Paulo Gabriel Melo Brandão

Avaliação do efeito da administração contínua de agentes anestésicos sobre a função miocárdica de suínos submetidos à parada cardíaca

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de Doutorado em Ciências

Programa de Anestesiologia

Orientadora: Dra Denise Aya Otsuki

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Brandão, Paulo Gabriel Melo
Avaliação do efeito da administração contínua de agentes anestésicos sobre a função miocárdica de suínos submetidos á parada cardíaca / Paulo Gabriel Melo Brandão. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.
Orientadora: Denise Aya Otsuki.

Descritores: 1.Proteção miocárdica 2.Parada cardíaca 3.Suínos 4.Fentanila 5.Sevoflurano 6.Dexmedetomidina

USP/FM/DBD-497/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico esta conquista aos meus pais, Cristiana e Rafael, que sempre me incentivaram na busca pelos meus objetivos, aconselhando e me guiando frente aos desafios.

A minha esposa Susana pelo apoio incondicional, sempre permanecendo ao meu lado e criando os alicerces para que eu enfrentasse cada viagem.

Aos meus filhos, Rafael, Olivia e Catarina, vocês são a razão de tudo.

A minha irmã, Ana Luísa, e à minha afilhada, Maria Júlia, por todo amor e carinho.

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Dra. Denise Aya Otsuki, por ter me aceitado como aluno mesmo sabendo dos desafios inerentes às minhas viagens, pela paciência e por ter me ajudado na realização de todos os experimentos. Poucos alunos tiveram a oportunidade de ter uma orientadora tão presente e dedicada em cada momento do estudo.

Agradeço ao Dr. Matheus Fachini Vane, além de um coorientador, um amigo que sempre se fez presente ao longo desses quatro anos participando de cada momento e desafio deste estudo.

A Dra. Debora Rothstein Ramos e o Gilberto de Mello Nascimento por todo apoio e convívio diário no LIM-08, que juntamente com o Matheus desenvolveram o modelo experimental em parada cardíaca, sem o esforço de vocês este estudo não poderia ter sido realizado.

Ao Prof. José Otávio Costa Auler Junior, professor titular da Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me aceitar no LIM 08 como aluno de pós-graduação.

A Prof. Dra. Maria José Carvalho Carmona pelo apoio na realização deste estudo e ter sido a responsável pela minha entrada no programa de pós-graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A minha colega de pós-graduação, Letícia Urbano, por ter me ensinado e me ajudado na análise dos resultados deste estudo.

A Dra. Elnara Negri e a Dra Nilsa Rodrigues pelo apoio e todo suporte na análise dos resultados desta tese.

A Profa. Dra. Elia Caldini por viabilizar a realização dos exames de microscopia eletrônica.

Ao Dr. Luiz Guilherme Aureliano de Lima pela ajuda na análise do estudo histopatológico cerebral.

A Dra. Marcia Koike que me auxiliou na avaliação histológica, contribuindo consideravelmente no resultado deste estudo.

Aos amigos Cris e Sérgio pela amizade e por terem me hospedado a cada passagem por São Paulo.

A Dra. Suzana Lobo por ter plantado a semente sobre a importância da pesquisa clínica durante toda a minha formação como especialista no Hospital de Base de São José do Rio Preto.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO DA LITERATURA 3

2.1 FISIOPATOLOGIA DA DISFUNÇÃO MIOCÁRDICA PÓS-RESSUSCITAÇÃO 3

2.1.1 Lesão por isquemia e reperfusão 4

2.1.2 Disfunção Miocárdica mediada por citocinas 5

2.1.3 Disfunção cardíaca induzida por catecolaminas e desfibrilação 6

2.2 CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA POR ANESTÉSICOS 7

2.2.1 Anestésicos halogenados 7

2.2.2 Opioides 9

2.2.3 Dexmedetomidina 10

3 OBJETIVOS 12

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO 12

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS 12

4 MÉTODO 13

4.1 PROTOCOLO ANESTÉSICO 13

4.2 PREPARO 14

4.3 MONITORIZAÇÃO 15

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 15

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS 15

4.6 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL 16

4.7 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA, METABÓLICA E DO TRANSPORTE DE OXIGÊNIO 18

4.7.1 Parâmetros hemodinâmicos indiretos 18

4.8 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA 19

4.8.1 Imagens 19

4.8.2 Análise da função ventricular 19

4.9 AVALIAÇÃO VENTILATÓRIA 20
4.10 AVALIAÇÃO LABORATORIAL E GASOMÉTRICA 20
4.10.1 Troponina-I 20
4.10.2 Gasometria arterial e venosa mista 20
4.11 ESTUDO ANATOMO-PATOLÓGICO 21
4.11.1 Microscopia óptica 21
4.11.2 Tunel 22
4.11.3 Microscopia eletrônica de transmissão 23
4.12 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE APOPTOSE POR MEIO DE WESTERN BLOTTING 24
4.13 MEDIDAS DE SUBSTÂNICAS OXIDANTES REAGENTES AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) 25
4.14 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 25
4.15 DESCARTE DE ANIMAIS 27
4.16 CÁLCULO AMOSTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA 27
5 RESULTADOS 28
5.1 PESOS DOS ANIMAIS 28
5.2 TROPONINA 28
5.3 REANIMAÇÃO CARDIOPULMONAR 29
5.3.1 Taxa e Tempo de RCE 29
5.3.2 Doses de adrenalina 30
5.3.3 Número de desfibrilações 30
5.4 VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS 31
5.4.1 Frequência cardíaca (FC) 31
5.4.2 Pressão arterial média (PAM) 33
5.4.3 Pressão da artéria pulmonar média (PAPm) 34
5.4.4 Pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP) 35
5.4.5 Pressão venosa central (PVC) 36
5.4.6 Índice Cardíaco (IC) 37
5.4.7 Índice de Resistência Vascular Sistêmica (IRVS) 38
5.4.8 Índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP) 38
5.4.9 Índice de Volume Sistólico (IVS) 39
5.5 PARÂMETROS DE PERFUSÃO E GASOMÉTRICOS 41
5.5.1 Lactato 41
5.5.2 Saturação Venosa Mista 42
5.5.3 Gradiente Arteriovenoso de CO_2 42
5.5.4 pH 43
5.5.5 Glicemia 44

5.6 Diurese 45
5.7 DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS 47
5.8 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA 49
5.8.1 Microscopia Óptica Miocárdica 49
5.8.2 Microscopia Óptica Pulmonar 50
5.8.3 Microscopia óptica cerebral 51
5.8.4 Imuno-histoquímica miocárdica 52
5.9 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE APOPTOSE POR MEIO DE WESTERN BLOTTING 52
5.10 TBARS 53
5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA 53
6 DISCUSSÃO 56
7 CONCLUSÕES 62
8 REFERÊNCIAS 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência Experimental 18

Figura 2 - Troponina I sérica dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 29

Figura 3 - Tempo para retorno a circulação espontânea dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar .. 29

Figura 4 - Doses de adrenalina utilizadas nos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 30

Figura 5 - Número de desfibrilações necessárias para RCE dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. § p≤0,05 vs FNT 30

Figura 6 - Frequência cardíaca dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 31

Figura 7 - Pressão arterial média dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 33

Figura 8 - Pressão da artéria pulmonar dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 34

Figura 9 - Pressão de oclusão da artéria pulmonar dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar .. 35

Figura 10 - Pressão venosa central dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 36

Figura 11 - Índice cardíaco dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 37

Figura 12 - Lactato arterial dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 41

Figura 13 - Saturação venosa dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 42

Figura 14 - pH arterial dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar..... 43

Figura 15 - Glicose dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar..... 44

Figura 16 - Microscopia de Luz do tecido pulmonar..... 50

Figura 17 - Microscopia Cerebral 51

Figura 18 - TUNEL tecido miocárdico 52

Figura 19 - Micrografia eletrônica de miocárdio de animal do grupo DEX, 30000x, mostrando uma área celular contendo mitocôndrias. Nota-se na região central, uma mitocôndria com volume relativamente aumentado e edema da matriz representado por uma área de menor eletrondensidade (asteriscos). É possível observar algumas pequenas vesículas periféricas (setas) que podem ser resultantes da ruptura da membrana externa mitocondrial..... 54

Figura 20 - Micrografia eletrônica de miocárdio de animal do grupo FNT, 30000x, mostrando a presença de miofibrilas (Miof) em corte transversal e de mitocôndrias. Notar uma alteração do padrão ultraestrutural típico, com cristas mitocondriais (seta) escassas. O volume mitocondrial está ocupado por uma matriz amorfa e eletrondensa (asterisco). 55

Figura 21 - Micrografia eletrônica de miocárdio do animal do grupo FNT,30000x. É possível observar uma mitocôndria com cristas em ziguezague (seta). 55

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Delineamento do Experimento 26

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hemodinâmicos dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar 32

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hemodinâmicos calculados 40

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão dos dados metabólicos 46

Tabela 5 - Dados Ecocardiográficos de acordo com o braço do estudo 48

Tabela 6 - Avaliação Microscopia Óptica Miocárdica 49

Tabela 7 - Avaliação Microscopia Óptica Pulmonar 50

Tabela 8 - Avaliação Histopatológica Cerebral 51

Tabela 9 - Imuno-histoquímica 52

Tabela 10 - Expressão de Proteína Bax e Bcl-x 53

Tabela 11 - Substâncias oxidantes reagentes ao ácido tiobarbitúrico 53

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A	Pico de velocidade da onda de enchimento atrial
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
Bax	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	Célula B de linfoma 2
CAM	Concentração Alveolar Mínima
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DC	Débito Cardíaco
DEX	Dexmedetomidina
Df	Degrees of Freedom
DMPR	Disfunção Miocárdica pós-ressuscitação
DOR	Receptor Opioide delta
E	Pico de Velocidade da onda de enchimento precoce
EDV	Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo
ENOS	Óxido Nítrico endotelial sintetase
ESV	Volume Sistólico Final do Ventrículo Esquerdo
$EtCO_2$	Capnografia ao final da expiração
FC	Frequência Cardíaca
FE	Fração de Ejeção
FiO_2	Fração Inspirada de Oxigênio
FNT	Fentanil
GapCO2	Gradiente Arteriovenoso de Gás Carbônico
GEE	Equações de Estimativas Generalizadas
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina -Eosina
Hz	Hertz
I/R	Isquemia e reperfusão
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Índice Cardíaco
IRVP	Índice de Resistência Vascular Pulmonar
IRVS	Índice de Resistência Vascular Periférica
IVS	Índice de Volume Sistólico
J	Joules
J/kg	Joules por quilograma
kg	Quilograma

LVDA	Área do Ventrículo Esquerdo Durante a Diástole
LVSA	Área do Ventrículo Esquerdo Durante a Sístole
MCE	Massagem Cardíaca Externa
ml	Mililitro
ml/kg	Mililitro por quilograma
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPTP	Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial
p	Nível de Significância Estatística
$PaCO_2$	Pressão arterial de gás carbônico
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PaO_2	Pressão arterial de Oxigênio
PaO_2/FiO_2	
PAP	Pressão da Artéria Pulmonar
PAPm	Pressão da Artéria Pulmonar Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PC	Parada Cardíaca
PEEP	Pressão Positiva ao Final da Expiração
PoAP	Pressão de Oclusão da Artéria Pulmonar
PVC	Pressão Venosa Central
PvO_2	Pressão Venosa de Oxigênio
RCE	Retorno a Circulação Espontânea
RCP	Reanimação Cardiopulmonar
SC	Superfície Corpórea
SEVO	Sevoflurano
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SPRCP	Síndrome Pós-ressuscitação cardiopulmonar
SVO_2	Saturação Venosa Mista
TBARS	Substâncias Oxidantes Reagentes ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP End Labeling
V	Volts
VD	Ventrículo Direita
VD AREA	Área Ventricular Direita
VD VDF	Volume Diastólico Final do Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
X^2 Wald	Wald Qui-quadrado

RESUMO

Brandão PGM. *Avaliação do efeito da administração contínua de agentes anestésicos sobre a função miocárdica de suínos submetidos à parada cardíaca*. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Disfunção miocárdica após uma parada cardíaca é um evento frequente e impõe grande morbimortalidade. Recentemente, agentes anestésicos têm sido descritos como cardioprotetores em estados de isquemia e reperfusão, sendo pouco estudados em situações de PC, justamente onde a proteção miocárdica se faz de maior utilidade. **Objetivos:** O objetivo deste estudo é avaliar o efeito de administrações contínuas de fentanil, sevoflurano, dexmedetomidina sobre a função miocárdica de suínos submetidos a PC. **Métodos:** Vinte e quatro porcos foram randomizados e submetidos à administração contínua de sevoflurano, sevoflurano associado a fentanil e sevoflurano associado a dexmedetomidina. A PC foi induzida por corrente elétrica alternada intracardíaca de 9V. Após 8 minutos do início da PC, os animais foram desfibrilados com 4J/Kg, iniciando massagem cardíaca externa e adrenalina 10µg/kg a cada 3 minutos. O retorno da circulação espontânea foi considerado quando a PAM se manteve acima de 40 mmHg por mais de 10 min. Os dados foram analisados utilizando equações de estimativa generalizadas e ANOVA quando indicado. Foram avaliados dados de ecocardiograma, medidas hemodinâmicas e perfusão tecidual, troponina I, avaliação do estresse oxidativo, expressão de proteínas reguladora de apoptose e marcação de apoptose em tecido miocárdico. Foram avaliados também inflamação e lesão miocárdica por microscopia óptica e eletrônica. **Resultados:** A taxa de retorno a circulação espontânea (RCE) foi de 100%. Não houve diferenças no tempo de RCE e nas doses de adrenalina. O grupo fentanil necessitou de maior número de desfibrilações que o grupo DEX. Não houve diferenças nos valores de troponina entre os grupos. O índice cardíaco sofreu um aumento em relação ao estado basal nos grupos SEVO e FNT. O grupo DEX obteve uma redução do índice cardíaco quando comparado ao grupo FNT e grupo SEVO ao longo do experimento. Não foram observada diferença entre os grupos em relação ao número de células apoptóticas no miocárdio. A expressão de proteínas Bcl-2 não apresentou diferenças entre os grupos no tecido miocárdico e cerebral. A concentração de proteínas Bax no tecido cerebral foi maior no grupo DEX do que no grupo FNT. Não foi evidenciado diferenças na microscopia óptica e eletrônica do tecido miocárdico e cerebral. **Conclusão:** Neste modelo de parada cardíaca, a escolhas entre diferentes regimes anestésicos não conferiu diferenças na miocardioproteção, nem tão pouco na marcação de células apoptóticas e na expressão de proteínas reguladora de apoptose cardíacas. O uso de dexmedetomidina esteve associado a menores valores de índice cardíaco após o retorno a circulação espontânea.

Descritores: Proteção miocárdica; Parada Cardíaca; Suíno; Fentanil; Sevoflurano; Dexmedetomidina.

ABSTRACT

Brandão PGM. *Assessment of continuous use of anesthetics agents on the myocardial function in swine model of cardiac arrest*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: Myocardial dysfunction after cardiac arrest is a frequent event and imposes great morbidity and mortality. Recently, opioids and other anesthetic agents have been described as possible cardioprotectors. There have been few studies assessing its protective effects in cardiac arrest situations, precisely where myocardial protection is most useful. **Objectives:** The aim of this study is to evaluate the effect of continuous infusions of fentanyl, sevoflurane, dexmedetomidine on the myocardial function of pigs submitted to cardiac arrest. **Methods:** Twenty-four adult pigs were randomized and given continuous administration of sevoflurane, sevoflurane + fentanyl, sevoflurane + dexmedetomidine. Cardiac arrest was induced by intracardiac 9V alternating electric current. Eight minutes after the onset of cardiac arrest, the animals were defibrillated with 4J / kg, external cardiac massage was initiated and adrenaline 10µg / kg every 3 minutes was administrated. The return of spontaneous circulation was considered when MAP remained above 40 mmHg for more than 10 min. All data were analyzed using generalized estimation equations for repeated measurements, or ANOVA when indicated. Echocardiogram data, hemodynamic measurements and tissue perfusion, oxidative stress assessment, apoptosis regulation protein expression were evaluated. Indicators of myocardial, histological and serum lesions will also be evaluated. **Results:** The rate of return to spontaneous circulation was 100%. There were no differences in time to return to spontaneous circulation and adrenaline doses. The fentanyl group required more defibrillations than the dexmedetomidine (DEX) group. There were no differences in troponin values between groups. The cardiac index increased from baseline in the sevoflurane (SEVO) and fentanyl (FNT) group. The DEX group presented a reduction in cardiac index when compared to the FNT group and SEVO group throughout the experiment. There were no differences in apoptotic cells among groups by reduced terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). Bcl-2 protein expression showed no differences between groups in myocardial and brain tissue. Bax protein concentration in brain tissue was higher in the DEX group than in the TNF group. No differences were found in optical and electron microscopy. **Conclusion:** In a cardiac arrest model, the choice between different anesthetic regimens did not confer differences in myocardioprotection, nor in apoptotic cell labeling and cardiac apoptosis regulatory protein expression. Dexmedetomidine use was associated with lower cardiac index values after return to spontaneous circulation.

Descriptors: Myocardial protection; Cardiac arrest; Swine; Fentanyl; Sevoflurane; Dexmedetomidine.

1 INTRODUÇÃO

A parada cardíaca (PC) é um evento terminal que implica na redução do fluxo sanguíneo, isquemia e morte celular. O manejo imediato desta condição através da reanimação cardiopulmonar (RCP) apresenta resultados bastante desanimadores com taxas de alta hospitalar próximas a 10 a 12% em pacientes vítimas de PC extra-hospitalar (1). O retorno da circulação espontânea (RCE) promove o retorno do fluxo sanguíneo aos tecidos que, paradoxalmente, perpetua e amplia as áreas de lesão tecidual. Este quadro denominado de lesão por isquemia e reperfusão (I/R) promove uma sequência de mecanismos que resultam em disfunção orgânica e morte celular, ocasionando a síndrome pós-ressuscitação cardiopulmonar (SPRCP). Esta síndrome é caracterizada por lesão cerebral anóxica, disfunção miocárdica pós-ressuscitação (DMPR) e lesão de isquemia-reperfusão sistêmica, sendo responsável pela grande morbimortalidade em pacientes sobreviventes à PC (2).

A DMPR é um fenômeno bem reconhecido, caracterizado por aumento nas pressões de enchimento ventricular e queda no débito cardíaco no período pós-ressuscitação. Sugere-se que grande parte da DMPR seja decorrente de um atordoamento miocárdico (3). A intensidade da DMPR está correlacionada com o tempo para recuperação da circulação espontânea, quantidade de adrenalina administrada e número de desfibrilações realizadas (4). Múltiplos mecanismos têm sido atribuídos à DMPR, mas o seu preciso mecanismo é incerto. Assim, a ampliação do arsenal terapêutico visando à limitação ou à diminuição do atordoamento miocárdico pode ser eficaz em amenizar a DMPR e, potencialmente, diminuir o risco de óbito.

Diversas drogas utilizadas na prática clínica como sedativos ou anestésicos demonstraram algum grau de proteção miocárdica em situações de I/R (5). Dentre estas drogas, o fentanil, o sevoflurano, a dexmedetomidina e o propofol são os anestésicos mais recentemente estudados quanto a proteção

miocárdica durante situações de I/R, como ocorre após o RCE. Os mecanismos propostos para estes agentes são variados e envolvem o pré-condicionamento isquêmico, a proteção contra a citotoxicidade catecolaminérgica, a diminuição do estresse oxidativo ou a proteção molecular contra a lesão de I/R (5). No entanto, até o presente momento não está claro quais drogas apresentariam maior efeito benéfico para os pacientes vítimas de PC.

De um modo geral, pacientes críticos sobreviventes a uma PC são submetidos a diversas técnicas de sedação quando atendidos em unidades de emergência e de terapia intensiva (6, 7). Portanto, a utilização de fármacos sedativos com propriedades cardioprotetoras em estados de I/R, talvez, possa contribuir para a recuperação de pacientes críticos sobreviventes à PC.

Considerando os possíveis efeitos protetores do sevoflurano, fentanil e dexmedetomidina, hipotetizamos que a administração do sevoflurano associado a dexmedetomidina ou fentanil possa ampliar a proteção miocárdica em comparação ao uso de sevoflurano isoladamente, levando a uma diminuição da lesão miocárdica e redução da disfunção ventricular secundária à PC revertida. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é comparar os efeitos cardioprotetores das infusões contínuas de fentanil e dexmedetomidina associados a sevoflurano comparado à administração isolada de sevoflurano em suínos submetidos a PC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em pacientes com RCE, a grande morbimortalidade subsequente está relacionada a lesão neurológica e a disfunção miocárdica (2). Em especial, a DMPR é um fenômeno caracterizado por redução da função ventricular global e aumento das pressões de enchimento. Sugere-se que na DMPR, o principal desencadeador seja atordoamento miocárdico e a sua recuperação ocorra, em modelos animais, em até 48 horas (3).

Em 2002, Laurent et al. publicou dados hemodinâmicos de 165 pacientes que sofreram PC fora do ambiente hospitalar. Inicialmente, hipotensão e baixo índice cardíaco ocorreram nas primeiras oito horas, porém o quadro hemodinâmico passou de um estado de baixo débito cardíaco para um quadro similar ao choque séptico com valores normalizados de débito cardíaco e baixa resistência vascular periférica, sendo necessário uso de drogas vasoativas e infusão de fluidos durante as 72 horas após a PC. A intensidade da DMPR variou conforme o tempo para RCE, quantidade de adrenalina administrada e número de desfibrilações realizadas (4).

Yao et al. realizou uma análise retrospectiva de 190 pacientes sobreviventes à PC extra-hospitalar com análise por ecocardiograma nas primeiras 24 horas. Neste estudo a DMPR foi presente em 44% dos pacientes admitidos, contudo a presença de DMPR não foi determinante para o aumento da mortalidade ou pior desfecho neurológico (8).

2.1 FISIOPATOLOGIA DA DISFUNÇÃO MIOCÁRDICA PÓS-RESSUSCITAÇÃO

A fisiopatologia da DMPR é complexa e parcialmente compreendida, mas é evidente que esta disfunção reversível do miocárdico ocorre sobreposta a uma doença estrutural prévia, porém os gatilhos desencadeantes para a PC são conceitualmente distintos aos da DMPR e são considerados apenas como

fatores predisponentes (9). A fisiopatologia atribuída à DMPR apresenta três vertentes: a lesão induzida por I/R, disfunção mediada pelas citocinas e lesão miocárdica induzida por catecolaminas. Além disso, a DMPR apresenta características semelhantes a condições clínicas já bem identificadas como disfunção miocárdica pós-circulação extracorpórea, cardiomiopatia induzida por estresse e disfunção miocárdica induzida pela sepse(8, 10-12).

2.1.1 Lesão por isquemia e reperfusão

A lesão induzida por I/R é a responsável pela deterioração orgânica após a PC evoluindo para estados como a DMPR, choque e a disfunção múltipla de órgãos (13, 14). Muitos estudos em I/R focam em oclusão vascular em uma porção segmentar do tecido miocárdico, fazendo uma correlação com o infarto agudo do miocárdio (IAM), contudo é importante ressaltar que as lesões de I/R induzidas pela PC e pela circulação extracorpórea ocorrem em todo o tecido miocárdico, afetando globalmente a função sistólica e diastólica (9).

A isquemia durante a PC provoca a depleção da produção energética e resulta em acúmulo de ácido lático proveniente do metabolismo anaeróbio. A insuficiência energética leva a uma redução do funcionamento da bomba de Na^+/K^+, com consequente acúmulo de sódio intracelular e edema celular. O acúmulo de lactato intracelular, também resulta na piora progressiva do edema através do trocador de Na^+/H^+ (15, 16). O excesso de Na^+ intracelular favorece a entrada de cálcio através do trocador de Na^+/Ca^{++}, este acúmulo também é somado a disfunção da bomba de Ca^{++}-ATPase devido a depleção energética. A hipercalcemia intracelular desencadeia a ativação da calcineurina e iniciação da apoptose celular pela abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) (17).

O MPTP é um canal de grande condutância inativo na membrana mitocondrial, que pode ser ativado na presença de grandes concentrações de cálcio, fosfato ou radicais livres. Todos esses elementos estão presentes durante a reperfusão. A abertura deste portão causa o rompimento da membrana mitocondrial e a liberação de Citocromo C no citossol. Essa proteína ativa a cascata de Caspases dando início ao processo de apoptose celular(15).

2.1.2 Disfunção Miocárdica mediada por citocinas

A I/R após o RCE estimula a produção de uma grande quantidade de citocinas, desencadeando um quadro de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), mesmo na ausência de infecção. Os valores bastante elevados de citocinas foram, inclusive, capazes de predizer a necessidade de drogas vasoativas e a mortalidade de pacientes que foram reanimados após a PC. Essa analogia seja, talvez, a responsável pelas mortalidades tão altas nas síndromes de choque séptico e pós-parada cardíaca (18, 19). Assim como a sepse e a vasoplegia da circulação extracorpórea, o insulto inflamatório produz um estado de vasodilatação patológica, depressão miocárdica e disfunção múltipla de órgãos, todas essas condições são mediadas pela produção exacerbada de óxido nítrico via óxido nítrico sintase induzida (iNOS), além da ativação de polimorfonucleares, expressão de moléculas de adesão e liberação de citocinas como interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNFα) (20).

As citocinas inflamatórias apresentam propriedades de redução inotrópica no miocárdio, contribuindo para a redução da função sistólica e diastólica. O TNFα é uma das principais citocinas responsáveis pela redução de contratilidade miocárdica. Kumar et al. identificaram a redução de inotropismo em miócitos *in vitro*, a partir da exposição dessas células ao plasma de pacientes com choque séptico ricos em TNFα e interleucina-1 beta (21). A administração de bloqueadores de TNFα, como o infliximab, foi capaz de melhorar parâmetros hemodinâmicos e função miocárdica em modelo porcino de PC (22). Na área clínica as citocinas apresentam papel de destaque em pacientes com a DMPR. Os valores de interleucina-6 foram inversamente correlacionados com níveis de pressão arterial média em pacientes comatosos após o RCE, apresentaram correlação com a necessidade de drogas vasoativas nas primeiras 72 horas de internação e foram relacionados a pior desfecho clínico em pacientes vítimas de PCR extra-hospitalar (23, 24).

2.1.3 Disfunção cardíaca induzida por catecolaminas e desfibrilação

A epinefrina é um fármaco frequentemente utilizado durante a RCP (25) e os efeitos miocárdicos das doses preconizadas têm sido muito estudados (26). A epinefrina melhora a perfusão coronariana e cerebral durante as manobras de RCP, ao redirecionar o fluxo sanguíneo sistêmico para as circulações cardíaca e cerebral, devido à ação vasoconstritora periférica (27), e esse efeito é diretamente proporcional à dose utilizada (28). Por outro lado, a epinefrina também promove um aumento do consumo miocárdico de oxigênio e diminuição do débito cardíaco após a RCP (29). A epinefrina usada durante RCP pode contribuir para a síndrome pós-ressuscitação (26) e seu uso em altas doses (100 µg/kg) aumenta a mortalidade nas primeiras 24 horas, independentemente do tempo de ressuscitação, tanto em adultos (30) como em crianças (27). Parte deste efeito decorre de sua cardiotoxicidade que foi capaz de induzir apoptose em células do miocárdio (31).

Da Luz et al. desenvolveram um modelo de lesão miocárdica induzida por epinefrina em doses sucessivas de 20 µg/kg, essas doses foram suficientes para ocasionar um aumento nos valores séricos de troponina em relação ao grupo sham (32). Em estudo experimental realizado em coelhos sadios, a disfunção do VE foi observada com doses elevadas de epinefrina de 4-5 µg/kg/min (33,34). Essas mesmas altas doses de epinefrina, já estão bem estabelecidas como causadoras de cardiomiopatia mediado por estresse (Takotsubo), e seus efeitos podem ser amenizados com betabloqueadores, corroborando com a teoria de cardiotoxicidade catecolaminérgica (35,36).

A desfibrilação é um dos pilares no tratamento de PC quando esta ocorre por fibrilação ou taquicardia ventricular (37). Apesar disso, quanto maior o número de desfibrilações, maior a maior incidência de DMPR (8). O mecanismo responsável por esse efeito deletério da desfibrilação não está bem elucidado, acredita-se que a energia resultante da desfibrilação possa ocasionar um aumento da temperatura e exacerbar as lesões, já presentes, decorrentes do insulto isquêmico (14,38).

2.2 CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA POR ANESTÉSICOS

Em 1986, Murry et al. encontraram aumento da resistência miocárdica ao insulto isquêmico após breves ciclos de I/R, que antecederam à lesão isquêmica final, resultando em diminuição da área de necrose e diminuição da depleção dos estoques de adenosina trifosfato (ATP), quando comparados ao grupo controle. Este efeito protetor foi denominado pré-condicionamento isquêmico (39). Em 2003, Zhao e colaboradores encontraram o efeito de pós-condicionamento isquêmico, no qual após um longo insulto isquêmico, foram realizados curtos períodos de I/R. Estes ciclos desencadearam mecanismos adaptativos capazes de reduzir o aumento do dano tecidual provocado pela reperfusão (40).

Várias drogas foram estudadas para avaliar os efeitos cardioprotetores em situações de I/R. Do ponto de vista clínico, a possibilidade de induzir farmacologicamente estados de pré-condicionamento e pós-condicionamento, atingir os mesmos efeitos benéficos de redução de disfunção ventricular e redução de arritmias, sem a necessidade de exposição do miocárdio a uma restrição do fluxo sanguíneo é muito interessante no caminho para descobrir novas terapias para síndromes de pós-parada cardíaca, a DMPR e a disfunção múltipla de órgãos.

2.2.1 Anestésicos halogenados

A primeira descrição dos efeitos cardioprotetores induzidas por halogenados foi em 1976. Bland e Lowestein descreveram efeitos protetores induzidos pelo halotano em cães submetidos a lesões isquêmicas pelo clampeamento da artéria coronária, quando avaliadas alterações do segmento ST durante períodos curtos de isquemia (41).

Os mecanismos exatos da proteção exercida pelos halogenados não estão esclarecidos. Os efeitos de pré-condicionamento isquêmico anestésico precoce (1-2 horas) são estabelecidos nos efeitos dos halogenados nos canais de potássio dependentes de ATP, de maneira muito similar ao pré-condicionamento isquêmico. No entanto, os efeitos tardios (72 horas) são desencadeados por

proteínas mediadoras, como a proteína G intracelular que ativa a fosfolipase C e D, estas responsáveis pela síntese de inositol-trifosfato e que por sua vez libera cálcio no retículo endoplasmático (42).

Durante pré-condicionamento anestésico, ocorrem a ativação de diversos receptores: Adenosina (A_1 e A_2), acetilcolina (M_2), α_1 e β_2 adrenérgicos, angiotensina II e opioides. Além disso, modelos animais de pré-condicionamento anestésico comprovaram atenuação da ativação de células NK e sua expressão gênica (42). Qiao et al. descreveram os efeitos do pré-condicionamento anestésico tardio via ativação de proteínas NFκB, na regulação da autofagia e atenuação da expressão de TNF-α, interleucina -1β e caspase 3 (43).

Estudos experimentais de PC também corroboram os efeitos cardioprotetores dos anestésicos inalatórios. Knapp et al. demonstrou que o uso de sevoflurano administrado anteriormente à PC, durante a reanimação e após RCE , estava associado a melhor inotropismo 24 horas após a lesão isquêmica em ratos (44). Já o estudo de 2017 realizado por Secher et al. não evidenciou diferenças nas taxas de RCE, porém os animais do grupo sevoflurano apresentaram menor tempo de parada cardíaca, menor número de doses de adrenalina durante a reanimação e valores maiores de pressão de perfusão coronariana (45).

Os efeitos de pós-condicionamento do sevoflurano na PC foram avaliados por Meybohm et al. em um modelo de porcino, cujo objetivo era mensurar os efeitos cardioprotetores do sevoflurano em comparação ao propofol. Os resultados indicam um efeito cardioprotetor do sevoflurano, tanto na incidência de lesão tecidual demonstrada pelos valores menores de troponina, quanto resultados do ponto de vista funcional e com valores ecocardiográficos melhores após RCE. Os benefícios abrangem uma redução nos valores de citocinas inflamatórias e redução de apoptose no tecido miocárdico (46).

2.2.2 Opioides

Os opioides estão em um conjunto de drogas que apresentam mecanismos primordiais na cardioproteção. Os seus receptores estão envolvidos em vários mecanismos adaptativos e protetores de estresse orgânico, dentre eles, a hibernação dos mamíferos, cujo objetivo é a redução do metabolismo basal em estados de privação de alimentos e hipotermia, este estado pode ser induzido por opioides via receptor DOR. Os receptores opioides também participam nos processos de apoptose, aumento do limiar arritmogênico, disfunção contrátil e inflamação. Todas essas características são fundamentais para o desfecho favorável à lesão por I/R (47).

O tecido miocárdico apresenta uma alta concentração de receptores opioides e durante o insulto isquêmico ocorre um aumento na produção e liberação de opioides, corroborando para o papel neuroendócrino do tecido miocárdico (48-50). Ademais, alguns modelos experimentais *in vitro* têm demonstrado efeitos cardioprotetores do fentanil, um opioide potente, com ação antiarrítmica e anti-isquêmica (51-53). A cardioproteção proporcionada pela administração sistêmica de opioides parece envolver mecanismos centrais, por meio do bloqueio da atividade simpática (54), e periféricos, nas células endoteliais, ao promover vasodilatação através de liberação de óxido nítrico (55). Em 1995, Schultz e cols. (33) demonstraram, em ratos, que o pré-condicionamento tem a participação de receptores opioides e que antagonistas, como a naloxona, são capazes de bloquear ou até mesmo reverter esse efeito. Em modelo experimental com coração isolado de coelhos, o fentanil reduziu a lesão miocárdica após 30 minutos de isquemia global seguidos de 120 minutos de reperfusão (34, 53, 56).

Há poucos ensaios clínicos sobre o efeito cardioprotetor dos opioides nos cenários mais comuns de lesão por I/R, contudo o estudo de da Luz e colaboradores confirmaram o efeito protetor do fentanil no tecido miocárdico em um modelo de lesão catecolaminérgica em um modelo porcino (32). Dentro desse contexto fisiopatológico, o papel dos opioides na atenuação da lesão tecidual induzida pela PC também deve ser estudado, já que até o presente momento não há estudos clínicos ou experimentais sobre os efeitos dos opioides frente a lesão induzida pela PC.

2.2.3 Dexmedetomidina

Estudos recentes têm demonstrado que a dexmedetomidina, um agonista altamente específico para receptores α_2, tem um possível efeito pré-condicionante no tecido miocárdico. A dexmedetomidina foi capaz de diminuir a área de isquemia em miocárdios submetidos à isquemia global e regional, além de causar uma redução do fluxo sanguíneo para as artérias coronárias (57). Este fato foi evidenciado em uma metanálise publicada em 2008, no qual a dexmedetomidina mostrou uma tendência a diminuir os desfechos miocárdicos, como infarto do miocárdico e mortalidade geral em cirurgias não cardíacas (58). Já em uma metanálise mais recente com 14 estudos, o uso de dexmedetomidina em pacientes de cirurgia cardíaca foi associado a menor incidência de arritmias ventriculares e a menor incidência de delirium (59).

Estudos experimentais encontraram efeitos benéficos da dexmedetomidina na lesão de I/R. Dong et al. identificaram uma redução na lesão miocárdica em ratos idosos submetidos a ligadura da artéria coronariana esquerda. Estes efeitos seriam decorrentes da redução do consumo de oxigênio e por efeitos antioxidantes (60). Contudo, o estudo realizado por Mimuro e colaboradores em corações isolados de ratos encontrou uma piora na área de infarto nos grupos que receberam dexmedetomidina pós-condicionamento, e esta lesão foi revertida com uso de um antagonista α_2-adrenérgico.

Poucos estudos avaliaram o efeito da dexmedetomidina sobre a DMPR. Um estudo feito em porcos evidenciou que o uso da dexmedetomidina durante a reanimação poderia causar uma redução da atividade simpática no período pós-ressuscitação e menor incidência de DMPR. O grupo de animais que foi submetido à dexmedetomidina usado no primeiro minuto de PC apresentou uma menor diminuição no débito cardíaco no período pós-ressuscitação, quando comparados com os animais que receberam placebo (61).

De modo geral, pacientes críticos em RCE em unidades de terapia intensiva são submetidos à sedação com a escolha da droga dependente do serviço ou mesmo do intensivista, podendo ser utilizadas várias drogas e suas combinações. Considerando-se os possíveis efeitos protetores respectivos de

fentanil, halogenados e dexmedetomidina, hipotetizamos que a administração de dexmedetomidina e fentanil associados a sevoflurano poderiam conferir uma proteção adicional ao tecido miocárdica comparado ao sevoflurano isoladamente, com diminuição da disfunção ventricular secundária à PC e à RCP com uso de altas doses de adrenalina e repetidas desfibrilações.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Comparar possíveis efeitos aditivos miocardioprotetores das infusões respectivas de fentanil e dexmedetomidina associados a sevoflurano comparados à administração isolada de sevoflurano em um modelo suíno de PC submetidos a RCP.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a influência da técnica sedativa sobre as variáveis hemodinâmicas, metabólicas, e marcadores de apoptose desencadeadas pela PC no tecido miocárdico.

4 MÉTODO

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (28/2015) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), o presente estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Anestesiologia (LIM 08), e no Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM12) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram avaliados 33 suínos do sexo masculino, pesando entre 25 a 30 kg, das raças Large White e Landrace, adquiridos de criadouros selecionados. Os animais foram submetidos a jejum alimentar por oito horas e com livre acesso à água. Todos os animais foram tratados respeitando-se as normas éticas para experimentos em animais propostas pelo Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação (COBEA).

4.1 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Os animais foram sedados com midazolam (0,25 mg/kg) e cetamina (0,5 mg/Kg) por via intramuscular e, após acesso venoso em uma das orelhas com cateter 20G (Abbocath Tplus –Abott, São Paulo, Brasil), foi realizada a indução anestésica intravenosa com propofol (4 mg/Kg). A hipnose foi mantida com administração da droga em estudo para a sedação (diferente em cada um dos grupos, como descrito adiante). O relaxamento neuromuscular foi induzido com infusão contínua de pancurônio (5 µg/kg/min) e a hidratação venosa mantida com solução de ringer lactato (5 ml/kg/h).

Após intubação orotraqueal os animais foram submetidos à ventilação em circuito semifechado no aparelho de anestesia Primus® (Dräger Medical, Lubeck, Alemanha), em ventilação controlada mecânica, utilizando-se fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 50%, volume corrente de 8 ml/kg, pausa inspiratória de

10% do tempo inspiratório. O modo ventilatório utilizado foi volume controlado com PEEP (pressão positiva no final da expiração) de 05 cmH_2O, objetivando-se manter capnometria entre 35 e 45 mmHg. Durante o período de PC sem RCP, definido em 8 minutos, os animais não receberam ventilação mecânica. Já na RCP, os animais foram ventilados com oxigênio a 100%. Após a PC, os animais foram ventilados com fração inspirada de oxigênio suficiente para manter uma saturação periférica de oxigênio acima de 94%.

4.2 PREPARO

Após intubação orotraqueal, foi realizada anestesia local com 05 ml de lidocaína a 1% sem vasoconstritor nos pontos de cateterização. Um cateter de polietileno (Abbocath T plus) de calibre 20G foi introduzido por dissecção da artéria femoral para coletas de amostras de sangue para a realização dos exames laboratoriais e aferição da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM). O débito urinário foi aferido através de cistostomia cirúrgica.

A veia jugular interna direita foi dissecada para a introdução do cateter de Swan-Ganz 7F (Swan Ganz Thermodilution Catheter Model 131HF7 – Edwards Healthcare Corporation, EUA).

Após posicionamento adequado do cateter, confirmado pelo aspecto morfológico da curva de pressão obtida, foi realizada a monitorização contínua da pressão de artéria pulmonar (PAP média, sistólica e diastólica), da saturação venosa de oxigênio (SvO_2) e do débito cardíaco (DC) com o uso do Monitor Edwards Vigilance II (Edwards Lifesciences, EUA). Foi realizada e anotada igualmente a pressão de oclusão da artéria pulmonar (PoAP) nos tempos determinados abaixo, junto com os demais parâmetros. Este cateter também possibilitou a aferição da temperatura durante todo o experimento.

O transdutor ecocardiográfico foi introduzido no esôfago, sendo mantido durante o experimento para medir o volume do ventrículo esquerdo e estimar sua função sistólica e diastólica (Envisor C HD, com transdutor 7,5/5,0 MHz Omniplane II T6210 transducer, Philips, EUA).

4.3 MONITORIZAÇÃO

Os animais foram submetidos à monitorização multiparamétrica contínua com eletrocardiografia, pressão arterial sistêmica, oximetria de pulso posicionado na cauda, analisador de gases acoplado ao aparelho de anestesia que forneceu de forma contínua a concentração inspirada e expirada dos gases oferecidos, além da capnografia.

A fração de ejeção do VE e demais parâmetros cardíacos foram monitorizados por ecocardiografia transesofágica durante o experimento em tempos determinados.

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Após o período de indução e monitorização, foi estabelecido um intervalo de 60 minutos para a estabilização do animal e, então, realizado a coleta de uma gasometria arterial inicial, excluindo-se do estudo os animais com $PaO_2/FiO_2 < 400$, por risco de presença de doença respiratória pulmonar no animal. Neste caso, os animais excluídos da pesquisa seriam sacrificados em plano profundo anestésico.

Após essa etapa inicial, foi realizada a coleta da primeira série (Basal) dos parâmetros hemodinâmicos, gasométricos, ecocardiográficos e laboratoriais:

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Imediatamente após o preparo, iniciou se o protocolo de sedação do animal previamente randomizado (www.randomizer.org). Para a manutenção da alocação sigilosa e a ordem da randomização, envelopes lacrados e devidamente numerados por uma pessoa não participante do projeto foram feitos.

- Grupo Sevoflurano (Grupo SEVO - Controle): Animais submetidos, após a indução anestésica, a administração de Sevoflurano, iniciado a 2,2% (0,5 CAM) por um período de uma hora antes da PC e por 6 horas após o retorno da circulação espontânea (62);
- Grupo Fentanil (Grupo FNT): Animais submetidos, após a indução anestésica, a administração de sevoflurano (2,2%) associado a uma infusão em bolus de fentanil 10 µ/kg seguido de infusão contínua a 0,005% de 20 µg/Kg/h por um período de uma hora antes da PC e por 6 horas após o retorno da circulação espontânea (62);
- Grupo Dexmedetomidina (Grupo DEX): Animais submetidos, após a indução anestésica, a administração de sevoflurano (2,2%) associado a uma infusão em bolus de 1 µg/kg seguido à administração contínua de Dexmedetomidina 0,001%, iniciado em 0,5 µg/kg/h por um período de uma hora antes da PC e por 6 horas após o retorno da circulação espontânea (63).

O tempo de análise após o RCE para este estudo foi definido em seis horas. Este tempo foi determinado para que ocorresse a completa reperfusão dos tecidos e para detecção de marcadores bioquímicos de lesão miocárdica (64). Todos os animais receberam infusão contínua de solução de ringer lactato (5 ml/kg/h).

4.6 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Após a indução anestésica, alocação, monitorização, estabilização do animal e coleta das amostras sanguíneas, conforme descrito acima, a PC foi induzida em fibrilação ventricular, utilizando-se uma descarga elétrica de corrente alternada de 9 V, 60 Hz em um cateter intracardíaco (LiveWire, St. Jude Medical, Estados Unidos), que foi introduzido na veia jugular interna e impactado na parede interna do ventrículo direito.

Imediatamente após confirmação eletrocardiográfica e ausência de onda de pulso arterial no início da fibrilação ventricular, foram descontinuadas a ventilação mecânica e a administração de drogas e fluidos.

O tempo de isquemia proposto para este estudo foi de 8 minutos, baseado em estudos prévios realizados em modelo suíno (64, 65).

Após 8 minutos de PC sem manobras de reanimação, foi realizada uma desfibrilação ventricular bifásica com carga de 4J/kg (Responder 2000, GE Medical Systems, Hannover, Alemanha), e a seguir foi iniciado um ciclo de 3 minutos de massagem cardíaca externa (MCE). Durante este ciclo foi administrada a primeira dose de adrenalina (10 µg/kg) sendo repetidos a cada 3 minutos. A MCE foi realizada manualmente, com frequência 100 a 120 compressões por minuto, sendo o responsável pela RCP trocado a cada 3 minutos. A qualidade da RCP foi avaliada pela pressão arterial diastólica, tendo como meta a sua manutenção acima de 20 mmHg durante a RCP, além da $EtCO_2$ entre 10 e 20 mmHg (37).

O ritmo cardíaco foi reavaliado a cada 3 minutos e novos choques bifásicos de 6 J/kg foram administrados quando verificado indicação.

Durante a RCP, a ventilação foi manual, com frequência de 6-8 incursões por minuto, buscando um volume corrente expirado próximo a 10 ml/kg e fração inspirada de oxigênio de 100%.

Caso houvesse refratariedade às manobras de RCP após 20 minutos do seu início, os esforços para a ressuscitação eram cessados e era confirmado o óbito do animal.

O RCE foi considerado quando a PAM estivesse acima de 40 mmHg por mais de 10 minutos, sendo este momento considerado como T10 e a partir deste momento, era reiniciada a infusão das drogas anestésicas, de acordo com a alocação do estudo.

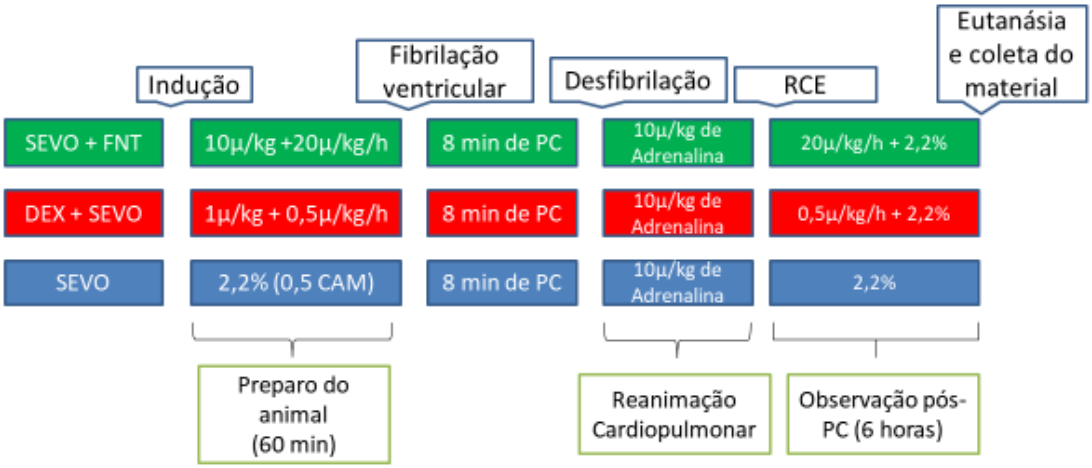


Figura 1 - Sequência Experimental

4.7 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA, METABÓLICA E DO TRANSPORTE DE OXIGÊNIO

Os parâmetros frequência cardíaca, pressão arterial média, saturação venosa de oxigênio, débito cardíaco, temperatura, pressão pulmonar média, pressão de oclusão de artéria pulmonar foram coletados no momento inicial (basal) e nos tempos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 minutos após o RCE e a estabilização da PAM acima de 70 mmHg.

4.7.1 Parâmetros hemodinâmicos indiretos

Após a captação dos dados hemodinâmicos diretos, foi calculado o índice cardíaco (IC), pela seguinte equação:

Índice cardíaco (IC) = Débito cardíaco (DC)/superfície corpórea (L/min/m^2);

Para o cálculo da superfície corpórea (SC) do porco foi empregada à equação:

$SC = K.P^{2/3}$, onde:

K = constante igual a 0,09 para animais acima de 4Kg

P = peso do porco em quilogramas

4.8 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

A avaliação ecocardiográfica foi realizada através de um sistema de ultrassonografia (Envisor C HD, Philips, EUA) com transdutor transesofágico de 7,5/5,0 MHz posicionado em plano anestésico profundo e mantido transesofágico durante todo experimento. A avaliação ecocardiográfica foi realizada no tempo basal e nos tempos 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após o RCE.

4.8.1 Imagens

As imagens foram estudadas em relação às seguintes posições: (a) transdutor na região gástrica (dentro do estômago), foram realizados cortes transversais e longitudinais do ventrículo esquerdo; (b) recuando o transdutor até a porção média do esôfago para a imagem das quatro câmaras do coração; (c) com o transdutor na base do coração, foram visualizados o átrio direito e esquerdo, a valva aórtica e o tronco da artéria pulmonar.

4.8.2 Análise da função ventricular

A função ventricular foi avaliada por meio da análise quantitativa do ventrículo esquerdo (VE) e direito (VD), seguindo as recomendações da ASE/SCA – American Society of Echocardiography / Society of Cardiovascular Anesthesiologists. Foram analisadas a fração de ejeção (FE), o volume diastólico final do ventrículo esquerdo (EDV), o volume sistólico final do ventrículo esquerdo (ESV), área do ventrículo esquerdo durante a sístole (LVSA), área do ventrículo esquerdo durante a diástole (LVDA), volume diastólico final do ventrículo direito (VD VDF), área ventricular direita (VD AREA).

4.9 AVALIAÇÃO VENTILATÓRIA

A avaliação ventilatória foi realizada por meio de monitorização contínua dos dados fornecidos diretamente pelo aparelho de anestesia Primus® (Dräger Medical, Lubeck, Alemanha), sendo coletada no tempo basal e após o RCE nos tempos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 minutos após o RCE. Os dados

4.10 AVALIAÇÃO LABORATORIAL E GASOMÉTRICA

4.10.1 Troponina-I

A lesão miocárdica foi mensurada pela dosagem da troponina I sérica, através do método de quimioluminescência automatizada. A amostra foi obtida no tempo basal, T60 e T360. O material foi encaminhado ao laboratório do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. A determinação quantitativa de Troponina I foi realizada por meio de imunoensaio tipo sanduíche efetuado em três etapas, utilizando o método de quimioluminescente direta e quantidades constantes de dois anticorpos monoclonais. Um reagente auxiliar para reduzir a ligação não específica foi utilizado. Para este método, foi utilizado o kit comercial ADVIA Centaur® TnI-Ultra (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, Nova York, Estados Unidos da América) em equipamento automatizado da mesma marca.

4.10.2 Gasometria arterial e venosa mista

Foram coletadas amostras de sangue arterial e venoso misto (1,6 ml) no tempo basal e nos tempos 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após o RCE para a aferição de pH, PaO2, PCO2, excesso de bases e bicarbonato. As coletas de sangue venoso misto para a obtenção dos valores de PvO_2 e SvO_2 foram realizadas através da extremidade distal do cateter da artéria pulmonar.

As amostras foram coletadas em seringas heparinizadas (BD Preset, Becton, Dickinson and Company) e vedadas para evitar o contato do sangue com o ar ambiente. O exame de cada amostra foi realizado em um analisador de pH e gases sanguíneos (ABL 800 Flex, Radiometer). Este aparelho também aferiu os valores de sódio, potássio, glicemia e lactato.

4.11 ESTUDO ANATOMO-PATOLÓGICO

Após o período de observação de 360 min, os animais foram eutanasiados em plano anestésico profundo com injeção intravenosa de 10 ml de cloreto de potássio a 19,1%; o cérebro, o coração e os pulmões foram retirados em bloco e fragmentos de 1 cm^2. Foram imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0. Após esta etapa, os fragmentos foram desidratados em gradiente alcoólica (70ºa 100º), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Dos blocos contendo os fragmentos serão obtidos cortes de 5µm em micrótomo para a realização de estudos morfológicos, imunoistoquímicos e morfométricos.

4.11.1 Microscopia óptica

Para a avaliação de necrose miocárdica foram preparadas lâminas em Hematoxilina–Eosina (HE) após o preparo das peças em parafina e analisadas com microscópio óptico. A coloração pelo método da Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada após os cortes histológicos serem desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (100ºa 70º) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Os cortes foram então lavados em água corrente e contra corados com eosina durante quinze minutos; a seguir, lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95ºe 100º), diafanizados em xilol e montados com lamínula e entellan para análise microscópica.

A análise foi realizada sob aumento de 100x. A necrose foi identificada através de características do núcleo (picnose e cariólise) e pelo aspecto do citoplasma (contração de bandas, presença de vacuolização e hipereosinofilia).

A necrose dos cardiomiócitos foi estimada pela razão entre o número de células com alterações nucleares e/ou citoplasmáticas e a área do miocárdio (células/mm^2) (66).

4.11.2 Tunel

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling in TUNEL (Roche – In Situ Cell Death Detection Kit, POD – cat. N. 11 684 817 910). O TUNEL foi utilizado para identificar as células cardíacas em apoptose. Os tecidos armazenados em formol foram processados e emblocados em parafina e os cortes dos tecidos foram colocados em lâminas silanizadas.

O processo de desparafinização foi feito ao colocar as lâminas em estufa a 60-65°C, durante 30 minutos e em seguida 3 banhos no xilol, 9 minutos em cada banho. Para hidratação do corte, as lâminas foram banhadas em álcool absoluto 2 vezes por 5 minutos, em seguida mais dois banhos por 3 minutos em álcool 80-96%. Para finalizar esta etapa as lâminas foram lavadas em água destilada e em seguida lavadas 3 vezes em tampão fosfato pH 7,4 (PBS).

O passo seguinte foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada pela proteinase K em temperatura ambiente por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com H_2O_2 3% em metanol por 30 min a temperatura ambiente e lavado 3 vezes em PBS. Em seguida as lâminas foram incubadas com 50µl da mistura da reação de TUNEL (5µ da solução de Enzima + 45µl da solução tampão) na câmara úmida a 37°C (estufa) por 60 minutos. Após esta etapa as lâminas foram incubadas com o conversor de peroxidase em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e posteriormente lavado 3 vezes em PBS. Foi utilizado o cromatógeno diaminobenzidina (DAB) onde as lâminas foram incubadas por 10 minutos e a contra-coloração foi com o verde de metila.

As lâminas foram analisadas com contagem manual, em microscópio de luz com aumento 100x. Foram avaliados 30 campos por lâminas com amostras do ventrículo esquerdo, sendo a análise realizada de forma cega. Foi calculada a média para cada lâmina e para cada grupo.

4.11.3 Microscopia eletrônica de transmissão

O material utilizado na obtenção de cortes ultrafinos foi constituído por pequenos fragmentos de coração contendo miocárdio.

1. Os fragmentos permaneceram na solução fixadora de glutaraldeído 2,0% dissolvidos em tampão cacodilato de sódio 0,1M de pH 7,2, durante 2 horas na geladeira.
2. A seguir o material foi lavado em uma solução contendo tampão cacodilato de sódio 0,1M de pH 7,2 e sacarose 0,2M, durante 1 hora também na geladeira.
3. O material foi, então, pós-fixado em uma solução de OsO4 a 1,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1M de pH 7,2, durante 1 hora na geladeira.
4. Lavagem novamente na solução descrita no item 2. e em seguida desidratação em gradiente de etanol durante 1 hora.
5. A etapa de pré-embebição consiste de passagens em misturas de etanol e resina (1:1, 1:2, 1:3) durante 3 horas e a embebição em resina pura durará 24 horas.

Após 72 horas de secagem, os blocos foram cortados em um ultramicrótomo LKB (Modelo 8800 Ultratome III), e foram obtidos cortes semifinos (1µm) utilizando facas de vidro, e corados a quente (a aproximadamente 70ºC) em solução de Azul de toluidina (1,25 g de carbonato de sódio; 0,50 g de azul de toluidina O; 50 ml de água destilada).

Cortes ultrafinos, prateados, com aproximadamente 70nm de espessura, foram obtidos no mesmo ultramicrótomo, porém utilizando facas de diamante, estes foram contrastados por acetato de uranila a 2,0%, durante 30 minutos e por citrato de chumbo a 0,5%, durante 10 minutos.

Os cortes ultrafinos foram estudados e micrografados em microscópio eletrônico Jeol 1010 para avaliação de alterações estruturais nas mitocôndrias e microfibrilas.

4.12 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE APOPTOSE POR MEIO DE WESTERN BLOTTING

Amostras de tecido miocárdico foram coletadas e congeladas a -80 °C para posterior realização de *western blotting*. A preparação do concentrado de proteínas foi iniciada com a homogeneização as amostras (Polytron PT 10-35, Kinematica, Suíça) em solução de K-Hepes (200 mM manitol, 80mM HEPES, 41 mM KOH; pH 7,5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, MO, EUA). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 4000 g por 30 minutos a 4 °C para remoção de debris celulares, e o sobrenadante foi avaliado quanto à concentração de proteínas pelo método de Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific).

O *western blotting* foi utilizado para investigar a expressão das seguintes proteínas: proteína anti-apoptótica Bcl-x e pro-apoptótica Bax (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida a 12% para Bcl-x e Bax. Após a transferência das proteínas para a membrana de PVDF (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, UK), os *blots* foram tratados com leite em pó desnatado 5%, diluído em TBS-T por 1 hora e incubados com anticorpos específicos para Bcl-x (1:500) e Bax (1:500). As marcações foram realizadas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (anti-goat 1:10000, anti-mouse 1:2000), respectivamente (Sigma, St. Louis, MO, EUA), visualizadas utilizando-se o sistema de quimiluminescência (Amersham ECL Western Blotting Detection, GE Healthcare, UK) e reveladas utilizando Alliance 4.2 (Uvitec, UK). A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com o anticorpo para GAPDH (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA). A semiquantificação das bandas obtidas nos filmes foi realizada por densitometria (Scion Image for Windows, IBM, NY, EUA) e normatizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização do GAPDH.

4.13 MEDIDAS DE SUBSTÂNICAS OXIDANTES REAGENTES AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A peroxidação lipídica gera substâncias reativas com o oxigênio. Algumas delas possuem afinidade com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malondialdeído. As concentrações plasmáticas de TBARS foram determinadas usando o método calorimétrico do ácido tiobarbitúrico. Uma amostra de plasma foi diluída em água destilada. Imediatamente, foi adicionado 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 17,5%, em seguida, 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,6%, pH 2. As amostras foram colocadas em água fervente por 15 minutos e a seguir resfriadas e, adicionado por último, 1 ml de TCA a 70%. As amostras a seguir foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante lido no espectrofotômetro com λ de 534 nm contra reagente branco. A concentração dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada por meio do coeficiente de extinção molar equivalente para malondialdeído (MDA equivalente), de 1,56x105 M-1 cm-1. Os níveis de TBARS plasmáticos foram expressos em nmol/ml.

4.14 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

O experimento teve duração total aproximada de 540 minutos e ocorreu de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Delineamento do Experimento

Tempos	Medidas Hemodi-nâmicas	Avaliação Ventilatória	Avaliação Ecocardiográfica	Avaliação Gasométrica	Dosagens Laboratoriais	Estudo Anatomopatológic, Estresse Oxidativo e Western Blotting
Basal	X	X	X	X	X	
0	X	X	X	X	X	
10	X	X		X		
20	X	X		X		
30	X	X	X	X	X	
40	X	X				
50	X	X				
60	X	X	X	X	X	
90	X	X				
120	X	X	X	X		
150	X	X				
180	X	X	X	X	X	
210	X	X				
240	X	X	X	X		
270	X	X				
300	X	X	X	X		
330	X	X				
360	X	X	X	X	X	X

Avaliação Hemodinâmica:	Frequência Cardíaca, Pressão Arterial Média, Saturação Venosa mista de Oxigênio, Débito Cardíaco, Temperatura, Pressão de Artéria Pulmonar, Pressão de Oclusão de Artéria Pulmonar, Variação do Volume Sistólico
Avaliação Ventilatória:	Pressão de pico, Pressão média, Volume Minuto, Volume Inspirado, Volume Expirado, Complacência Pulmonar, Gás Carbônico Expirado, Fração Inspirada de Oxigênio, Fração Inspirada de Sevoflurano (se aplicável)
Avalição Ecocardiográfica:	Análise quantitativa dos ventrículos, Fração de Ejeção, Volume diastólico final do Ventrículo Esquerdo (VE), Volume Sistólico final do VE, Área do VE durante a Sístole, Área do VE durante a diástole, Volume diastólico final do VD, Área do VD
Avaliação Gaso métrica:	Pressão Parcial de Oxigênio no Sangue Venoso e Arterial, Saturação Arterial e Venosa Mista, Pressão Parcial de Gás Carbônico Arterial e Venosa.
Avaliação Laboratorial:	Lactato, Hematócrito, Hemoglobina, Glicemia, Sódio e Potássio
Estudo Anatomopatológico e Estresse Oxidativo:	Microscopia Ótica e Imuno-histoquímica
Western Blott e TBARS	Expressão das seguintes proteínas, anti-apoptótica Bcl-x e pro-apoptótica Bax. Dosagem de estresse oxidativo

4.15 DESCARTE DE ANIMAIS

O descarte das carcaças foi feito de acordo com as recomendações do Grupo de Gerenciamento de Resíduos da FMUSP, devidamente acondicionados e identificados para posterior encaminhamento ao setor de coleta de resíduos infectantes da instituição.

4.16 CÁLCULO AMOSTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi obtido a partir do valor da troponina após a parada cardíaca (67) e foi calculado pelo software G power, terceira versão (68, 69) . Seis animais por grupo foram necessários para uma diferença de 15% entre os grupos, com um erro tipo 1 (α) de 0,05 e um poder de 0,80 para um teste bicaudal. Contudo, pensando em possíveis perdas, foram acrescentados dois animais, totalizando oito animais em cada grupo. As variáveis foram apresentadas em média ± desvio padrão. As variáveis contínuas de mensuração repetidas e de distribuição não normal foram analisadas usando Equações de Estimativa Generalizadas (GEE) comparando os grupos, o tempo e a interação (70). As variáveis não repetidas e de distribuição não normal foram analisadas com o teste de Kruskal-Wallis, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Significância estatística será definida com $p<0.05$. Todas as análises foram conduzidas utilizando o aplicativo R versão 3.5.3 e com complemento Geepack (71-73), e os gráficos foram feitos com o software Graphpad, La Jolla Califórnia USA, oitava versão.

5 RESULTADOS

O estudo foi realizado em 30 animais. A amostra selecionada para inclusão na análise do estudo foi de 24 animais. Três animais foram descartados por falha na técnica de reanimação cardiopulmonar (trauma torácico e trauma hepático confirmado por presença de hemorragia), três animais foram excluídos por apresentarem sinais de patologias pulmonares e infecciosas anteriores ao início do experimento.

5.1 PESOS DOS ANIMAIS

O peso médio dos animais, com seu respectivo desvio padrão, foram de 26,7±2,4 kg no grupo Sevo, 25,5±2,3 kg no grupo Fentanil e de 25,5±1,5 kg no grupo Dexmedetomidina, sendo que não houve diferença entre os grupos (p=0,4699).

5.2 TROPONINA

No presente estudo, houve um aumento nos valores de troponina, tanto no momento T60 quanto no momento T360 quando comparados ao estado basal nos respectivos grupos. Não houve diferenças entre os grupos (p=0,0556).

GEE			
Variável	**X^2 Wald**	**Df**	**P-valor**
Troponina			
Grupo	5,80	2	0,0556
Tempo	12,81	2	0,0017
Grupo*Tempo	8,40	4	0,0779

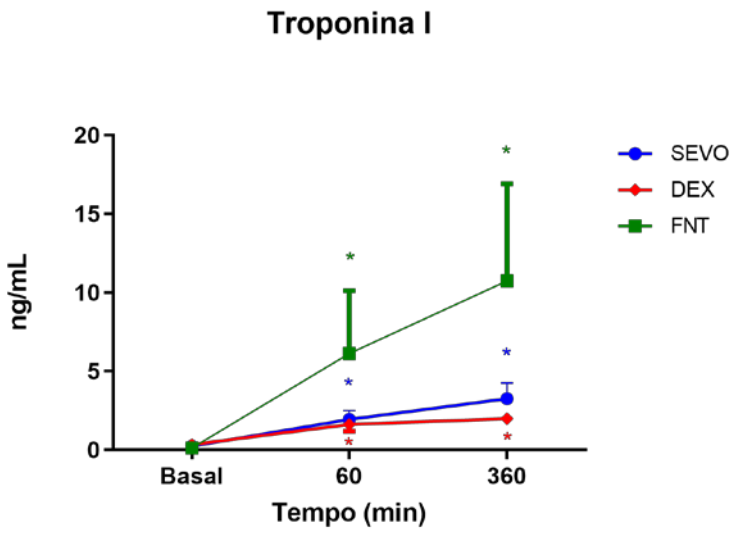


Figura 2 - Troponina I sérica dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo

5.3 REANIMAÇÃO CARDIOPULMONAR

5.3.1 Taxa e Tempo de RCE

A taxa de RCE foi de 87%. Não houve diferença no tempo para retorno a circulação espontânea entre os grupos estudados.

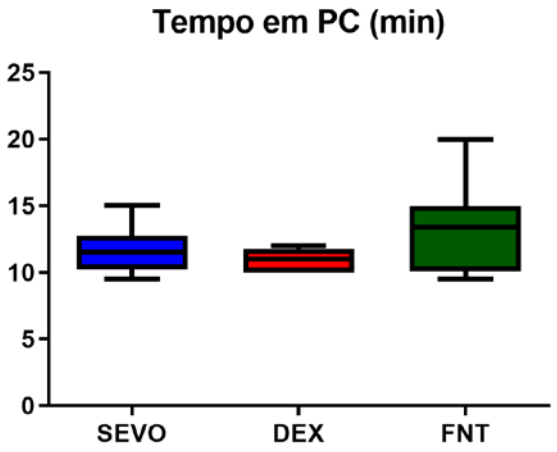


Figura 3 - Tempo para retorno a circulação espontânea dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar

5.3.2 Doses de adrenalina

Durante o experimento não houve diferenças entre o número de doses de adrenalina (p=0,1478).

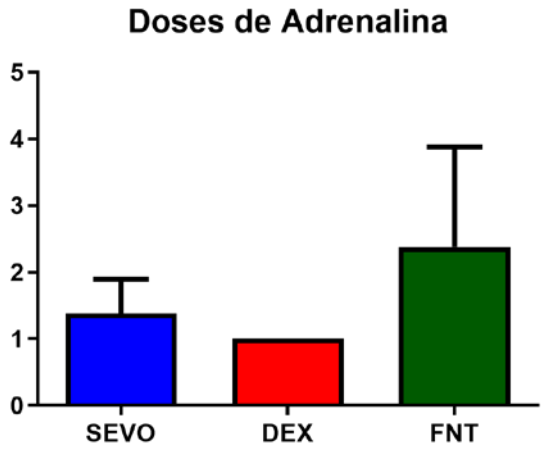


Figura 4 - Doses de adrenalina utilizadas nos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar

5.3.3 Número de desfibrilações

O grupo FNT necessitou de maior número de desfibrilações durante a reanimação cardiopulmonar em comparação ao grupo DEX (p=0,0238).

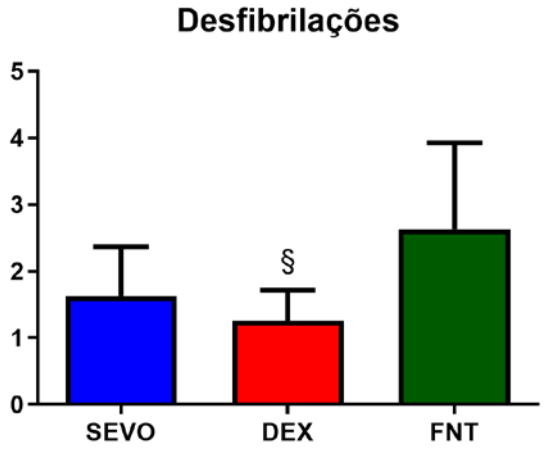


Figura 5 - Número de desfibrilações necessárias para RCE dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. § p≤0,05 vs FNT

5.4 VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS

A Tabela 02 apresenta as informações referentes às alterações hemodinâmicas durante todo o experimento e a Tabela 03 contém valores hemodinâmicos calculados.

5.4.1 Frequência cardíaca (FC)

Os valores de FC apresentam um aumento no grupo SEVO nos respectivos tempos T10, T20, T30, T40, T50, T60 e T90 quando comparados aos valores basais. O grupo FNT apresentou um aumento da FC similar nos tempos T10, T20, T30, T40, T50 e T60. O grupo DEX apresentou um aumento em relação ao estado basal apenas no T10, T20 e T30. Apenas o grupo DEX demonstrou diferença nos valores de FC em relação aos outros grupos em todos os períodos avaliados, excluindo-se o estado basal e o T10 para o grupo FNT como demonstrado na Tabela 02.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
FC			
Grupo	566,95	2	<0,0001
Tempo	42,48	16	<0,0001
Grupo*Tempo	42,43	32	0,102761

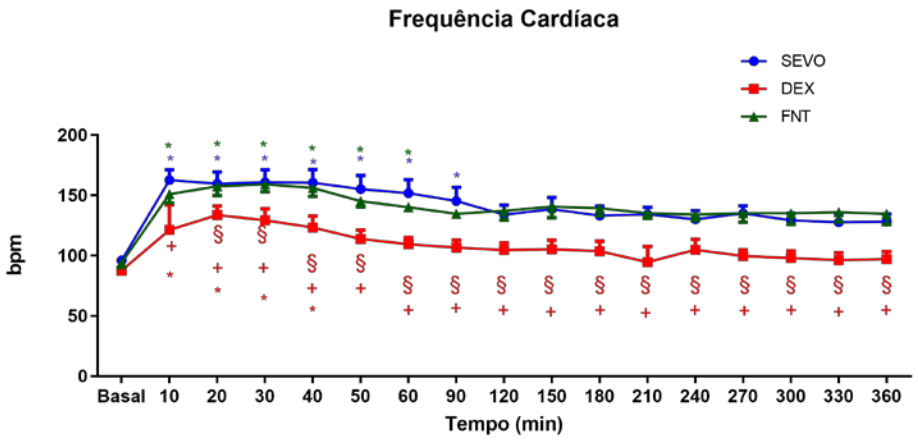


Figura 6 - Frequência cardíaca dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo. § indica valor diferente que o grupo FNT. + indica valor diferente que o grupo SEVO

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hemodinâmicos dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar

Parâmetros	**Grupos**	**Tempo**								
		Basal	T10	T30	T60	T120	T180	T240	T300	T360
FC	SEVO	96±6	163±24*	161±29*	152±32*	134±22	133±22	130±20	129±17	128±18
(bpm)	FNT	94±12	151±21*	159±18*	140±11*	137±21	139±18	134±13	135±26	135±25
	DEX	88±8	121±58*+	129±26*+§	109±16+§	105±17+§	104±23+§	105±25+§	98±16+§	97±18+§
PAM	SEVO	81±11	109±12	96±13	89±11	89±15	88±15	88±11	86±8	85±9
(mmHg)	FNT	85±10	110±17+	90±15+	70±17+	83±28+	75±15+	74±12+	70±13+	72±14+
	DEX	89±11	105±12§	96±9§	77±10§	82±13§	87±14§	82±10§	80±8§	77±9§
PAPm	SEVO	19±2	27±5 *	25±5	24±3	25±5	23±3	23±3	23±3	24±3
(mmHg)	FNT	20±2	27±2 *	25±3	23±3	25±7	24±3	23±2	22±2	23±1
	DEX	22±1	26±3 *	26±3	24±3	25±5	26±7	26±4	23±3	23±3
POAP	SEVO	13±3	14±2	13±2	13±2	13±2	12±2	12±2	12±2	12±2
(mmHg)	FNT	14±2	16±4	14±2	14±3	13±2	13±1	12±2	12±1	11±2
	DEX	13±1	15±2	17±1	15±1+	14±1	14±1+	13±1	13±1	14±2§
PVC	SEVO	10±1	10±2	10±1	10±2	11±2	10±2	10±2	9±2	9±1
(mmHg)	FNT	9±1	10±1	10±1	10±3	11±2	10±2	9±2	9±2	9±2
	DEX	11±3	11±3	13±4	13±3	12±3	12±3	11±3	11±3	11±3
IC	SEVO	4,1±0,3	5,6±1,1	4,2±0,8	3,8±0,7	3,9±0,5	4,2±0,6	4,3±0,5	4,6±0,7	4,6±0,2
(L/min/mm^2)	FNT	4,1±0,6	6,1±0,8	4,7±0,4	2,9±0,8+	3,5±0,7	4,0±1,3	4,3±1,2	4±1,6	4,7±1,3
	DEX	3,8±0,4	4,8±1,8	2,9±0,4+§	2,4±0,3*+	3,0±0,2	3,0±0,4	3,5±0,3	3,5±0,5	3,6±0,6

FC = Frequência Cardíaca / PAM = Pressão arterial Média / PAPm = Pressão da Artéria Pulmonar Média / POAP = Pressão de oclusão da Artéria Pulmonar / PVC = Pressão Venosa Central / IC = Índice Cardíaco. ***** indica valor diferente que o Basal ($p \leq 0,05$). § indica valor diferente que o grupo FNT. + indica valor diferente que o grupo SEVO.

5.4.2 Pressão arterial média (PAM)

O grupo FNT apresentou diferença nos valores inferiores de PAM no T10 e ao longo de todo o experimento quando comparado ao grupo SEVO. O grupo DEX apresentou diferenças com o grupo FNT em todos os momentos do estudo.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
PAM			
Grupo	566,95	2	<0,0001
Tempo	42,48	16	<0,0001
Grupo*Tempo	42,43	32	0,102761

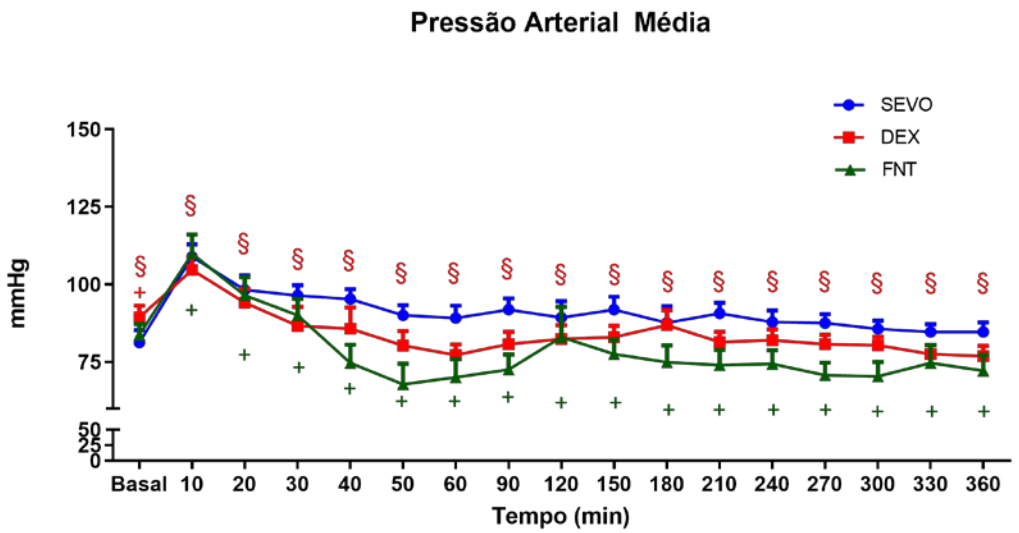


Figura 7 - Pressão arterial média dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo. § indica valor diferente que o grupo FNT. + indica valor diferente que o grupo SEVO

5.4.3 Pressão da artéria pulmonar média (PAPm)

A PAPm apresentou aumentos dos seus valores no T10, T20, T30 em todos os grupos em relação aos seus valores basais. O grupo DEX apresentou um aumento no período basal em relação ao grupo FNT.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
PAPm			
Grupo	8,40	2	0,015
Tempo	106,60	16	<0,0001
Grupo*Tempo	20,30	32	0,946

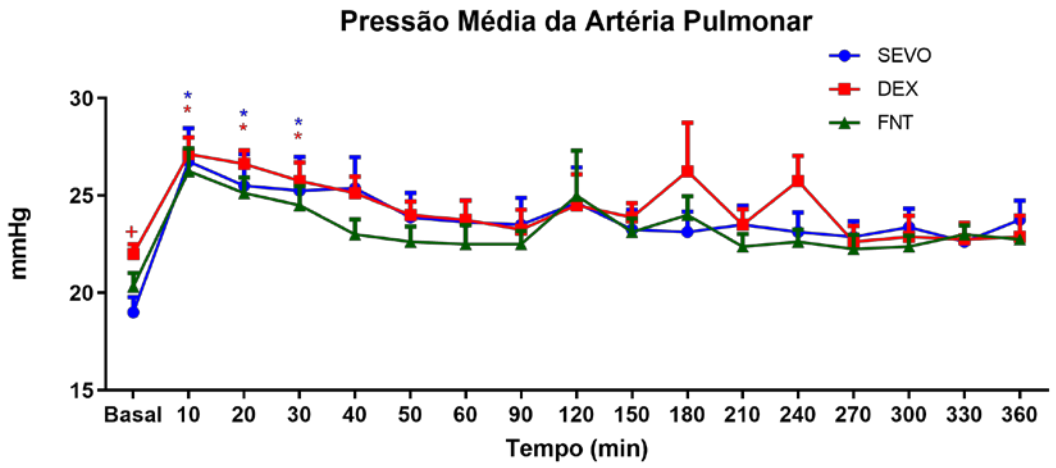


Figura 8 - Pressão da artéria pulmonar dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo. § indica valor diferente que o grupo FNT. + indica valor diferente que o grupo SEVO

5.4.4 Pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP)

O grupo DEX apresentou um aumento no período T20 em relação ao basal. O grupo DEX apresentou valores mais elevados quando comparado ao grupo SEVO nos períodos T40, T50, T60 e T180. No período T50 e T360, o grupo DEX apresentou valores mais elevados que o grupo FNT.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
POAP			
Grupo	44,30	2	<0,0001
Tempo	70,00	16	<0,0001
Grupo*Tempo	23,10	32	0,88

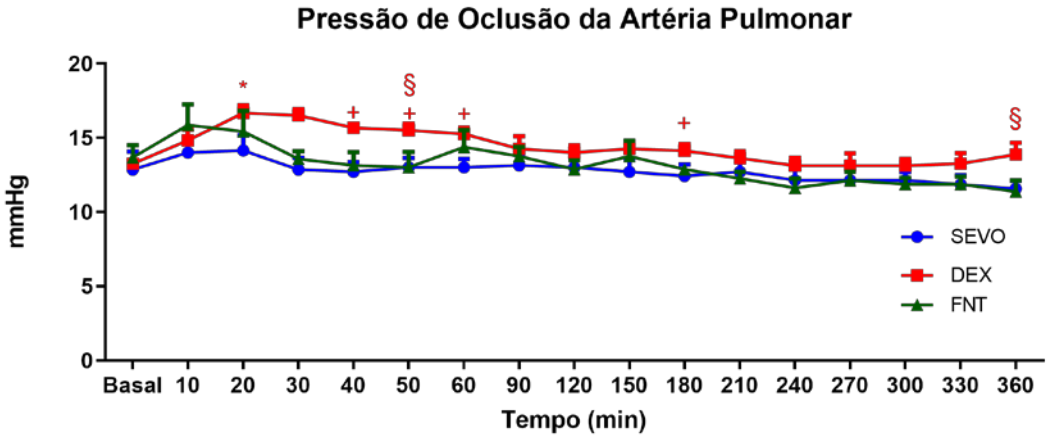


Figura 9 - Pressão de oclusão da artéria pulmonar dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo. § indica valor diferente que o grupo FNT. + indica valor diferente que o grupo SEVO

5.4.5 Pressão venosa central (PVC)

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de PVC em relação ao estado basal e entre os grupos.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
PVC			
Grupo	49,10	2	<0,0001
Tempo	16,70	16	0,41
Grupo*Tempo	10,60	32	1

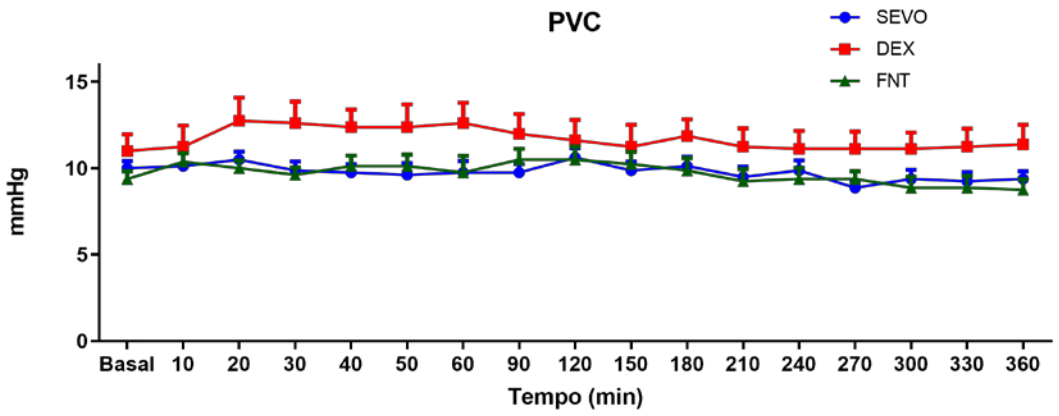


Figura 10 - Pressão venosa central dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar

5.4.6 Índice Cardíaco (IC)

O grupo DEX foi o único que sofreu uma redução nos tempos T40, T50 e T60 em relação ao estado basal. Entre os grupos, o grupo DEX obteve uma redução do IC no T30, T40, T50 e T60 em relação ao grupo SEVO e nos intervalos T30 e T40 ao grupo FNT. O grupo FNT apresentou valores inferiores em relação ao grupo SEVO nos momentos T50 e T60.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
IC			
Grupo	75,90	2	<0,0001
Tempo	139,10	16	<0,0001
Grupo*Tempo	47,20	32	0,041

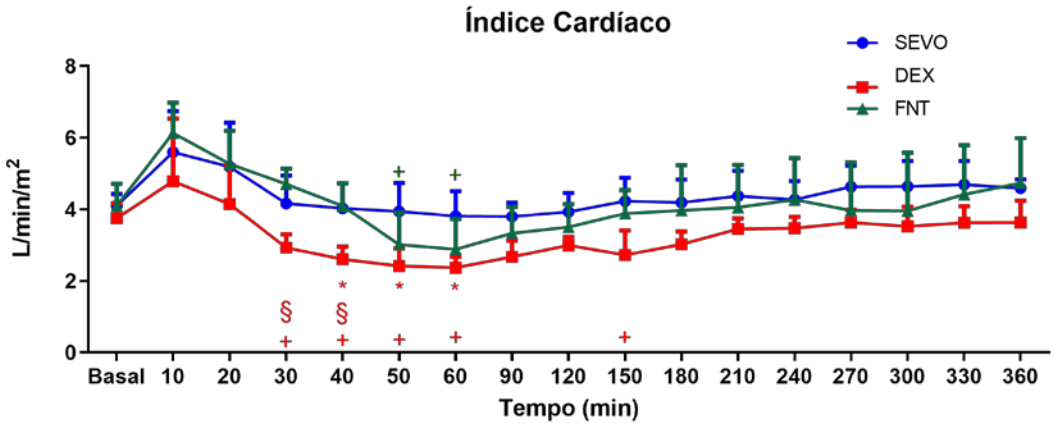


Figura 11 - Índice cardíaco dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo. § p≤0,05 vs FNT. + p≤0,05 vs SEVO

5.4.7 Índice de Resistência Vascular Sistêmica (IRVS)

Não houve diferenças nos grupos em relação ao estado basal. O grupo FNT apresentou valores mais elevados que o grupo SEVO no T300. O grupo DEX apresentou um aumento no IRVS no estado basal em relação ao grupo SEVO e valores maiores nos tempos T30, T40, T50, T180, T240 e T360 em comparação ao grupo FNT.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
IRVS			
Grupo	45,70	2	<0,0001
Tempo	117,50	16	<0,0001
Grupo*Tempo	29,90	32	0,57

5.4.8 Índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP)

Foi observado aumento dos valores IRVP em relação ao basal nos tempos T30, T40, T50, T60, T90, T120, T150 para o grupo SEVO. O grupo FNT apresentou valores elevados comparados ao basal nos períodos T50, T60, T120 e T180. O grupo DEX apresentou valores mais elevados que o grupo SEVO no basal, T150 e T 180 e nos intervalos basal, T40 e T150 para o grupo FNT.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
IRVP			
Grupo	11,90	2	0,0026
Tempo	109,60	16	<0,0001
Grupo*Tempo	43,50	32	0,084

5.4.9 Índice de Volume Sistólico (IVS)

O Índice de Volume Sistólico apresentou uma redução acentuada ao longo do tempo. O grupo SEVO apresentou esta diminuição nos períodos T30 e T60, grupo FNT apresentou nos intervalos T60 e T120, já o grupo DEX foi identificado a redução em T30 e T60. A avaliação entre os grupos demonstrou um aumento no grupo DEX em T300 comparado ao grupo FNT.

GEE			
Variável	**X^2 Wald**	**Df**	**P-valor**
IVS			
Grupo	10,80	2	0,0046
Tempo	269,80	16	<0,0001
Grupo*Tempo	45,50	32	0,0571

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hemodinâmicos calculados

Parâmetros	Grupos	Tempo								
		Basal	**T10**	**T30**	**T60**	**T120**	**T180**	**T240**	**T300**	**T360**
IRVS (dina-seg/cm^{-5}/m^2)	SEVO	1344±253	1364±202	1656±233	1703±338	1558±405	1486±472	1433±367	1326±284	1262±264
	FNT	1512±236	1407±193	1488±293	1676±165	1749±677	1429±273	1309±278	1387±438+	1112±175
	DEX	1655±255+	1534±566	1968±490§	1942±268	1860±369	1890±360§	1638±18§	1509±296	1418±239§
IRVP (dina-seg/cm^{-5}/m^2)	SEVO	113±50	174±40	237±56*	223±55*	219±62*	194±45	198±28	195±30	202±45
	FNT	128±44	148±66	178±92	259±88 *	294±156*	258±79*	227±49	242±86	206±44
	DEX	185±46+§	191±56	255±79	255±45	502±619	295±93+	261±91	212±69	201±71
IVS (mL/m^2/batimento)	SEVO	45±9	35±7	29±8*	25±5*	30±9	32±8	39±16	36±7	38±7
	FNT	45±4	43±18	32±11	21±6*	26±5*	30±7	31±7	29±9	35±12
	DEX	42±7	34±7	24±5*	25±7*	31±8	33±10	37±8	41±8§	42±7

IRVS = Índice de Resistência Vascular Periférica/ IRVP = Índice de Resistência Vascular Pulmonar/ IVS = Índice do Volume Sistólico. ***** indica valor diferente que o Basal ($p \leq 0,05$). § indica valor diferente que o grupo Fentanil. + indica valor diferente que o grupo Sevoflurano.

5.5 PARÂMETROS DE PERFUSÃO E GASOMÉTRICOS

5.5.1 Lactato

O grupo SEVO apresentou diferenças em relação ao estado basal no T10, T30, T60, T300 e T360. Os grupos FNT e DEX apresentaram aumentos nos períodos T10, T30 e T60. Entre os grupos, apenas nos T60 e T120 foi observado um valor aumentado no grupo DEX quando comparado ao grupo SEVO (Tabela 4).

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
Lactato			
Grupo	3,00	2	0,243
Tempo	1147,00	8	<0,0001
Grupo*Tempo	30,00	16	0,018

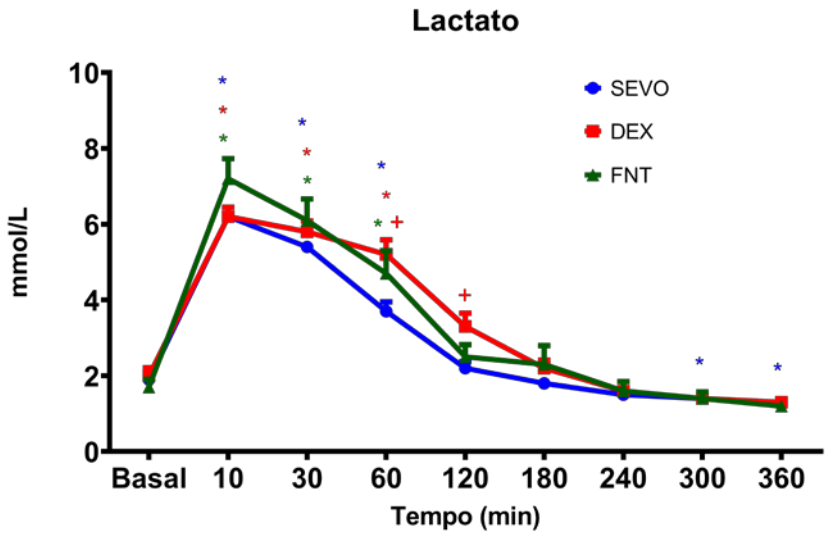


Figura 12 - Lactato arterial dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo. + indica valor diferente que o grupo SEVO

5.5.2 Saturação Venosa Mista

A saturação venosa mista (SVO_2) não apresentou diferenças em relação ao estado basal e não houve diferenças entre os grupos.

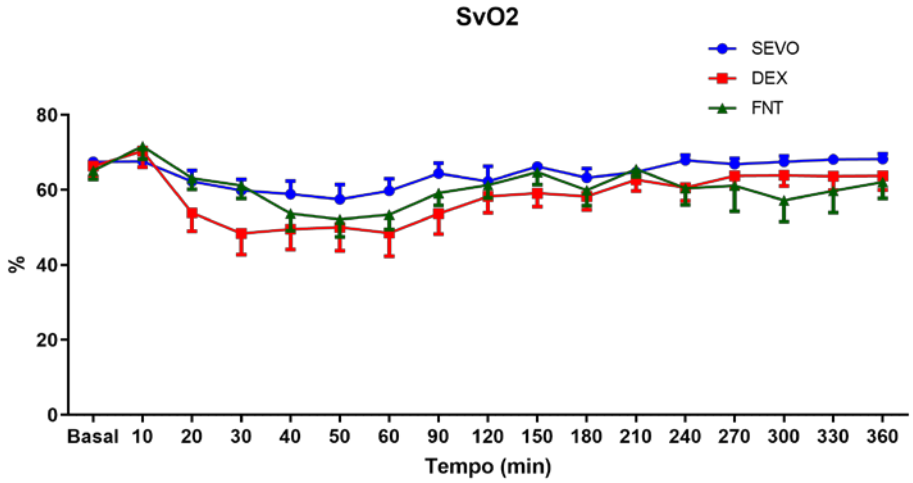


Figura 13 - Saturação venosa dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar

5.5.3 Gradiente Arteriovenoso de CO_2

O grupo DEX apresentou uma elevação em relação ao basal no T30. Entre os grupos, o grupo DEX apresentou um aumento no intervalo T30, T60 e T180 em relação ao grupo SEVO e apenas no T30 comparado ao grupo FNT.

GEE			
Variável	**X^2 Wald**	**Df**	**P-valor**
$GAPCO_2$			
Grupo	2,20	2	0,334
Tempo	42,30	8	<0,0001
Grupo*Tempo	24,00	16	0,089

5.5.4 pH

Os valores de pH apresentaram redução nos intervalos T10, T30 e T60 em todos os grupos. Não houve diferenças quanto o pH arterial entre os grupos.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
pH			
Grupo	0,00	2	0,79
Tempo	632,00	8	<0,0001
Grupo*Tempo	12,00	16	0,77

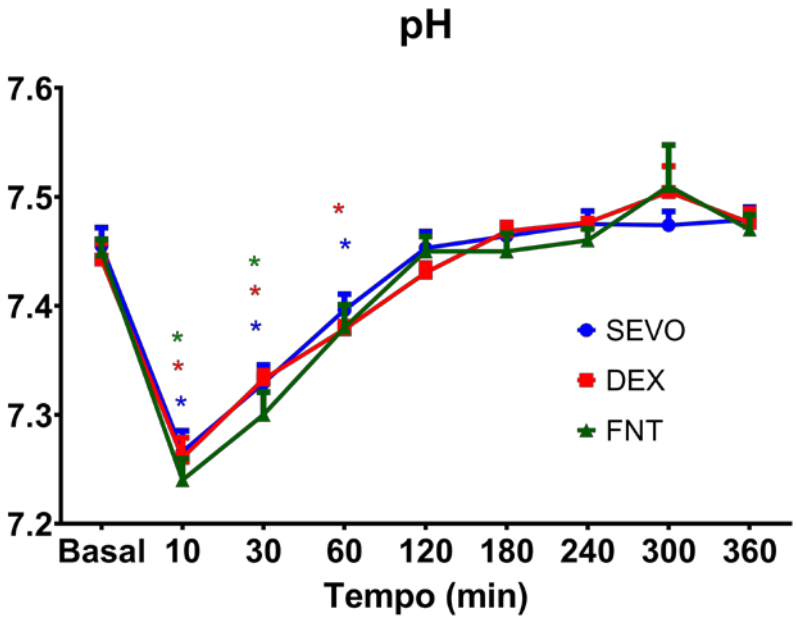


Figura 14 - pH arterial dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo

5.5.5 Glicemia

A glicemia dos animais apresentou um aumento em relação ao estado basal em todos os grupos nos tempos T10 e T30, o grupo FNT apresentou valores aumentados também no T60 e o grupo DEX nos tempos T60, T120 e T180, respectivamente. Entre os grupos, o grupo FNT apresentou aumento no momento T120 comparado ao grupo SEVO e o grupo DEX apresentou um valor menor que o grupo FNT no tempo T120.

GEE			
Variável	**X² Wald**	**Df**	**P-valor**
Glicemia			
Grupo	3,00	2	0,26
Tempo	385,00	16	<0,0001
Grupo*Tempo	9,00	32	0,92

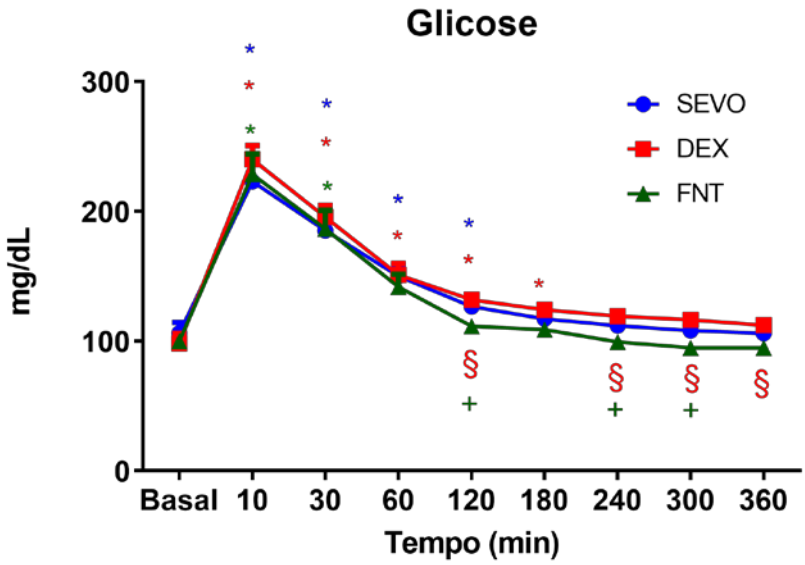


Figura 15 - Glicose dos animais anestesiados com sevoflurano (SEVO) ou sevoflurano + dexmedetomidina (DEX) ou sevoflurano + fentanil (FNT) submetidos a parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar. *p≤0,05 vs Basal do respectivo grupo. § p≤0,05 vs FNT. + p≤0,05 vs SEVO

5.6 Diurese

Não houve diferenças na diurese entre os grupos. O grupo SEVO teve uma diurese de 347±110 ml, o grupo FNT que apresentou diurese de 260±57 ml e o grupo DEX que apresentou diurese de 248 ±37ml (p=0,0508).

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão dos dados metabólicos

Parâmetros	Grupos	Tempo								
		Basal	**T10**	**T30**	**T60**	**T120**	**T180**	**T240**	**T300**	**T360**
Lactato (mmol/L)	SEVO	1,9±0,5	6,2±0,2 *	5,4±0,4*	3,7±0,7*	2,2±0,5	1,8±0,4	1,5±0,3	1,4±0,2*	1,3±0,2 *
	FNT	1,7±0,6	7,2±1,5*	6,1±1,6*	4,7±1,7*	2,5±0,9	2,3±1,4	1,6±0,7	1,4±0,5	1,2±0,3
	DEX	2,0±0,6	6,2±0,7*	5,8±0,8*	5,2±1,1*+	3,3±1,0+	2,2±0,6	1,6±0,3	1,4±0,2	1,3±0,2
SVO_2 (%)	SEVO	68±4	68±9	60±8	60±9	62±11	63±7	68±4	68±4	68±4
	FNT	65±7	72±10	61±10	53±11	61±10	60±12	60±13	57±16	62±13
	DEX	66±9	70±12	48±16	49±18	58±12	58±10	61±10	64±8	64±11
$GAPCO_2$ (mmHg)	SEVO	9±1	10±1	11±2	10±4	10±2	7±1	8±2	7±1	7±1
	FNT	10±1	9±5	10±3	12±6	8±5	9±4	7±5	9±4	7±3
	DEX	9±3	9±3	15±4*+	14±2+	10±4	10±3+	9±2	9±2	8±2
pH	SEVO	7,45±0,05	7,27±0,05*	7,33±0,05*	7,40±0,04	7,45±0,04	7,46±0,03	7,48±0,03	7,47±0,04	7,48±0,03
	FNT	7,45±0,03	7,24±0,06*	7,3±0,06*	7,38±0,06	7,45±0,04	7,45±0,05	7,46±0,03	7,51±0,11	7,47±0,04
	DEX	7,44±0,04	7,26±0,05*	7,33±0,02*	7,38±0,02*	7,43±0,03	7,47±0,02	7,48±0,01	7,5±0,07*	7,48±0,03
Glicemia (mg/dl)	SEVO	106±23	223±57*	185±43*	150±24	127±9	117±9	112±9	108±9	106±12
	FNT	98±22	240±30*	196±26*	151±25*	132±14+	124±11	119±10	116±10	112±12
	DEX	100±9	229±44*	187±41*	142±28*	111±14*§	109±16*	99±8	95±11	95±12

SVO_2 = Saturação Venosa Mista / $GAPCO_2$ = Gradiente Arteriovenoso de CO_2. * indica valor diferente que o Basal ($p \leq 0,05$). § indica valor diferente que o grupo Fentanil. + indica valor diferente que o grupo Sevoflurano.

5.7 DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS

Não houve diferença nos dados ecocardiográficos ao longo do tempo, tão houve diferenças nos diferentes grupos estudados, como demonstrados na Tabela 5. É importante ressaltar que houve grandes dificuldades nas análises das medidas ecocardiográficas, devido a impossibilidade de visualização das estruturas cardíacas (Janela), pois estas sofriam alterações após a reanimação cardiopulmonar.

Tabela 5 - Dados Ecocardiográficos de acordo com o braço do estudo

	Grupos	Tempo								
		Basal	**T10**	**T30**	**T60**	**T120**	**T180**	**T240**	**T300**	**T360**
FE (%)	SEVO	58±4	55±10	47±4	47	47±8	55±7	55±6	57±6	56±4
	FNT	60±2	50±2	48±8	43±6	52±8	50±8	53±3	51±5	52±6
	DEX	58±5	61±9	40±5	49±5	48±8	52±7	53±5	54±6	57±7
E m/s	SEVO	0,50±0,04	0,57±0,26	0,49±0,1	0,51±0,17	0,41±0,13	0,52±0,12	0,53±0,12	0,53±0,13	0,51±0,13
	FNT	0,43±0,1	0,55±0,16	0,47±0,24	0,41±0,2	0,46±0,2	0,49±0,23	0,50±0,16	0,55±0,27	0,41±0,09
	DEX	0,49±0,03	0,54±0,03	0,33±0,05	0,39±0,06	0,38±0,07	0,42±0,09	0,51±0,06	0,49±0,04	0,41±0,03
A m/s	SEVO	0,37±0,12	0,441±0,11	0,374±0,04	0,412±0,09	0,326±0,06	0,344±0,1	0,389±0,11	0,411±0,12	0,408±0,13
	FNT	0,303±0,11	0,403±0,14	0,379±0,09	0,279±0,09	0,289±0,11	0,34±0,16	0,347±0,1	0,309±0,18	0,328±0,05
	DEX	0,346±0,08	0,339±0,01	0,296±0,1	0,322±0,05	0,341±0,09	0,34±0,13	0,412±0,12	0,387±0,15	0,365±0,13
E/A	SEVO	1,46±0,41	1,26±0,36	1,31±0,17	1,25±0,37	1,26±0,29	1,44±0,76	1,4±0,22	1,31±0,22	1,29±0,34
	FNT	1,45±0,23	1,59±0,04	1,21±0,56	1,23±0,29	1,16±0,34	1,36±0,49	1,32±0,44	1,43±0,6	1,23±0,4
	DEX	1,45±0,29	1,38±0,24	1,2±0,31	1,42±0,29	1,6±0,24	1,44±0,1	1,43±0,27	1,48±0,5	1,23±0,17

FE = Fração de ejeção / E = Pico de Velocidade da onda de enchimento precoce / A = Pico de velocidade da onda de enchimento atrial

5.8 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

5.8.1 Microscopia Óptica Miocárdica

Foi realizado o estudo de microscopia óptica do tecido miocárdico com base na presença de picnose e vacuolização celular. Durante a análise, foi encontrado um grau maior de lesão nas regiões subendocárdicas. Diante dessas alterações, foi feito uma diferenciação na presença de lesões nas regiões subendocárdicas e não subendocárdicas.

Não houve diferenças entre os grupos.

Tabela 6 - Avaliação Microscopia Óptica Miocárdica

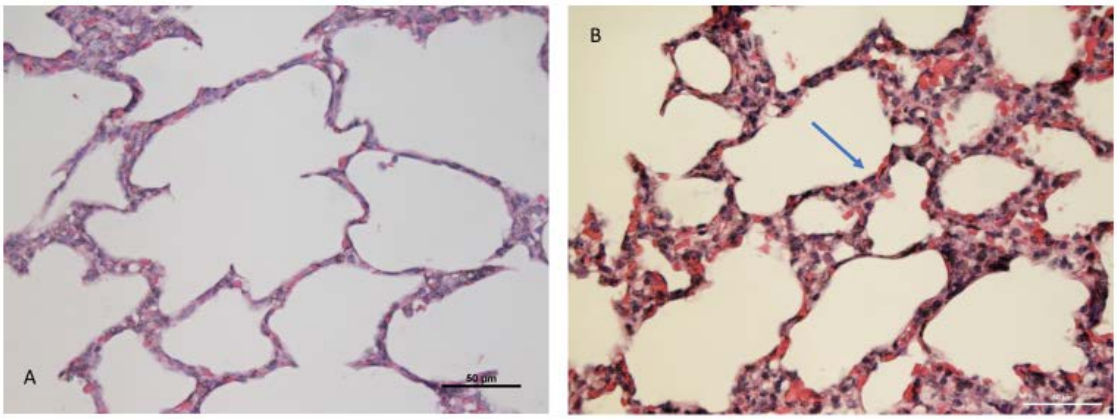
Microscopia Óptica	Região	Tecido Miocárdico			p
		SEVO	DEX	FNT	
Picnose	Subendocárdica	10,25 ± 29	23,43 ± 40	41,25 ± 76,3	0,69
	Não Subendocárdica	3,625 ± 10,3	12,3 ± 33	3,62 ± 10,2	0,97
Vacuolização	Subendocárdica	247 ± 420	364,6 ± 477	360,3 ± 467	0,68
	Não Subendocárdica	0	4,143 ± 11	7,250 ± 20	0,57

5.8.2 Microscopia Óptica Pulmonar

Na análise pela microscopia óptica do tecido pulmonar não foi encontrado diferença na presença de células inflamatórias ou epiteliais nas amostras coletadas.

Tabela 7 - Avaliação Microscopia Óptica Pulmonar

Microscopia Ótica	**Tecido Pulmonar**			
	SEVO	**DEX**	**FNT**	**p**
Células Inflamatórias	9,3 ± 5,2	10,4 ± 5,8	10 ± 5,8	0,8205
Células Epiteliais	3,8 ± 1,3	4,24 ± 1,4	4,9 ± 1	0,2737



A – Microscopia de luz do tecido pulmonar, aumento de 40x, no grupo DEX.

B – Microscopia de luz do tecido pulmonar, aumento de 40x, no grupo FNT, a seta azul indica aumento do infiltrado de células inflamatórias.

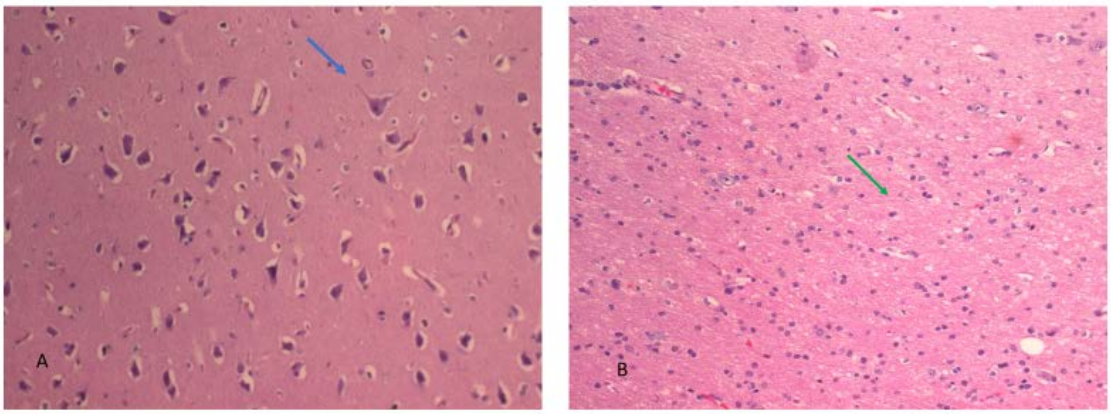
Figura 16 - Microscopia de Luz do tecido pulmonar.

5.8.3 Microscopia óptica cerebral

A avaliação histopatológica cerebral não encontrou diferença entre os grupos, quanto à presença de edema, neurônio vermelho, astrogliose infiltrado linfocitário e macrofágico. Na figura 17, a seta azul indica a presença de neurônio vermelho como sinal de lesão do tecido neurológico e a seta verde demonstra a presença de edema.

Tabela 8 - Avaliação Histopatológica Cerebral

	Tecido Cerebral					
M. Óptica	**Neurônio Vermelho**	**Edema**	**Hemorragia**	**Astrogliose**	**Infiltrado Linfocitário**	**Infiltrado Macrofágico**
SEVO	1,65 ± 0,5	1 ± 0,9	0,125 ± 0,35	0,5 ± 0,53	1 ± 1	0 ± 0
DEX	1,7 ± 0,48	0,7 ± 0,75	0 ± 0	0,71 ± 0,48	0,71 ± 0,75	0 ± 0
FNT	1,25 ± 0,46	1,0 ± 0,92	0,125 ± 0,35	0,5 ± 0,53	0,75 ± 0,46	0 ± 0



A – Microscopia de luz do tecido cerebral, aumento de 40x, na seta azul indica o neurônio vermelho.
B – Microscopia de luz do tecido cerebral, aumento de 40x, na seta verde indica edema tecidual

Figura 17 - Microscopia Cerebral

5.8.4 Imuno-histoquímica miocárdica

O estudo de imuno-histoquímica através da marcação de células apoptóticas pela técnica de TUNEL não identificou diferenças entre os grupos pesquisados.

Tabela 9 - Imuno-histoquímica

Imuno-Histoquímica	Tecido Miocárdico			
	SEVO	**DEX**	**FNT**	**p**
TUNEL	106,3 ± 112	60,1 ± 43	83,8 ± 69,7	0,743

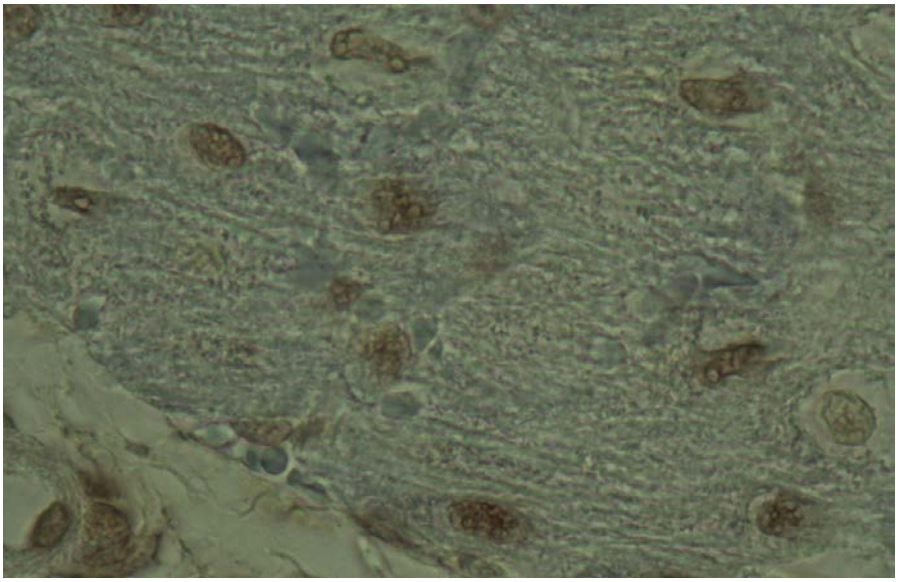


Figura 18 - TUNEL tecido miocárdico

5.9 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE APOPTOSE POR MEIO DE WESTERN BLOTTING

A expressão de proteína Bcl-x que promove proteção contra a apoptose foi semelhante nos três grupos estudados, tanto no tecido miocárdico quanto no tecido cerebral. A proteína Bax apresentou um aumento no tecido cerebral

no grupo Dexmedetomidina em relação ao grupo Fentanil (p = 0,043). Não houve diferenças na concentração de proteína Bax no tecido miocárdico entre os grupos.

Tabela 10 - Expressão de Proteína Bax e Bcl-x

	Tecido Cerebral				Tecido Miocárdico			
	SHAM	**SEVO**	**DEX**	**FNT**	**SHAM**	**SEVO**	**DEX**	**FNT**
Bax	100 ± 0	89,2 ± 23,4	106,1 ± 35,7§	64,4 ± 18,8	100 ± 33,7	89,9 ± 47,9	96,9 ± 51,3	102,5 ± 69,5
Bcl-x	100 ± 0	196,4 ± 87,4	199,6 ± 86,2	223,6 ± 38,7	100 ± 0	101,4 ± 49,8	101,4 ± 15,2	68,3 ± 37,5

§ p≤0,05 vs FNT.

5.10 TBARS

Não houve diferenças nos grupos nas medidas de substâncias oxidantes reagentes ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 11 - Substâncias oxidantes reagentes ao ácido tiobarbitúrico

TBARS				
	SHAM	SEVO	DEX	FNT
Tecido Cerebral	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,08	0,22 ± 0,07	0,22 ± 0,07
Tecido Miocárdico	0,42 ± 0,18	0,5 ± 0,32	0,65 ± 0,3	0,50 ± 0,12

5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A fotomicrografia do tecido miocárdico do animal do grupo DEX demonstram a presença de edema mitocondrial com áreas de menor eletrondensidade. A figura 19 sugere a preservação parcial das cristas

mitocondriais e rupturas das membranas mitocondriais com formação de pequenas vesículas devido as características hidrofóbicas das membranas.

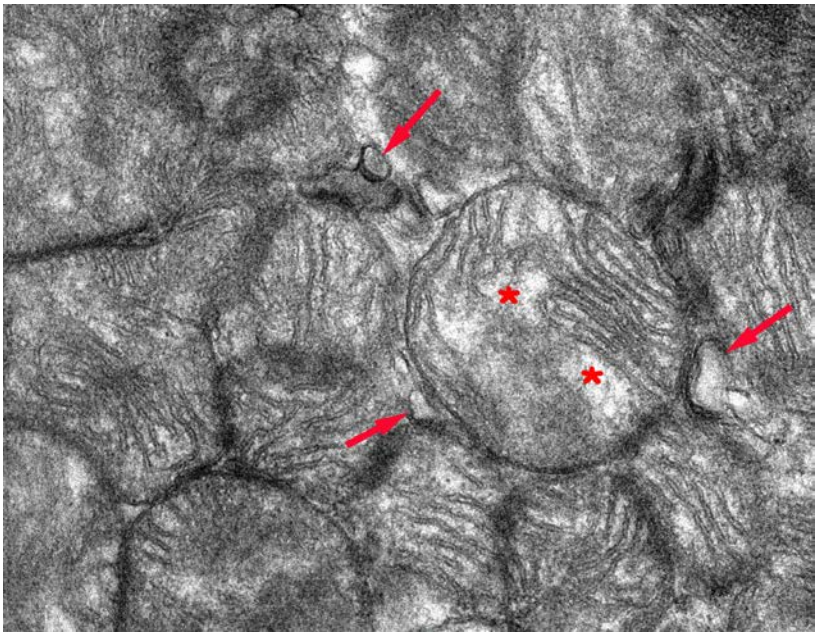


Figura 19 - Micrografia eletrônica de miocárdio de animal do grupo DEX, 30000x, mostrando uma área celular contendo mitocôndrias. Nota-se na região central, uma mitocôndria com volume relativamente aumentado e edema da matriz representado por uma área de menor eletrondensidade (asteriscos). É possível observar algumas pequenas vesículas periféricas (setas) que podem ser resultantes da ruptura da membrana externa mitocondrial.

A figura 20 do animal do grupo FNT sugere uma obliteração das cristas mitocondriais nas regiões centrais da fotomicrografia, sendo o espaço preenchido por substância amorfa eletrondensa. Na região periférica da fotomicrografia, ainda é possível observar a presença de resquícios das cristas mitocondriais (setas).

Na figura 21 do animal do grupo FNT, é possível observar a presença de cristas mitocondriais em padrão ziguezague característico de mitocôndrias com alta demanda energética.

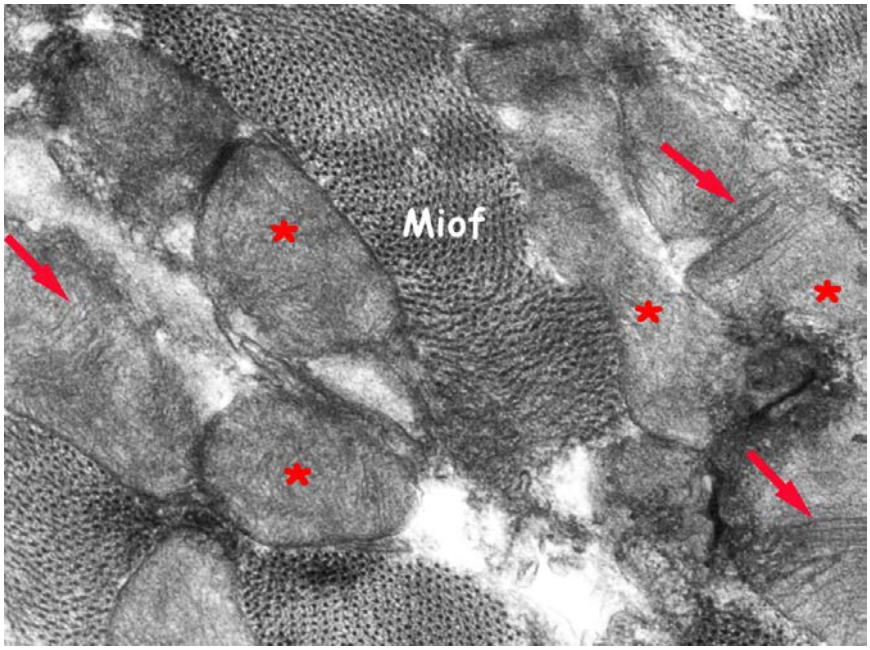


Figura 20 - Micrografia eletrônica de miocárdio de animal do grupo FNT, 30000x, mostrando a presença de miofibrilas (Miof) em corte transversal e de mitocôndrias. Notar uma alteração do padrão ultraestrutural típico, com cristas mitocondriais (seta) escassas. O volume mitocondrial está ocupado por uma matriz amorfa e eletrondensa (asterisco).

Figura 21 - Micrografia eletrônica de miocárdio do animal do grupo FNT,30000x. É possível observar uma mitocôndria com cristas em ziguezague (seta).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo não encontrou diferenças na proteção miocárdica em diferentes regimes anestésicos em um modelo animal de isquemia global por parada cardiorrespiratória. Durante a reanimação cardiopulmonar, não houve diferença entre o número de doses de epinefrina e o tempo para RCE, contudo ao analisar o número de desfibrilações realizadas durante a reanimação, o grupo FNT necessitou de um número maior de desfibrilações que o grupo DEX. O estudo histopatológico miocárdico, pulmonar e cerebral não revelou diferenças no grau de lesão tecidual entre os grupos, assim como não foi evidenciado diferenças na marcação de apoptose celular e na expressão de proteínas relacionadas com a apoptose no tecido miocárdico. A expressão de proteínas avaliada por Western-Blot encontrou um aumento na proteína Bax no grupo DEX em relação ao grupo FNT no tecido cerebral. Ao avaliar as variáveis hemodinâmicas, o grupo DEX apresentou uma redução da frequência cardíaca e do índice cardíaco ao longo experimento, tanto para o grupo FNT quanto ao grupo SEVO.

Este estudo é importante para a progressão no entendimento sobre os efeitos miocardioprotetores dos anestésicos em estados de I/R. Este é o primeiro estudo de nosso conhecimento que avalia os efeitos de proteção conferidos por anestésicos, tomando como referência os efeitos já amplamente estudados dos anestésicos inalatórios (44, 74-76) e parte para uma análise de associações farmacológicas utilizadas na prática clínica em um modelo de parada cardíaca "*in vivo*", já que algumas drogas utilizadas no presente estudo foram avaliadas previamente em modelos com maior distanciamento da realidade clínica como em modelos em corações isolados ou que não estavam vinculados a estados de I/R (32, 57, 77).

O modelo porcino de parada cardíaca realizado no presente estudo permitiu uma reanimação cardiopulmonar muito próxima das diretrizes

preconizadas (78) e apresentou uma taxa de RCE de 100%. Apesar de uma alta taxa de retorno a circulação espontânea, a lesão tecidual pelo tempo de isquemia de oito minutos foi suficiente para ocasionar um aumento significativo dos valores de troponina em todos os grupos em relação ao estado basal, além de proporcionar uma lesão orgânica importante com aumento dos valores de lactato e redução do pH durante os momentos iniciais de reperfusão do experimento compatíveis com os resultados em outros estudos utilizando-se do mesmo modelo (79).

Os valores de troponina não apresentaram discrepâncias entre os grupos estudados, todavia o grupo FNT apresentou uma tendência a ter valores elevados comparado aos grupos SEVO e DEX (p=0,0556). Somando se a isso, o grupo FNT necessitou de maior número de desfibrilações em relação ao grupo DEX e na análise de microscopia eletrônica o grupo FNT apresentou maior desestruturação das cristas mitocondriais que podem justificar maior depleção das reservas energéticas e possivelmente maior lesão e maiores dificuldades para o RCE. Não encontramos outros estudos prévios que justificassem estes achados e que correlacionem os opioides com pior lesão tecidual ou com maiores dificuldades para a reanimação. Em contraste com os resultados presentes, estudos apontam para o papel de miocardioproteção proferidos pelos opioides, inclusive um estudo realizado pelo nosso grupo e que nos levou a estudar os efeitos da associação de sevoflurano com fentanil no cenário de parada cardíaca. O estudo de da Luz e colaboradores encontraram um efeito protetor do fentanil em porcos submetidos a lesão cardíaca causada por altas doses de catecolaminas com redução dos valores de troponina, redução nos valores de caspase-3 no tecido miocárdico e menor alteração de estruturas intracelulares avaliados por microscopia eletrônica (32).

A miocardioproteção proferida pelos opioides apresentam efeitos distintos de acordo com os receptores estudados, sendo os receptores DOR os mais amplamente estudados como responsáveis por efeitos miocardioprotetores em modelos animais (80, 81). Apesar disso, optamos por estudar os efeitos do fentanil (opioide agonista MOR), que também apresentam resultados positivos na

literatura e por ser um opioide amplamente utilizado em anestesias cardíacas e como analgésico de escolha em pacientes graves sob ventilação mecânica nas unidades de terapia intensiva e que também apresenta resultados positivos na literatura (6, 32). É importante ressaltar que o presente estudo foi realizado em um modelo de parada cardíaca, sendo este, talvez, capaz de resultar em maior grau de lesão tecidual e por isso os efeitos do fentanil sejam atenuados ou insuficientes para promover proteção. Inclusive, os estudos que demonstram os efeitos benéficos dos opioides são estabelecidos em outros cenários clínicos como na cirurgia cardíaca ou infarto do miocárdio, sendo este o primeiro estudo de nosso conhecimento a avaliar os efeitos do fentanil em um modelo de PCR (53, 54, 82, 83).

Dentre as variáveis hemodinâmicas, o grupo DEX apresentou uma redução significativa nos valores de frequência cardíaca e do índice cardíaco após o RCE e durante todo o experimento em comparação aos outros grupos e apresentou valores mais elevados de lactato arterial e menor clearance após o RCE. Ao analisar os resultados, podemos creditar que o provável motivo desta redução, seja o efeito farmacológico do anestésico, cuja classe é alfa-2-agonista. Esta classe apresenta como características hemodinâmicas fundamentais bradicardia e hipotensão (84). No presente estudo, não podemos implicar que a redução do clearance de lactato esteja associada a pior desfecho, mas que novos estudos devem ser realizados para averiguar se estes valores mais elevados após a RCE possam ter algum impacto clínico. Todavia, a dexmedetomidina também pode ser responsável por efeitos clínicos benéficos na lesão por I/R, pois estudos recentes demonstram características protetoras ao tecido miocárdico em modelos experimentais. Yoshikawa et al. conduziram um experimento em corações de ratos isolados portadores de hipertrofia miocárdica hipertensiva pelo método de Langendorff para avaliar os efeitos cardioprotetores da dexmedetomidina em um modelo de I/R. Os animais expostos a DEX apresentaram menor grau de lesão e uma redução da função cardíaca, ambos revertidos pelo uso de antagonistas α-2-adrenérgico, indicando um efeito local cardíaco e sem efeito modulador do sistema nervoso autonômico (85).

No presente estudo, a administração de dexmedetomidina associada a sevoflurano não apresentou uma proteção adicional significativa comparado ao uso de sevoflurano isolado. Isso pode ter ocorrido devido a um efeito teto de miocardioproteção ou o efeito dessas duas drogas possam estar vinculados ao mesmo mecanismo responsável pela proteção. Riquelme et al. descreveu o envolvimento da via de produção endotelial de óxido nítrico (eNOS/NO) no mecanismo de proteção da dexmedetomidina, fato também confirmado por Bunte e colaboradores (86, 87). Essa via de produção também está presente no pré-condicionamento isquêmico via anestésicos inalatórios (42). Além disso, essas duas drogas apresentam efeitos na resposta inflamatória, com redução da ativação das células NF-κB e expressão de citocinas inflamatórias como TNF-α e interleucina-1 (42, 87, 88). A falta de sinergismo no efeito protetor miocárdico também pode ser explicada pela gravidade da lesão causada pela PC no modelo estudado. Até o presente momento, desconhecemos algum estudo que tenha avaliado os efeitos da dexmedetomidina em um modelo de parada cardíaca, que apresenta além da lesão de I/R, os efeitos mediados pelo uso de catecolaminas na reanimação e da desfibrilação.

Não houve diferenças na presença de marcadores apoptose nos grupos estudados no tecido miocárdico, tanto nas técnicas de imuno-histoquímica (TUNEL) quanto na expressão de proteínas Bax e Bcl-x. Esse resultado pode indicar que a técnica anestésica não foi capaz de influenciar a taxa de apoptose celular após a reperfusão entre os grupos estudados, verificados por métodos diferentes. O tempo do experimento de seis horas talvez seja o fator limitante para diferenciar a taxa de apoptose de celular e a expressão de proteínas reguladoras. No tecido cerebral, o grupo DEX apresentou uma elevação nos valores da proteína Bax em relação ao grupo FNT. De acordo com Liu et al., uma gama de estudos indica efeito neuroprotetor proveniente do uso de DEX, todavia doses elevadas podem levar a um aumento da taxa de neuroapoptose, necessitando de mais estudos avaliando os efeitos neuroprotetores da dexmedetomidina (89).

A decisão de avaliarmos o efeito pré-condicionante das drogas em um modelo de parada cardíaca deve-se à ampla utilização desses fármacos em

cirurgias cardíacas. A anestesia inalatória com sevoflurano é bastante difundida, devido a vários estudos experimentais na prevenção de lesões por I/R e em estudos em cirurgia cardíaca (90-92). A utilização de sevoflurano em modelos de PC já começou a ser validada em alguns estudos com resultados interessantes como o estudo de Meybohm et al (46) já citado previamente que demonstrou superioridade do sevoflurano frente ao propofol como cardioprotetor.

A dexmedetomidina vem ganhando espaço com vários estudos demonstrando um papel importante na proteção tecidual em diferentes órgãos(85, 93, 94). Peng et al. realizaram uma revisão sistemática sobre o uso desta droga em cirurgias cardíacas. Neste estudo, os benefícios demonstrados foram redução de ventilação mecânica, fibrilação atrial, tempo de internação e na incidência de parada cardíaca (84). A associação de dexmedetomidina e sevoflurano com o intuito de otimizar a proteção miocárdica foi descrita por Zhou et al. que em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca para troca valvar idealizou um protocolo de pré-condicionamento com o uso de sevoflurano e dexmedetomidina antes do início da circulação extracorpórea. Os resultados foram uma redução nos valores de troponina após 24 horas e de TNFα nas primeiras seis horas e um aumento das interleucinas 6 e 8 nos pacientes que receberam a associação de dexmedetomidina e sevoflurano (95).

Os resultados negativos do presente estudo levantam um questionamento interessante quanto a dificuldade de reproduzir achados cardioprotetores, outrora encontrados em modelos experimentais *in vitro* ou de menor complexidade, em modelos de maior semelhança à situação clínica estudada, ou mesmo em estudos clínicos que validem os achados encontrados nos estudos experimentais. Davidson et al. em um editorial recente faz um alerta sobre a complexidade fisiopatológica da lesão por I/R e a falta de estudos que avaliem o papel de outros fatores além dos cardiomiócitos, como o papel das células inflamatórias e do endotélio miocárdico (96).

O nosso estudo avaliou como desfecho primário a lesão direta dos cardiomiócitos via liberação direta de troponina e isso pode ter afastado a capacidade do presente estudo em detectar o papel cardioprotetor das drogas avaliadas em outros componentes do tecido cardíaco. Em 2018, Kobayashi et

al. identificou a capacidade protetora da dexmedetomidina em preservar o endotélio e o glicocálix em um modelo de resposta inflamatória ocasionada pela exposição a altas temperaturas, corroborando com a necessidade de estudar novos desfechos para estas drogas para aprofundar o conhecimento em proteção tecidual (97).

Este estudo tem como principais limitações a não realização dos experimentos com fentanil e dexmedetomidina isoladamente. Isto seria inviável tecnicamente, devido as propriedades de sedação leve destas drogas. A limitação do tempo de duração do experimento é um importante fator a ser considerado. O tempo de duração de seis horas possivelmente tenha sido insuficiente para analisar as curvas dos marcadores de lesão miocárdica, presença de lesões histológica e de apoptose que porventura necessitem de maior tempo de evolução para serem detectadas, contudo por questões logísticas de funcionamento do laboratório de investigação médica e falta de recursos humanos para a continuação do experimento no período noturno, optamos por manter o tempo de seis horas de reperfusão, haja vista que o estudo realizado pelo mesmo grupo foi capaz de identificar diferenças com um período de tempo similar e baseamos o resultado do presente estudo na elevação dos valores de troponina.

Uma limitação importante reside no fato de ser um modelo desenvolvido em animais saudáveis, o mesmo não ocorre rotineiramente na prática clínica, todavia a proposta seria avaliar os efeitos em animais saudáveis e futuramente estudar os efeitos em outros modelos fisiopatológicos. Optamos por não fazermos um grupo com propofol, devido a outros estudos terem demonstrado a superioridade dos anestésicos inalatórios na proteção da I/R e evitar um número maior de animais submetidos a este protocolo por questões éticas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que em um modelo de parada cardíaca a associação de sevoflurano com dexmedetomidina ou fentanil não resultou em maior cardioproteção quando comparado ao sevoflurano isoladamente. Essas associações anestésicas não conferiram diferenças nas taxas de apoptose celular no tecido miocárdico, tão pouco na expressão de proteínas reguladoras de apoptose.

8 REFERÊNCIAS

1. Andersen LW, Holmberg MJ, Berg KM, Donnino MW, Granfeldt A. In-Hospital Cardiac Arrest: A Review. *JAMA*. 2019;321(12):1200-10.
2. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, Geocadin RG, Zimmerman JL, Donnino M, et al. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. 2010;122(18 Suppl 3):S768-86.
3. Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, Berg RA. Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: an example of global myocardial stunning. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(1):232-40.
4. Laurent I, Monchi M, Chiche JD, Joly LM, Spaulding C, Bourgeois B, et al. Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(12):2110-6.
5. Kikuchi C, Dosenovic S, Bienengraeber M. Anaesthetics as cardioprotectants: translatability and mechanism. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172(8):2051-61.
6. Barr J, Fraser GL, Puntillo K, Ely EW, Gélinas C, Dasta JF, et al. Clinical practice guidelines for the management of pain, agitation, and delirium in adult patients in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2013;41(1):263-306.
7. Devlin JW, Skrobik Y, Gélinas C, Needham DM, Slooter AJC, Pandharipande PP, et al. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Pain, Agitation/Sedation, Delirium, Immobility, and Sleep Disruption in Adult Patients in the ICU. *Crit Care Med*. 2018;46(9):e825-e73.
8. Yao Y, Johnson NJ, Perman SM, Ramjee V, Grossestreuer AV, Gaieski DF. Myocardial dysfunction after out-of-hospital cardiac arrest: predictors and prognostic implications. *Intern Emerg Med*. 2018;13(5):765-72.
9. Jentzer JC, Chonde MD, Dezfulian C. Myocardial Dysfunction and Shock after Cardiac Arrest. *Biomed Res Int*. 2015;2015:314796.
10. Boland TA, Lee VH, Bleck TP. Stress-induced cardiomyopathy. *Crit Care Med*. 2015;43(3):686-93.
11. Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, Taccone FS, Franchi F, Scolletta S. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J Crit Care*. 2014;29(4):500-11.
12. Hausenloy DJ, Boston-Griffiths E, Yellon DM. Cardioprotection during cardiac surgery. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):253-65.
13. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart

Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. *Circulation*. 2008;118(23):2452-83.

14. Chalkias A, Xanthos T. Pathophysiology and pathogenesis of post-resuscitation myocardial stunning. *Heart Fail Rev*. 2012;17(1):117-28.

15. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-71.

16. Kimmoun A, Novy E, Auchet T, Ducrocq N, Levy B. Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside. *Crit Care*. 2015;19:175.

17. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(2):151-4.

18. Bro-Jeppesen J, Annborn M, Hassager C, Wise MP, Pelosi P, Nielsen N, et al. Hemodynamics and vasopressor support during targeted temperature management at 33°C Versus 36°C after out-of-hospital cardiac arrest: a post hoc study of the target temperature management trial*. *Crit Care Med*. 2015;43(2):318-27.

19. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Wanscher M, Nielsen N, Friberg H, Bjerre M, et al. Systemic Inflammatory Response and Potential Prognostic Implications After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Substudy of the Target Temperature Management Trial. *Crit Care Med*. 2015;43(6):1223-32.

20. Geppert A, Zorn G, Karth GD, Haumer M, Gwechenberger M, Koller-Strametz J, et al. Soluble selectins and the systemic inflammatory response syndrome after successful cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med*. 2000;28(7):2360-5.

21. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*. 1996;183(3):949-58.

22. Niemann JT, Youngquist S, Rosborough JP, Shah AP, Phan QT, Filler SG. Infliximab attenuates early myocardial dysfunction after resuscitation in a swine cardiac arrest model. *Crit Care Med*. 2010;38(4):1162-7.

23. Bro-Jeppesen J, Johansson PI, Kjaergaard J, Wanscher M, Ostrowski SR, Bjerre M, et al. Level of systemic inflammation and endothelial injury is associated with cardiovascular dysfunction and vasopressor support in post-cardiac arrest patients. *Resuscitation*. 2017.

24. Peberdy MA, Andersen LW, Abbate A, Thacker LR, Gaieski D, Abella BS, et al. Inflammatory markers following resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest-A prospective multicenter observational study. *Resuscitation*. 2016;103:117-24.

25. J. F. Update on cardiac resuscitation for sudden death: International guidelines 2000 ond resuscitation and emergency cardiac care. *Curr Opin Cardiol*. 2003;18(1):14-25.

26. Tang W, Weil M H, Sun S ea. Epinephrine increases the severity os postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation*. 1995;92(10):3089-93.

27. Perondi MBM, Reis AG, Paiva EF ea. A comparison of high-dose and standard-dose epinephrine in chlidren with cardiac arrest. *N England J Med*. 2004;350(17):1722-30.

28. Sardesai SH, Mourant AJ ea. Phaeochromocytoma and catecholamine induced cardiomyopathy presenting as heart failure. *Br Heart J*. 1990;63:234-7.

29. Association AH. Currents in emergency cardiovascular care. *American Heart Association*. 2005-2006;16:1-28.

30. Rivers EP, Worstman J, Rady MY ea. The effect of the total cumulative epinephrine dose administered during human CPR on hemodynamic, oxygen transport, and utilization variables in the postresuscitation period . *Chest*. 1994;106(5):1315-6.

31. Chen QM, VC. T. Apoptosis and heart failure: mechanism and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2002;2(1):43-57.

32. da Luz VF, Otsuki DA, Gonzalez MM, Negri EM, Caldini EG, Damaceno-Rodrigues NR, et al. Myocardial protection induced by fentanyl in pigs exposed to high-dose adrenaline. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(10):1098-107.

33. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2001;52(2):181-98.

34. Kato R, Foëx P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. Can J Anaesth. 2002;49(8):777-91.

35. Abraham J, Mudd JO, Kapur NK, Kapur N, Klein K, Champion HC, et al. Stress cardiomyopathy after intravenous administration of catecholamines and beta-receptor agonists. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(15):1320-5.

36. Zhang Q, Li C. Combination of epinephrine with esmolol attenuates post-resuscitation myocardial dysfunction in a porcine model of cardiac arrest. *PLoS One*. 2013;8(12):e82677.

37. Neumar RW, Otto CW, Link MS, Kronick SL, Shuster M, Callaway CW, et al. Part 8: adult advanced cardiovascular life support: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. 2010;122(18 Suppl 3):S729-67.

38. Yamaguchi H, Weil M, Tang W, Kamohara T, Jin X, Bisera J. Myocardial dysfunction after electrical defibrillation. *Resuscitation*. 2002;54(3):289-96.

39. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.

40. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H579-88.

41. Bland JH, Lowenstein E. Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. Anesthesiology. 1976;45(3):287-93.

42. Guerrero-Orriach JL, Escalona Belmonte JJ, Ramirez Fernandez A, Ramirez Aliaga M, Rubio Navarro M, Cruz Mañas J. Cardioprotection with halogenated gases: how does it occur? *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:837-49.

43. Qiao S, Xie H, Wang C, Wu X, Liu H, Liu C. Delayed anesthetic preconditioning protects against myocardial infarction via activation of nuclear factor-κB and upregulation of autophagy. *J Anesth*. 2013;27(2):251-60.

44. Knapp J, Bergmann G, Bruckner T, Russ N, Böttiger BW, Popp E. Pre- and postconditioning effect of Sevoflurane on myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation in rats. *Resuscitation*. 2013;84(10):1450-5.

45. Secher N, Malte CL, Tønnesen E, Østergaard L, Granfeldt A. Comparing anesthesia with isoflurane and fentanyl/fluanisone/midazolam in a rat model of cardiac arrest. *J Appl Physiol* (1985). 2017;123(4):867-75.

46. Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, Muller C, Zitta K, Foesel N, et al. Pharmacological postconditioning with sevoflurane after cardiopulmonary resuscitation reduces myocardial dysfunction. *Critical Care*. 2011;15(5):12.

47. Headrick JP, See Hoe LE, Du Toit EF, Peart JN. Opioid receptors and cardioprotection - 'opioidergic conditioning' of the heart. *Br J Pharmacol.* 2015;172(8):2026-50.

48. Chang MC, Lee AY, Lin WY, Chen TJ, Shyu MY, Chang WF. Myocardial and peripheral concentrations of beta-endorphin before and following myocardial ischemia and reperfusion during coronary angioplasty. *Jpn Heart J*. 2004;45(3):365-71.

49. Romano MA, McNish R, Seymour EM, Traynor JR, Bolling SF. Differential effects of opioid peptides on myocardial ischemic tolerance. *J Surg Res*. 2004;119(1):46-50.

50. Romano MA, Seymour EM, Berry JA, McNish RA, Bolling SF. Relative contribution of endogenous opioids to myocardial ischemic tolerance. *J Surg Res*. 2004;118(1):32-7.

51. Yu CK, Li YH, Wong GT, Wong TM, Irwin MG. Remifentanil preconditioning confers delayed cardioprotection in the rat. *Br J Anaesth.* 2007;99(5):632-8.

52. Peart JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul Pharmacol*. 2005;42(5-6):211-8.

53. Kato R, Foëx P. Fentanyl reduces infarction but not stunning via delta-opioid receptors and protein kinase C in rats. *Br J Anaesth*. 2000;84(5):608-14.

54. Lessa MA, Tibiriçá E. Pharmacologic evidence for the involvement of central and peripheral opioid receptors in the cardioprotective effects of fentanyl. *Anesth Analg*. 2006;103(4):815-21.

55. Fimiani C, Mattocks D, Cavani F, Salzet M, Deutsch DG, Pryor S, et al. Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cell Signal*. 1999;11(3):189-93.

56. Landoni G, Bignami E, Oliviero F, Zangrillo A. Halogenated anaesthetics and cardiac protection in cardiac and non-cardiac anaesthesia. *Annals of cardiac anaesthesia*. 2009;12(1):4-9.

57. Okada H, Kurita T, Mochizuki T, Morita K, Sato S. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts. *Resuscitation*. 2007;74(3):538-45.

58. Biccard BM, Goga S, de Beurs J. Dexmedetomidine and cardiac protection for non-cardiac surgery: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Anaesthesia*. 2008;63(1):4-14.

59. Geng J, Qian J, Cheng H, Ji F, Liu H. The Influence of Perioperative Dexmedetomidine on Patients Undergoing Cardiac Surgery: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152829.

60. Dong J, Guo X, Yang S, Li L. The effects of dexmedetomidine preconditioning on aged rat heart of ischaemia reperfusion injury. *Res Vet Sci*. 2017;114:489-92.

61. Badugu S, Udassi S, Shih A, Kaliki-Venkata G, Lopez-Colon D, Udassi JP. 111: DEXMEDETOMIDINE ADMINISTRATION DURING CPR DECREASES THE SYMPATHETIC RESPONSE AFTER RETURN OF SPONTANEOUS CIRCULATION. *Critical Care Medicine*. 2012;40(12):1-328.

62. Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (Second Edition) Academic Press - Elsevier; 2008.

63. Nunes S, Berg L, Raittinen LP, Ahonen H, Laranne J, Lindgren L, et al. Deep sedation with dexmedetomidine in a porcine model does not compromise the viability of free microvascular flap as depicted by microdialysis and tissue oxygen tension. *Anesth Analg*. 2007;105(3):666-72.

64. Vognsen M, Fabian-Jessing BK, Secher N, Løfgren B, Dezfulian C, Andersen LW, et al. Contemporary animal models of cardiac arrest: A systematic review. *Resuscitation*. 2017;113:115-23.

65. Cherry BH, Nguyen AQ, Hollrah RA, Olivencia-Yurvati AH, Mallet RT. Modeling cardiac arrest and resuscitation in the domestic pig. *World J Crit Care Med.* 2015;4(1):1-12.

66. Koike MK, Frimm Cde C, Curi M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction. *Int J Exp Pathol*. 2007;88(4):279-90.

67. Adams JA, Bassuk JA, Arias J, Wu H, Jorapur V, Lamas GA, et al. Acute effects of "delayed postconditioning" with periodic acceleration after asphyxia induced shock in pigs. *Pediatr Res*. 2008;64(5):533-7.

68. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. 2007;39(2):175-91.

69. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*. 2009;41(4):1149-60.

70. Baković D, Eterović D, Saratlija-Novaković Z, Palada I, Valic Z, Bilopavlović N, et al. Effect of human splenic contraction on variation in circulating blood cell counts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(11):944-51.

71. Søren Højsgaard UH, Jun Yan. The R Package geepack for Generalized Estimating Equations. *Journal of Statistical Software*. 2005;15(2).

72. Yan J, Fine J. Estimating equations for association structures. *Statistics in Medicine*. 2004;23(6):859-74.

73. Yan J. geepack: Yet Another Package for Generalized Estimating Equations. *R-News*. 2002;2:12-4.

74. Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, Müller C, Zitta K, Foesel N, et al. Pharmacological postconditioning with sevoflurane after cardiopulmonary resuscitation reduces myocardial dysfunction. *Crit Care*. 2011;15(5):R241.

75. Matsuura TR, Yannopoulos D, Aldakkak M, Bienengraeber M, Sarraf M, Bartos JA, et al. Anesthetic Postconditioning With Sevoflurane During Cardiopulmonary Resuscitation Improves Cardiac Mitochondrial Function in a Pig Model of Cardiac Arrest. *Circulation*. 2013;128(22):2.

76. Riess ML, Matsuura TR, Bartos JA, Bienengraeber M, Aldakkak M, McKnite SH, et al. Anaesthetic Postconditioning at the Initiation of CPR Improves Myocardial and Mitochondrial Function in a Pig Model of Prolonged Untreated Ventricular Fibrillation. *Resuscitation*. 2014;85(12):1745-51.

77. Mimuro S, Katoh T, Suzuki A, Yu S, Adachi YU, Uraoka M, et al. Deterioration of myocardial injury due to dexmedetomidine administration after myocardial ischaemia. *Resuscitation*. 2010;81(12):1714-7.

78. Link MS, Berkow LC, Kudenchuk PJ, Halperin HR, Hess EP, Moitra VK, et al. Part 7: Adult Advanced Cardiovascular Life Support: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. 2015;132(18 Suppl 2):S444-64.

79. Wollborn J, Ruetten E, Schlueter B, Haberstroh J, Goebel U, Schick MA. Standardized model of porcine resuscitation using a custom-made resuscitation board results in optimal hemodynamic management. *Am J Emerg Med*. 2018;36(10):1738-44.

80. Borges JP, Verdoorn KS, Daliry A, Powers SK, Ortenzi VH, Fortunato RS, et al. Delta opioid receptors: the link between exercise and cardioprotection. *PLoS One*. 2014;9(11):e113541.

81. See Hoe L, Patel HH, Peart JN. Delta Opioid Receptors and Cardioprotection. *Handb Exp Pharmacol*. 2018;247:301-34.

82. Wong GT, Huang Z, Ji S, Irwin MG. Remifentanil reduces the release of biochemical markers of myocardial damage after coronary artery bypass surgery: a randomized trial. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2010;24(5):790-6.

83. Irwin MG, Wong GT. Remifentanil and opioid-induced cardioprotection. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2015;29 Suppl 1:S23-6.

84. Peng K, Ji FH, Liu HY, Zhang J, Chen QC, Jiang YH. Effects of Perioperative Dexmedetomidine on Postoperative Mortality and Morbidity: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Ther*. 2019;41(1):138-54 e4.

85. Yoshikawa Y, Hirata N, Kawaguchi R, Tokinaga Y, Yamakage M. Dexmedetomidine Maintains Its Direct Cardioprotective Effect Against Ischemia/Reperfusion Injury in Hypertensive Hypertrophied Myocardium. *Anesth Analg*. 2018;126(2):443-52.

86. Riquelme JA, Westermeier F, Hall AR, Vicencio JM, Pedrozo Z, Ibacache M, et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism. *Pharmacol Res*. 2016;103:318-27.

87. Bunte S, Behmenburg F, Majewski N, Stroethoff M, Raupach A, Mathes A, et al. Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesth Analg*. 2019.

88. Gao JM, Meng XW, Zhang J, Chen WR, Xia F, Peng K, et al. Dexmedetomidine Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Suppressing TLR4-MyD88-NF-kappaB Signaling. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1674613.

89. Liu JR, Yuki K, Baek C, Han XH, Soriano SG. Dexmedetomidine-Induced Neuroapoptosis Is Dependent on Its Cumulative Dose. *Anesth Analg*. 2016;123(4):1008-17.

90. Lemoine S, Tritapepe L, Hanouz JL, Puddu PE. The mechanisms of cardio-protective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion: anaesthetic post-conditioning potentially translatable to humans? *British Journal of Anaesthesia*. 2016;116(4):456-75.

91. Likhvantsev VV, Landoni G, Levikov DI, Grebenchikov OA, Skripkin YV, Cherpakov RA. Sevoflurane Versus Total Intravenous Anesthesia for Isolated Coronary Artery Bypass Surgery With Cardiopulmonary Bypass: A Randomized Trial. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2016;30(5):1221-7.

92. Haraldsen P, Metzsch C, Lindstedt S, Algotsson L, Ingemansson R. Sevoflurane anesthesia during acute right ventricular ischemia in pigs preserves cardiac function better than propofol anesthesia. *Perfusion-UK*. 2016;31(6):495-502.

93. Zhou Y, Zhou X, Zhou W, Pang Q, Wang Z. The protective effect of dexmedetomidine in a rat ex vivo lung model of ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2018;33(1):1-13.

94. Sun Z, Zhao T, Lv S, Gao Y, Masters J, Weng H. Dexmedetomidine attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury through both anti-inflammation and anti-apoptosis mechanisms in rabbits. *J Transl Med*. 2018;16(1):209.

95. Zhou H, Zhou D, Lu J, Wu C, Zhu Z. Effects of Pre-Cardiopulmonary Bypass Administration of Dexmedetomidine on Cardiac Injuries and the Inflammatory Response in Valve Replacement Surgery With a Sevoflurane Postconditioning Protocol: A Pilot Study. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2019;74(2):91-7.

96. Davidson SM, Andreadou I, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ. Shining the spotlight on cardioprotection: beyond the cardiomyocyte. *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1115-6.

97. Kobayashi K, Mimuro S, Sato T, Kobayashi A, Kawashima S, Makino H, et al. Dexmedetomidine preserves the endothelial glycocalyx and improves survival in a rat heatstroke model. *J Anesth*. 2018;32(6):880-5.

MEDICINA

USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 27/01/16, **APROVOU** o documento abaixo mencionado, datado de 20/01/16, para o Protocolo de Pesquisa **nº 028/15**, intitulado: **"Avaliação do efeito da administração contínua de agentes anestésicos sobre a função miocárdica de suínos submetidos a parada cardíaca"** apresentado pelo Departamento de Cirurgia

- Inclusão de pesquisador executante: **Paulo Gabriel Melo Brandão**

Pesquisador Responsável: **Denise Aya Otsuki**

CEUA-FMUSP, 27 de Janeiro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais