

# **RUBENS CAMPANA PASQUALIN**

Estudo dos efeitos do sevoflurano, propofol e sufentanil  
sobre o miocárdio na lesão de isquemia e reperfusão:  
estudo experimental em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências  
Programa de: Anestesiologia  
Orientador: Prof.Dr.José Otávio Costa Auler Jr

São Paulo  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pasqualin, Rubens Campana

Estudo dos efeitos do sevoflurano, propofol e sufentanil sobre o miocárdio na  
lesão de isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos / Rubens Campana  
Pasqualin. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Anestesiologia.

Orientador: José Otávio Costa Auler Jr.

Descritores: 1.Isquemia miocárdica 2.Anestésico inalatório 3.Anestésico  
intravenoso 4.Pré-condicionamento isquêmico 5. Pré-condicionamento anestésico

USP/FM/DBD-422/10

**À minha esposa, pelo apoio e paciência.**  
**Às minhas filhas, o motivo de tudo.**  
**À memória de minha mãe, pelo exemplo de vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor José Otávio e à Professora Denise Fantoni pela confiança e apoio desde o início, meus sinceros agradecimentos.

À Professora Maria Cláudia por toda a colaboração para realização do projeto e disponibilidade para esclarecimento das dúvidas.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Hipertensão, Leandro, Cristiano, Matheus, Edson, Roberto, Maicon, Ivana, Georgia, Raquel, Kleiton, Cristiane e Celso, sem os quais este projeto seria imensamente mais difícil de concluir.

À Professora Lourdes e às colegas e amigas do Laboratório de Anatomia Patológica, Renata, Joice, Solange, Márcia e Sueli pela dedicação e ajuda para realização das lâminas.

Ao Professor Krieger pela disponibilização do Laboratório de Genética.

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro.

A Deus, sempre presente.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. JUSTIFICATIVA	05
3. OBJETIVOS	09
4. MATERIAL E MÉTODO	10
4.1 Animais	10
4.2 Definição dos grupos	11
4.3 Diagrama esquemático do protocolo experimental	13
4.4 Anestesia e preparação cirúrgica	14
4.4.1 Analgesia dos grupos crônicos	15
4.4.2 Eutanásia	16
4.5 Preparo do tecido	16
4.6 Isquemia regional do miocárdio(IRM)	17
4.7 Determinação da área de isquemia e de infarto	18
4.8 Detecção da apoptose pela coloração TUNEL	19
4.9 Expressão de Bcl-2 e Bax pelo método RT-PCR	20
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
6. RESULTADOS	24
6.1 Hemodinâmica	24
6.2 TUNEL	34
6.3 RT-PCR	38
6.4 Área de infarto e sob risco de infarto	39
7. DISCUSSÃO	44
7.1 Parâmetros hemodinâmicos	45
7.2 Área de infarto e sob risco de infarto	48
7.3 TUNEL e RT-PCR	50
8. CONCLUSÕES	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
10. ANEXOS	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

AI .....	área de infarto
AR .....	área sob risco de infarto
ATP .....	adenosina trifosfato
BAS .....	período basal
CPT .....	grupo sevoflurano, sufentanil e propofol
CTL .....	grupo controle
DAG .....	diacilglicerol
DP .....	duplo produto
DPDT+ .....	taxa máxima de aumento da pressão do ventrículo esquerdo
DPDT- .....	taxa máxima de queda da pressão do ventrículo esquerdo
FC .....	frequência cardíaca
H+ .....	próton hidrogênio
IAMF .....	período de 5 minutos finais da isquemia
IAMI .....	período de 5 minutos iniciais da isquemia
IRM .....	isquemia regional do miocárdio
$\kappa$ .....	receptor opióide kappa
$\delta$ .....	receptor opióide delta
$K_{ATP}$ .....	canal de potássio ATP dependente
$Na^+$ .....	íon sódio
NCE .....	enzima translocadora de $Na^+Ca^{++}$
NHE .....	enzima translocadora de $Na^+H^+$

PAS ..... pressão arterial sistólica

PC ..... período pré-condicionamento

PCI ..... pré-condicionamento isquêmico

PDFVE ..... pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

pH ..... potencial hidrogeniônico

PKC ..... proteína quinase C

PLC ..... fosfolipase C

PRO ..... grupo propofol

REPF ..... período de 5 minutos finais da reperfusão

REPI ..... período de 5 minutos iniciais da reperfusão

ROS ..... espécies reativas de oxigênio

SEV ..... grupo sevoflurano

SUF ..... grupo sufentanil

TTC ..... cloreto de trifeniltetrazólio

VE ..... ventrículo esquerdo

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Sequências de primers, temperaturas de anelamento e comprimento dos fragmentos dos genes estudados. ....	23
<b>Tabela 02:</b> Parâmetros hemodinâmicos .....	25
<b>Tabela 03:</b> Número total de células apoptóticas em campos alternados de toda extensão da lâmina (aumento de 40 vezes) .....	34
<b>Tabela 04:</b> Percentual total de fibrose nos grupos crônicos em toda extensão da lâmina (aumento de 20 vezes) .....	35
<b>Tabela 05:</b> Áreas de infarto e sob risco de infarto expressos como porcentagem da área do corte do ventrículo esquerdo nos grupo agudos e grupos crônicos .....	39



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01:** Pressão arterial sistólica em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão. .... 27

**Figura 02:** Média da frequência cardíaca em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos es do término do período de reperfusão. .... 28

**Figura 03:** Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão. .... 29

**Figura 04:** Taxa máxima de aumento da pressão no ventrículo esquerdo em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão..... 31

**Figura 05:** Taxa máxima de queda da pressão no ventrículo esquerdo em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão..... 32

**Figura 06:** Consumo de oxigênio pelo miocárdio em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão ..... 34

**Figura 07:** Número total de células apoptóticas em campos alternados em toda extensão das lâminas (aumento de 40 vezes)..... 36

**Figura 08:** Fotomicrografias de lâminas coradas por TUNEL nos grupos agudos e crônicos (aumento de 40 vezes). As setas indicam os núcleos fluorescentes de miócitos apoptóticos. .... 37

**Figura 09:** Expressão dos genes Bax e Bcl-2 nos grupos agudos. .... 38

**Figura 10:** Tamanho da área sob risco de infarto (AR) expressos como porcentagem da área do corte do ventrículo esquerdo no grupo agudo. .... 40

**Figura 11:** Comparação das áreas de infarto dos grupos agudo e crônico expressos como porcentagem da área do corte do ventrículo esquerdo. .... 40

**Figura12:** Fotografias dos cortes de miocárdio corados com TTC dos grupos agudos e crônicos. A coloração branca indica a área de infarto nos agudos e crônicos. A coloração azul (Evans) indica a área que não sofreu isquemia e reperfusão nos agudos. A coloração vermelha (TTC) indica a área sob risco que permaneceu viável nos agudos e crônicos. .... 41

## RESUMO

Pasqualin RC. Estudo dos efeitos do sevoflurano, propofol e sufentanil sobre o miocárdio na lesão de isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 68p.

A interrupção do fluxo sanguíneo, ou isquemia, representa um dos problemas mais importantes de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares enfrentados pelos médicos na sua rotina. Em relação ao miocárdio muitos estudos têm sido realizados nessa área e sabe-se que os anestésicos inalatórios e os opióides podem proteger as células cardíacas contra a lesão de isquemia e reperfusão. O propofol por sua vez parece não ter efeito de pré-condicionamento, porém apresenta características similares às ações antioxidantes da vitamina E, neutralizando os efeitos nocivos da produção de radicais livres. A associação de sevoflurano, sufentanil e propofol não está descrita na literatura. O objetivo deste estudo foi examinar a potencialização de cardioproteção entre sevoflurano, propofol e sufentanil por meio de análise do tamanho da área de infarto e inibição de apoptose em células miocárdicas. Ratos foram submetidos a 5 protocolos de pré-condicionamento diferentes e divididos em grupos agudos e crônicos. Os resultados indicaram que a associação destes anestésicos não conferiu proteção maior do que quando administrados isoladamente. Além disso, o sevoflurano conferiu proteção ao miocárdio no pós-infarto agudo e crônico. Já o propofol conferiu cardioproteção no pós-infarto crônico.

**Descritores:** isquemia miocárdica, anestésico inalatório, anestésico intravenoso, pré-condicionamento anestésico, pré-condicionamento isquêmico.

## ABSTRACT

Pasqualin RC. Study on the effects of sevoflurane, propofol and sufentanil on the myocardial ischemia and reperfusion injury: an experimental study in rats [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo, 2010. 68p.

The interruption of blood flow, or ischemia, represents one of the major problems of cardiovascular and cerebrovascular diseases seen by physicians in their routine. With respect to the myocardium, many studies have been conducted in this area and it is a known fact that inhaled anesthetics and opiates may protect cardiac cells against the ischemia and reperfusion injury. Propofol, in turn, seems to have no preconditioning effect, but it has similar characteristics to the antioxidant actions of vitamin E by neutralizing the harmful effects of free radical production. The combination of sevoflurane, sufentanil and propofol has not been described in literature. The aim of this study was to survey cardioprotection potentiation among sevoflurane, propofol and sufentanil by analyzing the size of infarct area and the inhibition of apoptosis in cardiac cells. Rats were subjected to five different preconditioning protocols and divided into acute and chronic groups. Results indicated that the combination of these anesthetics did not confer greater protection than when they were administered alone. Furthermore, sevoflurane conferred myocardial protection in the post-acute and chronic infarction stage. Propofol, in turn, conferred cardioprotection in the chronic post-infarction stage.

**Keywords:** myocardial ischemia, inhalational anesthetic, intravenous anesthetic, anesthetic preconditioning, ischemic preconditioning.

## 1. INTRODUÇÃO

A interrupção do fluxo sanguíneo, ou isquemia, representa um dos aspectos mais relevantes das doenças cardiovasculares e cerebrovasculares dentro da área médica. Muitos destes episódios isquêmicos podem ser revertidos em seus estágios iniciais por meio de procedimentos intervencionistas ou farmacológicos (Maxwell et al.,1997). Nas últimas décadas foram realizados numerosos estudos com a finalidade de limitar o dano ou a morte de células cardíacas frente a um insulto isquêmico. Apesar dos excelentes resultados obtidos com a implementação de trombolíticos e da intervenção por angioplastia e “stents” nas fases agudas, as intervenções tempo dependentes, tratamentos farmacológicos com antagonistas de canais de cálcio, nitroderivados, antioxidantes e betabloqueadores, com exceção dos últimos, não apresentam resultados muito satisfatórios para esta situação (Del Valle et al.,2003). No miocárdio, a reperfusão de áreas isquêmicas pode gerar: redução da força contrátil (atordoamento), arritmias de reperfusão e infarto e necrose de miócitos (Bollini R. 1990; Bernier et al.,1989; Hearse et al.,1986).

Também existe grande interesse nos efeitos do pré-condicionamento isquêmico (PCI) e dos agentes anestésicos como indutores do pré-condicionamento no miocárdio. Murry e colaboradores descreveram em 1986 o fenômeno do PCI pela primeira vez, submetendo corações a curtos períodos (5 minutos) de isquemia antes de um período prolongado (40 minutos). Esta técnica reduziu o tamanho da área infartada em mais de 50%. Um fenômeno similar tem sido observado com agentes inalatórios e

opióides provocando o fenômeno do pré-condicionamento farmacológico no miocárdio. Hoje se sabe que muitos anestésicos facilitam, melhoram ou inibem o pré-condicionamento. Com modo de administração diferente de muitos outros agentes indutores de pré-condicionamento cardíaco, que devem ser administrados diretamente nas artérias coronárias, os agentes anestésicos podem ser administrados com maior facilidade por via venosa ou inalatória. Isto ganha importância na anestesia de pacientes com risco elevado para isquemia miocárdica.(Zaugg et al.,2003).

Como consequência da lesão isquêmica, rapidamente ocorre depleção do trifosfato de adenosina (ATP). O metabolismo anaeróbico que se segue provoca o acúmulo do próton hidrogênio ( $H^+$ ) tornando a célula acidótica. Para reduzir a  $[H^+]$  e restaurar o pH, o miócito promove a troca de íons hidrogênio por íons sódio ( $Na^+$ ) por meio da enzima translocadora de  $Na^+H^+$  (NHE) presente no sarcolema. O acúmulo de sódio ativa outra enzima no sarcolema (NCE) que faz a troca do íon sódio pelo íon cálcio ( $Ca^{++}$ ) gerando sobrecarga deste íon no meio intracelular. O aumento da  $[Ca^{++}]$  induz a alta taxa de atividade metabólica com acúmulo de fosfatos inorgânicos e espécies reativas de oxigênio (ROS). Assim ocorre a formação de edema dos espaços intermembrana com subsequente “encolhimento” da matriz mitocondrial e desestruturação do complexo supramolecular, que se compõe da bomba de prótons ATPase, creatina quinase mitocondrial e enzima transportadora de adenina-nucleotídeo. Desta forma a produção de energia fica diminuída e resulta na depleção de ATP. Os poros de

permeabilidade transitória se abrem e ocorre a dissipação do potencial de membrana interno da mitocôndria levando a morte celular.

Os mecanismos de morte celular, necrose e apoptose, também vêm sendo largamente pesquisados. Embora esteja bem documentado que a necrose, como a maior forma de morte de miócitos, provoque a destruição de grande número de células após a isquemia e reperfusão do miocárdio, a indução da apoptose, primariamente iniciada na reperfusão, pode contribuir para o aumento da morte celular em um processo dinâmico e progressivo (Zhao ZQ & Vinten-Johansen., 2002).

Em associação com a sobrecarga de cálcio e de ROS, o estímulo isquêmico causa a liberação de mediadores do estresse incluindo adenosina, bradicinina, catecolaminas e opióides contribuindo para início da cascata de reações que promove o pré-condicionamento na tentativa de proteger a integridade celular. Esta cascata de reações ocorre com a ativação dos receptores sarcolemais de adenosina, catecolaminas ( $\alpha 1$  e  $\beta$  adrenérgicos), purinoreceptores, opióides ( $\delta$  e  $\kappa$ ), bradicinina, endotelinas, acetilcolina e angiotensina II, que estão diretamente ligados a G-proteína da membrana. A G-proteína amplifica o estímulo inicial dos receptores para a fosfolipase C (PLC). A ativação da PLC leva a formação do trifosfato de inositol, que promove a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e a produção de diacilglicerol (DAG). O DAG ativa diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC). Além do DAG a PKC pode ser ativada por G-proteínas, fosfolípídeos, cálcio intracelular aumentado, óxido nítrico e ROS. Finalmente a ativação da PKC induz a fosforilação e ativação dos canais de

potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) do sarcolema e da mitocôndria, que regulam a concentração de cálcio intracelular.

O pré-condicionamento isquêmico ou farmacológico exerce proteção ao miocárdio primeiramente pela ativação dos canais de  $K_{ATP}$  dependentes sarcolemais que promovem a redução do cálcio intracelular por meio da estabilização do potencial de membrana em repouso abaixo de -80mV e encurtamento do potencial de ação. Posteriormente a ativação dos canais de  $K_{ATP}$  dependentes mitocondriais leva a um aumento do volume da matriz mitocondrial e conseqüente redução do espaço intermembrana que acarreta na reorganização do complexo supramolecular, fechamento dos poros de permeabilidade transitória e restauração da produção de energia (Zaugg et al.,2003).



## 2. JUSTIFICATIVA

Procura-se justificar este presente estudo, uma vez que isoladamente os agentes anestésicos têm mostrado algum efeito protetor, mas sua associação ainda não está bem definida em potencializar ou não esta proteção. Também é cada vez mais comum a utilização destes agentes em associações para fins de anestesia balanceada. Os anestésicos voláteis e os opióides parecem proteger o miocárdio contra a lesão de isquemia e reperfusão (Zaugg et al., 2003). Estudos anteriores indicam que o halotano, enflurano, isoflurano e sevoflurano melhoram a função de corações isolados de ratos e coelhos submetidos a isquemia e reperfusão (Cope et al., 1997 ; Freedman et al., 1985; Novalija et al., 1999). O sevoflurano reduz o tamanho da área de infarto do miocárdio pela ativação dos canais de  $K_{ATP}$  dependentes e diminui o tempo necessário para induzir o pré-condicionamento farmacológico independente dos efeitos hemodinâmicos *in vivo* (Toller et al., 1999). Foi demonstrado também que o sevoflurano melhora a função cardíaca pós-isquêmica pela redução da entrada de cálcio mioplasmático quando administrado antes e após a isquemia, porém a proteção é maior quando administrado antes do período de isquemia (Varadarajan et al., 2002). Hu e colaboradores em 2004 trabalhando em corações isolados de ratos demonstraram que o isoflurano e o sevoflurano preconditionaram o coração contra a disfunção contrátil induzida por neutrófilos. Esta ação foi associada com a inibição da aderência dos neutrófilos e provavelmente ocorreu em função do aumento da resistência

do miocárdio ao estresse oxidativo. Estudos clínicos demonstraram que o sevoflurano (De Hert et al., 2002) preservou a função ventricular esquerda após cirurgia de revascularização com menor evidência de dano ao miocárdio nas primeiras 36hs de pós-operatório. Em 2003 o mesmo autor comparou os efeitos do propofol, desflurano e sevoflurano na recuperação da função miocárdica após cirurgia de revascularização em pacientes idosos e concluiu que os halogenados e não o propofol preservaram a função ventricular. Desta forma, em estudo clínico publicado em 2004, De Hert e colaboradores verificaram que a escolha do regime anestésico pode resultar em menor tempo de internação em unidade de terapia intensiva e por conseguinte de permanência hospitalar.

Por outro lado a proteção contra a lesão de isquemia e reperfusão pelos agonistas de receptores opióides tem sido estudada nos últimos anos. Em 1996 Schultz e colaboradores demonstraram que a morfina mimetiza o efeito cardioprotetor do pré-condicionamento isquêmico provavelmente pela ativação dos canais de  $K_{ATP}$  dependentes *in vivo*. O fentanil protege o miocárdio via receptores opióides e de adenosina pela cascata que leva a ativação dos canais de  $K_{ATP}$  dependentes (Kato et al., 2000). Pensa-se que a ativação seletiva dos agonistas opióides  $\delta_1$  exerça cardioproteção via interação com a G-proteína da membrana e ativação da PKC e possivelmente com outras quinases (Benedict et al, 1999) e finalmente com os canais de  $K_{ATP}$  dependentes (Fryer et al.,1999). Embora o receptor opióide  $\delta$  seja o subtipo mais proeminente na cardioproteção, o papel dos receptores  $\kappa$  não pode ser desconsiderado, particularmente na proteção

contra a fibrilação ventricular (Wang et al., 2001). Corroborando com estes achados constatou-se que o fentanil foi capaz de reduzir a incidência de arritmias ventriculares resultantes da isquemia do miocárdio em coelhos independente das ações hemodinâmicas sistêmicas (Lessa et al., 2004).

O propofol também tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Em 1992, Murphy e colaboradores concluíram que as propriedades “varredoras” de radicais livres do 2,6-diisopropilfenol (propofol) se assemelhavam às ações antioxidantes endógenas do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) além de possuir estrutura química similar a esta vitamina (Kahraman & Demiryurek.,1997). O propofol retardou o início e a magnitude da contratatura produzida pela isquemia antes da reperfusão e promoveu completa recuperação da pressão no ventrículo esquerdo durante a reperfusão (Mathur et al.,1999). Também em corações isolados de ratos ficou comprovado que este anestésico atenuou a disfunção mecânica, a peroxidação lipídica e a desordem metabólica durante a reperfusão (Kokita et al.,1998), além de alterações histológicas (Ko et al.,1997). Ocorreu atenuação das concentrações de cálcio e com isso diminuição da contração miocárdica em corações isolados de cobaias, possivelmente mediada pela diminuição do cálcio do retículo sarcoplasmático e do sarcolema (Nakae et al.,2000) e supressão da atividade de neutrófilos (Galley et al.,1998). Javadov e colaboradores em 2000 sugeriram que a proteção conferida pelo propofol contra isquemia global normotérmica e sobre cardioplegia a frio ocorreu devido a menor abertura dos poros de permeabilidade transitória da mitocôndria provavelmente como resultado da diminuição do estresse

oxidativo. Essas características sugerem que o propofol age diretamente na fase de reperfusão reduzindo os radicais livres, o influxo de cálcio e a atividade neutrofílica, porém não age como indutor de pré-condicionamento (Kato & Foëx., 2002).

Com o aumento da expectativa de vida da população, o número de pacientes com doença coronariana submetidos à cirurgia cardíaca e não cardíaca tende a aumentar. Sabe-se que estes pacientes, com idade superior a 70 anos, aproximadamente 1/3 são potenciais portadores de cardiopatia isquêmica aumentando assim a incidência de complicações peri-operatórias. Estes pacientes submetidos a cirurgias de grande porte, em especial a cirurgia de revascularização do miocárdio, apresentam uma incidência de isquemia do miocárdio em torno de 75% durante a realização da cirurgia (Slogoff & Keats.,1985; Haggmark et al .,1989). A ocorrência destes eventos isquêmicos está diretamente relacionada com o aumento da morbi-mortalidade peri-operatória. Desta maneira a utilização de estratégias protetoras são recomendadas e dependendo do anestésico, poderia haver proteção substancial do miocárdio no período peri-operatório, conceito ainda pouco explorado.

Estudos mais atuais têm demonstrado que a associação de opióides e halogenados apresentam sinergia no efeito cardioprotetor provavelmente pela potencialização da abertura dos canais de  $K_{ATP}$  dependentes conferindo uma maior proteção do que quando administrados isoladamente (Patel et al., 2002; Ludwig et al.,2003).

### 3. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos, em modelo experimental *in vivo* de lesão de isquemia e reperfusão do miocárdio:

1. Examinar a potencialização de cardioproteção entre sevoflurano, sufentanil e propofol por meio de análise do tamanho da área sob risco de infarto e área de infarto ; inibição da apoptose por meio de técnica de fluorescência e expressão dos genes antiapoptótico (Bcl 2) e pró-apoptótico (Bax).
2. Verificar as alterações hemodinâmicas durante a lesão de isquemia e reperfusão: frequência cardíaca; pressão arterial sistólica; pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; taxas máximas de aumento e queda da pressão do ventrículo esquerdo e trabalho cardíaco.

## **4. MATERIAL E MÉTODO**

Este projeto de pesquisa foi submetido a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq-HCFMUSP).

Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes do National Institute of Health (Guide for care and use of laboratory animals, 1985) que versa sobre o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório.

Os experimentos foram realizados no Laboratório da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **4.1. ANIMAIS**

Foram utilizados 142 ratos machos, linhagem Wistar, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso aproximado de 250 a 350g. Após óbitos, o número de animais analisados foi reduzido para 88. A utilização dos animais está discriminada abaixo (item 4.2). Os animais foram mantidos no biotério da Divisão de Experimentação na fase pré-experimental, com livre acesso a ração e água, em ambiente controlado para temperatura, umidade e exposição à luz artificial, com ciclos claros e escuros de 12 horas.

## 4.2. DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram divididos em 5 grupos aleatoriamente. Nos grupos do pré-condicionamento, metade de cada grupo foi submetida a eutanásia ao final do experimento (agudo) e a outra metade após 21 dias (crônico).

**Grupo Controle (CTL) agudo (n=8) e crônico (n=7):** animais sem pré-tratamento foram anestesiados com pentobarbital, procedendo-se a isquemia miocárdica por ligadura da artéria coronária descendente esquerda com posterior reperfusão. Nos agudos, eutanásia ao final do protocolo e coleta do tecido cardíaco. Nos crônicos, eutanásia no vigésimo primeiro dia e coleta do tecido cardíaco.

<b>CTL</b>	basal	(30 min)	oclusão (60min)	reperfusão (120 min)
------------	-------	----------	-----------------	----------------------

**Grupo Sevoflurano (SEV) agudo (n=10) e crônico (n=9):** Nos animais anestesiados com pentobarbital procedeu-se o pré-condicionamento com sevoflurano inalado na concentração de 2,2% durante 30 minutos, ligadura da artéria coronária descendente esquerda com posterior reperfusão. Nos agudos, eutanásia ao final do protocolo e coleta do tecido cardíaco. Nos crônicos, eutanásia no vigésimo primeiro dia e coleta do tecido cardíaco.

<b>SEV</b>	basal	sevoflurano(30 min)	oclusão (60min)	reperfusão (120 min)
------------	-------	---------------------	-----------------	----------------------

**Grupo Sufentanil (SUF) agudo (n=10) e crônico (n=8):** animais foram anestesiados com pentobarbital e pré-tratados com sufentanil 2µg/kg IV em *bolus* 30 minutos antes da isquemia miocárdica por ligadura da artéria coronária descendente esquerda e posterior reperfusão. Nos agudos, eutanásia ao final do protocolo e coleta do tecido cardíaco. Nos crônicos, eutanásia no vigésimo primeiro dia e coleta do tecido cardíaco.

<b>SUF</b>	basal	sufentanil(30 min)	oclusão (60min)	reperfusão (120 min)
------------	-------	--------------------	-----------------	----------------------

**Grupo Propofol (PRO) agudo (n=10) e crônico (n=8):** animais anestesiados com pentobarbital foram submetidos à isquemia miocárdica por ligadura da artéria coronária descendente esquerda e tratados com propofol 600µg/kg/min IV durante a reperfusão. Nos agudos, eutanásia ao final do protocolo e coleta do tecido cardíaco. Nos crônicos, eutanásia no vigésimo primeiro dia e coleta do tecido cardíaco.

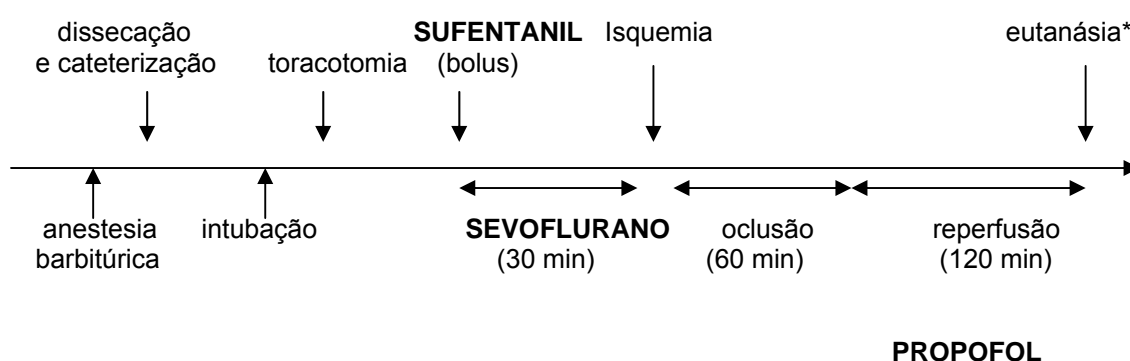
<b>PRO</b>	basal	(30min)	oclusão(60min)	propofol na reperfusão(120 min)
------------	-------	---------	----------------	---------------------------------



**Grupo Sevoflurano, Sufentanil e Propofol (CPT) agudo (n=10) e crônico (n=8):** animais foram anestesiados com pentobarbital e pré-tratados com sevoflurano e sufentanil antes da isquemia e com propofol 600µg/kg/min IV durante a reperfusão. Sevoflurano 2,2% durante 30 minutos e descontinuada a administração 15 minutos antes da isquemia; sufentanil 2µg/kg IV em *bolus* 30 minutos antes da isquemia. Nos agudos, eutanásia ao final do protocolo e coleta do tecido cardíaco. Nos crônicos, eutanásia no vigésimo primeiro dia e coleta do tecido cardíaco.

<b>CPT</b>	basal	sufentanil+sevoflurano(30min)	oclusão(60min)	propofol na reperfusão(120 min)
------------	-------	-------------------------------	----------------	---------------------------------

#### 4.3. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL



Obs: \* eutanásia ao final do protocolo nos agudos e eutanásia no vigésimo primeiro dia nos crônicos.

#### **4.4. ANESTESIA E PREPARAÇÃO CIRÚRGICA**

Os animais foram submetidos à anestesia geral com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg de peso vivo via intraperitoneal. O grau de anestesia foi verificado pela ausência de reflexos podais e palpebrais.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região do pescoço, hemitórax esquerdo e face medial do fêmur esquerdo. A seguir foram posicionados em decúbito dorsal e recobertos com campos cirúrgicos estéreis, expondo-se apenas a região da artéria carótida direita, veia e artéria femorais esquerdas para realização de dissecações e cateterização após antissepsia local com iodopovidine, para monitoração de variáveis hemodinâmicas e administração de fármacos. A seguir intubação orotraqueal e estabelecimento de ventilação mecânica controlada (Rodent Ventilator model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA), com fração inspirada de oxigênio de 0,21 (ar ambiente), frequência respiratória de 60 a 65 movimentos por minuto e volume corrente de 10ml/kg de peso vivo. A temperatura corporal foi mantida a 37°C pelo uso de colchão térmico e aferida por termômetro retal.

O cateterismo ventricular esquerdo foi realizado dissecando-se a artéria carótida comum direita separando-a cuidadosamente do nervo vago. A porção cranial foi ligada com fio cirúrgico e após uma pequena incisão na parede da artéria foi realizado o cateterismo do ventrículo esquerdo (VE) utilizando-se catéter de polietileno conectado a um transdutor de pressão (TSD104A Blood pressure transducer, Biopac Systems Inc, Goleta, CA, USA)

acoplado a um amplificador e registrado digitalmente (AcqKnowledge, Biopac Systems Inc, Goleta, CA, USA ) . A sonda inserida no VE permite a monitorização da pressão dentro desta cavidade e a partir destes valores aferir a pressão diastólica final calculando-se as velocidades máximas de aumento e queda da pressão no ventrículo esquerdo, DPDT+ e DPDT- respectivamente. Os valores de DPDT+ e DPDT- foram utilizados como índices para avaliar as variações de contratilidade e relaxamento de VE respectivamente.

A administração de pentobarbital sódico em infusão contínua (20 mg/kg/hora) para manutenção da anestesia foi feita por cateter inserido na veia jugular. A artéria femoral foi cateterizada para aquisição dos sinais da pressão arterial sistólica (PAS). Os registros hemodinâmicos foram digitalizados e gravados para posterior análise. Foram aferidas a frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistêmica sistólica (PAS), pressão diastólica final do VE (PDFVE), taxas máximas de aumento (DPDT+) e queda (DPDT-) da pressão do VE. O consumo de oxigênio pelo miocárdio foi avaliado por um índice clássico obtido pela multiplicação da FC pela PAS e expresso em mmHg/batimentos/minuto – duplo produto (DP).

#### **4.4.1 ANALGESIA DOS GRUPOS CRÔNICOS**

Para os grupos crônicos o protocolo seguido foi o mesmo, contudo ao final do período de reperfusão os animais receberam tratamento com penicilina benzatina (Benzetacil, Fontoura-Wyeth, 40.000UI/Kg) em dose única e meperidina (Dolosal inj. 50mg, Cristália, 10mg/kg/6hs SC) durante 3

dias e cetoprofeno (Ketofen inj.1%, Merial, 5mg/kg/24hs SC) durante 7 dias e foram mantidos no Biotério da Divisão de Experimentação até o vigésimo primeiro dia quando foram sacrificados para coleta do tecido cardíaco para determinação do tamanho da área de infarto, do número de células apoptóticas e expressão de genes anti e pró-apoptóticos.

#### **4.4.2 EUTANÁSIA**

Foi realizada por meio de aplicação intravenosa de pentobarbital sódico na dose de 90mg/kg.

#### **4.5. PREPARO DO TECIDO**

Ao término do período de reperfusão nos grupos denominados agudos, as amostras foram coletadas do terço apical do VE para identificação da apoptose. As amostras foram colocadas em tubos para isolamento do DNA e orientados em moldes apropriados para corte e fixação em temperatura ótima, congelados em nitrogênio líquido a -196°C para detecção de células apoptóticas pelo método TUNEL (terminal transferase UTP nick end labeling - *In situ* cell death detection kit, fluorescein Roche Applied Science/ Germany ) e expressão de genes da família Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins), cujas proteínas desempenham um papel fundamental na resposta celular a uma larga variedade de sinais apoptóticos. Foram obtidas criosecções (7µm) por meio de criostato Hacker-Bright e mantidos a -70°C para uso posterior. Após a colheita das amostras

para detecção da apoptose a oclusão coronariana foi rapidamente refeita para preparo da determinação da área de infarto.

Nos grupos crônicos as amostras de VE foram coletadas no vigésimo primeiro dia. Para estes grupos foi realizada a confecção de lâminas com a coloração do tricrômio de Masson, que permite a identificação das fibras colágenas a fim de quantificar a porcentagem de fibrose do tecido cardíaco.

#### **4.6. ISQUEMIA REGIONAL DO MIOCÁRDIO (IRM)**

Para a ligadura da artéria coronária esquerda procedeu-se a toracotomia no quinto espaço intercostal, permitindo a visualização do saco pericárdico. Este foi cuidadosamente dissecado para possibilitar a visualização dos vasos no epicárdio. Em seguida foi realizada a ligadura da artéria coronária esquerda com fio cirúrgico (mononylon 6-0). Com o auxílio de uma cânula de polietileno foi criado um dispositivo que serviu para induzir isquemia ao se comprimir a cânula contra o miocárdio correndo-se um nó. Ao se comprimir a cânula contra o miocárdio foi observada área de isquemia pelo empalidecimento da região logo abaixo do nó. Ao se soltar o nó desprendendo a cânula, seguiu-se a reperfusão do miocárdio. Esse procedimento gerou uma área de infarto central (AI) e uma área sob risco de infarto (AR).

#### **4.7. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DE ISQUEMIA E DE INFARTO**

Ao término do período de reperfusão nos grupos agudos, imediatamente após a colheita das amostras para detecção da apoptose, a oclusão coronariana foi refeita e iniciada infusão de 3 ml de solução de azul de Evans 1% durante 5 minutos pela veia jugular. Esse procedimento possibilitou a identificação da área normal (corada de azul) da área isquêmica (não corada). Foram realizados então cortes transversais de aproximadamente 2mm na região média do VE e colocados por um período de 20 minutos em solução tamponada (pH 7.4) de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% aquecida a 37°C. Desta forma ocorreu a coloração vermelho escura das áreas viáveis permanecendo pálida a área necrótica. O TTC reage com o NADH<sub>2</sub> e as enzimas desidrogenases presentes nos tecidos viáveis levando ao aparecimento de uma coloração vermelho escura. Por outro lado, durante a reperfusão ocorre a “lavagem” da região isquêmica, o que leva a retirada de NADH<sub>2</sub> e das enzimas desidrogenases das células necróticas, fazendo com que não haja a reação química e a coloração na área infartada permaneça pálida. Após a coloração os cortes foram imersos em solução de formol a 10% durante 30 minutos para permitir maior contraste entre as diferentes regiões. Os cortes foram fotografados individualmente com câmera digital (Sony Cyber-shot, 7.2 mega pixels) e analisados pelo programa Image Tool (Image Tool version 3.0, UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). O tamanho do infarto (AI) e sob risco de infarto (AR)

foram expressos como a percentagem do total do corte do VE (Santos et all, 2008; Spadaro et all, 1980).

Nos grupos crônicos foi realizada somente a coloração com o TTC para determinação da área de infarto, pois a área sob risco de infarto ao término dos 21 dias, já teria evoluído para a via necrótica ou de manutenção dos miócitos pela via cardioprotetora.

#### **4.8. DETECÇÃO DA APOPTOSE PELA COLORAÇÃO TUNEL**

As amostras de tecido do miocárdio congeladas a fresco foram processadas em parafina e cortadas com 6 a 7  $\mu$ m de espessura, fixadas em paraformaldeído 10% em solução salina tamponada por fosfato (PBS) por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram desparafinadas em 3 banhos de xilol (15 min cada) a temperatura ambiente, seguidos por passagens em etanol absoluto, 95% e 70%. A seguir foram lavadas em água ultrapura e mergulhadas em PBS. A permeabilização celular foi realizada com Proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) - concentração final de 20 $\mu$ g/ml) em Tris/ HCl 10mM pH 7.4 a 37°C em banho maria, por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS e o reagente de TUNEL (*In situ* cell death detection kit, fluorescein Roche Applied Science/ Germany) foi adicionado ao corte conforme instruções do fabricante. Este reagente permite a detecção da fragmentação do DNA através da marcação das porções terminais dos ácidos nucléicos. No controle negativo somente o Reagente B foi adicionado. A incubação em câmara úmida foi realizada a

40°C por 90 minutos. Após esse período as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos sob agitação constante e após a secagem foram montadas em prolong antifade (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss, onde as células apoptóticas marcadas foram quantificadas em toda sua extensão em campos alternados ( um sim e dois não) no aumento de 40 vezes. A área de fibrose foi analisada em toda extensão das lâminas, no aumento de 20 vezes, coradas pelo tricrômio de Masson nos grupos crônicos através do sistema computadorizado de análise de imagens Quantimet 500 (Leica Cambridge Ltda) acoplado com uma lupa (Zeiss).

#### **4.9. EXPRESSÃO DE Bcl-2 e Bax PELA TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)**

O RNA total foi preparado a partir de tecidos frescos congelados em nitrogênio líquido. A extração e preparação do RNA total compreendeu-se de cinco fases:

1) Foram pesadas 100 mg de tecido ainda congelado e colocadas em tubo para centrifugação. Posteriormente os tecidos foram homogeneizados com 1 ml de TRIzol (Gibco/BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA) por aproximadamente 30 segundos.

2) Após a homogeneização as amostras foram separadas em tubos tipo *ependorfs* e adicionados 200 µl de clorofórmio para que ocorresse a separação das fases. Feito isso, as amostras foram centrifugadas a 10.000



rpm por 15 minutos a 4 ° C. A fase aquosa que contém o RNA total foi retirada e transferida para um novo tubo tipo *ependorf* previamente identificado.

3) A precipitação do material foi realizada pela adição de 500 µl de isopropanol e depois os tubos foram invertidos e seguiram para mais uma centrifugação a 10.000 rpm por aproximadamente 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, permanecendo apenas o precipitado de RNA total.

4) O precipitado, após secagem completa do isopropanol, foi lavado com 1 ml de etanol 75% gelado em água isenta de RNAses. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 ° C e o sobrenadante foi novamente desprezado.

5) Depois de seco, o precipitado de RNA foi novamente suspenso em 300 µl de água livre de RNAses, sendo sua concentração determinada a partir da medida de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro nanodrop (ND-1000 spectrophotometer- NanoDrop Technologies, Inc.). As soluções de RNA foram armazenadas em alíquotas a –80°C até o uso.

A integridade das amostras foi verificada através da reação de eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo como revelador. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 20 minutos. Após o término da corrida, a visualização das bandas foi feita por meio de um sistema de luz ultravioleta (UV) acoplado a uma câmara digital (Eagle Eye, Stratagene).

Após a extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado realizando-se as seguintes etapas:

1) A concentração designada para cada amostra foi de 2 µg de RNA total / µl, assim calculou-se o volume ideal de RNA a ser pipetado para cada amostra. Feito isso, adicionou-se 1,0 ul de Oligo dT (concentração final de 0,025nM) e 1,0 ul de mM dNTP (concentração final de 0,5nM) em cada uma das amostras e completando o volume para 13 µl com água isenta de RNases. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 °C. Posteriormente foram diretamente para o gelo e a *mix* foi preparada.

2) A *mix* consistiu em uma mistura de 4,0 ul de 5X First Strand Buffer (concentração final de 1x), 0,5 ul de RNaseOUT (concentração final de 1U/ul) e 1,0 ul de SII transcript (concentração final de 10U/ul) para cada amostra. A *mix* foi adicionada as amostras e incubadas a 50°C por 60 minutos, seguidas de um aquecimento a 70°C por 15 minutos. Ao final da reação obteve-se um estoque de cDNA na concentração de 100 ng/µl. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

A expressão dos genes Bax, Bcl-2 e beta actina foi avaliada por PCR em tempo real (Higuchi, et al., 1992), com o equipamento ABI Prism 7500 Fast System (Applied Biosystem, Foster City, CA).utilizando o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA), que contém SYBR Green I como corante fluorescente. A avaliação foi realizada por  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), utilizando o gene beta actina como controle interno (normalizador) testado como gene de referência entre mais três pelo programa de normalização de expressão gênica por

PCR em tempo real (GeNorm). As sequências, temperaturas de anelamento e os comprimentos dos fragmentos do PCR são apresentados na Tabela 01 a seguir:

**Tabela 01** – Sequências de *primers*, temperaturas de anelamento e comprimentos dos fragmentos dos genes estudados.

<b>Primer (base)</b>	<b>Sequência</b>	<b>Condições de Amplificação</b>
<b>Bcl-2 (525)</b>	5'-TATGATAACCGGGAGATCGTGATC-3'	Desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 60°C por 30s e síntese a 72°C por 1 min por 33 ciclos
	5'-GTGCAGATGCCGGTTCAGGTAICTC-3'	
<b>Bax (310)</b>	5'-GACACCTGAGTGACCTTGG-3'	Desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 60° por 30s e síntese a 72°C por 1 min por 30 ciclos
	5'-GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC-3'	
<b>β-actina (660)</b>	5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3'	Modificados de acordo com os diferentes genes alvo
	5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'	

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados hemodinâmicos foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para determinação das diferenças significativas, com  $P < 0,05$ . Para a comparação dos dados das áreas de infarto dos grupos crônicos e agudos utilizou-se ANOVA seguida do teste de Fisher com  $P < 0,05$ . Os dados da área de infarto e área de risco de infarto dos grupos agudos foram analisados utilizando-se o teste  $t$  de Student em relação ao grupo CTL. Para o RT-PCR foi utilizado o teste  $t$  de Student para comparação dos grupos em relação ao CTL. Os dados da coloração TUNEL e do tricrômio de Masson foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para determinação das diferenças significativas, com  $P < 0,05$  e posteriormente foi utilizado o teste  $t$  de Student para comparação dos grupos em relação aos controles agudos e crônico.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. HEMODINÂMICA**

As médias e os desvios padrões dos parâmetros hemodinâmicos estão demonstrados na tabela 02.

**Tabela 02:** Parâmetros hemodinâmicos.

	BAS	PC	IAMI	IAMF	REPI	REPF
PAS	135,33±9,31	135,33±9,31	97,56±19,98*	116,28±19,10	106,56±20,73*	104,43±20,66*
PDFVE	6,97±0,82	6,97±0,82	10,72±4,95	10,22 ±2,25	9,91±2,01	10,27±3,21
<b>CTL</b> DPDT+	6313±1060	6313±1060	3894±1775†	5016±1166	4710±1441*	4764±1314*
n=15 DPDT-	-5112±1072	-5112±1072	-2928±1485*	-3600±3262	-3237±1136*	-3481±1069*
FC	394±47	394±47	381±62	385±45	374±45	332±56
DP	53642±9233	53642±9233	37846±12374*	44764±8912	39965±9623*	35257±10447*
PAS	136,80±9,26	107,84±14,94*	118,01±14,91	126,95±11,95	120,10±12,74	122,52±14,66
PDFVE	6,88±1,31	6,62±0,98	14,38 ±4,19*	12,5±2,99*†	11,57±2,61	12,67±4,05*†
<b>SEV</b> DPDT+	5687±1724	4289±816	5473±1272	5966±1260†	5051±998	4895±1021
n=19 DPDT-	-4677±959	-3475±495	-3603±850	-4102±960	-3555±883	-3617±833
FC	371±36	309±20*	361±27	349±34	350±36	327±40
DP	50779±5905	33408±5209*	42801±7159,54	44639±7599	42464±8628	40500±9242
PAS	135,59±8,07	119,47±13,67	103,23±24,42*	120,42±21,84	109,41±25,43	99,17±25,31*
PDFVE	6,16±0,70	6,19±0,84	14,92±6,81*	11,98±3,9*	10,25±2,53	11,42±3,54*†
<b>SUF</b> DPDT+	5638±1030	4999±1056	4464±1718	4880±1609	4327±1690	3680±1121*
n=18 DPDT-	-4606±1020	-3697±890	-3062±1151	-3458±1150	-3172±1182	-2663±879*
FC	345±24	329±32	350±35	350±57	352±55	320±45
DP	46892±4710	39489±7136	36275±9445	42474±11375	38731±10718	32108±10193*
PAS	139,49±14,10	139,49±14,10	109,2±5,85*	122,47±12,31	110,10±16,03	120,60±8,28
PDFVE	5,98±0,59	5,98±0,59	15,32±6,05*	12,28±5,28*†	10,70±3,92	11,57±4,97*†
<b>PRO</b> DPDT+	6196±1311	6196±1311	4401±829†	4992±1020	4612±1036	4751±501
n=18 DPDT-	-5107±1369	-5107±1369	-3095±481*	-3749±751	-3290±764*	-3296±498*
FC	359±65	359±65	374±44,02	350±46	342±51	336±41
DP	50827±13303	50827±13303	40902±5570	43128±7914	37836±8541	40616±6002
PAS	141,57±10,71	86,06±17,06*	120,44±21,27†	129,93±21,2†	109,26±20,20	113,69±22,29
PDFVE	6,13±0,71	6,11±0,68	14,26±5,07*	11,46±2,40*†	11,68±4,00	13,73±4,68*†
<b>CPT</b> DPDT+	6975±1358	3327±751*	4784±1852*	5248±1787*†	4408±1197*	4297±1304*
n=18 DPDT-	-5223±1255	-2451±721*	-3283±1260*	-3841±1499	-3166±1137*	-2968±1014*
FC	359±36	264±31*	329±51†	337±55†	321±50†	322±55†
DP	50889±7094	23098±7255*	40318±11480†	44742±13512†	36008±12061*†	37443±12433*†

Valores representativos da média e ± desvios padrões; ANOVA de duas vias, \* P<0,05 vs BAS no mesmo grupo, † P<0,05 vs PC no mesmo grupo. PAS= pressão arterial sistólica (mmHg); FC= frequência cardíaca (bpm); DPDT+= taxa máxima de aumento da pressão no ventrículo esquerdo (mmHg/seg); DPDT- = taxa máxima de queda da pressão no ventrículo esquerdo; DP= duplo produto (mmHg/bpm) e PDFVE= pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (mmHg); BAS=basal; PC= pré-condicionamento; IAMI= 5 minutos iniciais da isquemia; IAMF= 5 minutos finais da isquemia; REPI= 5 minutos iniciais da reperfusão; REPF= 5 minutos finais da reperfusão.

As análises foram feitas comparando-se os períodos do protocolo experimental. As tendências das médias da PAS estão demonstradas na figura 01.

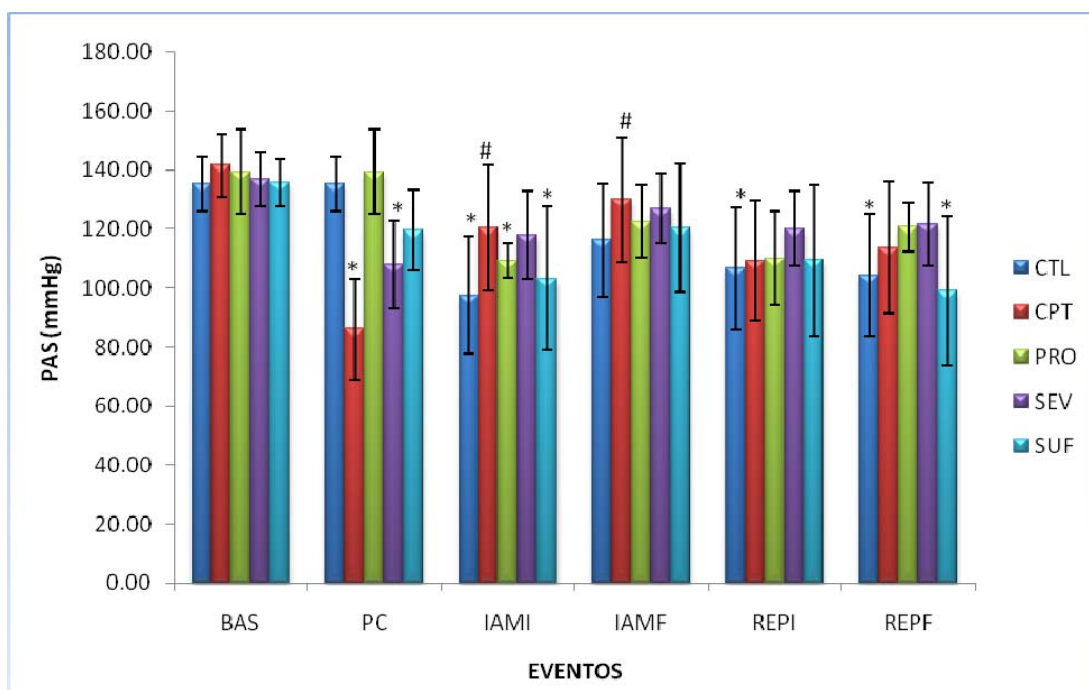
A PAS no período basal (BAS) não variou estatisticamente entre os grupos de estudo. Durante o pré-condicionamento (PC) com sevoflurano o grupo SEV apresentou redução da PAS estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao BAS (- 25,94%). O grupo sufentanil não apresentou alterações neste período em relação aos demais grupos. O PC com sevoflurano e sufentanil (grupo CPT) determinou redução significativa na PAS (- 64,5%).

Durante o início do período de isquemia (IAMI), dentro dos grupos CPT e SEV houve aumento da PAS em relação ao período PC, contudo somente o CPT foi estatisticamente significativo (+ 28,54%). Os outros grupos mantiveram a tendência de queda da PAS no IAMI. Dentro dos grupos CTL e PRO houve redução da PAS em relação ao BAS de 38,72% e 21,71% respectivamente. No grupo SUF a redução da PAS não foi significativa no PC, contudo em relação ao BAS foi de 23,83%.

Ao final do período isquêmico (IAMF) todos os grupos apresentaram aumento da PAS em relação ao IAMI. No grupo CPT houve aumento significativo em relação ao período IAMI do grupo CTL (+ 33,17%). Dentro do grupo CPT houve aumento de 50,03% em relação ao período PC. No início da reperfusão (REPI) todos os grupos apresentaram redução da PAS em relação ao período IAMF, porém nenhum apresentou redução significativa.

Ao final da reperfusão os grupos SEV e CTL se mantiveram estáveis, os grupos PRO e CPT apresentaram discreto aumento e o grupo SUF diminuição da PAS, mas sem significância estatística em relação ao período REPI.

**Figura 01:** Pressão arterial sistólica em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão.



Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões; ANOVA de duas vias \*  $P < 0,05$  vs. BAS no mesmo grupo, #  $P < 0,05$  vs. PC no mesmo grupo. CTL= grupo controle (n=15); SEV= grupo sevoflurano (n=19); SUF= grupo sufentanil (n=18); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=18); PRO= grupo propofol (n=18); PAS = pressão arterial sistólica (mmHg).

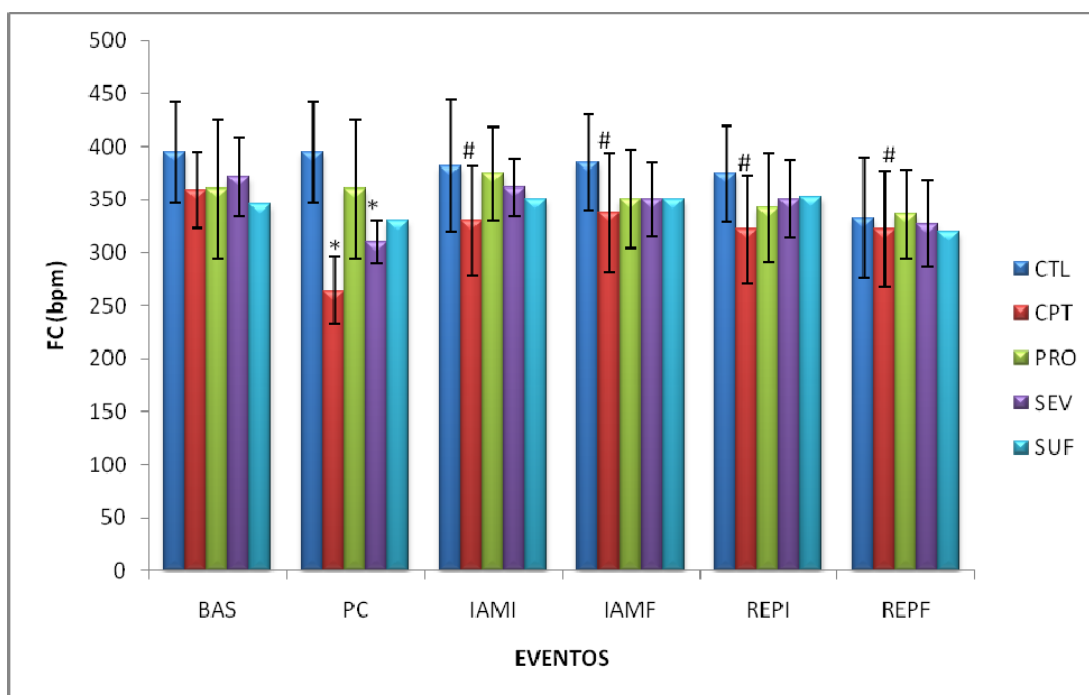
As tendências das médias da FC estão demonstradas na figura 02.

No período BAS não houve alterações em relação aos grupos de estudo. No período PC os grupos CPT e SEV apresentaram redução significativa da FC em relação ao BAS dentro de seus grupos de 26,34% e 15,68% respectivamente.

No período IAMI a FC aumentou nos grupos CPT, SEV, SUF e PRO, porém com significância somente no grupo CPT (+ 24,68%). Ao final do período de isquemia, os grupos CTL, CPT, SUF apresentaram leve aumento da FC sem significância. Já os grupos SEV e PRO apresentaram redução neste parâmetro também sem significância estatística.

Nos períodos inicial e final da reperfusão (REPI e REPF), os grupos apresentaram redução da FC exceto no CPT, que permaneceu estável, contudo neste grupo a FC não retornou aos valores do BAS, mas se recuperaram em relação ao PC.

**Figura 02:** Média da frequência cardíaca em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento , IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão.

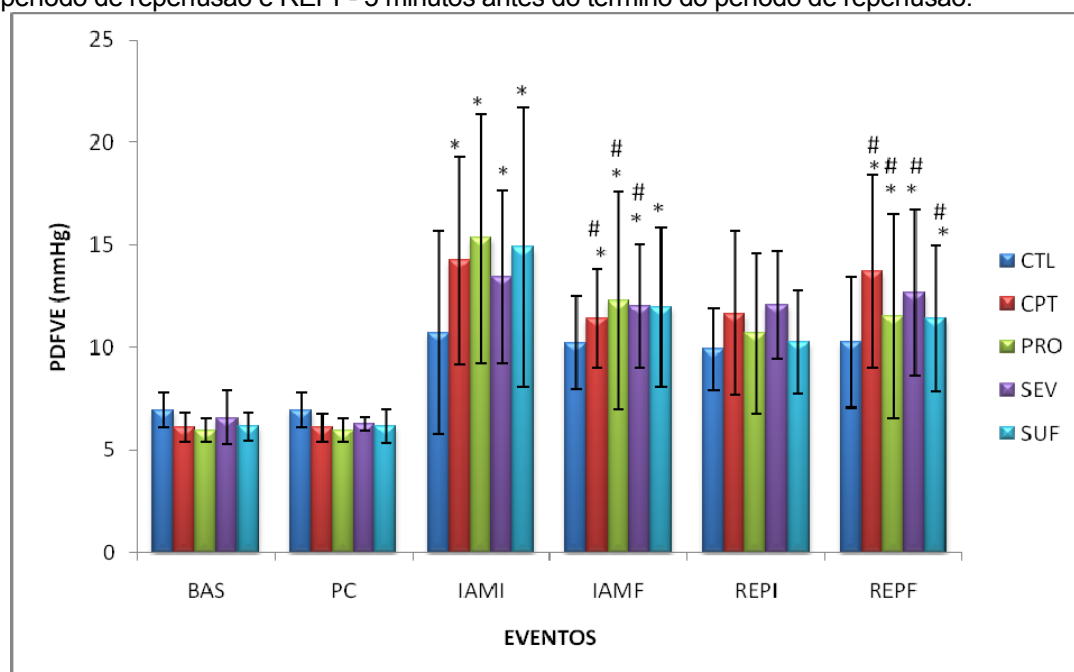


Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões; ANOVA de duas vias \*  $P < 0,05$  vs. BAS no mesmo grupo, #  $P < 0,05$  vs. PC no mesmo grupo. CTL= grupo controle (n=15); SEV= grupo sevoflurano (n=19); SUF= grupo sufentanil (n=18); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=18); PRO= grupo propofol (n=18); FC = frequência cardíaca (bpm).



As tendências das médias da PDFVE estão demonstradas na figura 03. Durante os períodos BAS e PC não houve alterações entre os grupos. Todos os grupos apresentaram aumento da PDFVE no período IAMI em relação ao PC. O grupo PRO apresentou aumento de 156,44%, o grupo SUF aumento de 142,65%, O CPT de 133,77% e o SEV de 123,52%. Ao final da isquemia (IAMF) houve redução da PDFVE em todos os grupos. Esta redução não foi significativa em relação ao IAMI, porém mantiveram aumento significativo em relação a seus respectivos períodos BAS e PC – PRO (105,69%), SUF (93,37%), SEV (91,1%) e CPT (87,7%). No início da reperfusão não houve diferenças entre os grupos em relação ao final da isquemia. Ao final da reperfusão novamente os grupos tenderam a aumento da PDFVE sem alterações significativas em relação ao período REPI, contudo permaneceram com aumento significativo em relação a seus respectivos períodos BAS e PC a seguir: PRO (93,8%), SUF (84,49%), SEV (92,76%) e CPT (125,08%).

**Figura 03:** Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento, IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI - 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão.

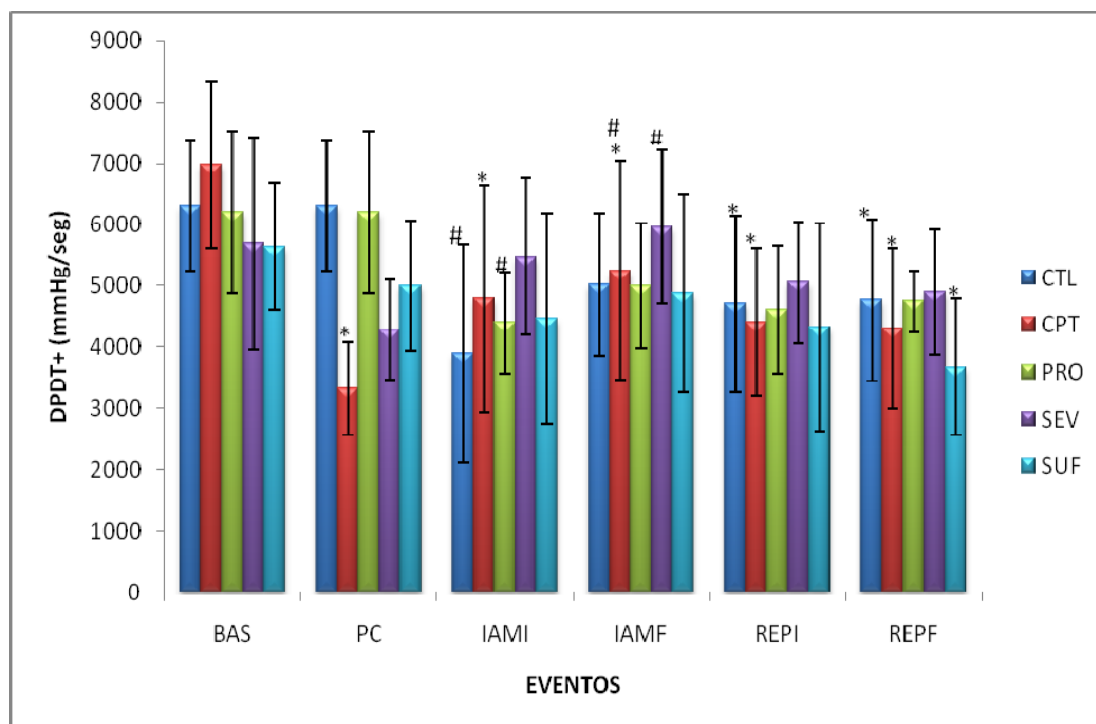


Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões; ANOVA de duas vias \*  $P < 0,05$  vs. BAS no mesmo grupo, #  $P < 0,05$  vs. PC no mesmo grupo. CTL= grupo controle (n=15); SEV= grupo sevoflurano (n=19); SUF= grupo sufentanil (n=18); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=18); PRO= grupo propofol (n=18); PDFVE = pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (mmHg).

As tendências das médias da taxa máxima de aumento da pressão (DPDT+) no ventrículo esquerdo estão demonstradas na figura 04.

Durante o período BAS não houve alterações significativas entre os grupos. No PC com sevoflurano o grupo SEV apresentou diminuição da DPDT+, porém sem significância estatística. O mesmo ocorreu com o PC do grupo SUF. No grupo CPT a redução foi significativa (52,3%). No início da isquemia os grupos PRO e CTL apresentaram reduções significativas em relação ao PC em seus grupos de 28,97% e 38,31% respectivamente. Os grupos CPT e SEV apresentaram tendência de aumento da DPDT+ em relação ao PC, contudo o grupo CPT, apesar do aumento deste parâmetro, permaneceu estatisticamente significativo em relação ao seu período BAS (-31,41%). Ao final do período de isquemia todos os grupos tenderam ao aumento da DPDT+. No grupo CPT houve aumento significativo em relação ao PC de 57,73%, contudo permaneceu com diminuição significativa em relação ao seu período BAS (25,75%). No grupo SEV houve aumento significativo em relação ao seu período de PC (39,94%). No início da reperfusão (REPI) todos os grupos apresentaram discreta redução da DPDT+. No grupo CPT diferença de -36,8% em relação ao BAS. No grupo CTL diferença de -25,39% em relação aos períodos BAS e PC. Ao final da reperfusão (REPF) as médias dos grupos permaneceram estáveis. Nos grupos SUF e CPT houve diferença significativa em relação aos seus períodos BAS (-34,74% e -38,39% respectivamente). O grupo CTL na REPF também apresentou redução significativa em relação aos seus períodos BAS e PC (24,53%). Os grupos PRO e SEV não apresentaram alterações.

**Figura 04:** Taxa máxima de aumento da pressão no ventrículo esquerdo em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento, IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão.

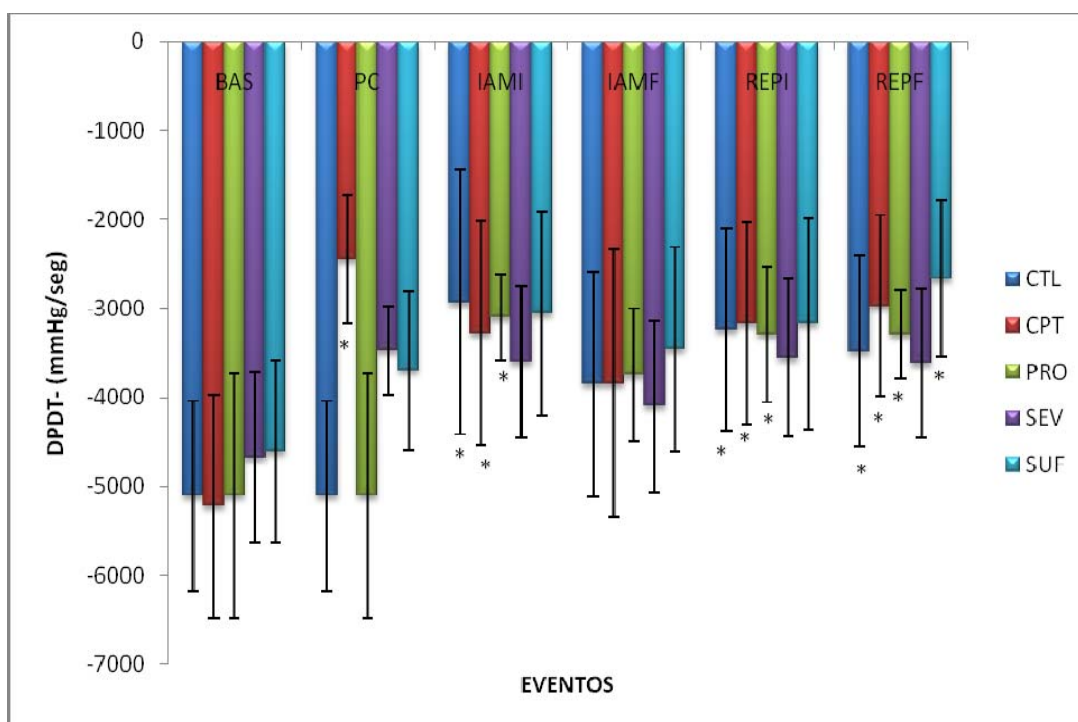


Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões; ANOVA de duas vias \*  $P < 0,05$  vs. BAS no mesmo grupo, #  $P < 0,05$  vs. PC no mesmo grupo. CTL= grupo controle (n=15); SEV= grupo sevoflurano (n=19); SUF= grupo sufentanil (n=18); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=18); PRO= grupo propofol (n=18); DPDT+ = taxa máxima de aumento da pressão no ventrículo esquerdo (mmHg/seg).

As tendências das médias da taxa máxima de queda da pressão (DPDT-) no ventrículo esquerdo estão demonstradas na figura 05. Durante o período BAS não houve alterações significativas entre os grupos. No período PC somente o grupo CPT apresentou aumento significativo (53,03%) em relação ao BAS. Durante a fase inicial da isquemia no grupo CTL houve aumento significativo da DPDT- em relação aos períodos BAS e PC de 42,73%. O grupo PRO seguiu a mesma tendência e apresentou aumento de 60,62% em relação aos períodos BAS e PC. Os grupos SEV e SUF não apresentaram variação significativa neste período. O grupo CPT no IAMI, apesar da diminuição em relação ao PC, manteve aumento significativo em

relação ao período BAS de 37,16%. Na fase final da isquemia todos os grupos apresentaram redução da DPDT-, porém sem significância estatística entre o IAMI. No início da reperfusão (REPI) somente os grupos PRO e CTL apresentaram aumento significativo em relação aos períodos BAS e PC em seus grupos de 35,55% e 36,65% respectivamente. O grupo CPT no REPI foi estatisticamente diferente (+ 39,27%) em relação ao período BAS no seu grupo. Ao final da reperfusão os grupos CPT e SUF mantiveram o aumento em relação ao BAS em seus grupos (43,16% e 42,18% respectivamente). Os grupos CTL e PRO apresentaram aumento significativo em relação aos períodos BAS e PC em seus grupos de 31,9% e 35,46% respectivamente.

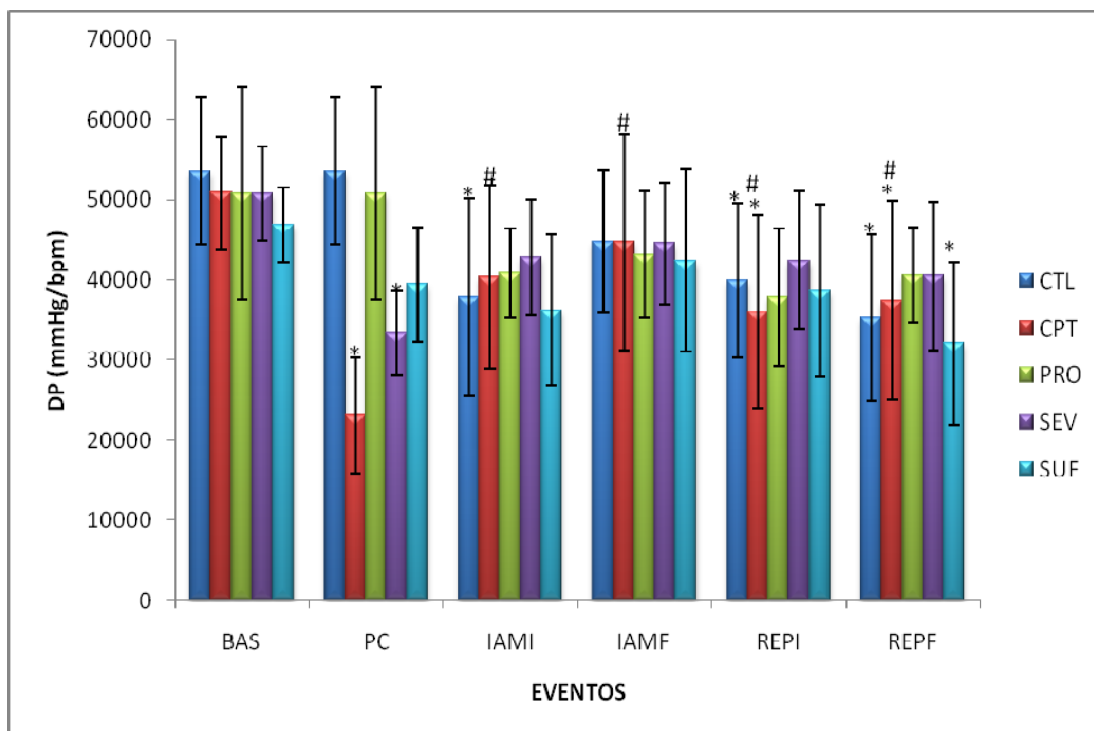
**Figura 05:** Taxa máxima de queda da pressão no ventrículo esquerdo em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento, IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão.



Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões; ANOVA de duas vias \*  $P < 0,05$  vs. BAS no mesmo grupo. CTL= grupo controle (n=15); SEV= grupo sevoflurano (n=19); SUF= grupo sufentanil (n=18); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=18); PRO= grupo propofol (n=18); DPDT- = taxa máxima de queda da pressão no ventrículo esquerdo (mmHg/seg).

As tendências das médias do consumo de oxigênio pelo miocárdio (duplo produto-DP) estão demonstradas na figura 06. Durante o período BAS não houve alterações significativas entre os grupos. No período PC os grupos CPT, SEV apresentaram diminuição do DP.(32,91% e 54,61% respectivamente). Durante o início da isquemia os grupos PRO, CTL e SUF apresentaram queda do DP, contudo somente o grupo CTL foi estatisticamente significativo em relação ao período PC (- 29,44%). Os grupos SEV e CPT melhoraram o DP sendo o CPT significativo em relação ao PC (42,7%). No início da reperfusão (REPI) o grupo CPT foi estatisticamente diferente em relação aos períodos BAS (-29,25%) e PC (+35,85%). No grupo CTL houve diminuição de 25,49% em relação aos períodos BAS e PC. Ao final da reperfusão (REPF) o grupo CPT foi diferente em relação aos períodos BAS (- 26,43%) e PC (- 38,31%). No grupo CTL a mesma tendência foi observada com diminuição do DP em relação aos períodos BAS e PC (34,27%). O grupo SUF no REPF foi diferente em relação ao BAS (- 18,69%).

**Figura 06:** Consumo de oxigênio pelo miocárdio em relação aos tempos de estudo: BAS - basal; PC – pré-condicionamento, IAMI - 5 minutos após o início do período de isquemia; IAMF - 5 minutos antes do término do período de isquemia; REPI- 5 minutos após o início do período de reperfusão e REPF- 5 minutos antes do término do período de reperfusão.



Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões; ANOVA de duas vias \*  $P < 0,05$  vs. BAS no mesmo grupo. CTL= grupo controle (n=15); SEV= grupo sevoflurano (n=19); SUF= grupo sufentanil (n=18); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=18); PRO= grupo propofol (n=18); DP= duplo produto (mmHg/bpm).

## 6.2. TUNEL

As médias e os desvios padrões do número de células apoptóticas e porcentagem de fibrose estão apresentados nas tabelas 03 e 04.

**Tabela 03:** Número total de células apoptóticas em campos alternados de toda extensão da lâmina (aumento de 40 vezes).

Grupos	Agudo (n)	Crônico (n)
CTL	7,78 $\pm$ 3,32 (8)	5,14 $\pm$ 1,77 (7)
SUF	12,25 $\pm$ 5,11 (10)	9,47 $\pm$ 2,67 (8)
SEV	8,40 $\pm$ 2,01 (10)	8,33 $\pm$ 2,78 (8)
CPT	8,70 $\pm$ 3,05 (10)	6,25 $\pm$ 3,61 (8)
PRO	11,10 $\pm$ 3,66 (10)	7,12 $\pm$ 1,64 (8)

Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões do número de células apoptóticas pela coloração TUNEL. ANOVA de uma via ( $P > 0,05$ ). CTL= grupo controle; SEV= grupo sevoflurano; SUF= grupo sufentanil; CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol; PRO= grupo propofol; n= número de animais por grupo.

**Tabela 04:** Percentual total de fibrose nos grupo crônicos em toda extensão da lâmina (aumento de 20 vezes).

Grupos (n)	CTL (7)	SEV (6)	SUF (8)	CPT (7)	PRO (8)
% de área	2,79±2,10	5,85±2,60	6,34±4,01	5,32±2,60	7,68±5,87

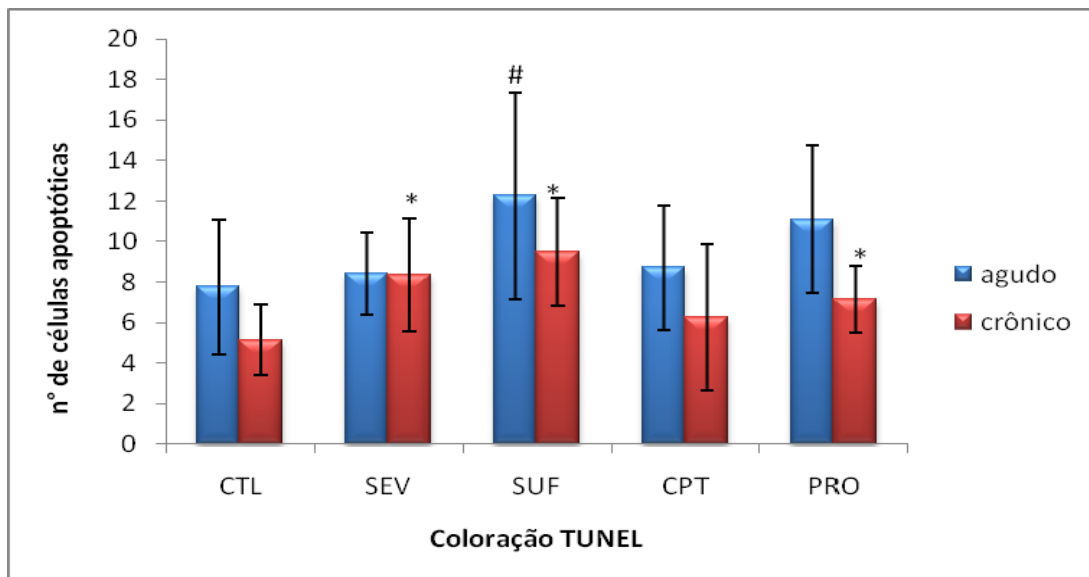
Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões da porcentagem de fibrose pela coloração tricrômio de Masson. ANOVA uma via ( $P > 0,05$ ). CTL= grupo controle; SEV= grupo sevoflurano; SUF= grupo sufentanil; CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol; PRO= grupo propofol; n= número de animais por grupo. A área foi medida pelo sistema computadorizado de análise de imagens (Quantimet 500).

As análises estatísticas dos dados obtidos com a metodologia TUNEL para detecção de células apoptóticas e quantificação da porcentagem de fibrose não foram estatisticamente significantes ( $P > 0,05$ ) utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA). O valor de P foi de 0,0919 para o número total de células apoptóticas. Para a porcentagem de fibrose nos grupos crônicos, pela metodologia do tricrômio de Masson, o valor de P foi de 0,4383.

Foi utilizado o teste *t* Student para analisar as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de estudo em relação aos controles agudos e crônicos (figura 07). O número total de células apoptóticas nos grupos agudos aumentou significativamente somente no grupo sufentanil. Nos grupos crônicos o aumento foi significativo nos grupos sevoflurano, propofol e sufentanil.

O percentual de fibrose também não foi significativo utilizando-se o teste *t* de Student nos grupos crônicos.

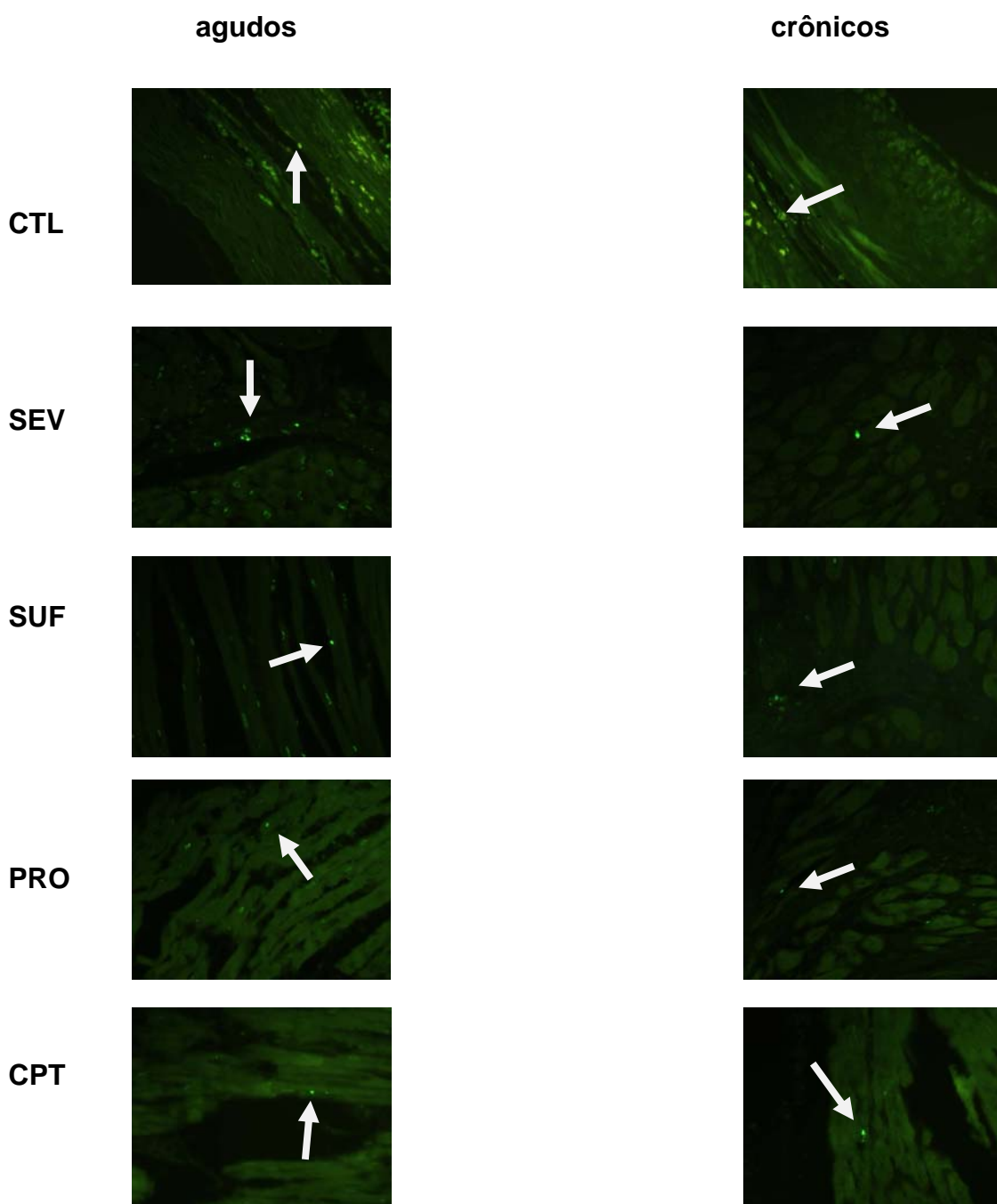
**Figura 07:** Número total de células apoptóticas em campos alternados em toda extensão das lâminas (aumento de 40 vezes).



Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões do número de células apoptóticas pela coloração TUNEL. Teste t \*  $P < 0,05$  vs. CTL nos crônicos; #  $P < 0,05$  vs. CTL nos agudos. CTL= grupo controle (n=8 agudos e n=7 crônicos); SEV= grupo sevoflurano (n=10 agudos e n=8 crônicos); SUF= grupo sufentanil (n=10 agudos e n=8 crônicos); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=10 agudos e n=8 crônicos); PRO= grupo propofol (n=10 agudos e n=8 crônicos).



**Figura 08:** Fotomicrografias de lâminas coradas por TUNEL nos grupos agudos e crônicos (aumento de 40 vezes). As setas indicam os núcleos fluorescentes de miócitos apoptóticos.

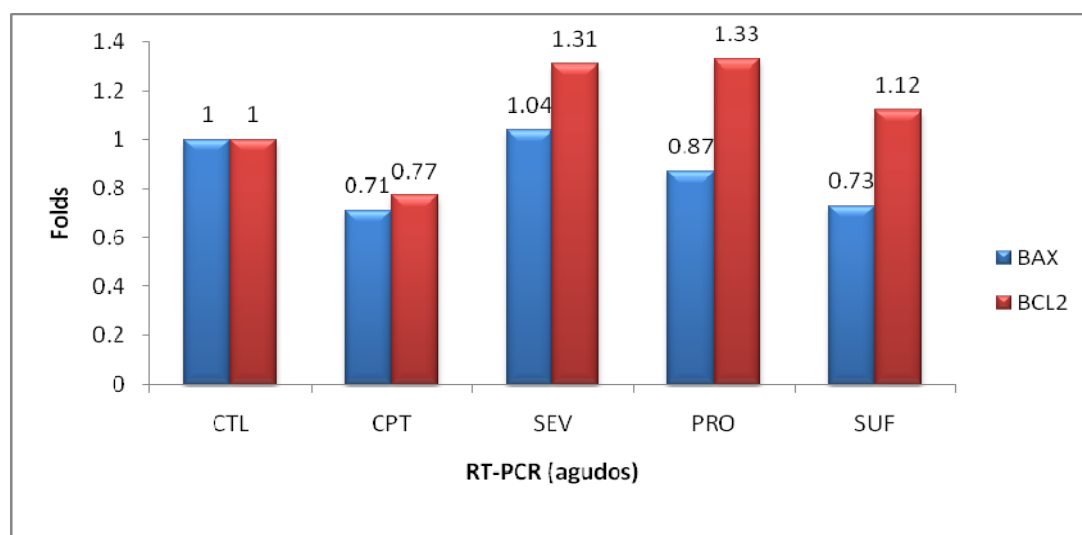


### 6.3. RT-PCR

Os dados obtidos da expressão dos genes antiapoptótico (Bcl-2) e pró-apoptótico (Bax) nos grupos agudos estão demonstrados na figura 08. A expressão de Bcl-2 no grupo CPT apresentou uma diminuição de 23% em relação ao grupo CTL. No grupo SEV ocorreu um aumento de 31% o mesmo ocorrendo com o grupo SUF (12%). O grupo PRO apresentou um aumento de 33% na expressão deste gene. A expressão de Bax no grupo CPT diminuiu 29% em relação ao CTL. Já o grupo SEV apresentou aumento de 4% em relação ao CTL. Os grupos PRO e SUF apresentaram diminuição na expressão deste gene em relação ao CTL de 13% e 27% respectivamente.

Foi realizado o teste *t* para comparação da expressão gênica entre os grupos em relação ao CTL, que foi usado como normalizador. Para o grupo CPT o P foi 0,67 (Bcl-2) e 0,16 (Bax). Para o grupo SEV o P foi 0,61 (Bcl-2) e 0,87 (Bax). No grupo PRO, P= 0,5 (Bcl-2) e 0,55 (Bax) e grupo SUF P= 0,79 (Bcl-2) e 0,2 (Bax). Todos considerados não significativos para o nível de significância de 5%.

**Figura 09:** Expressão dos genes Bax e Bcl-2 nos grupos agudos.



Valores representativos das médias da expressão gênica expressos em folds. Teste *t* para comparação entre os grupos vs CTL ( $P > 0,05$ ). CTL= grupo controle (n=4); SEV= grupo sevoflurano (n=10); SUF= grupo sufentanil (n=10); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=10); PRO= grupo propofol (n=10).

#### 6.4. ÁREA DE INFARTO E SOB RISCO DE INFARTO

As médias e os desvios padrões da área de infarto e sob risco de infarto pela coloração com TTC dos grupos crônicos e agudos estão apresentados na tabela 05.

**Tabela 05:** Áreas de infarto e sob risco de infarto expressos como porcentagem da área do corte do ventrículo esquerdo nos grupos agudos e crônicos.

	AI		AR
	<u>agudo</u>	<u>crônico</u>	<u>agudo</u>
CTL	18,7±5,4	24,69±8,38	22,5±2,94
SUF	17,07±5,44	20,1±7,47	22,29±8,25
SEV	10,56±6,11*#	15,35±10,2^	22,35±9,51
CPT	14,80±6,61	18,52±6,95	23,04±10,50
PRO	13,26±5,26	15,73±3,9^	21,05±5,48

Valores representativos das médias e  $\pm$  desvios padrões das áreas de infarto e sob risco de infarto nos grupos agudo e crônico. ANOVA de duas vias com  $P < 0,05$ . \*  $P < 0,05$  vs CTL agudo; #  $P < 0,05$  vs SUF agudo; ^  $P < 0,05$  vs CTL crônico. CTL= grupo controle (n=8 agudo e n=7 crônico); SEV= grupo sevoflurano (n=10 agudo e n=; SUF= grupo sufentanil (n=10 agudo e n=8 crônico); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=10 agudo e n=8 crônico); PRO= grupo propofol (n=10 agudo e n=8 crônico); AI= área de infarto; AR= área sob risco de infarto.

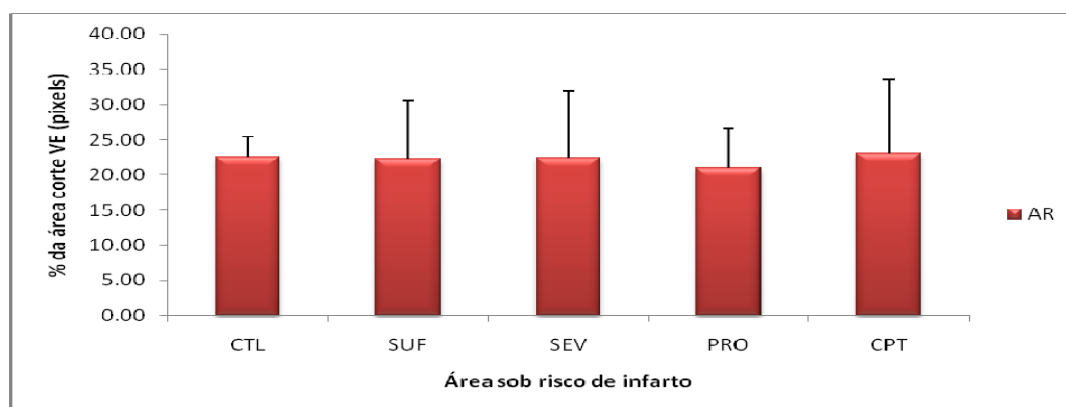
Os dados histológicos foram analisados por ANOVA seguidos do teste de Fisher para determinação das diferenças significativas.

Nos grupos agudos houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SEV e CTL (redução de 43,49% de AI do SEV em relação ao CTL) e SEV e SUF (redução de 38,13% de AI do SEV em relação ao SUF). Nos grupos crônicos houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PRO e CTL (redução de 36,23% de AI do PRO em relação ao CTL) e SEV e CTL (redução de 37,77% de AI do SEV em relação ao CTL).

As áreas sob risco de infarto nos grupos agudos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

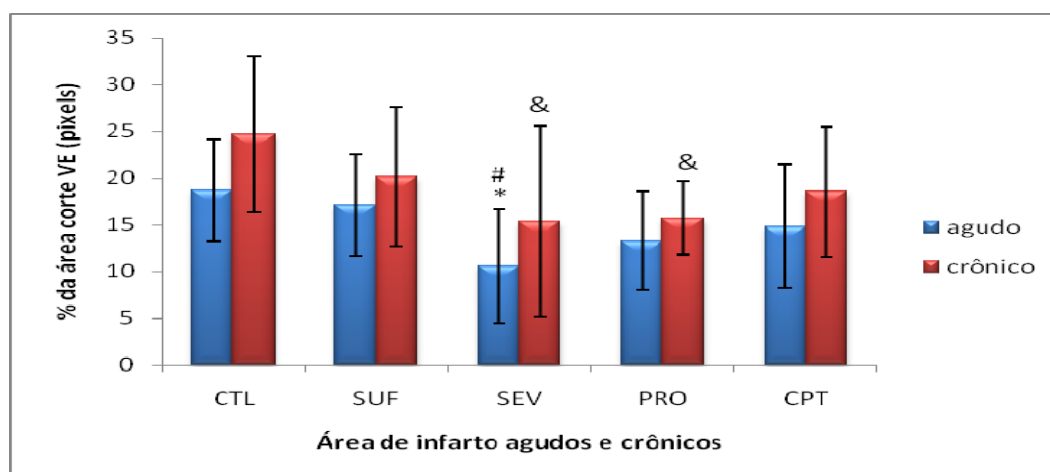
As figuras 10 e 11 demonstram as variações do tamanho da área de infarto e de risco de infarto entre os grupos agudos e crônicos.

**Figura 10:** Tamanho da área sob risco de infarto (AR) expressos como porcentagem da área do corte do ventrículo esquerdo no grupo agudo.



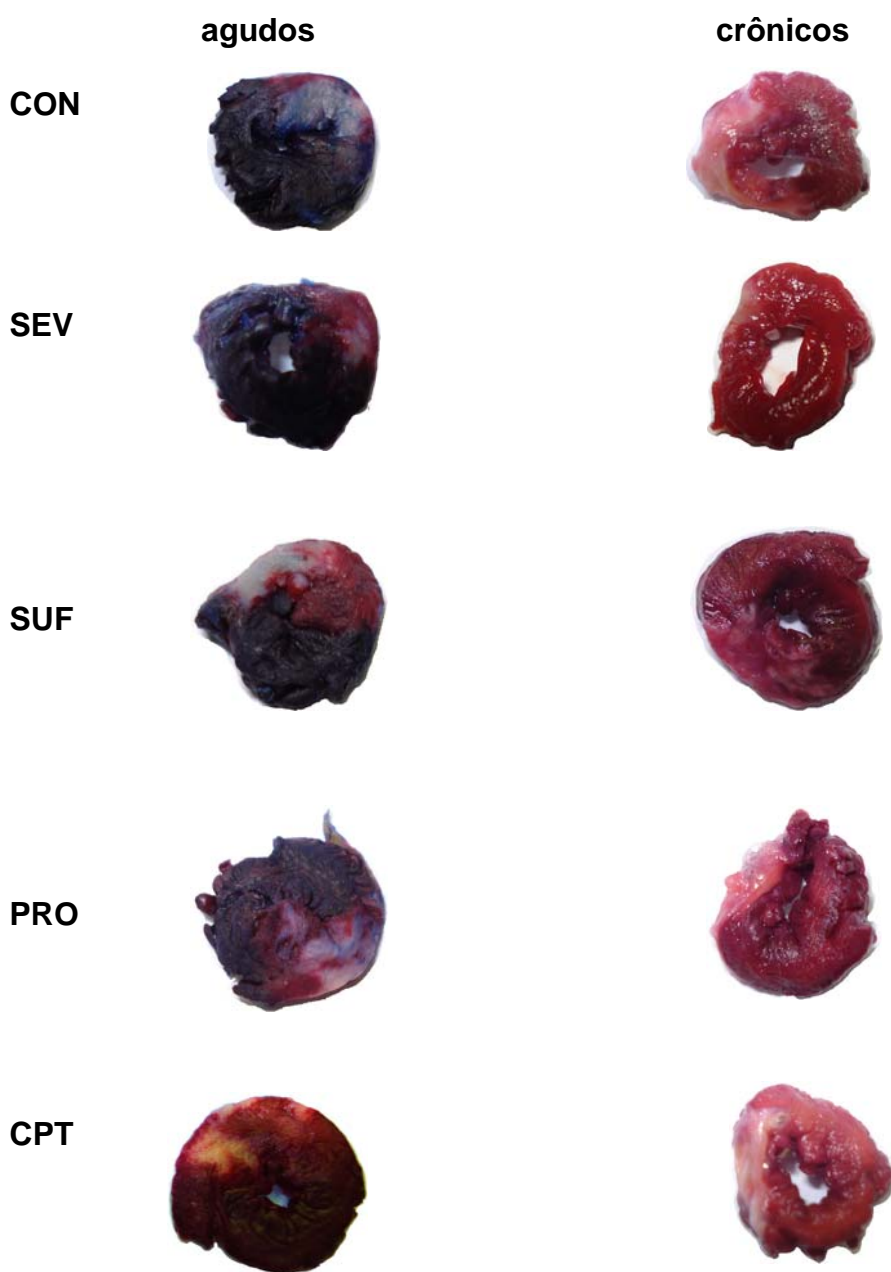
Valores representativos das médias  $\pm$  desvio padrão. Teste t para comparação entre os grupos vs CTL ( $P > 0,05$ ). CTL= grupo controle (n=8); SEV= grupo sevoflurano (n=10); SUF= grupo sufentanil (n=10); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=10); PRO= grupo propofol (n=10); AR= área sob risco de infarto.

**Figura 11:** Comparação das áreas de infarto dos grupos agudo e crônico expressos como porcentagem da área do corte do ventrículo esquerdo.



Valores representativos das médias  $\pm$  desvio padrão. ANOVA de uma via\*  $P < 0,05$  vs CTL agudo; #  $P < 0,05$  vs SUF agudo; &  $P < 0,05$  vs CTL crônico. CTL= grupo controle (n=8 agudo e n=7 crônico); SEV= grupo sevoflurano (n=10 agudo e n=9 crônico); SUF= grupo sufentanil (n=10 agudo e n=8 crônico); CPT= grupo sevoflurano+ sufentanil + propofol (n=10 agudo e n=8 crônico); PRO= grupo propofol (n=10 agudo e n=8 crônico).

**Figura12:** Fotografias dos cortes de miocárdio corados com TTC dos grupos agudos e crônicos. A coloração branca indica a área de infarto nos agudos e crônicos. A coloração azul (Evans) indica a área que não sofreu isquemia e reperfusão nos agudos. A coloração vermelha (TTC) indica a área sob risco que permaneceu viável nos agudos e crônicos.



Os resultados mais importantes estão apresentados a seguir:

Em relação à área de infarto:

a) diminuição da área de infarto do grupo SEV agudo (43,49%) em relação ao controle agudo;

b) diminuição da área de infarto do grupo SEV crônico (37,77%) em relação ao controle crônico;

c) diminuição da área de infarto do grupo PRO crônico (36,26%) em relação ao controle crônico;

As áreas sob risco de infarto nos grupos agudos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Em relação às alterações hemodinâmicas:

a) tendência de queda da pressão arterial em todos os grupos experimentais. Durante o pré-condicionamento os grupos SEV e CPT apresentaram reduções significativas da PA de 25,94% e 64,5% respectivamente.

b) queda da frequência cardíaca nos grupos SEV e CPT durante o pré-condicionamento. Nos outros períodos houve recuperação dessa variável em relação aos valores basais.

c) aumento significativo da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo durante a isquemia com tendência a diminuição nos períodos seguintes em todos os grupos. Contudo, excetuando-se o grupo controle, nenhum grupo foi capaz de recuperar a PDFVE em níveis próximos dos basais.

d) as taxas de aumento e queda da pressão no ventrículo esquerdo (DPDT+ e DPDT-, respectivamente), se comportaram de maneira

uniforme entre os grupos. O grupo CPT apresentou redução da DPDT+ (52,3%) e aumento da DPDT- (53,03%) durante o pré-condicionamento. O grupo SEV, apesar das variações entre os períodos, manteve-se estável em relação ao período basal exceto para a DPDT+ no final do período isquêmico.

e) o trabalho cardíaco (DP) apresentou diminuição significativa nos grupos CPT e SEV (32,91% e 54,61% respectivamente) durante o pré-condicionamento assim como ocorreu com as variáveis que compõem este índice (PA e FC). Nos outros períodos ocorreu tendência de melhora do trabalho cardíaco, porém somente os grupos SEV e PRO atingiram valores próximos aos basais ao final da reperfusão.

Número de células apoptóticas:

a) aumento do número de células apoptóticas do grupo SUF no experimento agudo e crônico.

b) Aumento de células apoptóticas dos grupos SEV e PRO no experimento crônico.

Expressão de genes Bcl-2 e Bax:

a) Não houve diferenças significativas da expressão gênica nos grupos agudos.

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo examinar a potencialização dos efeitos cardioprotetores de diferentes classes de anestésicos utilizando-se para isto o tamanho da área de infarto, área sob risco de infarto, inibição da apoptose e expressão dos genes antiapoptótico Bcl-2 e pró-apoptótico Bax. Os principais resultados observados foram: 1) a associação de sevoflurano, sufentanil e propofol não conferiu potencialização dos efeitos cardioprotetores em ratos submetidos à isquemia e reperfusão.

2) o pré-condicionamento com sevoflurano conferiu proteção ao miocárdio em ratos submetidos à isquemia e reperfusão evidenciada pela diminuição da área de infarto medida por técnica histoquímica (TTC) no pós infarto agudo e crônico.

3) o propofol conferiu efeito protetor ao miocárdio evidenciado pela diminuição da área de infarto por técnica histoquímica (TTC) no pós infarto crônico.

A estratégia de proteção ao miocárdio visa a diminuição de eventos isquêmicos nos períodos perioperatório, eventos estes que aumentam significativamente a morbi-mortalidade de pacientes com maior risco sob cirurgia (Slogoff & Keats.,1985; Haggmark et al.,1989). O termo cardioproteção se refere a ações que diminuam a área de infarto reduzindo os danos ao miocárdio.

Existem diferentes modelos experimentais de isquemia e reperfusão. Muitos dados são conflitantes em função da espécie animal utilizada, tempos de isquemia e reperfusão, isquemia global ou regional do miocárdio e regime de administração de fármacos durante o pré-



condicionamento. Neste estudo foi utilizado o modelo de isquemia e reperfusão em ratos Wistar submetidos à ligadura da artéria coronária esquerda durante 60 minutos e reperfusão com a soltura do nó sobre a artéria durante 120 minutos. A hipótese inicial foi a de que a aplicação dos diferentes anestésicos pudesse conferir um efeito adicional cardioprotetor, com redução maior da área de infarto do que quando utilizados isoladamente.

### **7.1. PARÂMETROS HEMODINÂMICOS**

As alterações hemodinâmicas observadas neste estudo estão de acordo com dados encontrados na literatura. Segundo Eger (1994), o sevoflurano, um anestésico geral halogenado sintetizado na década de 70, tem propriedades antiarritmogênicas e não sensibiliza o miocárdio a ação das catecolaminas quando comparado ao halotano. Tem efeito depressor da pressão arterial dose-dependente provavelmente devido à diminuição da resistência vascular periférica. Tende a manter o débito cardíaco, mas diminui a contratilidade por um bloqueio do influxo de cálcio e mantém a frequência cardíaca estável. Os grupos que receberam sevoflurano durante o PC apresentaram redução da PAS, FC e do trabalho cardíaco (DP). No grupo CPT esta diminuição foi maior possivelmente devido ao sinergismo com o sufentanil. Em estudo de Ludwig et al em 2003, a associação de morfina e isoflurano no pré-condicionamento cardíaco de cães submetidos à isquemia e reperfusão, as alterações hemodinâmicas foram similares aos encontrados no presente estudo durante este período, a despeito das diferenças entre os fármacos utilizados, contudo pertencentes as mesmas

classes farmacológicas. O trabalho cardíaco foi reduzido nestes grupos, pois está relacionado diretamente com estas variáveis. O efeito cardioprotetor do sevoflurano pode ser observado nos períodos de isquemia e reperfusão dos grupos SEV e CPT com o retorno dos valores próximos aos dos seus respectivos basais, contudo no grupo CPT não ocorreu o restabelecimento do trabalho cardíaco próximo dos valores basais durante a reperfusão, indicando piora da função miocárdica.

O efeito protetor do sevoflurano sobre a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo foi similar entre estes grupos. Em nosso estudo observou-se aumento da PDFVE e diminuição dos índices DPDT+ e DPDT- em ambos os grupos. A função contrátil não está diretamente relacionada ao estiramento miocárdico (Okoshi e Tucci.; 1996) , mas os dados são ainda conflitantes. Durante o REPI a pressão ventricular diminuiu, mas não alcançou os valores basais, contudo no grupo CPT observou-se a incapacidade de contração e relaxamento do miocárdio. Pode-se inferir que o efeito do sevoflurano dentro do grupo SEV no período pós-isquêmico está relacionado a redução da entrada de cálcio no cardiomiócito (Varadajan et al., 2002) ou pelo efeito inibitório sobre a disfunção contrátil induzida por neutrófilos (Hu et al., 2004), o mesmo não tendo ocorrido no grupo CPT.

O sufentanil é utilizado como adjuvante da anestesia geral inalatória com o intuito de reduzir a CAM dos halogenados. Também já estão estabelecidos os efeitos de redução da frequência cardíaca e da pressão arterial. Esta redução pode ser resultado da ação colinérgica e ação direta sobre o nó sino-atrial (Rifat et al., 1971). A administração de sufentanil, em

tempo maior (1-2 minutos), parece ocasionar bradicardia de menor intensidade (Glenski et al.,1988). No presente estudo, o sufentanil foi administrado em intervalo de tempo de três minutos a fim de minimizar este efeito. Foi observada uma tendência de redução da FC e PAS durante o PC, contudo o efeito protetor deste opióide não foi suficiente para manter a PAS e a PDFVE durante os momentos iniciais da isquemia. Todos os parâmetros hemodinâmicos, excetuando-se a FC, apresentaram piora significativa ao final da reperfusão. Bailey et al em 2000 relatou a incapacidade dos agentes opióides em bloquear a resposta hipertensiva disparada por estímulos de alta intensidade como a esternotomia para cirurgia cardíaca. Possivelmente esta deficiência na manutenção da função miocárdica tenha-se dado em função de estímulos de grande intensidade ao que o miocárdio sofreu durante a isquemia e reperfusão.

O propofol, um hipnótico com ação nos receptores GABA, é utilizado para indução anestésica ou manutenção da hipnose na anestesia geral. O efeito sobre o sistema cardiovascular mais relatado é a hipotensão, sobretudo por vasodilatação periférica. Por não provocar o efeito de pré-condicionamento no miocárdio foi utilizado durante o período da reperfusão devido à geração de grandes quantidades de radicais livres que ocorre com a reentrada de oxigênio no miocárdio nesta fase. Durante o estudo observou-se o efeito protetor sobre a contratilidade do miocárdio na reperfusão, que apesar de diminuída em relação ao período basal no grupo PRO, restabeleceu o índice DPDT+. Embora a PDFVE tenha se mantido alta e a DPDT- tenha indicado a diminuição do relaxamento do VE, o trabalho

cardíaco (DP) se manteve estável demonstrando um processo adaptativo neste período crítico. De fato, como relatam alguns estudos, o propofol é capaz de atenuar o influxo de cálcio e a atividade de neutrófilos (Nakae et al.,2000 e Galley et all.,1998). No grupo CPT esta tendência não se confirmou. A associação dos anestésicos no grupo CPT foi prejudicial sobre as variáveis hemodinâmicas em relação aos outros grupos.

## **7.2. ÁREA DE INFARTO E SOB RISCO DE INFARTO**

Neste estudo foram analisadas as áreas de infarto e sob risco de infarto nos grupos experimentais agudos. Nos grupos crônicos foi analisada somente a área de infarto, pois a área sob risco de infarto não é passível de quantificação sendo que os cardiomiócitos já evoluíram para necrose ou não ao final de 21 dias do evento isquêmico (Zhao et al.,2001).

Os efeitos cardioprotetores do sevoflurano ficaram evidentes, pois reduziram a área de infarto nos grupos SEV agudo e crônico quando comparados aos seus controles (43,49% e 37,77% respectivamente). Estes resultados estão de acordo com a literatura onde vários protocolos experimentais independente da metodologia aplicada ressaltam este efeito cardioprotetor. No grupo agudo este efeito foi estatisticamente significativo em relação ao grupo CTL e SUF.

Em contraste com a literatura a respeito dos efeitos cardioprotetores dos opióides, o pré-condicionamento com o sufentanil nos grupos crônicos e agudos não reduziu a área de infarto. O sufentanil

especificamente, não tem sido objeto de estudo para verificação de sua ação cardioprotetora, contudo um estudo de Sun et al em 2007 demonstrou que este agente foi capaz de reduzir o tamanho do infarto em ratos pré-condicionados. Foram aplicadas diferentes doses de sufentanil (1,5 e 20µg/kg de peso) pela via intraperitoneal 24hs antes da isquemia (45 minutos) e reperfusão (120 minutos). A metodologia aplicada no presente estudo foi diferente. Aplicou-se uma dose em bolus 30 minutos antes da isquemia e reperfusão. Poderia se inferir que no grupo crônico esta proteção pudesse ser observada, porém a área de infarto não foi estatisticamente diferente do grupo CTL.

No grupo que recebeu propofol na reperfusão (PRO) foi verificado o efeito protetor no experimento crônico. Uma redução de 36,23% em relação ao grupo CTL. Não existem dados na literatura a respeito da cardioproteção do propofol no infarto crônico. Em estudos clínicos comparando-se os efeitos cardioprotetores do sevoflurano e propofol concluiu-se que o primeiro preservou a função ventricular esquerda após a cirurgia de revascularização do miocárdio com menor tempo de internação em unidade de terapia intensiva (De Hert et al.,2002). No atual estudo a mesma tendência foi observada comparando-se a área de infarto entre os grupos SEV e PRO, contudo cronicamente tanto o SEV quanto o PRO apresentaram redução da área de infarto. Possivelmente os efeitos antioxidantes, a redução do influxo de cálcio e a diminuição da atividade neutrofílica do propofol (Kato & Foëx., 2002) possam ter influenciado na recuperação tardia do miocárdio diminuindo a área de infarto.

O grupo CPT que foi pré-condicionado com sevoflurano, sufentanil e recebeu propofol na reperfusão, a despeito das variáveis hemodinâmicas que configuraram este como o pior grupo em relação aos demais, apresentou redução da área de infarto tanto no protocolo agudo quanto crônico (20,85% e 24,98% respectivamente), porém não foi estatisticamente significativa. Poderia se inferir por este estudo, que os mecanismos de proteção discutidos teriam sido disparados independentemente dos efeitos hemodinâmicos da associação de sevoflurano, sufentanil e propofol, contudo como não foram utilizados protocolos confrontando-se os grupos com inibidores de receptores opióides como a naloxona ou antagonistas de canais de  $K_{ATP}$  dependentes como a gliburida, não foi possível distinguir os efeitos de cada fármaco neste grupo.

Os mecanismos celulares cardioprotetores disparados pelo pré-condicionamento anestésico ainda não estão completamente esclarecidos e uma discussão profunda sobre este tema não foi objetivo deste estudo.

### **7.3. TUNEL e RT- PCR**

A utilização das metodologias de RT-PCR e TUNEL foram realizadas para confrontar os dados obtidos com a coloração do miocárdio com TTC.

A necrose e a apoptose são as duas formas de morte celular associadas com a lesão de isquemia e reperfusão. Apoptose, ou morte celular programada é um tipo de "autodestruição celular" que requer energia

e síntese protéica para a sua execução. Está relacionada com a homeostase na regulação fisiológica dos tecidos implicando em renovação dos mesmos. Contudo, diferentes estímulos patológicos, em especial a isquemia e reperfusão, podem disparar mecanismos que irão determinar a via apoptótica, contribuindo de forma significativa para o aumento da morte celular em um processo dinâmico (Zhao & Vinten-Johanson 2002). A necrose difere da apoptose por representar um fenômeno degenerativo irreversível, causado por uma agressão intensa, sempre acompanhada de resposta inflamatória.

No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos quando submetidos à análise de variância. Contudo, observou-se diferenças quando os grupos agudos e crônicos foram comparados aos seus respectivos controles (Teste *t* de Student). No protocolo agudo, o grupo SUF apresentou aumento do número de células apoptóticas de 57,45% em relação ao CTL. Os outros grupos também apresentaram aumentos em relação ao CTL, porém sem significância estatística. Para os grupos crônicos ocorreu aumento significativo das células apoptóticas nos animais dos grupos PRO (38,52%), SEV (62,06%) e SUF (84,24%). A literatura é escassa em dados a respeito da apoptose em processos crônicos relacionados a isquemia e reperfusão. Muitos autores citam o pré-condicionamento anestésico do miocárdio como efetivo na redução do número de células apoptóticas (Zaugg et al., 2000; Wise-Faberowski et al., 2001; Wise-Faberowski et al., 2003), contrastando com nossos resultados. Poderia se inferir que a utilização dos anestésicos em

questão provocassem uma maior resposta inflamatória no miocárdio isquêmico deflagrando os mecanismos da via apoptótica e consequente aumento do número de células coradas pelo TUNEL nestes grupos.

A análise da expressão gênica tem se tornado cada vez mais importante na pesquisa científica, sendo a transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), o método de escolha para os genes selecionados. Os dados deste sugerem que a expressão do gene Bcl-2, cuja proteína desempenha papel fundamental na prevenção da apoptose principalmente pela inibição da liberação do citocromo C pela mitocôndria (Zhao et al.,2001) está aumentada nos grupos que receberam tratamento com sevoflurano (31%), sufentanil (12%) e propofol (33%) quando administrados isoladamente. O efeito sinérgico esperado com o uso destes anestésicos no grupo CPT não foi confirmado. Pelo contrário, ocorreu uma diminuição de 23% da expressão deste gene, contudo esta diminuição não determinou um aumento de miócitos apoptóticos corados pela coloração TUNEL neste grupo. A razão entre a expressão de Bcl-2 e Bax tem sido sugerida como determinante para o desfecho entre sobrevivência ou morte celular após estímulo apoptótico. Em todos os grupos experimentais ocorreu maior expressão do gene Bcl-2 em relação ao Bax, podendo-se inferir que a aplicação dos anestésicos facilita a via de proteção por apresentar maior quantidade de proteínas protetoras. Inversamente, nos grupos que receberam os anestésicos isoladamente, apesar do aumento da expressão de Bcl-2, o número de células apoptóticas aumentou em todos os grupos.



Ao final do estudo foi realizado protocolo de isquemia e reperfusão em 142 animais onde 54 vieram a óbito em diferentes momentos do experimento.

Mortalidade agudos:

CTL: 1 óbito no IAMI

SUF: 2 óbitos no IAMF e 1 na REPF

SEV: 1 óbito no PC e 1 no IAMI

PRO: 2 óbitos na REPI e 3 na REPF

CPT: 1 óbito no PC e 1 na IAMF

Mortalidade crônicos:

CTL: 2 óbitos IAMI, 1 no IAMF e 2 no período de espera para eutanásia

SUF; 3 óbitos no IAMI, 1 no IAMF, 3 na REPF e 3 no período de espera para eutanásia

SEV: 2 óbitos no IAMI, 2 no IAMF, 3 na REPF e 3 no período de espera para eutanásia

PRO: 2 óbitos no IAMF, 3 na REPI, 1 na REPF e 4 no período de espera para eutanásia

CPT: 1 óbito no PC, 2 no IAMF, 1 na REPI e 1 na REPF.

A realização deste projeto proporcionou o domínio da técnica do modelo de ligadura da artéria coronária com posterior reperfusão em ratos. Vale ressaltar a complexidade do protocolo experimental, as dificuldades estruturais e de ordem técnica enfrentadas durante toda a realização da pesquisa. Entretanto, apesar destas dificuldades, Este estudo possibilitou a

realização de um projeto de iniciação científica da acadêmica Maria Lúcia de Oliveira Saraiva do curso de Medicina da FMUSP na modalidade PIBIC/CNPQ com apresentação de pôster no XVII Simpósio Internacional de Iniciação Científica USP (anexo). Com a evolução do conhecimento adquirido, em relação ao pré-condicionamento anestésico, foi possível a elaboração de artigo científico de revisão na Revista Brasileira de Anestesiologia (anexo). Para projetos posteriores, as dificuldades encontradas no projeto em questão servirão de estímulo e aprendizado.

O pré-condicionamento anestésico já é considerado uma poderosa ferramenta a disposição dos anesthesiologistas na anestesia de pacientes com risco elevado para isquemia miocárdica intra-operatória. A proteção conferida pelos anestésicos contra estes eventos isquêmicos pode reduzir a morbi-mortalidade peri-operatória e diminuir o tempo de internação em unidades de terapia intensiva.

## **8. CONCLUSÕES**

A associação de sevoflurano, sufentanil e propofol não conferiu potencialização dos efeitos cardioprotetores em ratos submetidos à isquemia e reperfusão.

O pré-condicionamento com sevoflurano conferiu proteção ao miocárdio em ratos submetidos à isquemia e reperfusão por meio da diminuição da área de infarto medida por técnica histoquímica (TTC) no pós infarto agudo e crônico.

O propofol conferiu efeito protetor ao miocárdio observado por técnica histoquímica (TTC) no pós infarto crônico.

O pré-condicionamento não promoveu a diminuição do número de células apoptóticas nos grupos de estudo quando comparados aos controles.

Os grupos experimentais apresentaram tendência ao aumento na expressão do gene Bcl-2 em relação ao controle exceto no grupo onde foram associados o sevoflurano, sufentanil e propofol, que apresentou diminuição da expressão deste gene.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailey PL, Egan TD, Stanley TH . Intravenous opioid anesthetics. In: Miller RD, ed. *Anesthesia*. Philadelphia: Churchill Livingstone;2000.p. 273-376.

Benedict PE, Benedict MB, Su TP, Bolling SF. Opiate drugs and delta-receptor-mediated myocardial protection. *Circulation*.1999;100[supl.11]:11-357-60.

Bernard JM, Wouters PF, Doursout MF, Florence B, Chelly JE, Merin RG. Effect of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs. *Anesthesiology*.1990;72:659-62.

Bernier M, Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion arrhythmias : dose-related protection by anti-free radical intervention. *Am J Physiol*.1989;256:h1344–h1352.

Bolli R. Mechanism of myocardial “stunning”. *Circulation*.1990;82:723–738.

Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*.1997;86:699–709.

De Hert SG, Broecke PW, Mertens E, Sommeren EWW, De Blier IG, Stockman BA, Rudrigus IE. Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology*.2002;97:42-9.

De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rudrigus IE. Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*.2004;01:9-29.

Del Valle HF, Negroni JA, Lascano EC. Precondicionamiento cardiaco: protección miocárdia endógena contra el infarto, las arritmias y la disfuncion contráctil postisquemica. Primera parte. Precondicionamiento isquémico clásico. *Rev Fed Arg Cardiol*.2003;32:377-399.

Eger EI - New inhaled anesthetics. *Anesthesiology*.1994;80:906-922.

Freedman BM, Hamm DP, Everson CT, Wecksler AS, Christian CM. Enflurane enhances postischemic functional recovery in the isolated rat heart. *Anesthesiology*.1985;62:29-33.

Fryer RM, Eells JT, Nagase H, Groos GJ. Opioid-induced second window of cardioprotection : potential role of mitochondrial KATP channels. *Circ Res*.1999;84:846-51.

Galley HF, Dubbels AM, Webster NR. The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg.*1998;86:1289-93.

Glenski J., Friesen R.H., Lane G.A., Young S, Glascock J. Low dose sufentanil as a supplement to halothane anesthesia in infants and children. *Can J Anaesth.*1988;35:379-384.

Haggmark S, Hohner P, Ostman M, Friedman A, Diamond G, Lowenstein E, Reiz S. Comparison of hemodynamic, eletrocardiographic, mechanical and metabolic indicators of intraoperative myocardial ischemia in vascular surgical patients with coronary artery disease. *Anesthesiology.*1989;70:19-25.

Hanouz JL, Vivien B, Gueugniaud PY, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B. Comparison of the effects of sevoflurane, isoflurane and halothane on rat myocardium. *Br J Anaesth.*1998;80:621–7.

Hearse DJ, Manning AS, Downey JM, Yellon DM. Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischaemia and reperfusion? *Acta Physiol Scand.*1986;548:65-74.

Higuchi, R., G. Dollinger, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*.1992;10(4):413-7.

Hu G, Salem MR, Crystal GJ. Isoflurane and sevoflurane precondition against neutrophil-induced contractile dysfunction in isolated rat hearts. *Anesthesiology*.2004;100:489-97.

Javadov SA, Lim KHH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research*.2000;45:360-369.

Kahraman S, Demiryürek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg*.1997;84:1127-9.

Kato R, Foëx P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anesth*.2002;49:777-791.

Kato R, Ross S, Foëx P. Fentanyl protects the heart against ischemic injury via opioid receptors, adenosine A1 receptor and KATP channel linked mechanisms in rats. *Br J Anaesth*.2000;84:204-14.

Ko SH, Yu CW, Lee SK, Chue H, Chung MJ, Kwak YG, Chae SW, Song HS. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat hearts. *Anesth Analg.*1997;85:719-24.

Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg.*1998;86:252-8.

Lessa M A, Rodrigues E, Tibiriçá E. Cardioprotection action of fentanyl in a model of central sympathetic overactivity in rabbits : antiarrhythmic and anti-ischemic effects. *Acta Anaesthesiol Scand.*2004;48:1115-1122.

Livak, KJ. e TD. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*2001;25(4):402-8.

Lowe D, Hettrick DA, Pagel PS, Warltier DC. Influence of volatile anesthetics on left ventricular afterload in vivo: differences between desflurane and sevoflurane. *Anesthesiology.*1996;85:112–120.

Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane. *Anesthesiology.*2003;98:705–11.



Mathur S, Farhangkhgoee P, Karmazyn M. Cardioprotective effects of propofol and sevoflurane in ischemic and reperfused rat heart. *Anesthesiology*.1999;91:1349-60.

Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*.1997;58:95–117.

Murphy PG, Myers DS, Davis MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol ( 2,6-diisopropylphenol ). *Br J Anaesth*.1992;68:613-618.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*.1986;74:1124-36.

Nakae Y, Fugita S, Namiki A. Propofol inhibits Ca transients but not contraction in intact beating guinea pig hearts. *Anesth Analg*.2000;90:1286-92.

Novalija E, Fugita S, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated heart. *Anesthesiology*.1999;91:701-12.

Okoshi K, Tucci JF. Mecanismo de Frank-Starling e a primeira derivada temporal de pressão ventricular (DP/DT). *Arq Bras Cardio*.1996;66:233-237.

Pagel OS, Kampine JP, Schmeling WT, Wartier DC. Influence of volatile anesthetics on myocardial contractility in vivo: desflurane versus isoflurane. *Anesthesiology*.1991;74:900–7.

Patel HH, Ludwig LM, Fryer RM, Hsu AK, Waltier DC, Gross GJ. Delta opioid agonists and volatile anesthetics facilitate cardioprotection via potentiation of KATP channel opening. *FASEB J*.2002;16:1468-70.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*.2001;29(9):e45.

Rifat, K., Moret TP, Gemperle, M. Les effets de lanesthesie analgesique sequentielle sur le systeme cardiovasculaire du chien. Etude experimentale. *Ann. Anaesthetic*. 1971;1:12.

Santos L, Mello AFS, Antônio EL, Tucci PJF. Determination of myocardial infarct size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements and simplifications. *Braz J Med Biol Res*.2008;41:199–201.

Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Patol Lab Med*.1980;104:179–183.

Schultz JEJ, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res.* 1996;78:1100-1104.

Slogoff S, Keats AS. Does perioperative myocardial ischemia lead to postoperative myocardial infarction? *Anesthesiology.*1985;62:107-14.

Sun HT, Xue FS, Liu KP, Xu YC, Liu Y. Sufentanil preconditioning confers delayed cardioprotection in the intact rat. *Anesthesiology.*2007;107:A758.

Tanaka S, Tsuchida H, Nakabayashy K, Seki S, Namiki A. The effects of sevoflurane, isoflurane, halothane and enflurane on hemodynamic responses during an inhaled induction of anesthesia via mask in humans. *Anesth Analg.*1986;82:821-6.

Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology.*1999;91:1437-46.

Varadarajan SG, An J, Novalija E, Stowe DF. Sevoflurane before or after ischemia improves contractile and metabolic function while reducing myoplasmic Ca<sup>++</sup> loading in intact hearts. *Anesthesiology.*2002;96:125-33.

Wang GY, Wu S, Pei JM, Yu XC, Wong TM. Kappa but not delta opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarcted and arrhythmia in rats. *Am J Physiol.*2001;280:H384-91.

Wise-Faberowski L, Raizada MK, Summers C. Oxygen and glucose deprivation-induced neuronal apoptosis is attenuated by halothane and isoflurane. *Anesth Analg.*2001;93:1281-7.

Wise-Faberowski L, Raizada MK, Summers C. Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death. *J Neurosurg Anesthesiol.*2003;15:193-9.

Zaugg M, Jamali NZ, Lucchinetti E, Shafik AS, Siddiqui MA. Norepinephrine-induced apoptosis is inhibited in adult rat ventricular myocytes exposed to volatile anesthetics. *Anesthesiology.*2000;93:209-18.

Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth.*2003;91:551-565.

Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johanson J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res.*2000;45:651-660.

Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis*.2001;6:279-90.

Zhao ZQ, Vinten-Johanson J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2002;55:438-455.

## 10. ANEXOS



### **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.04.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **157/06**, intitulado: "Estudo do efeito protetor do sevoflurano, propofol e sufentanil sobre o miocárdio na lesão de isquemia e reperfusão. Estudo experimental em ratos" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. José Otávio Costa Auler Junior**

Pesquisador(a) Executante: **Dr. Rubens Campana Pasqualin**

CAPPesq, 12 de Abril de 2006.

**PROF. DR. CLAUDIO LEONE**  
Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

## Proteção Miocárdica pelo Pré- e Pós-Condicionamento Anestésico\*

### Myocardial Protection by Pre- and Post-Anesthetic Conditioning

Rubens Campana Pasqualin\*, José Otávio Costa Auler Jr., TSA\*

#### RESUMO

Pasqualin RC, Auler Jr. JOC — Proteção Miocárdica pelo Pré- e Pós-Condicionamento Anestésico.

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVO:** A isquemia miocárdica perioperatória é um evento comumente observado no período perioperatório podendo aumentar significativamente a morbimortalidade pós-cirúrgica. As propriedades cardioprotetoras dos anestésicos voláteis e dos opióides têm sido estudadas durante algumas décadas e hoje constituem poderosas ferramentas no manuseio de pacientes com doença coronariana isquêmica. O objetivo desta revisão foi fornecer fundamentos da proteção miocárdica por condicionamento.

**CONTEÚDO:** Serão discutidos os conceitos sobre lesão celular decorrente de isquemia e reperfusão, condicionamento isquêmico (PCI), condicionamento anestésico (PCA), assim como os mecanismos de proteção miocárdica. Estudos recentes em cirurgia cardíaca demonstram que a aplicação de curtos períodos de isquemia, durante a reperfusão, podem reduzir a área de infarto do miocárdio. Os anestésicos voláteis também podem apresentar efeito protetor na reperfusão miocárdica. Independentemente da via de sinalização que leva ao condicionamento, tanto aqueles que envolvem anestésicos quanto o isquêmico, considera-se que os canais de KATP dependentes mitocondriais sejam os mediadores finais de cardioproteção por controlarem o influxo de cálcio na mitocôndria e prevenirem a indução da necrose e apoptose. Apesar do PCI e PCA efetivamente reduzirem a área de infarto do miocárdio e melhorarem a função ventricular pós-operatória, é importante salientar que esses tratamentos devem ser anteriores ao evento isquêmico no sentido de justificar sua aplicabilidade clínica.

**CONCLUSÕES:** Os fenômenos conhecidos como condicionamento isquêmico e condicionamento anestésico do miocárdio, são bem conhecidos, sendo o mecanismo de proteção similar em ambas as situações, porém nem todos os passos que levam a esta proteção foram completamente esclarecidos. Mais investigações são necessárias, para que as propriedades cardioprotetoras dos agentes anestésicos possam ter aplicabilidade clínica crescente.

**Unitermos:** ANESTÉSICOS: inalatório, venoso; COMPLICAÇÕES: isquemia do miocárdio; FISIOPATOLOGIA; Cardiovascular: condicionamento isquêmico, reperfusão.

#### SUMMARY

Pasqualin RC, Auler Jr JOC — Myocardial Protection by Pre- and Post-Anesthetic Conditioning.

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Perioperative myocardial ischemia is commonly observed, and it can increase significantly postoperative morbidity and mortality. The cardioprotective properties of volatile anesthetics and opioids have been studied during several decades and currently constitute powerful tools in the management of patients with ischemic coronaryopathy. The objective of this review was to provide the fundamentals of myocardial protection by preconditioning.

**CONTENTS:** The concepts of cellular damage secondary to ischemia and reperfusion, ischemic preconditioning (IPC), and anesthetic preconditioning (APC), as well as the mechanisms of myocardial protection, are discussed. Recent studies in cardiac surgery demonstrated that the use of short periods of ischemia during reperfusion can reduce the area of myocardial infarction. Volatile anesthetic can also have a protective effect in myocardial reperfusion. Independently of the signaling pathway that leads to preconditioning, both anesthetic and ischemic, mitochondrial dependent KATP channels are considered the final mediators of cardioprotection by controlling the mitochondrial influx of calcium and, therefore, preventing the induction of necrosis and apoptosis. Although IPC and APC effectively reduce the area of myocardial infarction and improve postoperative ventricular function, it is important to stress that those treatments should be instituted before ischemic events to justify their clinical applicability.

**CONCLUSIONS:** Phenomena known as myocardial ischemic preconditioning and anesthetic preconditioning are well known, and the mechanism of protection is similar in both situations; however, not every step that leads to this protection has been fully explained. Further studies are necessary to increase the clinical applicability of the cardioprotective properties of anesthetics.

**Key Words:** ANESTHETICS, inhalational, intravenous; COMPLICATIONS: myocardial ischemia; PATHOPHYSIOLOGY, Cardiovascular: ischemic preconditioning, reperfusion.

\*Recebido do (Received from) Programa Pós-Graduação – Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Laboratório de Investigação Médica/Anestesiologia (LIM-8), São Paulo, SP

1. Aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação da FMUSP  
2. Diretor do Serviço de Anestesiologia e UTI Cirúrgica do InCor – Hospital das Clínicas da FMUSP; Professor Titular da Disciplina de Anestesiologia da FMUSP; Coordenador do Programa de Pós-Graduação Senso Stricto – Área de Anestesiologia

Apresentado (Submitted) em 18 de abril de 2007  
Aceito (Accepted) para publicação em 19 de junho de 2008

Endereço para correspondência (Correspondence to):  
Dr. José Otávio Costa Auler Junior  
Serviço de Anestesiologia InCor-FMUSP – 2º andar  
Avenida Enéas de Carvalho Aguiar 44 – Cerqueira César  
05401-900 São Paulo, SP  
E-mail: auler@hcnet.usp.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2008

**INTRODUÇÃO:** Recentes estudos têm demonstrado que a associação de halogenados e opióides apresentam sinergia na cardioproteção. Entretanto, a associação específica de sevoflurano, sufentanil e propofol não está descrita na literatura.

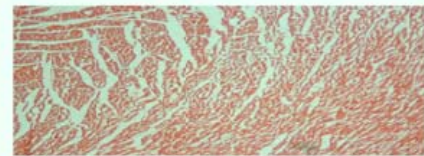
**OBJETIVOS:** Examinar a potencialização da cardioproteção por sevoflurano, propofol e sufentanil por meio da análise do tamanho da área de infarto.

**MATERIAL E MÉTODO:**

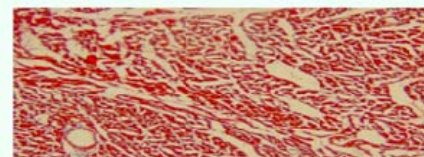
**Animais:** Serão manipulados de acordo com as diretrizes do National Institute of Health para o cuidado, utilização e manipulação de animais de laboratório. Durante os procedimentos, estes animais estarão sob anestesia com tiobutabarbital sódico (100-150 mg/kg) via intraperitonal de forma que não tenham dor.



**TRICROMO DE MASSON:**



Lâmina de miocárdio tratada com propofol



Lâmina de miocárdio sem tratamento prévio

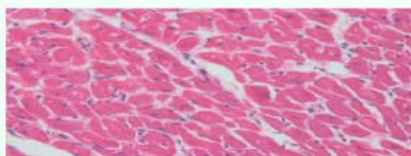


COMPLETA (Lâmina de miocárdio submetida a suf + pro + sev)

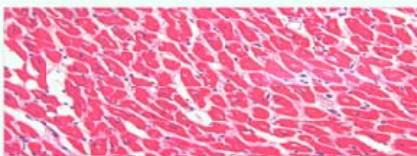
Quanto maior a área de edema à coloração de Masson, maior o dano aos miócitos e, portanto, menor proteção conferida pelo anestésico.

**Lâminas:** A análise de campos de tecido cardíaco de ratos, submetidos à eutanásia logo após sofrerem lesão de isquemia-reperfusão, será realizada por meio do software Leica Qwin sob 2 colorações:

**HEMATOXILINA-EOSINA:**



Lâmina de miocárdio tratada com sevoflurano



Lâmina de miocárdio tratada com sufentanil

Células de diâmetro maior à hematoxilina-eosina indicam menor proteção conferida pelo anestésico. Consideraremos o diâmetro da célula como a maior medida obtida perpendicularmente ao núcleo celular.

**RESULTADOS:**

EDEMA CELULAR		DIÂMETRO CELULAR	
ANESTÉSICO	MÉDIA	ANESTÉSICO	MÉDIA
CONTROLE	25,38	CONTROLE	193,591
SEVOFLURANO	25,60	SEVOFLURANO	62,247
PROPOFOL	24,35	PROPOFOL	194,882
SUFENTANIL	28,96	SUFENTANIL	24,013
COMPLETO	27,08	COMPLETO	216,366

**CONCLUSÕES FINAIS:**

Utilizando edema celular como parâmetro: o propofol foi o mais eficaz para a proteção do músculo cardíaco, seguido pelo controle, sevoflurano, completo e sufentanil.

Utilizando diâmetro celular como parâmetro: o sufentanil foi o mais eficaz para a proteção do músculo cardíaco, seguido pelo sevoflurano, controle, propofol e completo.

Os resultados obtidos não atenderam à hipótese de que a associação de anestésicos é mais eficaz para a proteção do miocárdio contra os danos causados pela lesão de isquemia-reperfusão.

**Bibliografia Consultada:** Benedict PE, Benedict MB, Su TP, Bolling SF. Opiate drugs and delta-receptor-mediated myocardial protection. *Circulation* 1989;100 [suppl. 11]:11-357-60; Lessa MA, Rodrigues E, Tibirica E. Cardioprotective action of fentanyl in a model of central sympathetic overactivity in rabbits: antiarrhythmic and anti-ischemic effects. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:1115-22; Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997;86:699-709; Dei Velle HF, Negrozi JA, Lascano EC. Precondicionamiento cardíaco: protección miocárdica endógena contra el infarto. las arritmias y la disfunción contráctil postisquémica. Primera parte. *Precondicionamiento isquémico clásico. Rev Fed Arg Cardiol* 2003;32:377-99.