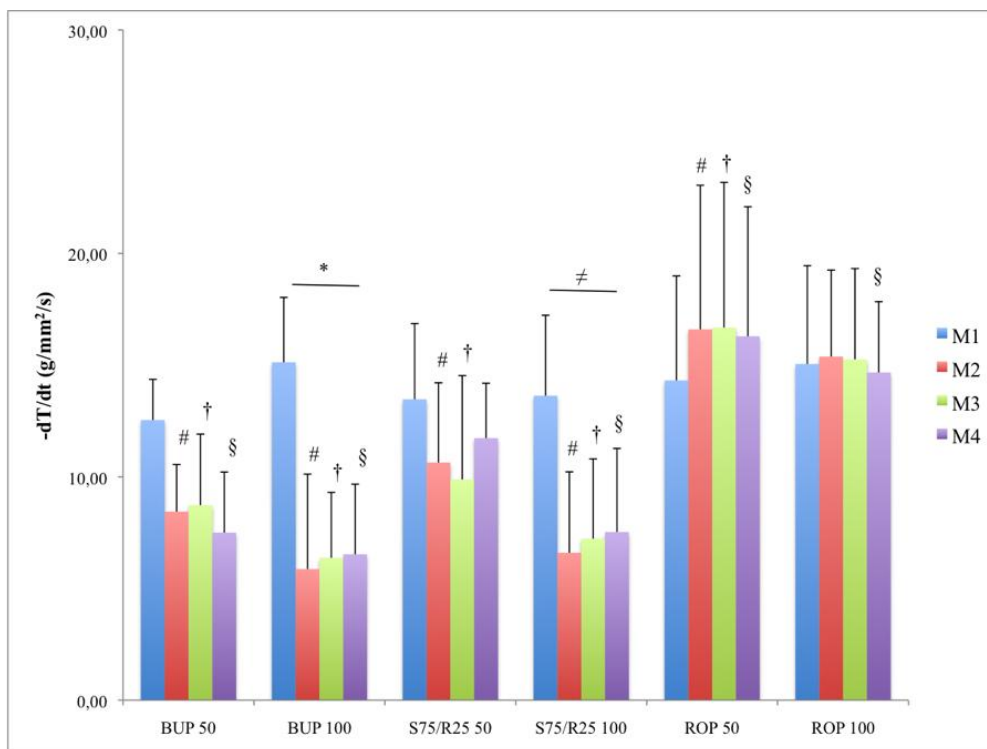
**Figura 5.** Velocidade máxima de variação da TD ($+dT/dt$, $g/mm^2/s$) nos diferentes grupos e momentos.

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; M1>M2=M3=M4 em BUP 100(*); M1>M2 em S75/R25 100(≠); ROP 50 > BUP 50 = BUP 100 = S75/R25 50 = S75/R25 100 em M2(#); ROP 50 > BUP 50 = BUP 100 = S75/R25 100 em M3(†) e M4(§); ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos ($p < 0,0001$).

Tabela 4. Velocidade máxima de decréscimo da TD ($-dT/dt$, $g/mm^2/s$) nos diferentes grupos e momentos

| | M1 | M2 | M3 | M4 |
|-------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| BUP 50 | 12,54 ± 1,82 aA | 8,44 ± 2,11 aC | 8,73 ± 3,18 aC | 7,50 ± 2,71 aB |
| BUP 100 | 15,13 ± 2,90 aA | 5,87 ± 4,25 bC | 6,37 ± 2,93 bC | 6,53 ± 3,14 bB |
| S75/R25 50 | 13,47 ± 3,39 aA | 10,64 ± 3,57 aBC | 9,88 ± 4,65 aBC | 11,73 ± 2,46 aAB |
| S75/R25 100 | 13,63 ± 3,60 aA | 6,60 ± 3,62 bC | 7,23 ± 3,57 bC | 7,53 ± 3,74 bB |
| ROP 50 | 14,31 ± 4,68 aA | 16,60 ± 6,45 aA | 16,68 ± 6,50 aA | 16,29 ± 5,80 aA |
| ROP 100 | 15,05 ± 4,40 aA | 15,38 ± 3,87 aAB | 15,26 ± 4,06 aAB | 14,67 ± 3,17 aA |

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; letras maiúsculas comparam diferentes grupos em um dado momento e letras minúsculas comparam diferentes momentos em um mesmo grupo; ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos ($p < 0,0001$).

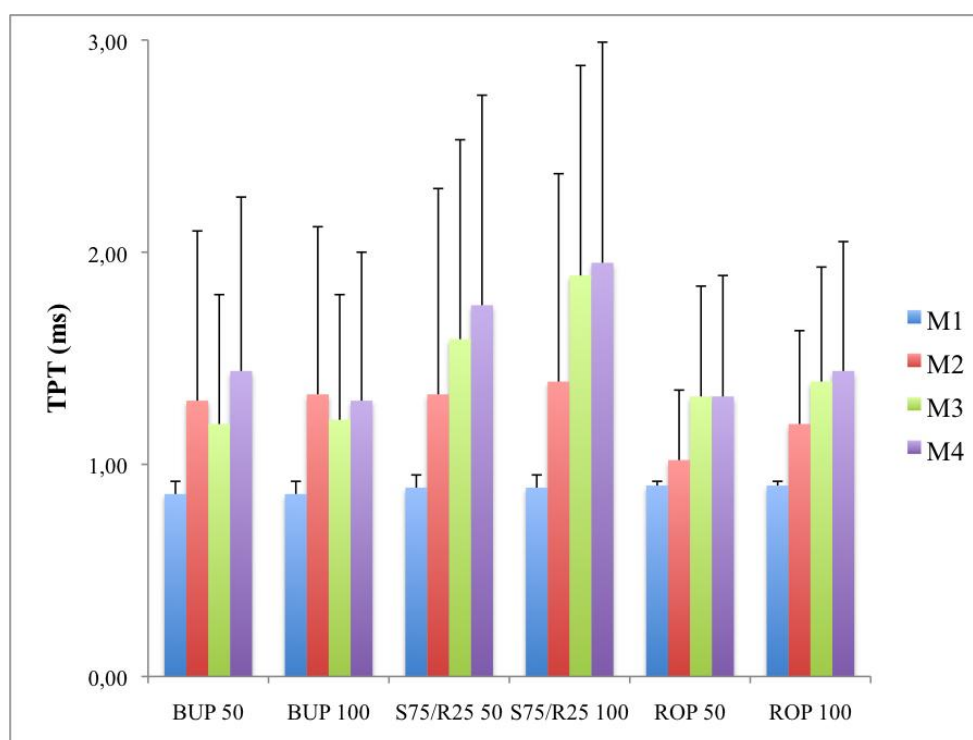
**Figura 6.** Velocidade máxima de decréscimo da TD ($-dT/dt$, $g/mm^2/s$) nos diferentes grupos e momentos.

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; M1>M2=M3=M4 em BUP 100(*); M1>M2=M3=M4 em S75/R25 100(≠); ROP 50 > BUP 50 = BUP 100 = S75/R25 50 = S75/R25 100 em M2(#) e M3(†); ROP 50 = ROP 100 > BUP 50 = BUP 100 = S75/R25 100 em M4(§); ANOVA; teste de Tukey; houve efeito da interação entre momentos e grupos ($p < 0,0001$).

Tabela 5. Tempo para atingir a tensão máxima desenvolvida (TPT, ms) nos diferentes grupos e momentos

| | M1 | M2 | M3 | M4 |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| BUP 50 | 0,86 ± 0,06 | 1,30 ± 0,80 | 1,19 ± 0,61 | 1,44 ± 0,82 |
| BUP 100 | 0,86 ± 0,06 | 1,33 ± 0,79 | 1,21 ± 0,59 | 1,30 ± 0,70 |
| S75/R25 50 | 0,89 ± 0,06 | 1,33 ± 0,97 | 1,59 ± 0,94 | 1,75 ± 0,99 |
| S75/R25 100 | 0,89 ± 0,06 | 1,39 ± 0,98 | 1,89 ± 0,99 | 1,95 ± 1,04 |
| ROP 50 | 0,90 ± 0,02 | 1,02 ± 0,33 | 1,32 ± 0,52 | 1,32 ± 0,57 |
| ROP 100 | 0,90 ± 0,02 | 1,19 ± 0,44 | 1,39 ± 0,54 | 1,44 ± 0,61 |

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; ANOVA; teste de Tukey; não houve efeito da interação entre momentos e grupos ($p > 0,05$).

**Figura 7.** Tempo para atingir a tensão máxima desenvolvida (TPT, ms) nos diferentes grupos e momentos.

Valores em média ± desvio padrão; BUP: músculos papilares intoxicados com bupivacaína racêmica; S75/R25: músculos papilares intoxicados com mistura enantiomérica; ROP: músculos papilares intoxicados com ropivacaína; M1: dados em situação basal; M2: dados após 5 minutos da adição do anestésico local; M3: dados após 10 minutos da adição do anestésico local; M4: dados após 15 minutos da adição do anestésico local; ANOVA; teste de Tukey; não houve efeito da interação entre momentos e grupos ($p > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Modelos experimentais que utilizam preparações com músculo papilar isolado permitem medir a capacidade do miocárdio em desenvolver força, independentemente de variáveis que possam influenciar o desempenho do músculo cardíaco *in vivo*, como frequência cardíaca, pré-carga e pós-carga.

Os resultados deste estudo mostraram que a bupivacaína racêmica e a mistura enantiomérica S75/R25, em concentrações elevadas, deprimiram a contratilidade do músculo papilar do rato. O mesmo comportamento foi observado em relação ao relaxamento muscular. A ropivacaína não apresentou efeitos depressores na contração e no relaxamento do músculo cardíaco.

Pesquisas *in vitro* com músculos cardíacos atriais e ventriculares em várias espécies de animais mostraram que a bupivacaína, em concentração de 10 μM , reduziu o pico de tensão máxima desenvolvida (TD) em 20% a 30%^{21,22,42}.

A diminuição na tensão máxima desenvolvida (TD) iniciou-se com concentrações diferentes, na dependência do anestésico local estudado. Assim, com a bupivacaína racêmica, foi observada redução da TD a partir da concentração de 10 μM e, com a ropivacaína, a partir de 30 μM , sendo mais intensa quanto maior a concentração utilizada. Também foi constatado que a diminuição da TD era concentração dependente e significativamente maior quando se utilizava a bupivacaína, resultados provenientes de pesquisa sobre contratilidade dos músculos papilares de roedores²¹. Já em modelo com músculo gastrocnêmio de ratos, a bupivacaína racêmica inibiu a contratilidade a partir de concentração tão pequena quanto 0,5 μM e a mistura S75/R25, com concentrações superiores a 5 μM . Este estudo, que avaliou os efeitos da

bupivacaína, de seus isômeros S e R e da mistura S75/R25 mostrou que a depressão máxima da contratilidade ocorreu após a concentração de 40 μM ³².

Neste nosso modelo experimental, a diminuição na TD (Tabela 1, Figura 3) somente foi obtida com a bupivacaína na concentração de 100 μM . Com a ropivacaína e a mistura enantiomérica S75/R25, não foram observadas alterações na TD, nem mesmo na maior concentração estudada. A diferença entre os resultados obtidos nessas pesquisas provavelmente se deve ao fato de que os modelos experimentais e as espécies animais estudadas foram diferentes.

Além da depressão da tensão desenvolvida (Tabela 1, Figura 3) constatou-se menor velocidade de desenvolvimento da tensão (+dT/dt) com a bupivacaína racêmica e com a mistura enantiomérica S75/R25 (Tabela 3, Figura 5). Houve diminuição de +dT/dt, em M1, de 62,5% no grupo da bupivacaína racêmica e 43,6% naquele da mistura enantiomérica S75/R25, mostrando os efeitos prejudiciais da bupivacaína à contratilidade miocárdica.

No coração isolado estimulado por marca-passo, a ropivacaína e a bupivacaína racêmica em doses equipotentes deprimiram a função contrátil com mesma intensidade³⁹. Esses resultados são diferentes dos obtidos na presente pesquisa na qual não foram utilizadas doses equipotentes dos AL.

Outros autores estudaram porções trabeculares de ventrículo esquerdo de cão estimuladas 30 vezes por minuto e observaram que doses baixas de ropivacaína (10 μM) não diminuíram a contratilidade miocárdica. O aumento progressivo das concentrações de ropivacaína diminuiu o inotropismo, chegando a 50% de redução da contratilidade com 73 μM e ausência de contração com concentrações próximas de 1.000 μM ²³.

Efeitos inotrópicos negativos dos AL também foram demonstrados em músculo isolado^{18,21,42}. A bupivacaína racêmica reduziu o inotropismo do músculo atrial de cobaias⁴² e a tensão desenvolvida do músculo ventricular isolado de furão duas vezes mais intensamente do que a ropivacaína nas concentrações de 100 μM ¹⁸. Em músculo papilar isolado de ratos, a levobupivacaína deprimiu os parâmetros de contração e relaxamento de forma mais pronunciada do que a bupivacaína racêmica e a ropivacaína em concentrações próximas de 1.000 μM ²¹.

Nos modelos experimentais com músculo isolado, a frequência cardíaca ou frequência de estimulação altera a resposta tecidual aos AL. Isso ocorre porque o bloqueio que esses fármacos causam nos canais iônicos é fásico, ou seja, sua intensidade é dependente da frequência com que os canais se apresentam nos estados ativado ou inativado^{43,44}. Tal fato explicaria a grande variabilidade nas doses e concentrações de AL que causam a cardiotoxicidade relatada na literatura. Enquanto no presente estudo houve redução do inotropismo em concentrações de até 50 μM , outros autores demonstraram efeitos inotrópicos negativos em concentrações até 20 vezes superiores a esta, porém com frequência de estimulação 5 vezes inferior à aplicada no presente estudo²¹.

Deve-se ressaltar que, em modelos que preservam a integridade do sistema de condução cardíaco, as doses de AL que induzem cardiotoxicidade são menores, uma vez que a concentração dos AL necessária para alterar o funcionamento elétrico do coração é inferior àquela prejudicial ao inotropismo. Portanto, a diminuição da contratilidade pode ser consequência da depressão do sistema de condução cardíaco¹⁶. Sob esse aspecto, os experimentos que utilizam o músculo papilar são mais acurados para avaliar os efeitos desses fármacos sobre a contratilidade. Eles excluem os efeitos

desencadeados pela intoxicação prévia do sistema de condução cardíaco, evitam que o tecido contrátil receba influências do sistema nervoso autônomo, como a estimulação simpática que aumenta o inotropismo e a frequência cardíaca e a participação de fatores hemodinâmicos, como pré-carga e pós-carga.

Diferente do modelo experimental utilizado no presente estudo, aqueles que utilizam animais vivos também são importantes para elucidar diversos aspectos relacionados à cardiotoxicidade dos AL. Assim, em ovelhas não anestesiadas e monitorizadas com cateteres de artéria pulmonar e de aorta, que foram intoxicadas com doses subconvulsivantes de bupivacaína racêmica e de seu isômero S puro (levobupivacaína), houve diminuição do desempenho sistólico do ventrículo esquerdo dose e tempo dependentes. Ambos os anestésicos apresentaram comportamento bifásico: diminuição da pressão do ventrículo esquerdo com doses baixas e aumento da mesma com doses elevadas. Contudo, o aumento exagerado das doses de AL comprometeu a contratilidade miocárdica. A bupivacaína racêmica desencadeou arritmias malignas com maior frequência que o seu enantiômero S⁴⁵.

Estudo em porcos mostrou que a presença de arritmias ventriculares durante infusão de bupivacaína reduziu o débito cardíaco em 40%. Apesar da diminuição do débito cardíaco, o aumento da resistência vascular periférica manteve os valores de pressão arterial próximos da normalidade⁴⁶.

Em cães concluiu-se que a concentração plasmática necessária para desencadear colapso cardiovascular foi menor com a bupivacaína racêmica, seguida da levobupivacaína e da ropivacaína. A bupivacaína racêmica apresentou maior letalidade, seguida da levobupivacaína e da ropivacaína⁴⁷. Porém, em porcos anestesiados, mantidos em ventilação assistida e intoxicados com doses equipotentes de bupivacaína e

ropivacaína, não foram observadas diferenças entre os fármacos quanto aos efeitos sobre a pressão arterial média, à velocidade máxima de desenvolvimento de pressão no ventrículo esquerdo e à pressão diastólica final do ventrículo esquerdo³⁸. Os mesmos resultados foram obtidos em cães nos quais a bupivacaína racêmica, a levobupivacaína e a ropivacaína deprimiram a contratilidade miocárdica de maneira similar, manifestada pela diminuição da fração de ejeção, da fração de encurtamento muscular e da variação temporal do desenvolvimento pressórico ventriculares e aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. A variação dos parâmetros foi dependente da concentração dos AL⁴⁸.

Também em ovelhas anestesiadas, doses equipotentes de bupivacaína racêmica, levobupivacaína e ropivacaína causaram bradicardia e diminuição do inotropismo sem alterar os valores de pressão arterial. Os efeitos cardiotoxicos dos AL foram exacerbados quando os animais estavam sob efeito de anestesia geral⁴⁹.

Os resultados obtidos nesses estudos são discordantes daqueles encontrados na presente pesquisa, na qual a ropivacaína não deprimiu a contratilidade miocárdica. Contudo são modelos diferentes^{38,48,49}.

Estudos em coração isolado também podem ser empregados para demonstrar os efeitos cardiotoxicos dos AL. Em cobaias nas quais se utilizaram os isômeros R e S da bupivacaína e da ropivacaína, a bupivacaína deprimiu a contratilidade miocárdica com intensidade duas a três vezes superior à da ropivacaína. Não houve diferenças entre os isômeros R e S do mesmo anestésico. O aumento no tempo de condução átrio-ventricular mostrou que os isômeros R e S da bupivacaína, em baixas concentrações, comportaram-se de maneiras diferentes, sendo o isômero R mais

tóxico que o S. O mesmo fenômeno foi observado com os isômeros da ropivacaína, porém com doses cinco vezes maior¹⁶.

A levobupivacaína em preparações de coração isolado de ratos não estimulados por marca-passo diminuiu em 70% a velocidade necessária para se obter o pico de pressão do ventrículo esquerdo e em 78% a pressão sistólica do ventrículo esquerdo com a dose de apenas 5 microg/mL⁵⁰.

Foi descrito que o isômero R da bupivacaína deprime a contratilidade e causa alterações eletrocardiográficas mais intensas que o isômero S em coração isolado não estimulado por marca-passo. Com o início da estimulação por marca-passo e consequente manutenção da frequência cardíaca, os isômeros R e S da bupivacaína foram igualmente depressores da contratilidade miocárdica²⁹.

Está bem estabelecido que os isômeros da bupivacaína racêmica propiciam efeitos eletrofisiológicos diversos. O isômero R é mais tóxico ao coração do que o isômero S¹.

Postula-se que as soluções que contêm maior quantidade de isômeros R sejam mais tóxicas do que aquelas constituídas por isômero S puro e que, quanto maior a porcentagem de isômero R na solução, mais deletéria ela é. Tal fato pode ser explicado porque, embora os isômeros S da bupivacaína apresentem perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos semelhantes aos da forma racêmica, eles apresentam menor toxicidade ao coração⁵¹.

Estudos experimentais mostraram que a manipulação dos isômeros da bupivacaína (S75/R25) pode contribuir para melhorar a eficácia do isômero S e reduzir o potencial tóxico da mistura racêmica^{32,52}. A depressão da contratilidade do músculo papilar do rato foi mais pronunciada com a bupivacaína racêmica e com o isômero R

que com a mistura S75/R25 e com o isômero S quando em contato com concentrações que variaram de 0,5 μM a 4 μM ³².

Todavia, nem todas as pesquisas foram unânimes em assegurar a menor toxicidade dos isômeros S. Algumas^{18,21} que utilizaram músculo papilar de ratos ou furão mostraram que a ropivacaína foi menos potente que a bupivacaína em deprimir o inotropismo cardíaco. Contudo, quando administradas doses equipotentes de diversos AL e seus isômeros isoladamente, a levobupivacaína, isômero S puro da bupivacaína, deprimiu o inotropismo cardíaco mais intensamente que a bupivacaína racêmica e a ropivacaína²¹. A relação de potência entre ropivacaína e bupivacaína foi de 0,62 e entre a levobupivacaína e a bupivacaína foi de 0,9⁵³⁻⁵⁵. Outros autores apresentaram relação de potência para desencadear cardiotoxicidade diferente baseada na dose letal após injeção intra-coronariana de bupivacaína, de levobupivacaína e de ropivacaína que foi de 2,1:1,2:1³⁴.

Como a bupivacaína e os seus isômeros isoladamente ou em mistura apresentam padrões farmacocinéticos semelhantes⁵¹, pode-se inferir que a potência em desencadear toxicidade cardíaca da mistura S75/R25 seja intermediária entre a da bupivacaína e a da levobupivacaína. Neste experimento, ao analisar o comportamento de TD nos diferentes grupos, observou-se que a ropivacaína apresentou os maiores valores quando comparados aos da bupivacaína em ambas as concentrações e ao da mistura S75/R25 na concentração de 100 μM .

Está descrito que a ropivacaína apresenta efeito bloqueador fraco nos canais de sódio do sarcolema⁵⁶ e menor interferência com o metabolismo energético tecidual do músculo cardíaco⁵⁷ quando comparada à bupivacaína. A bupivacaína, por sua vez, possui múltiplas ações inibitórias na contratilidade cardíaca incluindo a inibição na

liberação de cálcio, no sequestro de cálcio do retículo sarcoplasmático e diminuição na ativação das miofibrilas²².

Em modelo *in vitro*, a bupivacaína na concentração de 100 μM lenteou o aumento na concentração intracelular de cálcio¹⁸, sugerindo que o anestésico inibiria os canais que liberam cálcio do retículo sarcoplasmático⁵⁸ e diminuiria a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio²².

Estudo *in vitro* realizado em miócitos do ventrículo de ratos sugeriu que o isômero S da bupivacaína, mas não o R, foi capaz de aumentar a concentração intracelular de cálcio durante a contração eletricamente estimulada, o que poderia explicar a menor toxicidade cardíaca dos isômeros S²⁶.

A mobilização intracelular de cálcio seria consequência do aumento da captação do íon pelo retículo sarcoplasmático e/ou da liberação do cálcio do retículo através dos canais de liberação do cálcio dos receptores rianodina²².

Com relação à velocidade de variação do decréscimo da tensão, que se correlaciona com a velocidade de relaxamento do músculo, pode-se observar os menores valores desse atributo com a bupivacaína e com a mistura S75/R25 na dose de 100 μM (Tabela 4, Figura 6). Na comparação dos grupos, a ropivacaína produziu menores efeitos negativos no relaxamento cardíaco que a bupivacaína e a sua mistura enantiomérica S75/R25 (Tabela 4, Figura 6).

Esses resultados são semelhantes aos de outros autores que também relataram maior relaxamento do músculo cardíaco com a bupivacaína e o seu isômero S quando comparados à ropivacaína²¹.

Em condições isotônicas e isométricas, o relaxamento do músculo cardíaco é dependente da recaptção do cálcio pelo retículo sarcoplasmático⁵⁹ e o AL também

exerce seu efeito na função do retículo. Está descrito que o fármaco causa sobrecarga de cálcio com subsequente contratura nos músculos cardíacos²². Como a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio é modulada pelo próprio cálcio, o aumento na concentração celular do íon aumenta a sensibilidade dos miofilamentos lenteando o seu relaxamento^{60,61}. Desta forma é provável que alterações no manuseio intracelular do cálcio tenham papel importante no mecanismo depressor do miocárdio induzido pelo AL.

Os AL diferem entre si quanto à capacidade de agir nos diversos canais iônicos. Em músculo papilar de porcos da Índia, a bupivacaína foi dez vezes mais potente em inibir a corrente de cálcio do que a lidocaína⁶². De forma similar, a bupivacaína foi mais potente em inibir os canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato que a ropivacaína e o isômero S da bupivacaína⁶³. Essas variações causam alterações eletrofisiológicas diferentes no coração.

Com relação à tensão de repouso (Tabela 2, Figura 4), os músculos submetidos ao tratamento com bupivacaína 50 μ M apresentaram valores estatisticamente superiores já no momento controle (M1) e por isto a redução dos valores no transcorrer do experimento mostraram-se estatisticamente significativos.

Vários outros fatores devem ser considerados na avaliação da função contrátil do músculo cardíaco sob ação dos AL e seus isômeros, como alterações iônicas, danos celulares estruturais e interferência com o mecanismo energético dos miócitos. Estudos anteriores comprovaram que os AL bloqueiam os canais de sódio miocárdicos, levando ao surgimento de arritmias e alterações da condução cardíaca^{64,65}. O bloqueio dos canais de sódio miocárdicos no estado inativado apresenta estereoseletividade pelo isômero R da bupivacaína⁶⁴. O pré-tratamento com solução

hipertônica de NaCl a 7,5% reduziu a incidência de arritmias em cães intoxicados com bupivacaína, mostrando a importância do bloqueio dos canais de sódio nos mecanismos de cardiotoxicidade induzidos pelos AL⁶⁵.

Os canais de potássio adenosina trifosfato(ATP)-dependentes também podem estar envolvidos no mecanismo de intoxicação cardiovascular causada pelos AL⁶³. Foi demonstrado que o bloqueio dos canais de potássio ATP-dependentes sofre efeito da concentração e da isomeria dos AL, sendo três vezes mais intenso com a bupivacaína racêmica que com a levobupivacaína e a ropivacaína⁶³. Sob efeito da ropivacaína, o potencial de ação cardíaco mostrou alteração nas correntes iônicas de influxo de sódio, cálcio e da corrente retificadora de potássio, provocando, respectivamente, lentidão da despolarização celular, diminuição da fase de platô e desaceleração da repolarização do miócito⁶⁶.

Alterações do trânsito de cálcio e dos mecanismos de excitação/contração causadas pelos AL foram amplamente estudadas^{18,23,25,26}. Em coração isolado o potencial arritmogênico do isômero R da bupivacaína foi maior que o da levobupivacaína; entretanto, a inibição de correntes de cálcio não foi diferente entre os isômeros da bupivacaína e a mistura racêmica²⁵. Foi demonstrado que a bupivacaína diminui a tensão desenvolvida com a mesma intensidade em que diminui a concentração intracelular de cálcio no músculo cardíaco isolado, com potência duas vezes superior à da ropivacaína¹⁸. Em miócito cardíaco isolado, a bupivacaína racêmica e seus isômeros, principalmente a levobupivacaína, aumentaram a concentração intracelular de cálcio pela sua liberação do retículo sarcoplasmático via rianodina. A ropivacaína deprimiu a contratilidade cardíaca somente em concentrações elevadas ao mesmo tempo em que alterou o influxo de cálcio para o sarcolema²³. Modificações da

sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao cálcio podem estar associadas ao mecanismo de cardiotoxicidade dos AL. Houve aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio na presença da bupivacaína racêmica e seus isômeros em altas concentrações²⁶.

Quando induzidas pelo AL, as alterações funcionais cardíacas podem ser decorrentes de mudanças na estrutura de membranas celulares⁶⁷. A bupivacaína racêmica e seus isômeros, em membranas contendo cardiolipina e colesterol mimetizando membranas cardiovasculares, levaram ao aumento da fluidez das membranas, e os danos apareceram, em ordem crescente de potência, com a levobupivacaína, a bupivacaína racêmica e a R-bupivacaína⁶⁷.

Estudos prévios relacionados ao metabolismo energético mitocondrial^{39,50,68,69} mostraram que a bupivacaína racêmica apresentou maior efeito tóxico na cadeia respiratória que a ropivacaína, a lidocaína e a etidocaína⁶⁸. Em coração isolado, a levobupivacaína promoveu disfunção contrátil e arritmias com diminuição do consumo de oxigênio. Também foi observado que os efeitos foram revertidos com o uso de emulsão lipídica, principalmente quando associada ao marca-passo⁵⁰. Em pesquisa que compilou diversos efeitos dos AL sobre o metabolismo energético miocárdico, tais como a inibição do transporte de elétrons, da ATPase e do transporte de cálcio mitocondriais, foi observada interação entre o AL e a cardiolipina, impedindo a fosforilação oxidativa e o metabolismo de fosfolípidos, levando à apoptose celular. Os efeitos mais intensos foram desencadeados pela bupivacaína e relacionados à lipossolubilidade do fármaco e não à estereoisomeria⁶⁹.

A disfunção contrátil induzida pela bupivacaína e pela ropivacaína foi pesquisada em coração isolado com alterações estruturais nas mitocôndrias. Avaliando-

se o consumo de oxigênio, pode-se constatar que a bupivacaína e a ropivacaína causaram disfunção contrátil, lesões mitocondriais e diminuição do consumo de oxigênio com a mesma intensidade nas doses de 10 μM e 30 μM . Entretanto, após 20 minutos de perfusão livre de AL, os parâmetros funcionais e de consumo de oxigênio voltaram aos valores basais nas preparações com bupivacaína e ropivacaína, mas as lesões estruturais com bupivacaína somente retornaram ao aspecto basal após 60 minutos sem anestésico. Os principais danos mitocondriais observados foram o edema, seguido de lesões focais em cristas mitocondriais e densidades floculares na organela³⁹.

A diversidade de resultados relatados na literatura referentes aos efeitos dos AL sobre a função cardíaca pode ser atribuída às diferentes espécies animais e condições experimentais^{43,70}. Estudar a cardiotoxicidade dos AL envolve ações diretas e indiretas desses fármacos sobre o tecido cardíaco⁴³. Foi demonstrado que os AL, além de alterarem o funcionamento de canais iônicos⁶³⁻⁶⁶, interferem com os mecanismos de acoplamento entre a excitação elétrica e a contração celular^{18,23,25,26}, causam danos estruturais em membranas celulares⁶⁷ e disfunção no metabolismo do miócito^{39,50,68,69}. Entre as ações diretas, as alterações no funcionamento do tecido contrátil se manifestam por diminuição da TD e das variáveis temporais de desenvolvimento de tensão e de relaxamento, como observado no presente estudo e em outros que utilizaram músculos isolados^{18,21,42}. Em modelos de coração isolado, a diminuição de pressões desenvolvidas e das variáveis temporais do desenvolvimento de pressão, bem como a diminuição das frações de ejeção e de encurtamento foram manifestações da toxicidade dos AL diretamente sobre o tecido contrátil^{16,19,23,29,39,50}. O mau funcionamento do tecido de condução cardíaco sob efeito dos AL, como lentidão da condução atrioventricular e do sistema Hiss-Purkinje, também compromete a função contrátil do miocárdio. Dessa

forma, a utilização de experimentos *in vivo* ou que preservam o sistema de condução, como o coração isolado, pode levar a interpretações equivocadas com relação aos efeitos dos AL sobre a contratilidade miocárdica⁴³. As ações dos sistemas nervoso central e autônomo sobre o coração, o uso de ventilação controlada ou respiração espontânea, o estado volêmico e a presença de outros fármacos, como anestésicos gerais, são fatores indiretos que podem influenciar a avaliação dos efeitos desencadeados pelos AL e serem fontes de confusão⁴³. Sabe-se, por exemplo, que a estimulação simpática decorrente da intoxicação do sistema nervoso central pelos AL induz resposta bifásica, com aumento inicial de parâmetros hemodinâmicos e inotrópicos^{45,49}.

A forma de administração dos AL pode alterar a interpretação dos resultados. Muitos pesquisadores administraram doses únicas, tentando mimetizar a injeção intravascular inadvertida de AL no ser humano, enquanto outros aplicaram a infusão contínua com o objetivo de descobrir a dose tóxica⁴³. Em animais vivos, a administração de AL pode não ser sistêmica, mas em órgãos isolados. Por exemplo, a perfusão coronariana isolada pode determinar os efeitos tóxicos dos AL sobre o coração, sem a influência dos efeitos sistêmicos desses fármacos⁷¹. Também podem ser estudados os efeitos desencadeados pela intoxicação do SNC sobre a função cardiovascular pela infusão de AL na circulação carotídea^{34,72}.

As propriedades físico-químicas dos AL, associadas às características físicas do bloqueio dos canais iônicos causados por esses fármacos, interferem na resposta inotrópica do miocárdio. Entre elas, a solubilidade lipídica é das mais importantes, sendo os anestésicos mais lipossolúveis os responsáveis por efeitos inotrópicos negativos mais intensos^{24,31,43,44}. Acredita-se que o aumento da solubilidade

lipídica leva a maior afinidade de ligação dos AL aos canais iônicos, dificultando sua remoção^{1,24,47}. Estudos prévios nos quais se aplicaram técnicas para remoção dos fármacos dos locais de ação, como perfusão livre de AL em coração isolado (*wash-out*), demonstraram que os AL mais lipossolúveis, como a bupivacaína racêmica, se desligam dos canais iônicos mais lentamente que os menos lipossolúveis, como a ropivacaína^{29,39,66}.

Embora muitos dos resultados do presente estudo sejam semelhantes aos resultados encontrados na literatura, as concentrações anestésicas utilizadas nesta pesquisa não são equipotentes, são equimolares. Foi comprovado que a potência do anestésico determina o seu efeito tóxico⁷³ e que diferentes isômeros do mesmo fármaco apresentam potências diferentes³¹. Assim, a utilização de doses equimolares pode mascarar os efeitos cardiotoxicos de fármacos menos potentes, como a ropivacaína, em relação aos mais potentes como a bupivacaína, mostrando uma limitação do presente estudo.

5 CONCLUSÃO

A mistura enantiomérica S75/R25 deprimiu a função contrátil do miocárdio de forma semelhante à da bupivacaína racêmica. A ropivacaína não determinou efeitos depressores sobre a contratilidade do músculo papilar isolado de ratos quando comparada à bupivacaína racêmica.

6 REFERÊNCIAS

1. Groban L, Dolinski SY. Differences in cardiac toxicity among ropivacaine, levobupivacaine, bupivacaine and lidocaine. *Tech Reg Anesth Pain Manag.* 2001; 5 (2): 48-55.
2. Cobo B. *Historia del Nuevo Mundo.* Lima, Peru 1653.
3. von Anrep V. Über die physiologische Wirkung des cocain. *Pflugers Arch Physiol.* 1880; 21: 38-77.
4. Liljestrand G. Carl Koller and the development of local anesthesia. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1967; 299: 1-30.
5. Koller C. On the use of cocaine for producing anaesthesia on the eye. *Lancet.* 1884; 2: 990-4.
6. Hall RJ. Hydrochlorate of cocaine. *N Y Med J.* 1884; 40.
7. Halsted WS. Pratical comments on the use and abuse of cocaine; suggested by its invariably succesfull employment in more than a thousand minor surgical operations. *N Y Med J.* 1885; 42: 294.
8. Marx GF. The first spinal anesthesia. Who deserves the laurels? *Reg Anesth.* 1994; 19 (6): 429-30.
9. Quincke H. Die Lumbalpunktion des Hydrocephalus. *Berl Klin Wochenschr.* 1891; 28: 929-33,65-8.
10. Mayer E. The toxic effects following the use of local anesthetics. *JAMA.* 1924; 82: 876-85.

11. Einhorn A. Über die Chemie der Iokalen Anästhetica. Munch Med Wochenschr. 1899; 46: 1218-20,54-6.
12. Holmdahl MH. Xylocain (lidocaine, lignocaine), its discovery and Gordh's contribution to its clinical use. Acta Anaesthesiol Scand Suppl. 1998; 113: 8-12.
13. Mattison JB. Cocaine poisoning. Med Surg Rep. 1891; 115: 645-50.
14. Neal JM, Bernards CM, Butterworth JFt, Di Gregorio G, Drasner K, Hejtmanek MR, et al. ASRA practice advisory on local anesthetic systemic toxicity. Reg Anesth Pain Med. 2010; 35 (2): 152-61.
15. Albright GA. Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. Anesthesiology. 1979; 51 (4): 285-7.
16. Graf BM, Abraham I, Eberbach N, Kunst G, Stowe DF, Martin E. Differences in cardiotoxicity of bupivacaine and ropivacaine are the result of physicochemical and stereoselective properties. Anesthesiology. 2002; 96 (6): 1427-34.
17. Heavner JE. Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. Reg Anesth Pain Med. 2002; 27 (6): 545-55.
18. Mio Y, Fukuda N, Kusakari Y, Amaki Y, Tanifuji Y, Kurihara S. Comparative effects of bupivacaine and ropivacaine on intracellular calcium transients and tension in ferret ventricular muscle. Anesthesiology. 2004; 101 (4): 888-94.
19. Simon L, Kariya N, Edouard A, Benhamou D, Mazoit JX. Effect of bupivacaine on the isolated rabbit heart: developmental aspect on ventricular conduction and contractility. Anesthesiology. 2004; 101 (4): 937-44.
20. David JS, Amour J, Duracher C, Ferretti C, Precloux P, Petit P, et al. Comparison of the effects of mepivacaine and lidocaine on rat myocardium. Eur J Anaesthesiol. 2007; 24 (2): 190-7.

21. David JS, Ferreti C, Amour J, Vivien B, Eve O, Petit P, et al. Effects of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on myocardial relaxation. *Can J Anaesth.* 2007; 54 (3): 208-17.
22. Mio Y, Fukuda N, Kusakari Y, Tanifuji Y, Kurihara S. Bupivacaine attenuates contractility by decreasing sensitivity of myofilaments to Ca²⁺ in rat ventricular muscle. *Anesthesiology.* 2002; 97 (5): 1168-77.
23. Szentandrassy N, Szabo A, Almassy J, Jona I, Horvath B, Szabo G, et al. Effects of articaine and ropivacaine on calcium handling and contractility in canine ventricular myocardium. *Eur J Anaesthesiol.* 2010; 27 (2): 153-61.
24. Graf BM. The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1 (3): 207-14.
25. Zapata-Sudo G, Trachez MM, Sudo RT, Nelson TE. Is comparative cardiotoxicity of S(-) and R(+) bupivacaine related to enantiomer-selective inhibition of L-type Ca(2+) channels? *Anesth Analg.* 2001; 92 (2): 496-501.
26. Chedid NG, Sudo RT, Aguiar MI, Trachez MM, Masuda MO, Zapata-Sudo G. Regulation of intracellular calcium by bupivacaine isomers in cardiac myocytes from Wistar rats. *Anesth Analg.* 2006; 102 (3): 792-8.
27. Kiuchi MG, Zapata-Sudo G, Trachez MM, Ririe D, Sudo RT. The influence of age on bupivacaine cardiotoxicity. *Anesth Analg.* 2011; 112 (3): 574-80.
28. Krikava I, Jarkovsky J, Stourac P, Novakova M, Sevcik P. The effects of lidocaine on bupivacaine-induced cardiotoxicity in the isolated rat heart. *Physiol Res.* 2010; 59 Suppl 1: S65-9.
29. Kariya N, Cosson C, Mazoit JX. Comparative effect of lidocaine, bupivacaine and RAC 109 on myocardial conduction and contractility in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 2012; 691 (1-3): 110-7.

30. McCaslin PP, Butterworth J. Bupivacaine suppresses $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in neonatal rat cardiomyocytes with increased extracellular K^+ and is reversed with increased extracellular Mg^{2+} . *Anesth Analg*. 2000; 91 (1): 82-8.
31. Vladimirov M, Nau C, Mok WM, Strichartz G. Potency of bupivacaine stereoisomers tested in vitro and in vivo: biochemical, electrophysiological, and neurobehavioral studies. *Anesthesiology*. 2000; 93 (3): 744-55.
32. Trachez MM, Zapata-Sudo G, Moreira OR, Chedid NG, Russo VF, Russo EM, et al. Motor nerve blockade potency and toxicity of non-racemic bupivacaine in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005; 49 (1): 66-71.
33. Nogueira CS, Lima LC, Paris VC, Neiva PM, Otani ET, Couceiro Rde O, et al. A comparative study between bupivacaine (S75-R25) and ropivacaine in spinal anesthesia for labor analgesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2010; 60 (5): 484-94.
34. Morrison SG, Dominguez JJ, Frascarolo P, Reiz S. A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized swine. *Anesth Analg*. 2000; 90 (6): 1308-14.
35. Vanhoutte F, Vereecke J, Verbeke N, Carmeliet E. Stereoselective effects of the enantiomers of bupivacaine on the electrophysiological properties of the guinea-pig papillary muscle. *Br J Pharmacol*. 1991; 103 (1): 1275-81.
36. Valenzuela C, Snyders DJ, Bennett PB, Tamargo J, Hondeghem LM. Stereoselective block of cardiac sodium channels by bupivacaine in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation*. 1995; 92 (10): 3014-24.
37. Mazoit JX, Decaux A, Bouaziz H, Edouard A. Comparative ventricular electrophysiologic effect of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on the isolated rabbit heart. *Anesthesiology*. 2000; 93 (3): 784-92.

38. Lefrant JY, de La Coussaye JE, Ripart J, Muller L, Lalourcey L, Peray PA, et al. The comparative electrophysiologic and hemodynamic effects of a large dose of ropivacaine and bupivacaine in anesthetized and ventilated piglets. *Anesth Analg.* 2001; 93 (6): 1598-605, table of contents.
39. Hiller N, Mirtschink P, Merkel C, Knels L, Oertel R, Christ T, et al. Myocardial accumulation of bupivacaine and ropivacaine is associated with reversible effects on mitochondria and reduced myocardial function. *Anesth Analg.* 2013; 116 (1): 83-92.
40. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci.* 2000; 320 (4): 244-8.
41. Krebs HA, Henseleit K. Studies on urea formation in the animal organism. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem.* 1932; 210: 33-66.
42. Herzig S, Ruhnke L, Wulf H. Functional interaction between local anaesthetics and calcium antagonists in guineapig myocardium: 1. Cardiodepressant effects in isolated organs. *Br J Anaesth.* 1994; 73 (3): 357-63.
43. Butterworth JFt. Models and mechanisms of local anesthetic cardiac toxicity: a review. *Reg Anesth Pain Med.* 2010; 35 (2): 167-76.
44. Mulroy MF. Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: incidence and preventive measures. *Reg Anesth Pain Med.* 2002; 27 (6): 556-61.
45. Huang YF, Pryor ME, Mather LE, Veering BT. Cardiovascular and central nervous system effects of intravenous levobupivacaine and bupivacaine in sheep. *Anesth Analg.* 1998; 86 (4): 797-804.

46. Nystrom EU, Heavner JE, Buffington CW. Blood pressure is maintained despite profound myocardial depression during acute bupivacaine overdose in pigs. *Anesth Analg.* 1999; 88 (5): 1143-8.
47. Groban L, Deal DD, Vernon JC, James RL, Butterworth J. Cardiac resuscitation after incremental overdosage with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized dogs. *Anesth Analg.* 2001; 92 (1): 37-43.
48. Groban L, Deal DD, Vernon JC, James RL, Butterworth J. Does local anesthetic stereoselectivity or structure predict myocardial depression in anesthetized canines? *Reg Anesth Pain Med.* 2002; 27 (5): 460-8.
49. Copeland SE, Ladd LA, Gu XQ, Mather LE. The effects of general anesthesia on the central nervous and cardiovascular system toxicity of local anesthetics. *Anesth Analg.* 2008; 106 (5): 1429-39, table of contents.
50. Stehr SN, Ziegeler JC, Pexa A, Oertel R, Deussen A, Koch T, et al. The effects of lipid infusion on myocardial function and bioenergetics in l-bupivacaine toxicity in the isolated rat heart. *Anesth Analg.* 2007; 104 (1): 186-92.
51. Vale NB, Delfino JB. Farmacologia dos anestésicos locais. In: Delfino JD, Vale NB, editors. *Anestesia Peridural: Atualização e Perspectiva*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001. p. 43-63.
52. Simonetti MPB, Ferreira FMC. Does the D-Isomer of Bupivacaine Contribute to the Improvement of Efficacy in Neural Block? *Reg Anesth Pain Med.* 1999; 24 (3): 43.
53. Sia AT, Goy RW, Lim Y, Ocampo CE. A comparison of median effective doses of intrathecal levobupivacaine and ropivacaine for labor analgesia. *Anesthesiology.* 2005; 102 (3): 651-6.

54. Polley LS, Columb MO, Naughton NN, Wagner DS, van de Ven CJ. Relative analgesic potencies of ropivacaine and bupivacaine for epidural analgesia in labor: implications for therapeutic indexes. *Anesthesiology*. 1999; 90 (4): 944-50.
55. Camorcia M, Capogna G, Columb MO. Minimum local analgesic doses of ropivacaine, levobupivacaine, and bupivacaine for intrathecal labor analgesia. *Anesthesiology*. 2005; 102 (3): 646-50.
56. Arlock P. Actions of three local anaesthetics: lidocaine, bupivacaine and ropivacaine on guinea pig papillary muscle sodium channels (V_{max}). *Pharmacol Toxicol*. 1988; 63 (2): 96-104.
57. Sztark F, Malgat M, Dabadie P, Mazat JP. Comparison of the effects of bupivacaine and ropivacaine on heart cell mitochondrial bioenergetics. *Anesthesiology*. 1998; 88 (5): 1340-9.
58. Komai H, Lokuta AJ. Interaction of bupivacaine and tetracaine with the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel of skeletal and cardiac muscles. *Anesthesiology*. 1999; 90 (3): 835-43.
59. Chemla D, Lecarpentier Y, Martin JL, Clergue M, Antonetti A, Hatt PY. Relationship between inotropy and relaxation in rat myocardium. *Am J Physiol*. 1986; 250 (6 Pt 2): H1008-16.
60. Hofmann PA, Fuchs F. Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. *Am J Physiol*. 1987; 253 (4 Pt 1): C541-6.
61. Nwasokwa ON. A model of the time course of myocardial dynamics: use in characterisation of relaxation and evaluation of its indices. *Cardiovasc Res*. 1993; 27 (8): 1510-21.

62. Coyle DE, Sperelakis N. Bupivacaine and lidocaine blockade of calcium-mediated slow action potentials in guinea pig ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987; 242: 1001-5.
63. Kawano T, Oshita S, Takahashi A, Tsutsumi Y, Tomiyama Y, Kitahata H, et al. Molecular mechanisms of the inhibitory effects of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Anesthesiology.* 2004; 101 (2): 390-8.
64. Nau C, Wang SY, Strichartz GR, Wang GK. Block of human heart hH1 sodium channels by the enantiomers of bupivacaine. *Anesthesiology.* 2000; 93 (4): 1022-33.
65. Scalabrini A, Corregiari F, Rocha e Silva M. Effects of hypertonic sodium chloride solution on the electrophysiologic alterations caused by bupivacaine in the dog heart. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36 (4): 531-9.
66. Szabo A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horvath B, Szabo G, Banyasz T, et al. Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Anesthesiology.* 2008; 108 (4): 693-702.
67. Tsuchiya H, Mizogami M. R(+)-, Rac-, and S(-)-bupivacaine stereostructure-specifically interact with membrane lipids at cardiotoxically relevant concentrations. *Anesth Analg.* 2012; 114 (2): 310-2.
68. Weinberg GL, Palmer JW, VadeBoncouer TR, Zuechner MB, Edelman G, Hoppel CL. Bupivacaine inhibits acylcarnitine exchange in cardiac mitochondria. *Anesthesiology.* 2000; 92 (2): 523-8.
69. Shen X, Wang F, Xu S, Qian Y, Liu Y, Yuan H, et al. Is cardiolipin the target of local anesthetic cardiotoxicity? *Rev Bras Anesthesiol.* 2010; 60 (4): 445-54.

70. Groban L. Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. *Reg Anesth Pain Med.* 2003; 28 (1): 3-11.
71. Chang DH, Ladd LA, Copeland S, Iglesias MA, Plummer JL, Mather LE. Direct cardiac effects of intracoronary bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine in the sheep. *Br J Pharmacol.* 2001; 132 (3): 649-58.
72. Ladd LA, Chang DH, Wilson KA, Copeland SE, Plummer JL, Mather LE. Effects of CNS site-directed carotid arterial infusions of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in sheep. *Anesthesiology.* 2002; 97 (2): 418-28.
73. Mazoit JX, Boico O, Samii K. Myocardial uptake of bupivacaine: II. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bupivacaine enantiomers in the isolated perfused rabbit heart. *Anesth Analg.* 1993; 77 (3): 477-82.