

## Efeito do Diazepam na Contratilidade Miocárdica e na Resposta à Dopamina. Estudo em Corações Isolados de Ratos

José Ildevaldo de Carvalho, Márcio Pitchon, Wilson de Souza Lima, Otoni Moreira Gomes  
Belo Horizonte, MG

**Objetivo** - Estudo experimental das ações farmacodinâmicas do diazepam e sua interação com a dopamina em corações isolados de ratos.

**Métodos** - Foram submetidos a estudo, corações de 30 ratos da raça wistar com peso médio de 1,22g Após anestesia em câmara fechada, os corações foram excisados, suspensos pela canula aórtica de perfusão coronária e divididos em 4 grupos: I) dopamina - 3mcg/ml; IIA) diazepam -50ug/ml; IIB) diazepam - 100 ug/ml; III) diazepam (50um/ml) - dopamina (3ug/ml). Utilizou-se a preparação de Langendorff com perfusato de solução de Krebs-Henseleit gaseificada, com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, e a técnica de Gottlieb e Magnus modificada por Pitchon para registro dos procedimentos: frequência cardíaca (FC) e o índice de tensão/tempo (dT/dt).

**Resultados** - Grupo I: ocorreu elevação dos valores médios e do índice dT/dt em todos os corações estudados (de 37gs<sup>-1</sup> para 70 e 53gs<sup>-1</sup>, 1° e 3° min; p<0,001); grupos IIA e IIB: observou-se que o diazepam provocou queda dos valores médios de dT/dt (de 35 para 24 e 30gs<sup>-1</sup>, no 1° e 3° min p<0,001 - grupo IIA de 32gs<sup>-1</sup> declinou para 23 e 25gs<sup>-1</sup>, no 1° e 3° minutos respectivamente, grupo IIB; p<0,001). No grupo II, quando associado à dopamina, não houve variações significantes dos parâmetros em estudo. As FC seguiram as variações da dT/dt nos grupos estudados.

**Conclusão** - O diazepam apresenta efeitos cronotrópico e inotrópico negativo nas doses de 50 ug/ml e 100 ug/ml e inibe os efeitos inotrópico da dopamina.

**Palavras-chave:** diazepam, dopamina, função miocárdica

## Effect of Diazepam in Myocardial Contractility and in the Response to Dopamine. Study in Isolated Rat Hearts

**Purpose** - The myocardial contractility variations and the cardiac rate were studied in isolated hearts of rats with injection of diazepam, dopamine and the association of both.

**Methods** -In all animals, after anesthesia, the hearts were removed and perfused with Krebs-Henseleit solution enriched by 95% O<sub>2</sub> under a constant pressure of 90cm H<sub>2</sub>O, until complete stabilization, for control value recordings. The following groups were studied: I) ten hearts: after stabilization the control values were recorded and dopamine (3 ug/ml) injected; IIA and IIB): also ten hearts were used and submitted to 50 ug and 100ug of diazepam injections respectively. III) ten hearts studied with 50 ug of diazepam and 3 ug/ml of dopamine injection in a sequential form.

**Results** - Myocardial contractility arose in group I, from 37 g. seg<sup>-1</sup> (control mean-value) to 70 and 53 g seg<sup>-1</sup> (1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> min); p<0.001. In the groups IIA and IIB the dT/dt fell considerably in relation to the control: 35 g. seg<sup>-1</sup> to 24 and 30g seg<sup>-1</sup> (1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> min) - group IIA; p<0.001 - 32 g seg<sup>-1</sup> to 22 and 25 g seg<sup>-1</sup> (1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> min) - group IIB; p<0.001. In the group III, a partial inhibition of the inotropic effects of dopamine by the injection of diazepam was observed. Heart rate follows fully the dT/dt variations in the groups IIA, IIB and III.

**Conclusion** - Diazepam presents inotropic and cronotropic negative effects with the 50 ug as well as with 100 ug injection and the cronotropic and inotropic effect of dopamine (3 ug) injection is partially inhibited by the previous injection (50 ug) of diazepam.

**Key-words:** diazepam, dopamine, myocardial function

Arq Bras Cardiol, volume 65 (n° 2),159-162, 1995

Hospital São Francisco de Assis - Belo Horizonte, MG.

Correspondência: José Ildevaldo de Carvalho - Serviço do Coração do Hospital São Francisco de Assis - Rua Itamaracá, 535 - CEP 31110 - Belo Horizonte, MG

Recebido para publicação em 17/1/95

Aceito em 13/2/95

Recentemente, diversas combinações de barbitúricos, narcóticos e tranqüilizantes têm sido utilizadas como anes-tésicos ou na sua complementação, destacando-se os benzodiazepínicos. Em 1959, Sternbach e col<sup>1</sup> obtiveram a síntese do diazepam. Squires e Braestrup<sup>2</sup> e Mohler e Okada<sup>3</sup> descobriram seus receptores centrais. Costa e Guidotti<sup>4</sup> sugeriram que os receptores benzodiazepínicos centrais e os

do ácido gama-aminobutírico constituem duas entidades distintas, mas presentes em um mesmo complexo macromolecular. Receptores benzodiazepínicos periféricos, não ligados ao ácido gama-aminobutírico, mas relacionados aos canais de cálcio, foram descritos por Marangos e col<sup>5</sup>, em 1982 e identificados no coração, rins e muitos outros locais por Anholt e col<sup>6</sup>. A interação dos benzodiazepínicos com os canais de cálcio é um aspecto importante da cardiologia moderna. Os resultados publicados sobre o efeito dos benzodiazepínicos, em particular do diazepam, sobre a contratilidade miocárdica, exibem aspectos conflitantes. Mestre e col<sup>7</sup>, Daniel<sup>8</sup>, Hernandez<sup>9</sup> relatam efeito inotrópico negativo; Castillo Ferrando<sup>10</sup>, efeito inotrópico positivo; Gonzales e col<sup>11</sup> duplo efeito. Clinicamente, o diazepam tem sido utilizado amplamente em doses que determinam concentrações sanguíneas superiores a 5,0,ug/ml, provavelmente pelo fato de seus efeitos cardiovasculares ainda não terem sido devidamente definidos.

Os efeitos farmacológicos da dopamina são complexos devido ao grande número de receptores que esta substância estimula, tendo sido utilizada neste ensaio experimental como padrão-ouro de inotropismo e cronotropismo positivo.

Tendo em vista a relativa escassez de informações inerentes às resultantes da associação de diazepam e dopamina, programou-se a presente investigação cujo objetivo foi estudar, em corações isolados de ratos, os efeitos do diazepam isoladamente ou associado à dopamina, sobre a contratilidade miocárdica.

## Métodos

Foram estudados 30 corações de ratos da raça *wistar*, com peso médio de 1,22g, provenientes do biotério do Serviço do Coração do Hospital São Francisco de Assis. Os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico em câmara fechada e após toracotomia ampla e ressecção do plastrão esterno-costal, a aorta ascendente foi dissecada e canulada, sendo o coração excisado e o ventrículo esquerdo drenado por uma incisão longitudinal cuidadosa na parede lateral, evitando-se lesões de artérias coronárias principais. Os corações foram suspensos pela cânula de perfusão aórtica e unidos ao sistema de perfusão coronária. Empregou-se o método de Langendorff<sup>12</sup> com perfusato de solução de Krebs-Henseleit<sup>13</sup>, gaseificada com 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono, obtendo-se um pH médio de 7,380,054. A composição da solução de Krebs-Henseleit utilizada foi: NaCl (126,00mM/l), NaHCO<sub>3</sub> (25,00mM/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,20), KCl (4,80), MgSO<sub>4</sub> (1,20), CaCl<sub>2</sub> (2,50), glicose (11,00). Utilizou-se unidade de aquecimento contendo módulo descartável (Flumen Produtos Médicos Ltda), mantendo a temperatura de 37,0 ± 0,5 °C e pressão de perfusão constante de 90 cm de H<sub>2</sub>O. Após a estabilidade, o coração foi acoplado ao sistema de

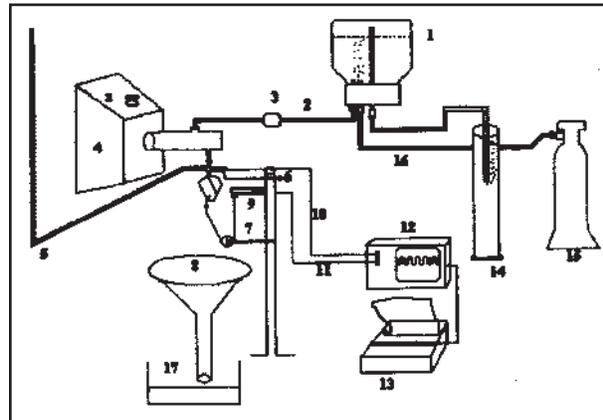


Fig. 1 - Diagrama da preparação pelo método de Langendorff com pressão constante de perfusão: 1) reservatório; 2) linha de perfusão; 3) filtro; 4) trocador de calor com termostato; 5) coluna para controle da pressão de perfusão; 6) linha de infusão de solução e drogas; 7) sistema de roldanas; 8) filtro; 9) transdutor de força; 10) sensor de temperatura; 11) conexão do transdutor ao biomonitor; 12) monitor; 13) impressora; 14) válvula reguladora de pressão; 15) cilindro de carbogênio; 16) linha de gaseificação do perfusato; 17) becker para recolher perfusato.

registro de contratilidade (fig. 1), utilizando-se o transdutor de força modelo *Grass (Force Displacement Transducer Model FT 03-Grass Instrument Co)*, acoplado ao ápice do coração por um sistema de roldanas com micro-rolamento, conforme técnica de Gottlieb e Magnus, modificada por Pitchon<sup>14</sup>. Os registros de derivada de tensão/tempo (dT/dt) e frequência cardíaca (FC) foram processados por Biomonitor Bese - Bioengenharia (DH 073) e impressos para análise e estudo comparativo (fig 1). Os corações foram mantidos em atividade durante 15min antes do 1º registro (controle) da investigação. Foram constituídos 4 grupos: **grupo I** - dopamina: 10 corações aos quais foram administrados 1ml da solução de dopamina na concentração de 3 ug/ml, sendo realizados registros 1, 3 e 5 min; **grupo II A** - diazepam: em 10 corações administrado 1ml da solução de diazepam, contendo 50 ug/ml e obtidos traçados 1, 3 e 5min; **grupo II B** - diazepam: utilizados os mesmos corações do grupo II A; após 15 min do término das experiências anteriores foi registrado novo controle

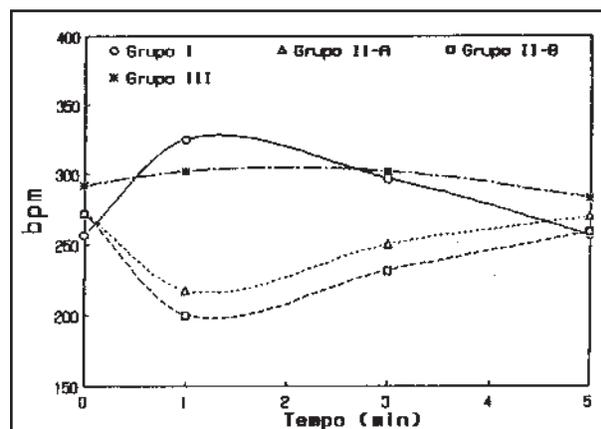


Fig. 2 - Variação da frequência cardíaca. Valores em médias (bpm)

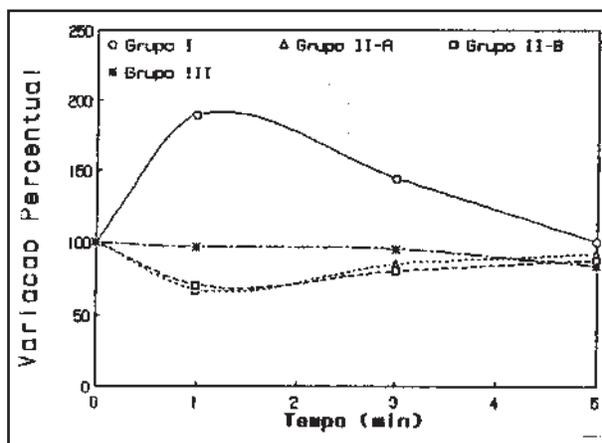


Fig. 3 - Variação perceptual da dT/dt em relação ao controle de cada grupo

e injetados 100 ug/ml de diazepam diluído em solução de Krebs-Henseleit<sup>13</sup> e realizados registros 1, 3, e 5min; **grupo III** diazepam-dopamina: utilizados 10 corações e administrados de forma seqüencial 50 ug/ml de diazepam e 3 ug/ml de dopamina, ambos diluídos em solução padrão, obtendo-se registro de contratilidade 1, 3 e 5 min. Foram estudadas variações da FC (bpm) e da dT/dt (g.s<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos foram submetidos a estudo estatístico, utilizando o programa EPI INFO versão 5.01B<sup>15</sup> através de técnicas de estatística descritiva, análise de variância e comportamento do teste “t” de Student<sup>16</sup> para amostras independentes e comparações pareadas. Nos casos em que não foi possível a utilização do teste “t”, empregou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney<sup>17</sup>. O nível de significância foi fixado em 0,05.

## Resultados

O programa de pesquisa, cumprido nos 30 ratos estudados, apresentou valores em médias das variações das FC dos animais. O comportamento destes valores dependeu do grupo estudado: no grupo I, após a injeção de dopamina (3 ug/ml), ocorreu elevação média da FC de 25729bpm (controle) para 32648bpm, no 1º min (p<0,001), e para 29725bpm, no 3º min (p<0,001), retornando a 256bpm, após 5min. Entretanto no grupo IIA, a FC média do grupo controle (27342) sofreu redução importante no 1º min (21740bpm, p<0,001) e 3º min (25126bpm, p<0,05). No 5º min a variação média da FC não foi estatisticamente significativa (27041bpm, p>0,05). Em relação ao grupo IIB, as variações médias de FC seguiram o mesmo padrão observado no grupo IIA. Assim, enquanto a frequência média dos animais controle era de 27241bpm, no 1º min, ocorreu redução para 20128bpm (p<0,001), mantendo-se até o 3º min (23231bpm, p<0,001). Já no 5º min houve recuperação dos batimentos cardíacos (25915bpm, p<0,05). No grupo III não houve variações significantes dos valores em médias da FC do controle (29220bpm) em relação ao

1º min (30231bpm, p>0,05), 3º min (30232bpm, p>0,05) e 5º min (28314bpm, p>0,05). Observou-se aumento importante da contratilidade miocárdica quando as médias do grupo I em controle (3811g.s<sup>-1</sup>) foram comparadas às obtidas no 1º min (6924g.s<sup>-1</sup>, p<0,001) e 3º min (5316g.s<sup>-1</sup>, p<0,001). No 5º min, os valores praticamente retornaram àqueles controles (3711g.s<sup>-1</sup>, p>0,05). No grupo IIA, o valor médio inicial da dT/dt de 3510g.s<sup>-1</sup> reduziu-se para 249g.s<sup>-1</sup> e para 309g.s<sup>-1</sup> no 1º e 3º min, respectivamente (p<0,001), assim como ao final do 5ºmin (329g.s<sup>-1</sup>, p<0,05). Nos valores encontrados para a variável dT/dt do grupo IIB, notou-se redução acentuada do desempenho cardíaco no 1º e 3º min, quando comparado ao controle (329 para 227 e 258g.s<sup>-1</sup>, respectivamente; p<0,001). No 5º min, houve recuperação do estado inotrópico (27,009g.s<sup>-1</sup>, p>0,05). A associação diazepam-dopamina (grupo III) não promoveu variações significantes do desempenho cardíaco. Observou-se, no 1º min, 3210g.s<sup>-1</sup>; no 3º min, 3211g.s<sup>-1</sup>; e no 5º min, 3014g.s<sup>-1</sup>, enquanto no grupo controle a média de dT/dt era 3411g.s<sup>-1</sup> (p>0,05). A figura 2 fornece uma visão global das médias de FC e a figura 3 da variação perceptual da dT/dt.

## Discussão

As propriedades fisiológicas e farmacológicas dos receptores periféricos dos benzodiazepínicos são pouco conhecidas, apesar de demonstradas em vários órgãos, como coração, rim e fígado, e de estarem relacionadas aos canais de cálcio. Estudos recentes mostram que os receptores do tipo central podem estar envolvidos nas respostas cardíacas do diazepam. O flumazenil, antagonista benzodiazepínico central, reverte as ações inotrópica e cronotrópica negativas do diazepam em fragmentos isolados de miocárdio de ratos<sup>9</sup>, assim como reverteu o choque diazepam-induzido no homem<sup>18</sup>. O efeito depressor da força e frequência cardíacas pelo diazepam encontra apoio em bases experimentais<sup>7-9</sup>, tornando difícil explicar o efeito inotrópico positivo encontrado por outros autores<sup>10, 11</sup>. Nossos resultados confirmam os dados que denunciam a depressão miocárdica provocada pela diazepam. Cantor e col<sup>19</sup> relataram que os antagonistas dos canais de cálcio (nifedipina e nitrendipipina) deslocaram agonistas benzodiazepínicos dos receptores periféricos destas substâncias em corações de ratos, inferindo que suas ações seriam similares àquelas dos bloqueadores dos canais de cálcio. Entretanto tem sido demonstrado que os benzodiazepínicos atuam em locais independentes, mas bloqueando a abertura dos canais iônicos<sup>20</sup>.

Em análise geral, pode-se concluir que o modelo de coração isolado pela técnica de Langerdorff modificada foi um método eficaz para avaliação do desempenho ventricular, induzido pelo diazepam e dopamina, sendo que a dopamina, isoladamente, determinou efeitos inotrópicos

e cronotrópicos positivos, em concentrações de 3µg/ml, e o diazepam exibiu efeito depressor da força de contração e da frequência cardíaca, nas doses de 50 e

100,ug/ml, e foi capaz de inibir os efeitos inotrópico e cronotrópico positivos da dopamina, na concentração de 50µg/ml.

### Referências

1. Sternbach LH - The benzodiazepine story. *J Med Chemistry*, 1979; 22:1-7.
2. Squires RF, Braestrup C - Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 1977; 266: 732-734.
3. Möhler H, Okada T - Properties of [<sup>3</sup>H]-diazepam binding to benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. *Life Sciences*, 1977; 20: 2010-101.
4. Costa E, Guidotti A - Molecular Mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1979;19: 531-45.
5. Marangos P, Patel J, Boulenger JP, Rosenberg C - Benzodiazepine binding sites in brain using. [<sup>3</sup>H] RO 5-4864. *Mol Pharmacol*, 1982; 22: 26-32.
6. Anholt RRH, Souza EB, Granite MLO, Snyder SH - Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *J Pharmacol Exper Ther*, 1985; 233: 517-26.
7. Mestre M, Carriot T, Belin C et al - Electrophysiological and pharmacological evidence that peripheral-type benzodiazepine receptors are coupled to channel in the heart. *Life Science*, 1984; 36: 391-400.
8. Daniel HB - Cardiovascular effects of diazepam and chlordiazepoxide. *Eur J Pharmacol*, 1975; 32: 58-65.
9. Hernandez J - The negative inotropic effects of diazepam in rat right ventricular strips. *J Pharm Pharmacol*, 1991; 43: 879-81.
10. Castillo-Ferrando JR, Perez Ojeda E, Encina L, Serrano JS - Modification on the inotropic effect of digoxin by diazepam in rat left atria. *J Pharm Pharmacol*, 1985; 37: 828-9.
11. Gonzales R, Zeegers A, Eigenhuis JJ, Leeuwijn RS, Van Wilgenburg H - A comparative study of diazepam and midazolam induced actions in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol*, 1990;183: 2082.
12. Langerdorff O - Untersuchungen am überlebenden sangerthierherzen. *Arch Ges Physiol*, 1985; 61: 291. Apud: The isolated perfused warm-blooded heart according to Langerdorff, Doring HJ e Dehnert H - *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology* - Reprint of the IST. English Edition, 1987.
13. Krebs HA, Henseleit K - Untersuchungen ober die Hanstoffbildung im tierkorper. *Hope Zeylers Z Physiol Chem*, 1932; 210: 33. Apud: The isolated perfused warm - blooded heart according to Langerdorff Doring HJ, Dehnert H - *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology*. Reprint of the IST. English Edition, 1987.
14. Pitchon M - Proteção miocárdica: "Paradoxo do cálcio" - Estudo em corações isolados de ratos. Tese de Mestrado. Belo Horizonte, 1992.
15. Dean AG, Dean JA, Burton AH, Dicker RC - EPI INFO, Version 5: a Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Centers for Disease Control. Atlanta. Georgia, USA 1990.
16. Snedecor WG, Cochran WC - The comparison of two samples. In: *Statistical Methods*. 7 ed. AMES, Iowa State University Press, cap. 6, 1980; 83.
17. Siegel S - *Nom Parametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York: Mc Graw Hill 1956;184.
18. Wendy C, Evans TC, Jehle D, Harchelrddad F, Isaacs M - Flumazenil for the reversal of refractory benzodiazepine-induced shock. *Clin Toxicol*, 1991; 29: 537-42.
19. Cantor EH, Kenessey A, Semenuk G, Spector S - Interaction of calcium channel blockers with non neuronal benzodiazepine binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81:1549-52.
20. Nakasawa K, Wove K, Ohara-imaizumi M, Fugimori K, Tanaka A - Inhibition of Ca-channels by diazepam compared with that by nicaldipine in pheochromocytoma Pcl 12 Cells. *Red Brain Research*, 1991; 553: 44-50.