

INFLUÊNCIA DA ANESTESIA E/OU DEGOLAMENTO SOBRE O COMPORTAMENTO MECÂNICO DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DE VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS.

ANTONIO CARLOS CICOGNA, OSCAR H. L. BING

O comportamento dos músculos isolados de ventrículo esquerdo de ratos, submetidos a contração isométrica, foi analisado após os animais serem sacrificados por simples decapitação ou anestesiados com pentobarbital sódico ou alfa cloralose antes de serem degolados.

Procurou-se avaliar qual dos tratamentos referidos, possivelmente via redução do estresse animal, é a mais adequada para ser empregada em ratos que terão, posteriormente, seus músculos papilares utilizados experimentalmente.

Concluiu-se que, não houve diferença no comportamento das fibras isoladas entre os diferentes grupos de ratos. Aventou-se a possibilidade que o resultado obtido seria decorrente do longo intervalo de tempo entre o sacrifício do animal e o registro das variáveis, fato que poderia atenuar a ação de fatores, como o estresse, que poderiam acarretar disfunção do músculo papilar.

Arq. Bras. Cardiol. 53/4:197-200—Outubro 1989

A partir da década de 1960, métodos experimentais que utilizam músculos cardíacos isolados passaram a ser empregados por inúmeros cardiologistas, possibilitando a aquisição de amplos conhecimentos de mecânica muscular em corações normais e patológicos¹⁻⁵.

Desde que, durante os experimentos, músculos cardíacos isolados são oxigenados por difusão, é necessário utilizar amostras musculares de pequeno diâmetro, em razão de que fibras com raios adequados possibilitam conveniente oxigenação das células cardíacas^{6,7}. Os músculos papilares ventriculares de ratos, em virtude de poderem preencher o requisito citado, são muito utilizados por investigadores que trabalham com fibras cardíacas isoladas^{5,8,9}.

Em 1628, o pensamento de William Harvey incluindo na expressão "Every affection of the mind that is attendand with either pain or pleasure, hope or fear, is the cause of an agitation whose influence extends to the heart", já antevia as relações entre as emoções e as doenças cardíacas. Esta percepção confirmou-se, pois sabe-se hoje que o estresse está associado a doenças coronarianas, hipertensão arterial, arritmias e morte súbita¹⁰.

A influência que o estresse, via sistema nervoso simpático, exerce sobre o sistema cardiocirculatório nos animais de experimentação já foi objeto de estudos¹¹, entretanto, a possível influência que o estresse poderia exercer sobre o posterior desempenho de fibras cardíacas isoladas, não foi investigado até o presente momento. Apesar da carência de informações a este respeito, pesquisadores que utilizam músculos papilares isolados, procuram minimizar o estresse a que serão submetidos os animais antes de serem sacrificados. Neste sentido, enquanto alguns autores utilizam simplesmente o degolamento, outros investigadores preferem anestésiar os animais, por acreditarem que este tratamento, antes do degolamento, reduz mais intensamente o estresse a que será submetido o animal no momento do sacrifício^{8,12}.

A presente investigação foi realizada com a finalidade de avaliar qual das manobras referidas, anestesia e/ou degolamento, possivelmente via redução do estresse animal, seria a mais apropriada para ser empregada em ratos que terão, posteriormente, o desempenho do músculo papilar isolado avaliado funcionalmente. Um grupo de animais foi sacrificado por simples degolamento, enquanto que outros dois lotes fo-

ram previamente anestesiados (cloralose ou pentobarbital), antes de serem degolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste experimento foram utilizados ratos machos, Charles River, pesando entre 170 e 230 gramas. Três grupos de animais foram estudados: um grupo sacrificado por decapitação e que não recebeu nenhum tipo de tratamento pré-sacrifício e dois grupos tratados com pentobarbital sódico (50 mg/kg/ip) ou alfa cloralose (100 mg/kg/ip) antes de serem decapitados. Após o sacrifício dos ratos, os tórax foram abertos, os corações removidos e colocados durante 1 a 2 min num recipiente contendo solução de Krebs Henseleit¹³, aquecida a 28°C e previamente oxigenada durante 10 min com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após os corações terem sido removidos da solução, dissecou-se o ventrículo direito com a finalidade de se expor o septo interventricular. Este, foi dividido ao meio a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior; a seguir, os mesmos foram dissecados numa câmara, especialmente construída para este fim, e que continha solução de Krebs Henseleit em condições semelhantes a anterior. Durante a dissecação manteve-se nas extremidades dos músculos papilares segmento da parede livre ou do septo interventricular do ventrículo esquerdo; nestes excessos de musculatura foram presos anéis e aço inoxidável, o que evitou a lesão das extremidades dos músculos papilares. A seguir, os músculos foram transferidos para câmaras de

vidro, contendo solução de Krebs Henseleit oxigenada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, envolvidas por sistema de circulação de água aquecida, que tinha por finalidade manter a solução nutritiva à temperatura constante de 28°C. Cada músculo papilar foi suspenso verticalmente na câmara de vidro, sendo que a extremidade tendinosa superior foi conectada, via anel e fio de aço inoxidável de 0,038 cm de diâmetro, à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. A extremidade inferior do músculo, via anel e fio de aço semelhantes aos descritos anteriormente, foi conectada a transdutor de força (Stahtam 67B-075-350); o fio de aço atravessava uma fenda preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso um peso de 5 a 10 g (pré-carga) e que tinha por finalidade promover estiramento inicial do músculo papilar. Sobre a extremidade do braço longo de cada alavanca existia um micrômetro que permitia, pela possibilidade de controlar a extensão dos movimentos da alavanca, evitar o excessivo estiramento e ajustar o comprimento de repouso do músculo. A alavanca era de magnésio, rígida, leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 6:1. O esquema do sistema utilizado é mostrado na figura 1.

Os músculos papilares, imersos na solução oxigenada de Krebs Henseleit a 28°C e submetidos a pequena força de estiramento, foram estimulados 12 vezes por minuto por meio estimulador (Grass modelo SD9) e eletrodos de platina tipo agulha (E8- Grass), coloca dos paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Nestes foram aplicados estímulos elétricos em onda

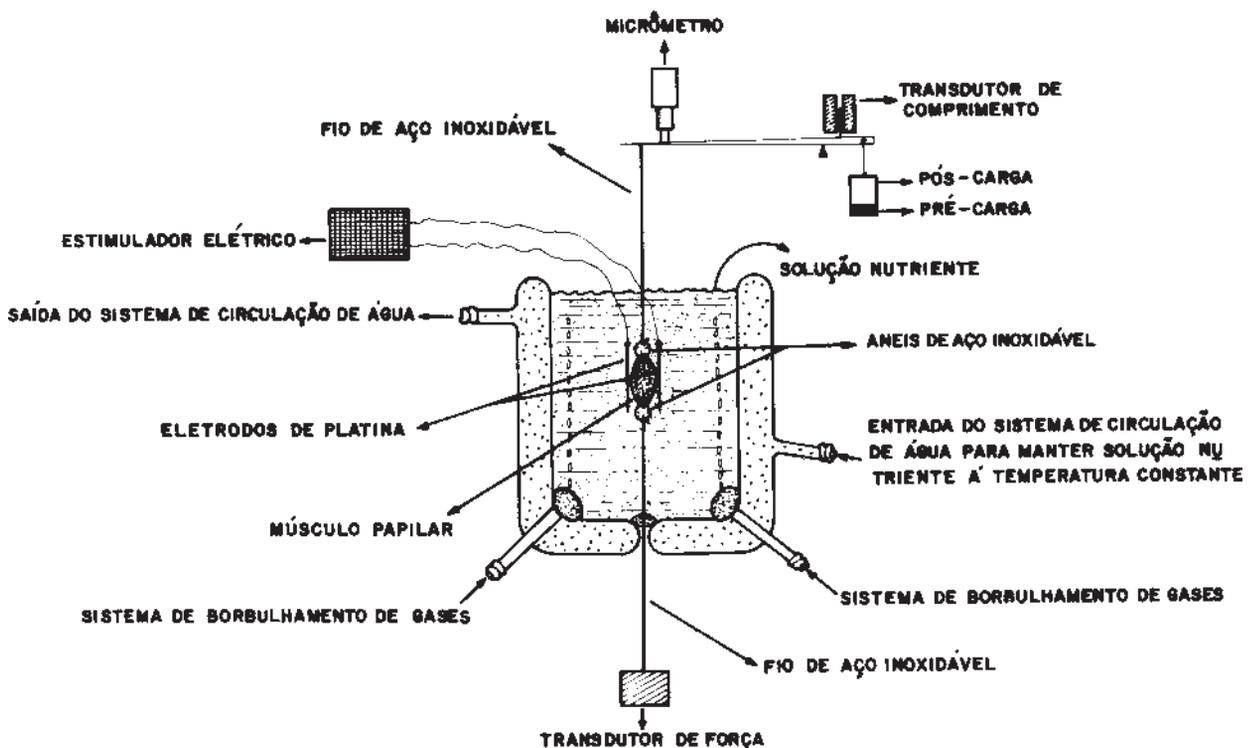


Fig. 1 — Representação do sistema utilizado no experimento com músculos papilares isolados

quadrada de 5 milissegundos, na voltagem de 10 a 20% acima do valor mínimo necessário pare provocar resposta mecânica máxima do músculo.

A composição da solução de Krebs-Henseleit, em milimoles por litro, foi: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,16 Mg SO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 25,88 NaHCO₃. A pressão parcial de oxignio (PO₂) da solução foi mantida entre 550 e 600 mmHg.

Após os músculos terem contraído durante 60 min contra a pré-carga, o que possibilitou às fibras cardíacas desenvolverem encurtamento máximo e força desenvolvida máxima (contração isotnica), adicionou-se  pré-carga um peso de 50 g (pós-carga). A carga total (pré + pós-carga) impediu os músculos de se encurtarem, passando os mesmos a desenvolverem somente força (contração isométrica). A partir deste momento, os músculos foram estirados gradual e progressivamente por meio de pequenos deslocamentos da alavanca isotnica provocados pelo manejo do micrmetro. A alteração no comprimento de repouso dos músculos acarretou aumento na força de repouso (diastólica) e força desenvolvida. As fibras musculares foram estiradas até atingir o comprimento de repouso (Lmax) associada  força desenvolvida isométrica máxima. Após serem novamente colocados em contração isotnica durante 10 min. os músculos foram postos em contração isométrica para a determinação final da Lmax. Depois de 15 min de contração isométrica estável, o experimento foi iniciado. Preparações instáveis ou com desempenho não satisfatório não foram utilizadas.

As seguintes variáveis foram analisadas: força ou tensão desenvolvida máxima (TD), força ou tensão de repouso (TR), tempo para tensão desenvolvida atingir o seu valor máximo (TPT), velocidade máxima de variação temporal da tensão desenvolvida (+ dp/dt), velocidade máxima de variação temporal de relaxamento da tensão desenvolvida (- dp/dt), tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% do seu valor máximo (TR50) e retardo eletromecânico, isto é, o tempo entre a estimulação elétrica e o início da atividade mecânica (REM). Estes parâmetros foram registrados no polígrafo da Hewlett-Packard 7758A, o qual estava acoplado a microcomputador Apple II plus.

Os parâmetros utilizados para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (mm²). O comprimento "in vitro", em Lmax, foi medido com catetmetro Gartner. A porção do músculo entre os anéis de aço foi cortada, seca com papel de filtro e pesada. A rea seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento do músculo; considerou-se que o músculo papilar tem forma geométrica, uniforme, cilíndrica e peso específico de 100 g/cm³. Os valores da força e respectiva derivada foram divididos pela correspondente área seccional do músculo.

Neste trabalho os dados são apresentados como média + desvio padrão da média (x + DPM). A comparação entre os grupos para o conjunto das variáveis (estatística D₂) e para cada variável (estatística F) foi feita por análise de variância completada pelo teste de Tukey. Foram consideradas significantes as diferenças de mdia com valor de p < 0,05.

RESULTADOS

Na tabela I e figura 2 estão expostos os resultados obtidos nos três grupos de ratos estudados, degolados (D), pentobarbital e degolamento (PB) e alfacloralose

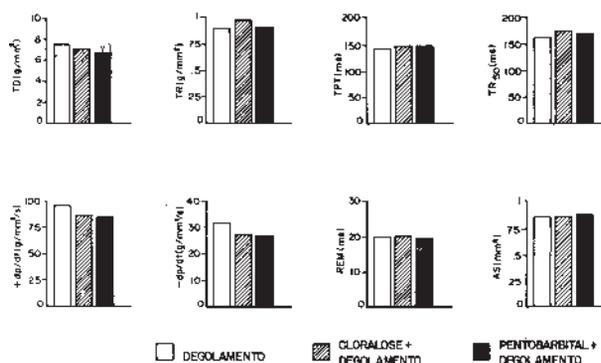


Fig- 2 Representação gráfica dos valores médios da tensão desenvolvida máxima (TD) tensão de repouso (TR, tempo para tensão desenvolvida máxima atingir o valor máximo (TPT), velocidade máxima de variação temporal da tensão desenvolvida (+ dp/dt), velocidade máxima da variação temporal de relaxamento da tensão desenvolvida (-dp dt), tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50%, do seu valor máximo (TR50), retardo eletromecânico (REM) e área seccional dos músculos (AS).

TABELA I - Parâmetros cardíacos (X ± DPM) obtidos da contração isométrica.

	n	TD (g mm ²)	TR (g/mm ²)	TPT (ms)	TR ₅₀ (ms)	+dT/dt (g/mm ² /s)	-dT/dt (g/mm ² /s)	REM (ms)	AS (mm ²)
Degolamento	9	7.45 ± 0.96	0.90 ± 0.29	141 ± 7	165 ± 13	96 ± 12	32 ± 4	20 ± 1	0.85 ± 0.15
Pentobarbital Sódico	7	6.71 ± 1.32	0.90 ± 0.42	147 ± 6	172 ± 26	85 ± 20	27 ± 4	19 ± 5	0.86 ± 0.16
Alfa cloralose + degolamento	6	6.97 ± 1.80	0.95 ± 0.31	146 ± 8	177 ± 23	86 ± 19	28 ± 7	20 ± 5	0.85 ± 0.31

n: número de preparações; TD: tensão desenvolvida máxima; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para a tensão desenvolvida atingir o valor máximo; TR₅₀: tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% do seu valor máximo; +dT/dt: velocidade máxima variação temporal da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima da variação temporal de relaxamento da tensão desenvolvida; REM: retardo eletromecânico, isto é, o tempo entre a estimulação elétrica e o início da atividade mecânica; AS: rea seccional; g/mm²: grama por milímetro quadrado; g/mm²/s: grama por milímetro quadrado por segundo; ms: milissegundo; mm²: milímetro quadrado; x + DPM: média ± desvio padrão da mdia.

mais degolamento (ALC). A administração das drogas não provocou diferença significativa entre o conjunto das variáveis de cada grupo ($D_2=11.773$; $p>0,50$). Também não houve variação significativa entre cada variável dos grupos estudados, como TD ($D = 7,5 \pm 0,96$ g/mm², PB = $6,71 \pm 1,32$ g/mm², ALC = $6,97 \pm 1,80$ g/mm²; $p > 0,05$), TR ($D = 0,90 \pm 0,29$ g/mm², PB = $0,90 \pm 0,42$ g/mm² e ALC = $0,95 \pm 0,31$ g/mm²; $p > 0,05$), TPT ($D = 141 \pm 7$ ms, PB = 147 ± 6 ms e ALC = 146 ± 8 ms; $p > 0,05$), TR50 ($D = 165 \pm 13$ ms, PB = 172 ± 26 ms e ALC = 146 ± 8 ms; $p > 0,05$), +dt/dt ($D = 96 \pm 12$ g/mm²/s, PB = 85 ± 20 , e ALC = 86 ± 19 g/mm²/s; $p > 0,05$), -dt/dt ($D = 32 \pm 4$ g/mm², PB = 27 ± 4 g/mm²/s e ALC = 28 ± 7 g/mm²/s; $p > 0,05$), e REM ($D = 20 \pm 1$ ms, PB = 19 ± 5 ms e ALC = 20 ± 5 ms; $p > 0,05$). Não houve diferença significativa entre as áreas seccionais dos três grupos ($D = 0,85 \pm 0,15$ mm², PB = $0,86 \pm 0,16$ mm² e ALC = $0,85 \pm 0,31$ mm²; $p > 0,05$).

DISCUSSÃO

O estresse influencia profundamente o sistema cardiovascular por meio do sistema nervoso autonômico. As alterações na atividade adrenérgica e colinérgica promovem variações em vários parâmetros cardiocirculatórios como, pressão arterial, débito cardíaco, resistência periférica, consumo de oxigênio, frequência e inotropismo cardíaco, podendo, também, acarretar arritmias e morte súbita^{10,14}.

Estudos experimentais demonstraram que animais submetidos a estresse de grande intensidade podem desenvolver importantes graus de lesões morfológicas, como denervação de fibras cardíacas e hemorragia subendocárdica^{15,16}.

Não há informações a respeito da relação entre estresse animal e comprometimento "in vivo" dos músculos papilares. Levando-se em conta as informações anteriores, é lógico admitirmos que animais doadores de músculo isolados deveriam ter o estresse atenuado, a fim de se evitar possível comprometimento dos músculos papilares. A tentativa de diminuição do estresse é feita anestesiando-se o animal ou utilizando-se métodos rápidos de sacrifício, como o degolamento.

O resultado do presente experimento mostrou que os diferentes tratamentos utilizados não provocaram diferença de comportamento entre os músculos isolados. Uma explicação plausível para este achado seria o longo intervalo de tempo (85 min) entre o momento do sacrifício dos animais e o início do registro das variáveis. A possível influência do estresse, mesmo que variando para cada grupo, sobre a fibra isolada teria sido atenuada durante o intervalo do tempo citado, possibilitando uma recuperação semelhante dos diferentes grupos de músculos papilares.

Em resumo, podemos concluir pelos dados obtidos neste experimento, que o uso isolado do degolamento ou a associação do mesmo com anestésicos,

tipo cloralose ou pentobarbital, não acarretou diferença no comportamento dos músculos papilares isolados de ventrículo esquerdo de ratos. Acreditamos, que o resultado deva-se, possivelmente, ao longo período de tempo que decorreu entre o sacrifício do animal e registro das variáveis; este fato poderia atenuar os efeitos deletérios de fatores, entre os quais o estresse animal, que poderiam comprometer, reversivelmente, o desempenho do músculo cardíaco isolado.

SUMMARY

The mechanical performance of isometrically contracting papillary muscle was studied in rats sacrificed by decapitation or anesthetized with sodium pentobarbital or chloralose before decapitation. The purpose was to evaluate which maneuver would be the more adequate to be used, when performance of papillary muscle mechanics must be evaluated later.

The data suggest that either anesthetic agents used in this experiment and/or decapitation have the same effects on isolated muscle performance in the three groups. The results may be a consequence of the time elapsed between animal decapitation and the recording of cardiac parameters: this fact would attenuate the many factors that could promote mechanical performance dysfunction or isolated papillary muscles.

REFERÊNCIAS

1. Abbot BC, Mammaerts WFHM—A study of inotropic mechanisms in the papillary muscle preparation. *J Gen Physiol*, 42: 533, 1959.
2. Sonnenblick EH—Implications of muscle mechanisms in the heart. *Fed Proc*, 21: 975, 1962.
3. Sonnenblick EH—Force-velocity relation in mammalian heart muscle. *Am J Physiol*, 202: 931, 1962.
4. Yeatman Jr LA, Parmley WW, Urschell CW et al—Dynamics of contraction of cardiac muscles. *Am J Physiol*, 200: 534, 1971.
5. Capasso JM, Malhotra A, Remily JS et al—Effects of age on mechanical and electrical performance of rat myocardium. *Am J Physiol*, 245: H72, 1983.
6. Snow TR, Bressler PB—Oxygen sufficiency in working rabbit papillary muscle at 25 °C. *J Molec Cell Cardiol*, 9: 595, 1977.
7. Paradese NF, Schmitter JL, Surmitis JM—Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. *Am J Physiol*. 241: H348, 1981.
8. Bing OHL, Matsushita S, Fanburg BL et al—Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. *Circ Res*, 28: 234, 1971.
9. Bing OHL, Brooks WW, Wiegner AW—Myocardial mechanics in two models of pressure overload hypertrophy. *Perspect Cardiovasc Res*, 8: 167, 1983.
10. Braunwald E—Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular medicine. 3 ed. Philadelphia, W. B Saunders, 1988. p. 1883.
11. Engel GL—Psychologic stress, vasodepressor (vasovagal) syncope and sudden death. *Ann Int Med*. 89: 403, 1978.
12. Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE et al—Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res*, 47: 922, 1980.
13. Krebs HR, Henseleit K—Untersuchen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 210: 33, 1962.
14. Bove AA—The cardiovascular response to stress. *Psychosomatics*, 18: 13, 1977.
15. Corley KC, Shiel FO, Mauk HP et al—Electrocardiographic and cardiac morphological changes associated with environmental tal stress in squirrel monkeys. *Psychosom Med*, 35: 361, 1973.