

Padronização de modelo de coração isolado “working heart” com circulação parabiótica

Development of isolated swine “working heart model” with parabiotic circulation

Lindemberg da Mota SILVEIRA FILHO¹, Orlando PETRUCCI JUNIOR², Marcio Roberto do CARMO³, Pedro Paulo Martins de OLIVEIRA⁴, Karlos Alexandre de Sousa VILARINHO⁵, Reinaldo Wilson VIEIRA⁶, Domingo Marcolino BRAILE⁷

RBCCV 44205-944

Resumo

Objetivo: Desenvolver modelo de coração isolado de suíno “working heart” sob suporte por circulação parabiótica e verificar se o mesmo é estável e se possibilitou de forma efetiva a mensuração dos dados propostos.

Métodos: O modelo foi padronizado durante preparação para estudo de associação de agente à solução cardioplégica. Foram realizados 18 experimentos com um animal suporte e um animal doador em cada. O coração do animal doador foi perfundido como coração isolado pelo animal suporte em modo de execução de trabalho (“coração ejetante”). O coração isolado foi submetido à isquemia regional por pinçamento da artéria interventricular anterior seguido de isquemia global. Durante reperfusão, com o coração ejetante (em modo

“working heart”), aos 30, 60 e 90 minutos foram medidos parâmetros hemodinâmicos de contratilidade e metabólicos, obtendo-se assim a elastância máxima (Emax), o trabalho sistólico pré-recrutável (PRSW), rigidez do ventrículo (EDPRV), fluxo coronariano, consumo de oxigênio e dosagens de lactato e glicose.

Resultados: Os animais suporte ficaram estáveis durante todo o experimento. O pH, a pressão parcial de oxigênio e o hematócrito foram mantidos estáveis e dentro da faixa fisiológica. O coração isolado foi perfundido de forma adequada durante todo o experimento. Os dados hemodinâmicos e metabólicos propostos puderam ser mensurados adequadamente e sempre com o coração ejetante, em modo de execução de trabalho (“working heart”).

1. Mestre em Cirurgia. Médico assistente da Disciplina de Cirurgia Cardíaca - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
2. Professor Assistente Doutor da Disciplina de Cirurgia Cardíaca da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
3. Biólogo perfusionista. Mestrando da Disciplina de Cirurgia Cardíaca da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
4. Mestre em Cirurgia. Médico assistente Médico assistente da Disciplina de Cirurgia Cardíaca - Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
5. Médico assistente da Disciplina de Cirurgia Cardíaca da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
6. Professor Doutor Disciplina de Cirurgia Cardíaca Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
7. Professor Doutor Disciplina de Cirurgia Cardíaca Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Trabalho realizado na Disciplina de Cirurgia Cardíaca, Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Endereço para correspondência:

Lindemberg Mota Silveira Rua Barreto Leme 2022/ 101 - Cambuí - Campinas - SP - Brasil CEP 13025-085 Fone: (55-19) 3255-2792. E-mail: lindembergms@uol.com.br

Artigo recebido em 8 de outubro de 2008
Artigo aprovado em 12 de fevereiro de 2008

Conclusão: O modelo de coração isolado desenvolvido tipo "working heart" se manteve estável durante todo o experimento, sem a administração de drogas cardiopônicas e possibilitou a mensuração de todos os dados propostos de forma efetiva com o coração executando trabalho.

Descritores: Coração/cirurgia. Modelos animais. Suínos. Soluções cardioplégicas. Procedimentos cirúrgicos cardíacos. Reperfusão miocárdica/métodos.

Abstract

Objective: To develop an isolated working heart model with parabiotic circulation in swines and verify its stability and possibility to allow effective measurements of hemodynamic and metabolic data.

Methods: This model was developed during study of association of agents to cardioplegia. There were performed 18 experiments, each with a support animal and a donor animal. Donor animal heart was perfused as isolated working heart with parabiotic circulation from support animal.

Isolated heart underwent regional ischemia by interventricular artery clamping, followed by global ischemia. During reperfusion in working heart state mode at 30, 60 and 90 minutes, contractility indices such as elastance, preload recruitable stroke work index and metabolic data were acquired.

Results: Support animals were kept stable throughout the procedures without use of blood transfusions or vasoactive drugs. pH, oxygen partial pressure and hematocrit were kept stable and within physiologic ranges. Isolated heart was perfused adequately throughout the experiment. All hemodynamic and metabolic data proposed were adequately measured in working heart state mode.

Conclusion: This swine isolated "working heart" model was kept stable throughout the experiments with no administration of vasoactive drugs and it allowed adequate measurements of metabolic and hemodynamic data.

Descriptors: Heart/surgery. Models, animal. Swine. Cardioplegic solutions. Cardiac surgical procedures. Myocardial reperfusion/methods.

INTRODUÇÃO

Desde Langendorff os modelos em corações isolados têm sido utilizados com sucesso para o estudo de corações em mamíferos [1]. Estes tipos de modelo permitem o estudo das propriedades mecânicas do coração, do fluxo coronariano e o estudo metabólico do órgão isolado [2]. Os modelos de coração isolado primordiais evoluíram com a utilização por Heymans e Kochmann de circulação parabiótica [3]. Neste tipo de modelo, um animal suporte é utilizado para manter o órgão isolado perfundido e apesar destes conferirem preparações de maior complexidade que as preparações com soluções cristalóides, permitem ao modelo uma proximidade maior com a situação fisiológica [4].

No nosso meio, foi descrita a padronização de modelo de coração isolado com circulação parabiótica em porcos, que demonstrou ser modelo estável, permitindo a realização de procedimentos e estudo do órgão isolado sob diversas condições [4]. O coração do porco apresenta características anatômicas e fisiológicas que permitem sua utilização com sucesso como modelo para comparação com o coração humano [5]. Modelos de coração isolado com coração ejetante, em que os parâmetros são avaliados com o coração executando trabalho ("working heart state"), são utilizados para aproximar as condições experimentais da realidade clínica [6]. Um modelo semelhante, em coração isolado de suíno com circulação parabiótica, que fosse estável e reprodutível, capaz de permitir o estudo amplo de variáveis hemodinâmicas e metabólicas com o coração executando

trabalho poderia ser ainda mais semelhante às condições fisiológicas humanas.

Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo de coração isolado de suíno tipo com coração ejetante ("working heart") mantido sob suporte por circulação parabiótica e verificar se o mesmo é de fato estável de ser mantido e se possibilita de forma efetiva a mensuração dos dados que foram propostos.

MÉTODOS

O modelo foi padronizado durante estudo piloto com finalidade de permitir estudos posteriores com intervenção. Neste caso, o estudo complementar teve como objetivo testar o efeito da adição de agentes à solução cardioplégica. Ao todo foram realizados 18 experimentos utilizando fêmeas de porcos Large-White, em cada experimento foram usados um animal suporte, pesando ao redor de 40 kg, e um animal doador, pesando ao redor de 10 kg. Os animais foram tratados de acordo com as normas técnicas e direitos internacionais de pesquisa em animais [7] e os experimentos aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da universidade.

Animal suporte

Os animais suporte em cada experimento foram mantidos em jejum por 6 horas antes do procedimento. Cada animal recebeu, por via intramuscular, 1 mg de atropina e 25 mg/kg de quetamina e, a seguir, foi pesado e levado à sala de

operação, onde era anestesiado com 12,5 µg/kg de cloridrato de fentanila e 15 mg/kg de pentobarbital intravenoso. Em seguida, o animal era submetido a tubagem orotraqueal e administradas 8 mg de brometo de pancurônio, dose repetida ao longo do experimento conforme necessidade. Colocado em ventilação controlada com volume corrente de 10 ml/kg e fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 100%.

O animal era posicionado em decúbito dorsal horizontal na goteira de Claude Bernard e realizado:

- Acesso à veia jugular esquerda para infusão de volume cristalóide e medicamentos;
- Dissecção da artéria carótida comum esquerda e cateterização da mesma com cateter de polietileno de 5 mm para mensuração de pressão arterial média;
- Administração de heparina 500 UI/kg por via intravenosa e isolamento da veia jugular direita e da artéria carótida comum direita, canuladas individualmente com cateteres de polietileno de ¼ de polegada de diâmetro interno para respectivamente retorno venoso e aspiração de sangue arterial para o sistema de perfusão (Figura 1).

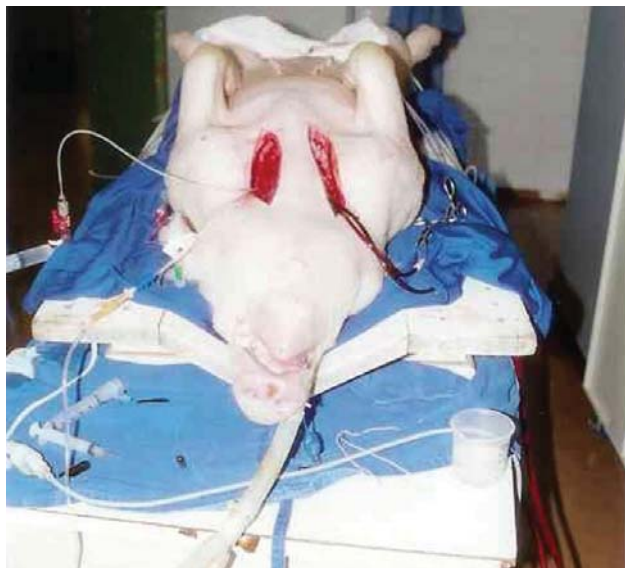


Fig. 1 - Visão geral do animal suporte em decúbito dorsal horizontal, com acessos vasculares canulados. Cervicotomia bilateral. Cateteres em veia jugular interna e artéria carótida esquerdas, para monitorização da pressão arterial média (PAM) de forma contínua. Canulação da veia jugular e artéria carótida direitas com tubos de ¼ de polegada. Tubagem orotraqueal e ventilação mecânica com FiO₂ a 100% e 10 ml/kg de volume corrente.

Animal doador

Os animais doadores em cada experimento foram submetidos aos mesmos cuidados pré-operatórios e monitorização anestésica que os animais suporte. Submetidos a ventilação mecânica à pressão com 100% de oxigênio.

Cada animal era colocado em decúbito dorsal horizontal em goteira de Claude Bernard e realizado:

Toracotomia mediana via esternotomia longitudinal, abertura das pleuras e do pericárdio. Administração de 500 UI/kg de heparina intravenosa.

Colocação de cristais piezoelétricos TRX6 da Sonometrics - London, Ontário - Canadá, em número de quatro, no epicárdio das paredes posterior e anterior, na base e no ápice do ventrículo esquerdo, fixados com fio de polipropileno 4.0.

Colocação de cateter tipo "abbocath" número 18 no ápice do ventrículo esquerdo para mensuração da pressão no mesmo, e fixação com fio de polipropileno 4.0.

Sistema de monitorização e perfusão

Para a realização das medidas no coração doador e depois em todas as medidas realizadas com o coração isolado no sistema de perfusão, foram utilizados os aparelhos descritos abaixo:

- Fluxômetros por doppler T206 (Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, EUA);
- Monitor com quatro canais de pressão (PCA-4, Sonometrics, London, Ontario, Canadá);
- Jogo de cristais piezoelétricos, utilizados num total de quatro (TRX6 Sonometrics, London, Ontario, Canadá);
- Sincronizador de cristais piezoelétricos (TRX6 Sonometrics, London, Ontário, Canadá);
- Programa CardioSoft 3.1.2 da Sonometrics, London, Ontário, Canadá.

O sistema utilizado para perfundir o coração isolado do animal doador tão logo este era retirado do animal foi constituído por tubos de polivinil de ¼ de polegada de diâmetro interno, conectores em Y com medidas de ¼ nas três extremidades, reservatórios de cardiectomia, bomba de circulação extracorpórea de roletes tipo DeBakey fabricada pela Braille Biomédica (São José do Rio Preto - SP), cateteres de polietileno de 15 mm de diâmetro interno para linhas de pressão e cânulas do tipo venosa infantil conectadas a torneira de três vias.

Preparação do coração isolado

O coração do animal doador era excisado com o cateter do ventrículo esquerdo e os cristais piezoelétricos fixos a este. A aorta era pinçada, ambas as veias cavas ligadas, e as veias pulmonares incisadas e o coração totalmente retirado após incisão na aorta ascendente e na artéria

pulmonar. A contagem do tempo de isquemia era iniciada. Em mesa, a aorta era canulada mantendo-se a cânula acima da valva aórtica e dos óstios das artérias coronárias. O átrio esquerdo era exposto e eram ressecados os óstios das veias pulmonares e canulado o átrio esquerdo, acima da valva mitral, para impedir regurgitação. A artéria pulmonar era canulada e a cânula introduzida até a cavidade do ventrículo direito. Estas três cânulas eram fixadas com fios de poliéster e conectadas a linhas de pressão.

As cânulas e o coração isolado eram fixados e posicionados em aparelho de suporte, onde eram mantidos por todo o experimento. Eram conectados aos tubos aferentes e eferentes e iniciada a reperfusão, interrompendo-se o tempo de isquemia.

Reperfusão do coração isolado

Nos primeiros 20 minutos de reperfusão, o coração isolado era desfibrilado quando necessário e reperfundido em modo passivo até estabilização das variáveis monitoradas. Em modo passivo, o sangue aspirado da artéria carótida pela bomba de roletes era enviado para a cânula em aorta do coração isolado. Este sangue era drenado pela cânula colocada no ventrículo direito (VD) pela artéria pulmonar e coletado em reservatório de cardiectomia, ou drenado pela cânula do átrio esquerdo para outro reservatório de cardiectomia. Uma vez nesses reservatórios, era devolvido ao animal suporte pela bomba de roletes. Durante esse período de perfusão passiva, a pressão de perfusão da aorta do coração isolado era monitorizada pelas linhas de pressão e o fluxo desta perfusão medido por dopplerfluxômetro na cânula da aorta. O fluxo coronariano era obtido por dopplerfluxômetro na cânula do VD, que coletava o efluente do coração isolado (Figura 2).



Fig. 2 - Visão geral do coração isolado perfundido. Coração isolado com minipinça metálica para indução da isquemia regional. Reservatório AE, funcionando como reservatório de pré-carga. Reservatório venoso de onde o sangue era reinfundido para o animal suporte. Linha aferente ao animal suporte da bomba de roletes. Fios dos cristais piezoelétricos.

Após 20 minutos de reperfusão passiva, a perfusão era convertida para modo de execução de trabalho ("working heart state"). O fluxo do animal suporte para a aorta do coração isolado era interrompido e o sangue aspirado era mandado para

reservatório de cardiectomia e deste, funcionando como reservatório pré-carga, enviado para o átrio esquerdo canulado do coração isolado. A pressão no átrio esquerdo era mensurada. O sangue que chegava então ao ventrículo esquerdo era bombeado do coração isolado pela cânula aórtica para um reservatório arterial. A pressão de perfusão aórtica era mensurada, obtendo-se assim, ao mesmo tempo, as necessárias pré e pós-cargas para o coração isolado. A pressão na aorta e no átrio esquerdo era mensurada pelas linhas de pressão conectadas às cânulas e a pressão no ventrículo esquerdo, por linha de pressão conectada ao cateter do ventrículo esquerdo. Essas linhas de pressão eram conectadas ao monitor (PCA-4, Sonometrics, London, Ontario, Canadá). O sangue que chegava ao reservatório arterial retornava a um terceiro reservatório de cardiectomia e deste era aspirado pela bomba de roletes e reinfundido ao animal suporte para ser oxigenado. O sangue efluente do seio coronário, correspondente ao fluxo coronariano era drenado do ventrículo direito para o terceiro reservatório e deste reinfundido ao animal suporte (Figura 3).

Durante a fase de reperfusão "working heart state", o coração isolado era reperfundido executando trabalho. Os fluxos aórticos e coronarianos eram mensurados com dopplerfluxômetros colocados respectivamente nas cânulas aórtica e do ventrículo direito conectadas a console (T206, Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, EUA). Os cristais piezoelétricos do ventrículo esquerdo eram conectados a sincronizador (TRX6, Sonometrics, London, Ontario, Canadá) para calcular o volume do ventrículo esquerdo e para obter as curvas de volume e pressão e os índices de contratilidade relacionados a estes.

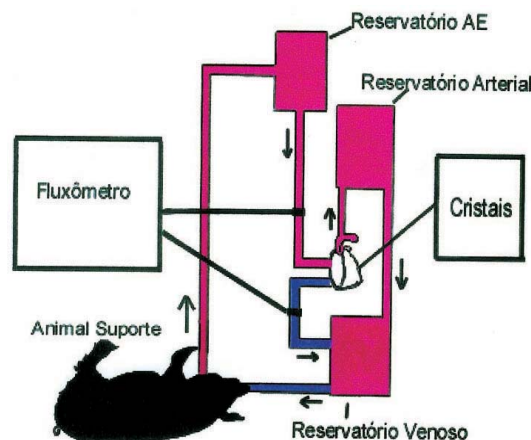


Fig. 3 - Esquema do sistema de perfusão. Em modo "working heart" o sangue aspirado do animal suporte era direcionado para o reservatório AE que funcionava como pré-carga. Deste para o coração isolado de onde era ejetado na aorta para o reservatório arterial. O sangue retornava para um reservatório venoso junto com o sangue efluente do seio coronário, drenado por cânula na artéria pulmonar. Deste reservatório era reinfundido no animal suporte. Variações de altura dos reservatórios AE e arterial correspondiam a variações respectivamente de pré e pós-carga. Sob monitorização pelas linhas de pressão no AE, na aorta, e no VE, pelos cristais piezoelétricos para obtenção do volume ventricular e pelos fluxômetros para mensuração do débito cardíaco e fluxo coronariano

Monitorizações realizadas “in situ” e em coração isolado em funcionamento

No coração do animal doador “in situ” e depois durante a reperfusão do coração isolado em modo de trabalho foram medidos:

- Débito cardíaco e volume do VE por meio dos cristais piezoelétricos sincronizados, fixos ao epicárdio e conectados ao sincronizador TRX6;
- Pressão do VE (por de linha de pressão);
- Pressão do átrio esquerdo (por linha de pressão) correspondendo à pré-carga oferecida;
- Pressão na raiz aórtica (por linha de pressão);
- Fluxo aórtico e fluxo coronariano pelos dopplerfluxômetros;
- Registro eletrocardiográfico;
- Gasometria em sangue efluente do coração isolado e do animal suporte, permitindo determinar assim o conteúdo de oxigênio e o consumo de oxigênio pelo coração isolado;
- Dosagem de glicemia e lactato do sangue efluente do coração isolado e do animal suporte;
- Obtenção de curvas de volume-pressão (pela sincronização sônica dos cristais piezoelétricos realizada pelo programa) durante períodos em que era provocada variação de pré-carga;
- Elastância máxima ($E_{\text{máx}}$) - Relação entre a pressão sistólica e o volume ventricular. Índice de contratilidade miocárdica correspondente à inclinação da reta composta por diferentes pontos da relação volume e pressão obtida no final da sístole em diferentes condições de pré-carga [8];
- Relação de trabalho sistólico pré-recrutável (PRSW) - Relação linear entre trabalho sistólico e volume diastólico final;
- Relação diastólica pressão-volume (EDPRV - “end diastolic pressure volume relationship”), permitindo medir a rigidez do ventrículo.

Estes últimos três parâmetros foram obtidos a partir da análise das curvas de volume e pressão possibilitada pelo programa nos registros efetuados com variação de pré-carga. Todas as medidas acima foram realizadas em períodos determinados e registradas pelo programa CardioSoft 3.1.2 da Sonometrics.

O consumo de oxigênio foi obtido pela diferença entre a amostra de sangue arterial do animal suporte e do sangue coletado do seio coronário na cânula do ventrículo direito, conforme a fórmula:

$$MVO_2 = 0.1 \times \text{Fluxo coronariano} / \text{Peso final do ventrículo esquerdo} \times ((SO_{2a} - SO_{2v}) \times 1,34 \times \text{Hb} / 100 + 0.03 \times 7,5 \times (pO_{2a} - pO_{2v})),$$

onde MVO_2 e o consumo de oxigênio expresso por 100 g de

miocárdio, SO_{2a} e SO_{2v} são as saturações de oxigênio (em %) do animal suporte e do seio coronário do coração isolado respectivamente, Hb e o conteúdo de hemoglobina (em g/L) e pO_{2a} e pO_{2v} são as pressões parciais de oxigênio do animal suporte e do seio coronário do coração isolado, respectivamente [9].

Após a realização das medidas aos 90 minutos de reperfusão, o experimento era interrompido com eutanásia do animal suporte, com dose letal de cloreto de potássio. O coração isolado era dissecado, sendo removidos a parede do ventrículo direito, os átrios, e os grandes vasos, em seguida o restante era pesado [10]. Amostras do ventrículo esquerdo sobre área submetida a isquemia regional eram enviadas para análise histológica.

Medidas comparadas entre os grupos com coração “in situ” e coração isolado

- Elastância máxima;
- “EDPVR”;
- Trabalho sistólico pré-recrutável (PRSW).

Medidas comparadas apenas com o coração isolado

- Dosagem de lactato;
- Consumo de oxigênio;
- Consumo de glicose;
- Peso úmido final do ventrículo esquerdo;
- Número de desfibrilações.

Metodologia e aquisição dos dados

Com a aparelhagem instalada sobre o coração do animal doador ainda “in situ”, eram registrados os dados e sem do posteriormente armazenados no programa. Os dados hemodinâmicos extraídos das curvas de volume e pressão eram obtidos com tracionamento de fita cardíaca aplicada na veia cava inferior, para promover variação da pré-carga. Após a excisão do coração doador e sua colocação no aparato de suporte, após 30 minutos de reperfusão (20 minutos de “reperfusão passiva” seguidos de reperfusão em modo “working heart”), os dados de estabilização do modelo eram mensurados. Após isso, a perfusão era novamente convertida para forma passiva e a artéria interventricular anterior era pinçada e assim mantida por 30 minutos, para induzir isquemia regional. Durante este período, freqüentemente, ocorriam arritmias ventriculares que não eram tratadas. A seguir, a pinça da artéria interventricular anterior era retirada e a perfusão interrompida por 90 minutos. Os modelos eram sorteados e divididos em três grupos: Grupo 1 recebeu a cada 30 minutos deste período solução cardioplégica de St Thomas (ST), o grupo 2 recebeu a mesma dose de St Thomas acrescido de trimetazidina (TMZ) e o grupo 3 correspondeu ao grupo controle (Co), sem receber solução cardioplégica.

Ao fim dos 90 minutos, a perfusão do coração isolado era reiniciada, inicialmente de modo passivo por 20 minutos.

Durante esta fase, o coração era desfibrilado com choques de 5J, quantas vezes fosse necessário para manter uma contratilidade satisfatória e registrado o número total de desfibrilações. Após 20 minutos, a perfusão do coração isolado era convertida para modo com coração ejetante ("working heart") a determinadas pré e pós-carga. O modelo era mantido neste modo de execução de trabalho até o fim do experimento. Com 30 minutos do início da reperfusão, eram realizadas as medidas com o auxílio da aparelhagem já citada. O registro das variações das curvas de volume e pressão era obtido enquanto se variava manualmente a altura do reservatório pré-carga, manobra esta análoga ao tracionamento da veia cava inferior realizada no coração "in situ". As medidas eram realizadas novamente aos 60 e 90 minutos de reperfusão (Figura 4).

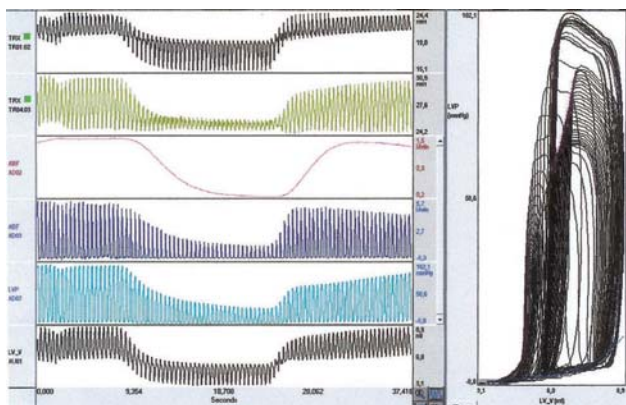


Fig. 4 - Visão de tela típica do programa utilizado. À esquerda, o registro da monitorização dos cristais e curvas obtidas. À direita, exemplo de curva de volume-pressão típica com variação de pré-carga. Da variação destas curvas foram obtidos os índices de contratilidade pesquisados.

O coração isolado era mantido assim pelo animal suporte ao todo por 240 minutos, assim divididos:

- 30 minutos para estabilização inicial após retirada do coração do animal doador;
- 30 minutos de indução de isquemia regional;
- 90 minutos de isquemia global e administração dos diferentes tratamentos;
- 90 minutos de reperfusão.

Durante todo o experimento, foram colhidos exames de gasometria arterial e dosagem de sódio, potássio e hematócrito do animal suporte periodicamente. O animal suporte foi mantido anestesiado e com pressão arterial média em torno de 80 mmHg, para isso recebendo o retorno venoso de seu sangue pelo circuito e reposição cristalóide. Bicarbonato de sódio 8,4% foi administrado quando necessário para manter o animal suporte livre de acidose. Em nenhum momento foi utilizado qualquer agente cardiotônico.

Análise estatística

Os resultados estão demonstrados em média \pm dois erros padrão da média. Para comparação entre grupos em diferentes momentos foi utilizada análise de variância (ANOVA) associada a teste de Bonferroni para identificação de diferenças. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Os testes foram realizados utilizando o pacote estatístico Graphpad Prism para Windows (Graphpad Software, San Diego, Califórnia).

RESULTADOS

A pressão arterial média dos animais suporte foi mantida estável com as medidas descritas e sempre acima de 80 mmHg. Os animais suporte foram mantidos hemodinamicamente estáveis durante todo o experimento, sem diferenças em relação à pressão parcial de oxigênio e ao pH. O hematócrito foi menor no grupo St Thomas que nos demais, mas sem variação significativa ao longo do decorrer do experimento (Figura 5).

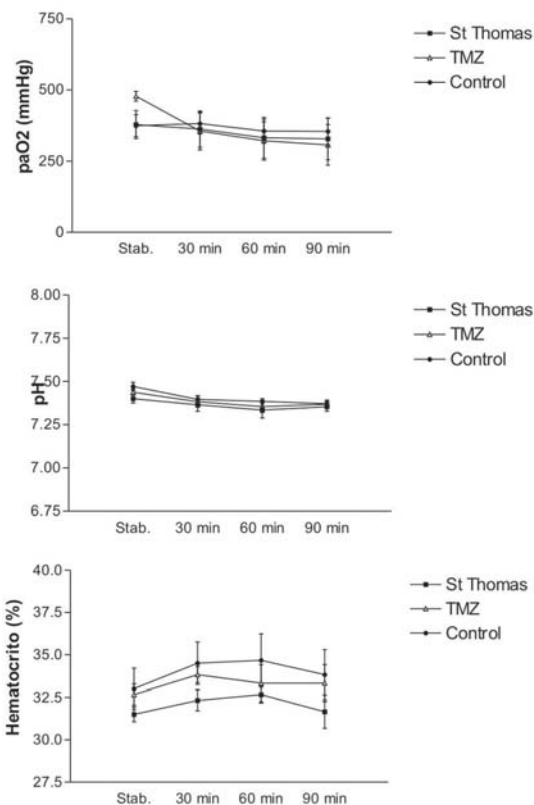


Fig. 5 - Pressão parcial de oxigênio (acima), pH (meio) e hematócrito (abaixo) dos animais suporte ao longo do procedimento. Dados apresentados como média e dois erros padrão da média (EPM) (n=6) em cada grupo. Os dados mostram estabilidade do modelo desde a estabilização até os 90 minutos de reperfusão total (período total de 180 minutos).

O tempo médio de isquemia, calculado do início da excisão do coração do animal doador até o início de sua reperfusão, foi de 755 ± 102 segundos.

No período de reperfusão, após os 30 minutos de isquemia regional seguido de 90 minutos de isquemia global, os grupos controle e o grupo St Thomas apresentaram mediana de 5 desfibrilações. O grupo Trimetazidina apresentou mediana de uma desfibrilação, porém não foi demonstrada diferença estatística significativa. O peso úmido final do ventrículo esquerdo apresentou diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre o grupo Trimetazidina e os demais, sendo o peso úmido final do ventrículo esquerdo do grupo Trimetazidina menor. Não houve diferença entre os grupos St Thomas e controle.

Os índices de contratilidade obtidos a partir da variação de pré-carga das curvas de volume e pressão foram comparados entre os grupos, incluindo os dados coletados "in situ". Os três dados de contratilidade menos dependentes de fatores externos não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos valores obtidos no momento da estabilização antes que fosse realizada a indução de isquemia ou tratamento específico. Isto foi observado nos três grupos. A elastância máxima apresentou importante diminuição das medidas de estabilização para as medidas aos 30, 60 e 90 minutos de reperfusão. Não houve porém diferença estatística significativa entre os três grupos. O trabalho sistólico pré-recrutável (PRSW) e o "EDPVR", relacionado com a rigidez do coração permaneceram estáveis e sem diferença estatística significativa entre os três grupos.

O fluxo coronariano apresentou grande dispersão nos resultados nos grupos St Thomas e controle, enquanto apresentou-se mais regular no grupo Trimetazidina, contudo, não houve diferença estatística significativa entre os três grupos.

O lactato efluente do seio coronário, coletado da cânula colocada no ventrículo direito pela artéria pulmonar apresentou elevação desde as medidas de estabilização até os 30, 60 e 90 minutos de reperfusão. Este aumento foi progressivo e nos três grupos, sem demonstrar diferença estatística significativa entre eles. Quando o nível de lactato obtido foi corrigido conforme o peso final do ventrículo esquerdo de cada experimento, os resultados obtidos foram similares, sem diferença significativa.

O consumo de oxigênio foi obtido de acordo com a fórmula anteriormente descrita e não houve diferença estatística significativa entre os três grupos. O consumo de glicose aos 30 minutos de reperfusão apresentou diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo Trimetazidina ($p \leq 0,05$), mas esta diferença não se verificou aos 60 e 90 minutos de reperfusão entre os três.

A análise histológica foi realizada de forma ilustrativa, analisando-se fragmentos corados com hematoxilina-

eosina. Os fragmentos provenientes dos corações do grupo controle (Co) apresentaram presença mais intensa de nichos de células cardíacas edemaciadas e estrutura citoplasmática demonstrando sinais de lise celular. Os núcleos das células provenientes do grupo controle (Co) também mostraram picnose de forma mais freqüente. Os fragmentos dos grupos St Thomas (ST) e grupo trimetazidina (TMZ) apresentaram menos edema e menos picnose celular. Não foram verificadas diferenças evidentes entre os grupos St Thomas (ST) e trimetazidina (TMZ).

DISCUSSÃO

O coração do porco é anatomicamente bastante semelhante ao humano, com exceção da veia hemiazigos que drena para o seio coronário. As dimensões do coração suíno também são bastante semelhantes às humanas em relação ao peso. Sua semelhança com o coração humano em relação à pobreza de colaterais coronárias preexistentes, mas a grande capacidade de formação de colaterais mediante isquemia, faz do porco um animal muito adequado para estudo do coração comparado ao humano [5].

Modelos têm sido utilizados em coração de porco "in situ" para mensurar diferentes parâmetros de contratilidade de forma adequada e fidedigna em relação à anatomia e à fisiologia humanas [11]. Estudos em coração isolado de porcos vêm sendo descritos com intenção de mimetizar as situações fisiológicas encontradas em humanos com um modelo mais compatível com a anatomia humana sem perder as vantagens relacionadas ao estudo de coração isolado em si [6], tais como a possibilidade de estudar as respostas farmacológicas e mecânicas do coração isoladamente sem envolver as respostas dos diferentes sistemas do animal [4,6].

O modelo descrito permitiu a aquisição de dados em um coração isolado perfundido com sangue. Para esta finalidade foi utilizada a circulação parabiótica. A manutenção do modelo por um total de 240 minutos, sendo que destes decorreram 90 minutos de reperfusão após o coração isolado ter permanecido sob isquemia localizada regional por 30 minutos, seguido de isquemia global por 90 minutos, demonstra a exequibilidade do modelo. Petrucci Jr et al. [4], em descrição de modelo experimental em coração isolado de suínos com circulação parabiótica não "working heart", obtiveram modelo estável por tempo semelhante ao realizado neste estudo sem utilização de hemoderivados ou agentes cardiotônicos.

O hematócrito fornecido aos três grupos permaneceu sempre dentro da faixa fisiológica de Flecknell [12] e constante, embora um pouco menor no grupo St Thomas (ST). A pressão parcial arterial de oxigênio (pO_{2a}) e o pH também foram mantidos estáveis e dentro dos valores fisiológicos durante os experimentos.

O tempo de isquemia decorrente desde a retirada do

coração do animal doador até o início de sua reperfusão com intuito de estabilização foi compatível com a literatura para preparações em mamíferos [13,14].

No início da reperfusão logo após o término do tempo de isquemia, e após o período de isquemia regional seguido de isquemia global em que os grupos eram tratados, a reperfusão do coração isolado era realizada de forma passiva. Por simples pinçamento de tubos, o sangue era inicialmente enviado para a aorta e assim mantida pressão de perfusão coronariana adequada, monitorada, sempre em torno de 70 mmHg. Nesta fase, chamada de perfusão em modo passivo, o coração isolado era mantido drenado com o sangue desviado para o reservatório conectado ao átrio esquerdo, que era mantido em nível abaixo do coração isolado.

Também o sangue correspondente ao fluxo coronariano nesta fase era drenado pela cânula colocada no ventrículo direito para outro reservatório. Durante este período, o coração isolado era desfibrilado quando necessário e gradativamente obtinha uma contratilidade mínima satisfatória. Com 20 minutos de reperfusão desta forma, com mudança de pinçamento do tubo da via aferente, o sangue aspirado pela bomba de roletes do animal suporte era mandado para o reservatório pré-carga já com sua altura elevada, conectado ao átrio esquerdo. Neste modo, o coração isolado era perfundido com o sangue tomando seu caminho "natural", chegando ao ventrículo esquerdo por reservatório correspondendo à pré-carga. A perfusão era mantida assim, com o coração isolado ejetando sangue para o reservatório arterial pelo resto do tempo e com essa forma de reperfusão os dados eram adquiridos e armazenados.

A utilização dos cristais piezoelétricos (TRX6 Sonometrics) no epicárdio do animal doador e depois neste quando colocado isolado permitiu a obtenção acurada do volume ventricular. Não foram encontrados relatos de estudos em coração isolado estudando aditivos à solução cardioplégica com a utilização de aparelhagem semelhante em que fossem comparados tais parâmetros de contratilidade pouco dependentes.

Durante a aquisição dos dados "in situ" e no coração isolado, com o tracionamento de fita cardíaca aplicada em veia cava inferior [15] e com a mudança de altura do reservatório pré-carga na reperfusão do coração isolado, pode-se obter curvas de volume e pressão que de acordo com suas variações puderam permitir o cálculo de determinados índices de contratilidade.

A elastância máxima é um índice relativamente independente da pré e pós-carga momentâneas [8,15]. Este é um índice demonstrado pela curva obtida pela união de vários pontos correspondentes ao fim da sístole, obtidos nas seguidas curvas de volume e pressão obtidas com oclusão parcial e temporária da veia cava inferior, o que no coração isolado foi obtido com variação da altura do reservatório pré-carga. O trabalho sistólico pré-recrutável

(PRSW) possivelmente seja o índice de contratilidade menos dependente de outros parâmetros dentro de valores fisiológicos [4,16]. A EDPVR ("end diastolic pressure volume relationship") é uma regressão exponencial entre a pressão diastólica e o volume diastólico final, também obtida a partir da variação das curvas de volume e pressão [17]. Estes três índices conferem ao modelo a possibilidade de calcular índices experimentais menos variáveis de acordo com os parâmetros externos, como a frequência cardíaca e a pós-carga.

Araki et al. [18] publicaram padronização de modelo em coração isolado "working heart" de porcos perfundidos com solução cristalóide e mensuraram a elastância máxima e a rigidez do ventrículo. Neste estudo, os resultados dos parâmetros de contratilidade obtidos "in situ" coerentes com os resultados obtidos no coração isolado à estabilização, antes dos tratamentos aplicados, ressaltam a aplicabilidade deste modelo. Este fato foi também compatível com a literatura. [18,19].

O débito cardíaco pode ser mensurado de acordo com as curvas de volume e de pressão obtidas a partir dos cristais piezoelétricos e da monitorização da pressão do ventrículo esquerdo e por dopplerfluxômetro instalado em cânula eferente do coração isolado. O fluxo coronariano, de forma semelhante, pode ser mensurado por dopplerfluxômetro instalado na cânula eferente do ventrículo direito. No mesmo ato da aquisição dos dados hemodinâmicos, eram colhidas amostras de sangue do animal suporte e sangue efluente do seio coronário da cânula do ventrículo direito do coração isolado. Assim, foi possível mensurar de forma adequada o lactato efluente, o consumo de oxigênio, a diferença de glicose afluente e efluente ao coração isolado que permitiu obter o consumo de glicose.

O pinçamento da artéria interventricular anterior do animal foi realizado com intuito de caracterizar no modelo situação de isquemia aguda com o coração prestes a receber tratamento. Esta estratégia foi semelhante à descrita por Horsley et al. [20].

A ausência de melhora no comportamento hemodinâmico com o uso de qualquer método de proteção miocárdica em relação ao controle, possivelmente, pode ser atribuída ao refinamento deste modelo em incluir dados mensurados em modo "working heart".

O peso úmido final do ventrículo esquerdo foi significativamente menor no grupo trimetazidine em relação aos outros. Quando calculado o peso corrigido pelo peso do animal doador de onde o coração foi retirado, os valores do grupo trimetazidine foram significativamente menores em relação ao grupo controle, sem diferença com o grupo St Thomas. Petrucci Jr. [21] encontrou peso úmido maior no grupo controle que em corações isolados de suínos que receberam solução cardioplégica cristalóide ou sanguínea.

Provavelmente, a não administração de qualquer solução de proteção miocárdica ao grupo controle tenha promovido maior edema intersticial que se traduziu em aumento do peso úmido final.

As diferenças encontradas na análise histológica realizada, com evidência de menor edema e picnose celular nos grupos que receberam solução cardioplégica St Thomas associada ou não ao trimetazidina sugerem algum grau de proteção miocárdica nestes grupos em relação ao controle.

CONCLUSÃO

O modelo de coração isolado desenvolvido tipo "working heart" se manteve estável durante todo o experimento, sem a administração de drogas cardiotônicas e possibilitou a mensuração de todos os dados propostos de forma efetiva com o coração executando trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Doring HJ, Dehnert HD. The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. In: Koberlein K, ed. *Methods in experimental physiology and pharmacology*. Freiburg, Germany:Biomesstechnik-Verlag March GmbH;1987.
2. Doring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique: Function - Application. *Physiologia Bohemoslovaca*. 1990;39:481-504.
3. Heymans JF, Kochmann M. Une nouvelle méthode de circulation artificielle à travers le couer isolé de mammifère. *Archs Intern Pharmacodynamie et de Thérapie*. 1904;13:531-8.
4. Petrucci Junior O, Oliveira PP, Carmo MR, Vieira RW, Braile DM. Standardization of an isolated pig heart preparation with parabiotoxic circulation: methodological considerations. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(5):649-59.
5. Swindle MM, Horneffer PJ, Gardner TJ, Gott VL, Hall TS, Stuart RS, et al. Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Lab Anim Sci*. 1986;36(4):357-61.
6. Chinchoy E, Soule CL, Houlton AJ, Gallagher WJ, Hjelle MA, Laske TG, et al. Isolated four-chamber working swine heart model. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(5):1607-14.
7. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos na experimentação animal. In: São Paulo:Congresso do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;1991.
8. Suga H. Left ventricular time-varying pressure-volume ratio in systole as an index of myocardial inotropism. *Jpn Heart J*. 1971;12(2):153-60.
9. Budrikis A, Bolys R, Liao Q, Ingemansson R, Sjoberg T, Steen S. Function of adult pig hearts after 2 and 12 hours of cold cardioplegic preservation. *Ann Thorac Surg*. 1998;66(1):73-8.
10. Brooks WW, Healey NA, Sen S, Conrad CH, Bing OH. Oxygen cost of stress development in hypertrophied and failing hearts from the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1993;21(1):56-64.
11. Kaczmarek I, Feindt P, Boeken U, Guerler S, Gams E. Effects of direct mechanical ventricular assistance on regional myocardial function in an animal model of acute heart failure. *Artif Organs*. 2003;27(3):261-6.
12. Flecknell PA. In: *Laboratory animal anaesthesia. A practical introduction for research workers and technicians*. Academic Press, 1996.
13. Gamble WJ, Conn PA, Kumar AE, Plenge R, Monroe RG. Myocardial oxygen consumption of blood-perfused, isolated, supported, rat heart. *Am J Physiol*. 1970;219(3):604-12.
14. Werner JC, Whitman V, Fripp RR, Schuler HG, Morgan HE. Carbohydrate metabolism in isolated working newborn pig heart. *Am J Physiol*. 1981;241(5):E364-71.
15. Grossman W, Braunwald E, Mann T, McLaurin LP, Green LH. Contractile state of the left ventricle in man as evaluated from end systolic pressure-volume relations. *Circulation*. 1977;56(5):845-52.
16. Glower DD, Spratt JA, Snow ND, Kabas JS, Davis JW, Olsen CO, et al. Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. *Circulation*. 1985;71(5):994-1009.
17. Guyton RA. A synopsis of cardiac physiology. In: Edmunds LH, ed. *Cardiac surgery in the adult*. 1 ed. New York:McGraw-Hill Companies;1997. p.59-84.
18. Araki Y, Usui A, Kawaguchi O, Saito S, Song MH, Akita T, et al. Pressure-volume relationship in isolated working heart with crystalloid perfusate in swine and imaging the valve motion. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;28(3):435-42.
19. Kanashiro RM, Nozawa E, Murad N, Gerola LR, Moisés VA, Tucci PJ. Myocardial infarction scar plication in the rat: cardiac mechanics in an animal model for surgical procedures. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(5):1507-13.
20. Horsley WS, Whitlark JD, Hall JD, Gott JP, Pan-Chih Hyang AH, et al. Revascularization for acute regional infarct: superior protection with warm blood cardioplegia. *Ann Thorac Surg*. 1993;56(6):1228-38.
21. Petrucci Jr O. Estudo comparativo entre solução cardioplégica cristalóide e microcardioplegia sanguínea normotérmica em corações agudamente isquêmicos [Tese de doutorado]. Campinas:Universidade Estadual de Campinas;2004.