

Lair G. T. Ribeiro  
Joel Spadaro  
Tedd A. Brandon  
Han-Seob Kim  
Jack L. Titus  
Peter R. Maroko  
Richard R. Miller

## Efeitos do d-600 (metoxi-verapamil) na mortalidade e tamanho do infarto após oclusão coronariana em ratos

*A finalidade deste estudo foi avaliar os efeitos de metoxi-verapamil (D-600) na mortalidade e no tamanho final do infarto, em ratos com oclusão coronariana.*

*Inicialmente, o tronco comum da coronária esquerda foi ocluído em 212 ratos. Os animais foram randomizados em um grupo-controle e um grupo tratado com D-600. A mortalidade após os primeiros 15 minutos da oclusão do tronco comum da artéria coronária esquerda era 40% menor no grupo tratado que no grupo-controle ( $P < 0,01$ ). A diferença de mortalidade entre os dois grupos manteve-se 48 horas após a oclusão.*

*Os ratos que sobreviveram 48 horas após-oclusão coronária tiveram seus infartos medidos por planimetria e os resultados foram: 38,2% no grupo controle e 37,6% no grupo tratado.*

*Estes resultados nos permitem concluir que D-600 diminui a mortalidade após oclusão coronariana em ratos, provavelmente por ação antiarrítmica.*

A doença isquêmica do miocárdio é a causa mais comum de morte no mundo ocidental. Assim, por exemplo, por ano, nos Estados Unidos da América aproximadamente 700.000 pessoas falecem em consequência da doença cardíaca isquêmica e 1.300.000 são acometidas de infarto do miocárdio. Aproximadamente 50% dos que morrem na fase aguda têm morte súbita, tendo a fibrilação ventricular como causa mortis<sup>1</sup>.

As arritmias e/ou insuficiência cardíaca são responsáveis pela morte na fase aguda do infarto do miocárdio<sup>2</sup>. Os antagonistas do cálcio são substâncias que, além de provocar vasodilatação coronariana<sup>3,4</sup> e diminuir o consumo de oxigênio do miocárdio<sup>5,6</sup>, têm efeitos antiarrítmicos<sup>7-9</sup>. Todas essas propriedades conjugadas dão a esse grupo de drogas um grande potencial no sentido de proteção do miocárdio isquêmico.

Os efeitos do D-600, antagonista do cálcio de efeitos mais potentes, e com propriedades muito semelhantes às do verapamil<sup>10,11</sup>, foram avaliados no que diz respeito à mortalidade e ao tamanho do infarto, após oclusão coronariana em ratos.

### Material e métodos

O estudo foi feito em ratos Sprague-Dawley, pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais eram anestesiados com

éter e o tórax aberto no 5.º eie. O coração era então exposto e o tronco comum da artéria coronária esquerda ligado com um fio de seda (4-0), 1-2mm de sua origem. A seguir, o coração era reintroduzido na cavidade torácica e os músculos e pele fechados com um fio de seda 1.0<sup>12,14</sup>.

Os animais foram divididos em dois grupos: **grupo A** - em 64 ratos, a randomização foi realizada 10 minutos antes da oclusão coronária. No grupo tratado, D-600 foi administrado 0,05 mg/kg por via endovenosa e 0,05 mg/kg no subcutâneo, simultaneamente e imediatamente após a randomização. A injeção no subcutâneo foi repetida 10 minutos mais tarde, seguindo-se à oclusão coronariana: **grupo B** - em 148 ratos a randomização foi feita logo após a oclusão coronariana e a droga foi dada na mesma dose e esquema do grupo A.

Os ratos-controles de ambos os grupos receberam injeções de soro fisiológico no mesmo volume que o grupo tratado.

A mortalidade em ambos os grupos foi avaliada aos 15 minutos e às 48 horas após oclusão da artéria coronária. A mortalidade devida à cirurgia, per se, foi avaliada em 10 ratos nos quais o tórax foi aberto do mesmo modo, o coração exposto, mas a artéria coronária não foi ocluída.

Trabalho realizado no Departamento de Cardiologia e Patologia do The Methodist Hospital - Houston, TX e Deborah Heart and Lung Center - Browns Mills, NJ e em parte, financiado pelo The National Heart and Lung Blood Vessel Research and Demonstration Center, Baylor College of Medicine HL-17269.

Os ratos que sobreviveram às 48 horas foram sacrificados e os corações retirados. O sucesso da oclusão foi determinado pela injeção de tinta nanquim (carvão coloidal) no óstio coronariano. Se a porção anterior da parede ventricular se tornasse impregnada pela tinta, a oclusão era considerada incompleta e o animal excluído do estudo.

A quantidade de miocárdio infartado foi avaliada por histologia quantitativa. Os corações foram fixados em formaldeído a 10% por 24 horas e os ventrículos cortados do ápice até a base em 4 fatias de 2 mm de espessura, paralelas ao sulco atrioventricular. Após corado pelo método da eosina-hematoxilina, cada coração era projetado numa tela com magnificação de 10 vezes e feita a planimetria para a determinação da área do miocárdio normal e do miocárdio necrosado<sup>14</sup>.

A diferença na mortalidade foi avaliada pelo teste do  $\chi^2$  e a comparação do tamanho do infarto entre o grupo-controle e tratado foi feita usando-se o teste "t" de Student<sup>15</sup>.

A mortalidade pôde ser avaliada em somente 222 dos 277 ratos submetidos à cirurgia. Um animal faleceu antes da abertura do tórax e sua morte foi considerada pelo efeito da anestesia. Trinta ratos (12%) morreram durante o procedimento cirúrgico, antes da oclusão coronariana e foram considerados "morte cirúrgica". Vinte e dois ratos (8%) tiveram falha na oclusão da coronária e foram excluídos do estudo. Portanto, nos 22 ratos restantes a mortalidade pôde ser avaliada. Dez ratos tiveram o tórax aberto, mas a coronária não ocluída, para testar a mortalidade cirúrgica per se. Nenhum desses ratos morreu nas 48 horas que se seguiram à operação.

**Mortalidade nos primeiros 15 minutos - grupo A:** sessenta e quatro ratos foram randomizados para um grupo-controle e um grupo tratado com D-600, 10 min antes da oclusão coronariana. A mortalidade, 15 min após oclusão coronariana, foi 46% (16/35) no grupo-controle e somente 17% (5/29) no grupo tratado com D-600, o que é estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) (fig. 1). Houve redução de 63% na mortalidade com o tratamento; grupo B: cento e quarenta e oito ratos foram randomizados imediatamente após a oclusão coronariana num grupo-controle ( $n = 79$ ) e num grupo tratado com D-600 ( $n = 69$ ). A mortalidade, 15 min após a oclusão coronariana, foi 43% (34/79) no grupo-controle e 26 (18/69) no grupo tratado com D-600, ( $P < 0,001$ ) (fig. 2). Essa redução de mortalidade é de 40%.

**Mortalidade nas primeiras 48 horas** - nos primeiros 15 min, 44% (50/114) dos ratos que não receberam nenhuma droga morreram e 23% (23/98) no grupo que recebeu D-600. Nas primeiras 48 horas, 22 ratos morreram no grupo-controle e 21 no grupo tratado. Cinco dos 21 pertenciam ao grupo tratado que recebeu a droga antes da oclusão e 16 ao grupo tratado que recebeu a droga após a oclusão coronariana.

A mortalidade geral (grupos A + B) 48 horas após a oclusão coronariana era 63% (72/114) no grupo-controle e 45% (44/98) no grupo tratado com D-600 ( $p < 0,001$ ) (fig. 3).

Essa redução de mortalidade pelo tratamento foi de 29%.

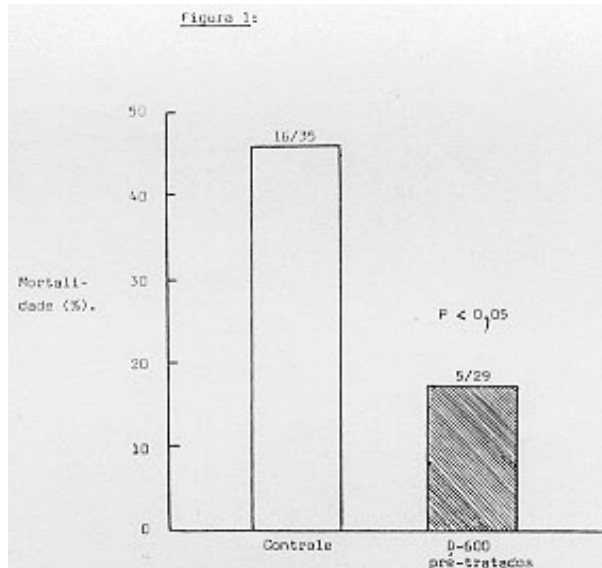


Fig. 1 - Efeitos do metoxi-verapamil (D-600), após oclusão coronariana em ratos. Mortalidade (%) aos 15 min D-600 foi administrado 10 min antes da oclusão.

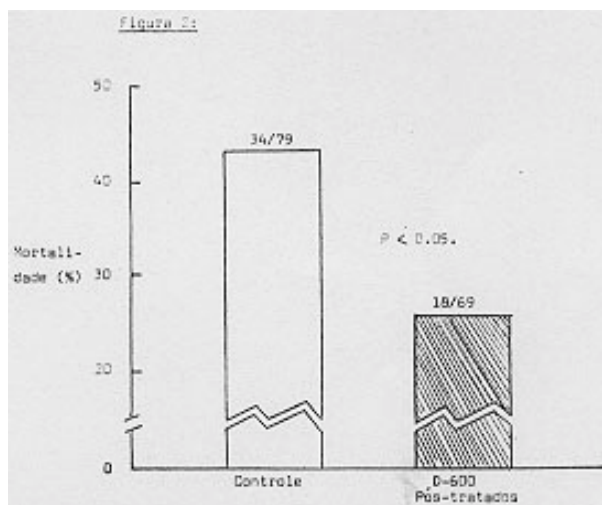


Fig. 2 - Efeitos do metoxi-verapamil (D-600), após oclusão coronariana em ratos. Mortalidade (%) aos 15 min. D-600 foi administrado imediatamente após oclusão coronariana.

**Tamanho do Infarto** - Os infartos dos ratos que sobreviveram as 48 horas foram medidos por planimetria. No grupo-controle o infarto era  $38,2 \pm 1,5\%$  do ventrículo esquerdo, o que não era diferente dos  $37,6 \pm 1,2\%$  no grupo tratado com D-600 (fig.4).

## Discussão

A isquemia miocárdica é o resultado de um desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio pelo miocárdio. As duas principais conseqüências desse desequilíbrio são arritmia e infarto do miocárdio.

Boa porcentagem dos pacientes acometidos de infarto do miocárdio tem êxito letal e a morte ocorre na maioria dos casos antes que o paciente chegue ao hospital. Essas mortes são,

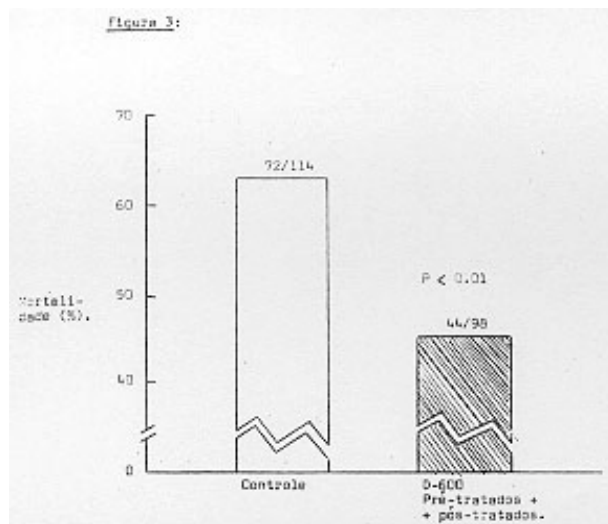


Fig. 3 - Efeitos do metoxi-verapamil (D-600), após oclusão coronariana em ratos. Mortalidade (%) após 48 horas. Os dois grupos (pré e pós-tratados) foram incluídos para avaliação da mortalidade.

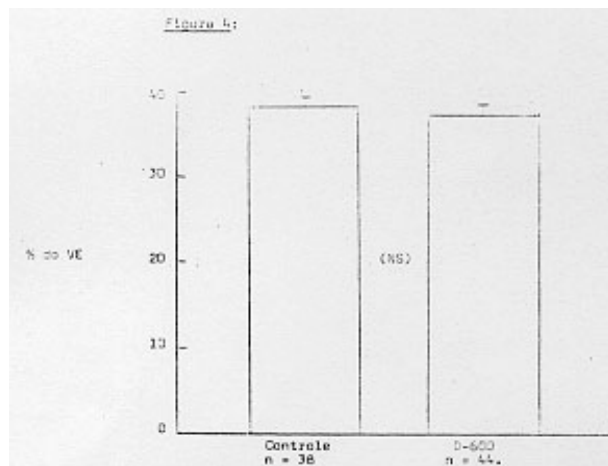


Fig. 4 - Tamanho do infarto sob uso de metoxi-verapamil (D-600), determinado pela planimetria, 48 horas após oclusão. Os resultados são apresentados em (%) do ventrículo esquerdo.

quase na totalidade dos casos, devidas a arritmias primárias, mais especificamente fibrilação ventricular<sup>1</sup>. Dos pacientes com infarto do miocárdio que chegam ao hospital, ainda 15-20% vão falecer em consequência de arritmias ou insuficiência cardíaca. A incidência de falência miocárdica, edema agudo de pulmão e/ou choque cardiogênico tem relação com o tamanho da área ventricular esquerda comprometida pelo infarto<sup>16</sup>.

Na última década, muitas investigações têm sido feitas em animais e seres humanos no sentido de reduzir o tamanho do infarto<sup>17-20</sup>. Diminuindo o tamanho do infarto, espera-se diminuir a incidência da falência miocárdica e arritmias, desde que existe uma relação entre o tamanho do infarto e a presença de arritmias<sup>21</sup>.

A droga ideal para ser aplicada nas primeiras horas do infarto do miocárdio seria aquela capaz de atuar diretamente em ambas as consequências - protegendo o

miocárdio isquêmico e tendo propriedades antiarrítmicas.

Os antagonistas do cálcio são drogas que têm propriedades vasodilatadoras das artérias coronárias<sup>3,4</sup>, diminuindo o consumo de oxigênio miocárdio pela redução na contratilidade<sup>5,6,21</sup> e têm importante ação vasodilatadora<sup>22</sup>. Alguns dos antagonistas do cálcio têm, também, ação antiarrítmica<sup>7-9</sup>, aumentando o limiar de fibrilação ventricular após oclusão coronariana mas o efeito antiarrítmico não é uma propriedade comum a todos os antagonistas do cálcio<sup>23</sup>.

Neste estudo, testou-se o D-600, o qual tem propriedades muito semelhantes ao verapamil<sup>10,11</sup>, porém com maior potência farmacológica. Os resultados obtidos mostraram que existe importante redução na mortalidade quando observada tanto nos primeiros 15 min, quanto nas primeiras 48 horas. Nos primeiros 15 min as mortes ocorreram provavelmente por arritmias, embora não tivéssemos monitorização para comprovação. Não havia diferença na mortalidade dos 15 min às 48 horas entre o grupo tratado e o grupo-controle. A ação benéfica manifestou-se nos primeiros 15 min, sugerindo que a redução na mortalidade ocorreu pela ação antiarrítmica do fármaco. A redução de mortalidade foi significativamente maior no grupo de tratamento profilático (grupo A), o que demonstra que a droga penetra no miocárdio isquêmico mais facilmente quando não há obstrução e que conseqüentemente o tratamento profilático pode oferecer maiores benefícios.

O infarto do miocárdio foi medido por planimetria nos ratos que sobreviveram após 48 horas, não se encontrando nenhuma diferença entre os dois grupos. Entretanto, considerando que a mortalidade foi maior no grupo-controle e admitindo que os ratos que morreram foram os que tiveram maior infarto (que gera mais arritmia) como é de esperar<sup>22</sup>, pode-se supor que, ao medir o tamanho do infarto após 48 horas, haveria uma subestimação do tamanho no grupo-controle.

Portanto, D-600 provocou significativa diminuição na mortalidade após a oclusão da artéria coronária em ratos. Outras investigações precisam ser realizadas no sentido de avaliar se os mesmos efeitos existem em seres humanos.

## Summary

Calcium antagonists may be useful in the treatment of schema-induced arrhythmia; however, data are lacking concerning the effects of the new agent, methoxy-verapamil (D-600). The proximal left coronary artery was occluded (CAO) in 148 rats randomized into control (C) (n = 79) or D-600 (n = 69); 0.05 mg/kg of the drug was given either intravenously (IV) or subcutaneously (SC), immediately after randomization; the SC injection was repeated 10 min later. Mortality at 15 min after CAO: 43% (34/79) in C vs 26% (18/69) in D-600 (P < 0.05). In 64 additional rats D-600 was given prior to CAO (0.05 mg/kg IV and SC, and SC injection repeated just after CAO). Mortality 15 min post CAO was 46% (16 of 35 C rats) vs 17% (5/29) in D-600 (P < 0.005). Overall mortality 48 hours after CAO was 64% (72/114) in C vs 45%

(44/98) in D-600 ( $P < 0.01$ ). Infarct size, by planimetry, was  $38.2 \pm 1.5\%$  of left ventricle in C and  $37.6 \pm 1.2\%$  in the D-600 treated group ( $P < 0.05$ ). Thus, D-600 markedly reduces early mortality following CAO both in pre-treated and post-CAO treated animals.

## Referências

1. Lown, B.; Wolf, M. A. - Approaches to sudden death from coronary heart disease. *Circulation*, 44: 130, 1971.
2. Peel, A. A. F.; Simple, T. - Immediate prognosis in acute myocardial infarction. In Meltzer, L. E.; Dunning, A. J. (ed.) *Textbook of Coronary Care*. The Charles Press, Philadelphia, 1972.
3. Henry, P. D. - Calcium Ion ( $\text{Ca}^{++}$ ) antagonists: Mechanisms of action and clinical application. *Practical Cardiology* 5: 145, 1979.
4. Da Luz, P.; Barros, L. F. M.; Leite, J. J.; Pileggi, F.; Décourt, L. V. - Effect of verapamil on regional coronary and myocardial perfusion during acute coronary occlusion. *Am. J. Cardiol.* 45: 269, 1980.
5. Fleckenstein, A. - Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. In Harris, P.; Opie, L. (ed.) - *Calcium and the Heart*, Academic Press, London and New York, 1971. p. 135.
6. Nayler, W. G.; Gran, A.; Slade, A. - A protective effective of verapamil on hypoxic heart muscle. *Cardiovasc. Res.* 10: 650, 1976.
7. Kaumann, A. J.; Aramendia, P. - Prevention of ventricular fibrillation induced by coronary ligation. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 164: 326, 1968.
8. Sechamroth, L.; Krikler, D. M.; Garret, C. - Immediate effects of intravenous verapamil in cardiac arrhythmias. *Br. Med. J.* 1: 660, 1972.
9. Singh, B. N.; Vaghan Williams, E. M. - A fourth class of antidysrhythmic action. Effect of verapamil ouabain toxicity, on atrial and ventricular action potentials and on other features of cardiac function. *Cardiovasc. Res.* 6: 109, 1972.
10. Watanabe, A. M.; Berch, H. A., Jr. - Subcellular myocardial effects of verapamil and D-600. Comparison with propranolol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 191: 241, 1974.
11. Nawrath, H.; Ten Eick, R. E.; McDonald, T. F.; Trantweim, W. - On the mechanism underlying the action of D-600 on slow inward current and tension in mammalian myocardium. *Circ. Res.* 40: 408, 1977.
12. Johns, T. N. P.; Olson, B. J. - Experimental myocardial infarction. I. Method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg.* 140: 675, 1954.
13. Selye, H.; Bajrusz, E.; Grasoos, S.; Mendell, P. - Single techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 11: 398, 1960.
14. Maclean, D.; Fishbein, M. C.; Maroko, P. R.; Braunwald, E. - Hyaluronidase-induced reductions in myocardial infarct size. Direct quantification of infarction following coronary artery occlusion in the rat. *Science* 194: 199, 1976.
15. Snedecor, G. W.; Cochran, W. G. - *Statistical methods*, Sixth edition. Anes. The Iowa State University Press 1967; pp 91-119 and 135-171.
16. Page, D. L.; Caulfield, J. B.; Kastor, J. A.; DeSanctis, R. W.; Sanders, C. A. - Myocardial changes associated with cardiogenic shock. *N. Engl. J. Med.* 285: 133, 1971.
17. Maroko, P. R.; Braunwald, E. - Modification of myocardial infarct size after coronary occlusion. *Ann. Intern. Med.* 79: 720, 1973.
18. Maroko, P. R.; Radvany, P.; Braunwald, E.; Hale, S. L. - Reduction of infarct size by oxygen inhalation following acute coronary occlusion. *Circulation*, 52: 360, 1975.
19. Ribeiro, L. G. T.; Hillis, L. D.; Fishbein, M. C. - Davis, M. A.; Maroko, P. R.; Braunwald, E. - A method for demonstrating the efficacy of intervention designed to limit infarct size following coronary occlusion. *Cardiovasc. Res.* 12: 334, 1978.
20. Gold, H. K.; Leinbach, R. C.; Maroko, P. R. - Propranolol induced reduction of signs of ischemic injury during acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 38: 689, 1976.
21. Cox, J. R., Jr.; Roberts, R.; Ambox, H. D.; Oliver, C., Sobel, B. E. - Relations between enzymatically estimated myocardial infarct size and early ventricular dysrhythmia. *Circulation*, 53 (Suppl. 1): 150, 1976.
22. Müller, J. E.; Günther, S. S. - Nifedipine therapy for Prinzmetal's angina. *Circulation*, 57: 137, 1978.