

**MARCELO SOUZA XAVIER**

**Efeito do azul de metileno como adjuvante no  
desfecho da parada cardíaca : estudo  
experimental em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

---

Programa de Anestesiologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Aya Otsuki

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2017**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Xavier, Marcelo Souza  
Efeito do azul de metileno como adjuvante no  
desfecho da parada cardíaca : estudo experimental em  
ratos / Marcelo Souza Xavier. -- São Paulo, 2017.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Anestesiologia.  
Orientadora: Denise Aya Otsuki.

Descritores: 1.Parada cardíaca 2.Epinefrina  
3.Azul de metileno 4.Ratos 5.Traumatismo por  
reperfusão 6.Hipóxia-isquemia encefálica

USP/FM/DBD-509/17

## **Dedicatória**

Dedico esta conquista a minha mãe Elizabeth e ao meu pai Elias, os quais me deram uma boa base educacional e condições para que pudesse crescer pessoal e profissionalmente.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a essa força superior que nos guia e nos dá força para seguirmos com nossas vidas.

Agradeço a minha família por me apoiar e incentivar a cada conquista obtida, Elizabeth, Sérgio, Vanessa, Welliton.

Agradeço a Profa Maria Jose Carvalho Carmona, que me recebeu tão bem quando cheguei a USP para iniciar o projeto do doutorado, me passando seus conhecimentos e abrindo possibilidades de crescimento.

Agradeço a Dra Denise Aya Otsuki, que me recebeu no meio do doutorado, assumindo a orientação da minha tese e um novo projeto, possibilitando que este sonho se concretizasse. Sempre disponível e com muita disposição para fazer com que o projeto desse certo e tivesse bons resultados.

Agradeço ao Dr Matheus Vane, amigo e conselheiro durante o projeto, ajudando com que o projeto pudesse ocorrer e ter bons resultados.

Agradeço a Dra. Débora que me auxiliou no Lim-8, ajudando na execução do projeto e nas idéias para boa evolução do mesmo e boa escrita.

Agradeço ao Gilberto, funcionário do Lim-8, sempre disponível para ajudar, inclusive tendo passado do horário algumas vezes.

Agradeço a Dra Leticia pelo apoio durante a pesquisa, propiciando que muitos dados pudessem ser obtidos.

Agradeço a Dra Mariana e ao Sr. Severino, que apoiou a execução da análise histológica e imunohistológica.

Agradeço ao Dr Cristiano pelo grande auxílio na análise histológica, fazendo grande diferença no resultado final do estudo.

Agradeço aos colegas e amigos Andreia e Mauro, que me auxiliaram no começo do projeto, possibilitando com que eu pudesse realizar cursos importantes para a minha evolução no doutorado. E ao colega e chefe Eduardo Giroud por ter possibilitado folgas no trabalho para conclusão de créditos da pós-graduação.

Agradeço ao Doutor Francisco Laurindo e a Senhora Laura, que auxiliaram na avaliação de dados do estudo.

Agradeço as equipes dos LIM 12 e 16, que disponibilizaram a estrutura para que eu pudesse realizar a leitura das lâminas do tunnel e análise imunohistoquímica.

Agradeço a todos aqueles que não citei o nome aqui, mas que participaram de alguma forma nesta caminhada, ajudando em alguma etapa do projeto ou tendo paciência comigo, nos momentos de grande stress.

A jornada valeu a pena!

Esta tese está de acordo com as normas em vigor no momento da publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Lista de Gráficos	
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1 Epinefrina .....	4
3.2 Síndrome pós-parada cardiorrespiratória.....	7
3.2.1 Lesão miocárdica .....	11
3.2.2 Lesão cerebral .....	13
3.3 Óxido nítrico.....	15
3.4 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	17
3.5 Azul de metileno.....	18
4 MÉTODOS .....	22
4.1 Animais e grupos.....	22
4.2 Preparo inicial dos animais.....	23
4.3 Indução da parada cardiorrespiratória e protocolo de ressuscitação cardiopulmonar .....	24
4.4 Condução após RCE .....	29
4.5 Análise dos desfechos .....	30
4.5.1 Dados hemodinâmicos .....	30
4.5.2 Análises laboratoriais .....	30
4.5.3 Análise histológica.....	31
4.5.4 Análise imunohistoquímica .....	32
4.6 Dosagem de proteínas inflamatórias.....	33
4.6.1 Extração de proteínas .....	33
4.6.2 Western blot.....	33
4.7 Dosagem de estresse oxidativo .....	34
4.8 Análise estatística .....	34
5 RESULTADOS .....	36
5.1 Retorno da circulação espontânea e ressuscitação cardiopulmonar.....	36
5.2 Pressão arterial e frequência cardíaca .....	39
5.3 Exames laboratoriais .....	41
5.4 Pressão diastólica .....	47

5.5	Dosagem de proteínas e de estresse oxidativo .....	48
5.6	Troponina .....	49
5.7	Histologia.....	50
5.8	Marcação de Tunel.....	53
6	DISCUSSÃO .....	57
6.1	Grupo Sham.....	57
6.2	Retorno da circulação espontânea e pressão arterial .....	58
6.3	Exames laboratoriais e de anatomia patológica.....	60
6.3.1	Gasometria.....	60
6.3.2	Lactato.....	63
6.3.3	Glicemia.....	63
6.3.4	Eletrólitos.....	64
6.3.5	Coração.....	65
6.3.6	Cérebro .....	68
6.4	Seleção do modelo experimental e padronização do método.....	69
6.5	Limitações e pontos negativos do estudo .....	72
6.6	Considerações finais.....	72
7	CONCLUSÕES .....	74
8	ANEXOS .....	75
8.1	Anexo 1 - Aprovação da CEUA.....	75
8.2	Anexo 2 – Resultados dos exames do grupo azul .....	76
8.3	Anexo 3 – Resultados da análise histológica do grupo azul .....	77
9	REFERÊNCIAS.....	78



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Distribuição da mediana do tempo de ressuscitação cardiopulmonar, com mínimo e máximo, e de sobrevivência após retorno da circulação espontânea .....	37
<b>Tabela 2</b> – Mediana da pressão arterial, com mínimo e máximo, de acordo com os períodos de registro do estudo, separados por grupos (mmHg).....	40
<b>Tabela 3</b> – Mediana, com mínimo e máximo, da frequência cardíaca de cada grupo, nos períodos de registro do estudo (batimentos por minuto) .....	41
<b>Tabela 4</b> – Mediana dos parâmetros da gasometria, nos períodos basal e após retorno da circulação espontânea, por grupos de estudo. Valores mínimo e máximo entre parênteses .....	42
<b>Tabela 5</b> – Mediana do Excesso de base e do bicarbonato, nos períodos basal e após retorno da circulação espontânea, por grupo de estudo. Valores mínimo e máximo entre parênteses .....	43
<b>Tabela 6</b> – Avaliação da correlação estatística entre PaO <sub>2</sub> após o retorno da circulação espontânea com marcação de Tunel do cérebro, marcação de Tunel do coração e lactato após o retorno da circulação espontânea .....	44
<b>Tabela 7</b> – Mediana das concentrações plasmáticas de potássio e cálcio, nos períodos basal e após retorno da circulação espontânea, por grupo de estudo .....	45
<b>Tabela 8</b> – Variação da glicemia em cada grupo, considerando o valor basal e a medida após 10 min de retorno da circulação espontânea.....	46
<b>Tabela 9</b> – Mediana do lactato nos períodos basal e após o retorno da circulação espontânea, separados por grupos.....	46

<b>Tabela 10</b> – Mediana da pressão arterial diastólica durante a ressuscitação cardiopulmonar, com mínimo e máximo, separadas por grupo de estudo (mmHg) .....	47
<b>Tabela 11</b> – Mediana da dosagem de troponina nos ratos com retorno da circulação espontânea, com valores mínimo e máximo entre parênteses .....	50
<b>Tabela 12</b> – Características histológicas de lesão hipóxico-isquêmica avaliadas no coração, separadas por grupo, dos ratos que tiveram retorno da circulação espontânea, referidas em percentual da amostra .....	50
<b>Tabela 13</b> – Características histológicas de lesão hipóxico-isquêmica avaliadas no cérebro, separadas por grupo, dos ratos que tiveram retorno da circulação espontânea, referidas em percentual da amostra .....	52
<b>Tabela 14</b> – Mediana da marcação de Tunel em cada grupo, com mínimo e máximo de lesões em cada grupo.....	53
<b>Tabela 15</b> – Parâmetros hemodinâmicos no ser humano e no rato.....	70

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Curva pressórica do ventrículo direito e eletrocardiografia durante a localização do ventrículo direito ..... 25
- Figura 2** – Curva de pressão arterial e eletrocardiograma durante a estimulação elétrica de fibrilação ventricular ..... 25
- Figura 3** – Posicionamento do rato com o compressor externo automático .... 27
- Figura 4** – Secção histológica de um corte miocárdico (H&E, 400x). A figura superior representa uma área lesionada com eosinofilia citoplasmática proeminente, com perda das estriações celulares características dessa topografia e presença de discretas vacuolizações, evidenciando uma lesão precoce resultante de surto de hipóxia/isquemia. A figura inferior representa uma área normal com fibras cardíacas mantendo suas estriações citoplasmáticas..... 51
- Figura 5** – Secção histológica de um corte cerebral (H&E, 400x). Secção histológica de cérebro demonstrando área de neurônios lesionados por ação de hipóxia/isquemia. Setas indicando neurônios eosinofílicos, com reorganização das organelas citoplasmáticas caracterizada por sua redistribuição mais periférica em relação ao núcleo..... 52
- Figura 6** – Campo de lâminas de cérebro, mostrando a marcação de Tunel, em aumento 1000X, com lesões por apoptose demonstradas pelas setas. A: grupo controle, B : grupo epinefrina, C: grupo misto, D: grupo sham ..... 55
- Figura 7** – Campo de lâminas de coração, apresentando a marcação de Tunel, com perda das estriações e núcleos com cromatina periférica (1000x), demonstradas pelas setas. A: grupo controle, B: grupo epinefrina, C: grupo misto, D: grupo sham ..... 56

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Preparo dos animais, da indução anestésica até o início da ressuscitação cardiopulmonar.....	26
<b>Gráfico 2</b> – Protocolo de ressuscitação cardiopulmonar para cada grupo, e seguimento conforme ritmo eletrocardiográfico e medida de pressão arterial média aferida.....	28
<b>Gráfico 3</b> – Distribuição dos ratos nos grupos de estudo e com sobrevivida após ressuscitação cardiopulmonar para cada grupo .....	36
<b>Gráfico 4</b> – Correlação entre o lactato após o retorno da circulação espontânea e o tempo de ressuscitação cardiopulmonar .....	38
<b>Gráfico 5</b> – Correlação entre o tempo de ressuscitação cardiopulmonar e a dosagem de troponina para cada grupo.....	38
<b>Gráfico 6</b> – Mediana da pressão arterial média nos diversos grupos, em relação temporal, desde o tempo basal até o encerramento do protocolo .....	39
<b>Gráfico 7</b> – Dosagem da proteína BAX nos grupos de estudo .....	48
<b>Gráfico 8</b> – Dosagem da proteína TLR4 nos grupos de estudo .....	48
<b>Gráfico 9</b> – Dosagem da enzima TBARS nos grupos de estudo.....	49
<b>Gráfico 10</b> – Mediana de lesões em cada grupo, para análise da marcação de Tunel no cérebro e no coração.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AESP	Atividade elétrica sem pulso
AM	Azul de metileno
AMPc	Adenosina monofosfato ciclica
ANG1	Angiopoetina 1
ANG2	Angiopoetina 2
ANOVA	Teste estatístico de Análise de Variância
ATC	Ácido tricloroacético
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BAX	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	Celular B de linfoma 2
BHE	Barreira hematoencefálica
CEUA-USP	Comissão de ética no uso de animais – Universidade de São Paulo
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiograma
EGC	Enzima guanilato ciclase
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FV	Fibrilação ventricular
GA	Grupo azul de metileno
GC	Grupo controle
GE	Grupo epinefrina
GM	Grupo misto
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GS	Grupo Sham
GSK-3 $\beta$	Glicogênio sintase kinase-3 $\beta$
GTP	Guanosina trifosfato
H&E	Hematoxilina & heosina
IAM	Infarto agudo do miocárdio
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida

IOT	Intubação orotraqueal
irpm	Incursões respiratórias por minuto
JAK/STAT	Janus quinase/ transdutor de sinal e ativador da transcrição
MAO	Monoamina oxidase
MCE	Massagem cardíaca externa
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato-hidrogênio
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PAD	Pressão arterial diastólica
PAI	Pressão arterial invasiva
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Parada cardiorrespiratória
RCE	Retorno da circulação espontânea
RCP	Ressuscitação cardiopulmonar
RNA	Ácido ribonucleico
Ry-R2	Receptores rianodina 2
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório do adulto
SPPCR	Síndrome do pós-parada cardiorrespiratória
SPSS	Programa para análise estatística
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBS-T	Tris-buffered salina and Tween 20
TLR4	Toll-like receptors 4
TVSP	Taquicardia ventricular sem pulso
VM	Ventilação mecânica
VD	Ventrículo direito
XO	Xantina oxidase
bpm	batimentos cardíacos por minuto
C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> S.3H <sub>2</sub> O	Fórmula molecular do azul de metileno
Ca <sup>++</sup>	Cálcio

cm	centímetro
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
Hz	Hertz
J	Joules
mA	miliamper
mcg/kg	microgramas/quilograma
mcg/kg/dose	micrograma/quilograma/dose
mg/dL	miligrama/decilitro
mg/kg	miligrama/quilograma
mg/kg/dose	miligrama/quilograma/dose
mg/kg/h	miligrama/quilograma/hora
ml	mililitro
ml/kg	mililitro/quilograma
mmHg	milímetro de mercúrio
mmol/L	milimol/litro
Na <sup>+</sup>	Sódio
ng/ml	nanograma/mililitro
nm	nanômetro
nmol/prot/ml	nanomol/proteína/mililitro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO-	Peroxinitrito
p	nível de significância estatística
PaCO <sub>2</sub>	Pressão arterial de gás carbônico
PaO <sub>2</sub>	Pressão arterial de oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
°C	Graus centígrados
μL	Microlitro
μm	micrômetro

## Resumo

Xavier MS. *Efeito do azul de metileno como adjuvante no desfecho da parada cardíaca: estudo experimental em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

**INTRODUÇÃO:** O uso da epinefrina na ressuscitação cardiopulmonar (RCP) tem sido questionado devido aos efeitos adversos como dano miocárdico e cerebral. Fármacos como azul de metileno têm sido estudados como adjuvantes, objetivando reduzir essas lesões. **OBJETIVOS:** Neste estudo objetivou-se avaliar o efeito da administração do azul de metileno em bôlus durante a RCP, na lesão miocárdica e cerebral. **MÉTODO:** Quarenta e nove ratos Wistar machos submetidos a parada cardíaca por fibrilação ventricular foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com 11 animais: azul de metileno (GA, 2mg/kg), solução salina (GC, salina 0,9% 0,1ml), epinefrina (GE, 20mcg/kg), epinefrina + azul de metileno (GM), além do grupo sham com 5 animais. A fibrilação ventricular foi induzida por estimulação elétrica direto no ventrículo direito por 3 minutos, sendo mantidos por mais 2 minutos em anóxia. As manobras de RCP foram iniciadas com o fármaco correspondente de cada grupo, massagem torácica, ventilação e desfibrilação. Após retorno a circulação espontânea (RCE), os animais foram observados durante quatro horas. Foram coletados sangue para gasometria e troponina, tecido cardíaco e cerebral para análise histológica, marcação de TUNEL, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Os grupos foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o teste de comparação múltipla com correção de Bonferroni quando adequado. **RESULTADOS:** Animais do grupo GE apresentaram 63% de RCE, enquanto o GC e GM obtiveram 40% e 45%, respectivamente, sem diferença estatística entre os grupos ( $p=0,672$ ). O grupo GA apresentou apenas 18% de RCE e foi excluído da análise. O tempo de RCP do GC foi maior comparado aos grupos GE e GM, mas sem diferença estatisticamente significativa. Os animais do grupo GM apresentaram PAM maior comparado ao grupo GC, no momento imediatamente após a RCE ( $P=0,007$ ). Em todos os grupos os animais apresentaram acidose, queda da  $PaO_2$  e aumento do lactato após PCR e RCP. A mediana da troponina sérica foi maior no GC (130ng/ml) comparada ao grupo GE (3,8ng/ml), e GM (43,7ng/ml), porém sem diferença estatística. O grupo GC apresentou aumento significativo na expressão proteica dos marcadores BAX e TLR4. Não houve diferença estatística em relação a histologia e marcação de TUNEL entre os grupos submetidos a PCR. **CONCLUSÃO:** A utilização de azul de metileno em bolus na RCP de forma isolada apresentou resultados negativos em relação ao retorno da circulação espontânea. A utilização de azul de metileno associada a epinefrina não diminuiu a presença de lesões no cérebro e no coração decorrentes da parada cardíaca.

Descritores: parada cardíaca; epinefrina; azul de metileno; ratos; traumatismo por reperfusão; hipóxia-isquemia encefálica



## Abstract

Xavier MS. *Effect of methylene blue as an adjuvant on the outcome of cardiac arrest: an experimental study in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

**INTRODUCTION:** The use of epinephrine in cardiopulmonary resuscitation (CPR) has been questioned due to adverse effects such as myocardial and cerebral damage. Drugs such as methylene blue have been studied as adjuvants in order to reduce lesions. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the effect of methylene blue administration during CPR on myocardial and cerebral lesion. **METHOD:** Forty nine Wistar male rats submitted to ventricular fibrillation cardiac arrest (CA) were randomly assigned to four principal groups with 11 cases each one: methylene blue (MB, 2mg/kg), control (CTRL, 0.1ml saline 0.9%), epinephrine (EPI, 20µg/kg), epinephrine plus methylene blue (EPI+MB), and a sham group, wich have 5 cases. Ventricular fibrillation was induced by direct electrical stimulation in the right ventricle for 3 minutes and anoxia was maintained until a total of 5 minutes. CPR was initiated using the group drug, ventilation, chest compressions and defibrillation. The animals were observed for four hours after return of spontaneous circulation (ROSC). Blood samples were collected for blood gas and troponin measurements. Heart and brain tissues were harvested for the evaluation of oxidative stress, inflammation, histological and TUNEL staining. Groups were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test and Bonferroni post test. **RESULTS:** ROSC was achieved in 63% of the cases in EPI, 40% in CTRL, and 45% in EPI+MB (P=0.672). MB was excluded from analysis because of its low ROSC rate (18%). CPR duration was longer in CTRL compared to EPI and EPI+MB, without statistical significance. EPI+MB animals presented higher arterial pressure compared to the CTRL group, immediately after ROSC (P=0.007). All animals presented acidosis, decreased PaO<sub>2</sub> and increased lactate after CA and CPR. Serum troponin was higher in CTRL (130ng/ml) compared with EPI (3.8ng/ml) and EPI+MB (43.7ng/ml), without statistical significance. CTRL presented higher BAX and TLR4 expression. There was no difference in TUNEL staining and histology among CA groups. **CONCLUSION:** Methylene blue in bolus during CPR did not improve outcome. Methylene blue combined with epinephrine did not decrease CA-related myocardial and cerebral lesions.

Descriptors: cardiac arrest; epinephrine; methylene blue; rats; reperfusion injury; hypoxia-ischemia, brain

---

# 1 INTRODUÇÃO

A parada cardiorrespiratória (PCR) é o pior desfecho reversível encontrado na prática médica, sendo realizados estudos para melhoria do tratamento empregado. Apesar dos esforços, a morbidade e mortalidade ainda permanecem elevadas. A fase após o RCE apresenta diversas complicações, sendo estas resumidas na síndrome pós-parada cardiorrespiratória (SPPCR). Esta envolve diversas complicações como perda da autoregulação cerebral, lesão miocárdica com disfunção ventricular global, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, supressão adrenal, além de descompensação das doenças prévias <sup>(1)</sup>.

As complicações mais importantes nesta fase são a disfunção miocárdica e o dano cerebral. A disfunção miocárdica por causar baixo débito com hipotensão, mantém o quadro de hipoperfusão sistêmica e pouca oferta de oxigênio, o que perpetua o processo de lesão, incluindo a cerebral. O dano cerebral é o principal fator de óbito e sequelas, devendo ser evitado a qualquer custo <sup>(2)</sup>.

As complicações da SPPCR estão relacionadas a diversos fatores, entre eles o tempo de PCR sem ressuscitação cardiopulmonar (RCP), tempo total de RCP, resposta inflamatória sistêmica e eventos adversos dos medicamentos utilizados, com destaque para a epinefrina. Esta tem sido apontada por diversos estudos por possuir um efeito deletério, principalmente por sua ação beta adrenérgica <sup>(3)</sup>. No coração, a epinefrina promove aumento do consumo miocárdico de oxigênio e redução do débito cardíaco após o retorno da circulação espontânea (RCE), mantendo o estado de hipoperfusão coronariana. Outro ponto de destaque é a indução de apoptose pela cardiotoxicidade deste medicamento, ampliando a área de lesão tecidual. Além do efeito miocárdico, a epinefrina também possui diversos efeitos negativos no cérebro, intestino e outros órgãos, sendo fator de risco isolado para mortalidade nas primeiras 24 horas quando utilizada em altas doses (maior de 100 mcg/kg) <sup>(3-6)</sup>.

Assim, fármacos alternativos têm sido estudados para que, em associação com a epinefrina, possam reduzir os efeitos adversos e manter os

benéficos. Um destes fármacos é o azul de metileno (AM), o qual tem se mostrado uma opção para tratamento da PCR, pois atenua o efeito oxidativo e inflamatório sobre o miocárdio e o encéfalo. O AM tem efeito inibitório direto sobre a formação da óxido nítrico sintetase (NOS) e bloqueia a síntese de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) pela inibição da enzima guanilato ciclase (EGC), importante na regulação da vasoconstricção. Protege também do efeito de algumas espécies reativas de oxigênio (ERO), devido à inibição da xantina oxidase (XO) <sup>(7-13)</sup>.

Apesar de existirem estudos com uso do AM em pacientes que apresentaram PCR, estes só utilizam o AM em infusão contínua, visando melhorar a resposta hemodinâmica após RCE ou amenizar os danos da SPPCR. Há que se questionar se a dose somente em bolus não poderia ocasionar o mesmo efeito, já que a meia vida do fármaco é de 6 a 8 horas. Não foram encontrados estudos que testem este medicamento, utilizado em bolus durante a RCP, visando reduzir os efeitos deletérios da epinefrina no miocárdio e no cérebro.

## 2 OBJETIVOS

Primário: Avaliar o efeito do azul de metileno, em bolus, na redução da lesão miocárdica após ressuscitação cardiopulmonar, analisada pela dosagem de troponinas, em ratos

Secundário: avaliar o efeito do azul de metileno, utilizado em bolus durante a ressuscitação cardiopulmonar, na redução das lesões cerebral e miocárdica, da resposta inflamatória e do estresse oxidativo, assim como das alterações na gasometria e eletrolitos.

Hipóteses

H<sub>0</sub>: Azul de metileno utilizado durante a RCP não altera desfechos

H<sub>1</sub>: Azul de metileno utilizado durante a RCP reduz dano cerebral e miocárdico

---

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Os estudos relativos ao tratamento da PCR sempre objetivaram elevar a taxa de RCE, porém, o foco de estudo atualmente tem sido as complicações apresentadas pelos pacientes após o RCE. Percebeu-se que há elevada mortalidade destes, com índice de alta hospitalar muito baixo, chegando a menos de 20 % em PCR dentro do hospital e 5-9 % em PCR que ocorre fora do ambiente hospitalar. As complicações envolvem a descompensação das doenças prévias do paciente, as alterações causadas nos diversos órgãos e o processo inflamatório causado pelo processo de isquemia e reperfusão <sup>(14,15)</sup>. Desta forma, tem-se estudado todas as etapas envolvidas na RCP e os cuidados após o RCE, com o intuito de melhorar os resultados.

#### 3.1 Epinefrina

Segundo o protocolo atual de RCP, da American Heart Association, o único fármaco de uso em todos os ritmos de PCR é a epinefrina. É um medicamento que tem ação alfa-adrenérgica (vasoconstrição) e beta-adrenérgica (inotrópico). Há diversos estudos mostrando o benefício do uso deste fármaco na RCP, com maior taxa de RCE, melhor perfusão cerebral e coronariana, melhora da pressão diastólica e da pressão de perfusão cerebral. A epinefrina aumenta o fluxo coronariano, melhorando o fluxo de nutrientes e oxigênio ao miocárdio, evitando a estase e eliminando metabólitos como ácido láctico e CO<sub>2</sub> <sup>(14,16-18)</sup>.

No entanto, alguns estudos apontam o efeito deletério da epinefrina no miocárdio e em outros órgãos, principalmente devido ao efeito beta-adrenérgico. Este efeito ocasiona o aumento do consumo de oxigênio, com aumento do risco de isquemia miocárdica. Outro fator de dano é a ativação da proteína quinase A pela epinefrina, a qual está implicada na apoptose de células miocárdicas. O efeito deletério pela ação beta-adrenérgica foi determinado com

estudos realizados com a metoxamina, um fármaco com efeito alfa-adrenérgico isolado (alfa1-agonista), nos quais não foram observados os efeitos deletérios da epinefrina. O estudo de Tang et al. (1995) é um dos exemplos, tendo demonstrado pior desempenho ventricular e maior necessidade de desfibrilação em pacientes que foram reanimados com epinefrina, em comparação com o grupo que utilizou um fármaco somente alfa-adrenergico <sup>(3,19,20)</sup>. Outro estudo foi o de Ditchey and Lindenfel (1988), que obtiveram o mesmo desfecho, mas com melhor resultado ao utilizar a metoxamina. Neste estudo, o grupo em que foi utilizado epinefrina o fluxo coronariano dobrou, porém houve aumento do lactato e redução da quantidade de adenosina trifosfato (ATP) no miocárdio. Já no grupo da metoxamina estas alterações deletérias não ocorreram <sup>(17)</sup>. Além disto, estudos feitos com epinefrina associada a um antagonista beta-adrenérgico também demonstraram redução dos efeitos indesejados <sup>(18)</sup>.

Além do efeito no miocárdio, o uso de epinefrina tem apresentado pior mortalidade, principalmente em altas doses, devido a maior incidência de estado hiperadrenérgico após RCE, caracterizado por hipertensão e taquicardia. Também há efeito em outros órgãos, com vasoconstrição pulmonar e cerebral, piorando a oferta de nutrientes e a troca gasosa <sup>(18-20)</sup>. A epinefrina pode ser considerada um fator independente de redução da sobrevida em 30 dias <sup>(21)</sup>.

Apesar de se saber há mais de 30 anos sobre os efeitos deletérios da epinefrina, este medicamento ainda é incorporado aos algoritmos de manejo da PCR pois é capaz de resultar em maiores incidências de RCE. Contudo ao se avaliar alta hospital e dano neurológico, há dados conflitantes na literatura, com estudos em que não houve diferença do uso de epinefrina em relação ao placebo <sup>(14,18,22-26)</sup> e outros que demonstram maior sobrevida no grupo epinefrina <sup>(27,28)</sup>. Estes dados levantam questionamentos sobre a manutenção do uso da epinefrina no tratamento da PCR e seu real benefício, mas muitas dúvidas ainda persistem <sup>(21,29,30)</sup>.

Os principais vieses colocados em relação a estes estudos são o baixo número de casos em que a RCP foi realizada sem epinefrina, as diferenças epidemiológicas e de doenças de base entre os grupos, além de outras características do estudo. Parte deste viés reside na baixa aceitação pelos profissionais de saúde em não utilizar a epinefrina, uma vez que este

medicamento esta enraizado na cultura médica nessas situações. Outro ponto é a variabilidade de fatores causais, variações no manejo do paciente após o RCE, intervenções, sendo difícil ter grupos equiparados para comparação <sup>(22)</sup>. Todas estas variáveis, além de ocasionar vieses aos estudos, tornam as conclusões pouco confiáveis para definir mudanças de conduta.

Também se discute se a repetição das doses de epinefrina ocasionam benefício real. Em dois estudos, de Cairns et al. (1998) e Bar-Joseph et al. (2000), houve boa resposta a primeira dose de epinefrina, porém não houve resposta hemodinâmica significativa as doses posteriores. Estes estudos levantam a teoria de que doses repetidas de epinefrina dessensibilizariam os receptores adrenérgicos miocárdicos e periféricos, com respostas diminuídas após a primeira dose <sup>(31,32)</sup>.

Nesta idéia de otimizar a RCP e reduzir os efeitos deletérios da epinefrina, outros fármacos e substâncias têm sido utilizados, como o azul de metileno, as soluções hipertônicas e hiperoncóticas. Estes estudos visam tanto aumentar o percentual de RCE como reduzir os danos orgânicos, principalmente no cérebro e coração, os órgãos mais envolvidos na alta mortalidade. Porém, pela dificuldade de realização de ensaios clínicos, estes estudos têm sido realizados de forma experimental, tentando elucidar mecanismos e resultados preliminares para posteriormente serem realizados em seres humanos <sup>(3,19)</sup>.

O uso das soluções hipertônicas e hiperoncóticas, assim como do azul de metileno, possibilitou melhorar o fluxo na microcirculação e na macrocirculação, melhorando a perfusão periférica e retornando o fluxo sanguíneo aos diversos órgãos de forma mais precoce. Com o retorno mais precoce da perfusão sanguínea, ocorre redução do grau de lesão celular e, conseqüentemente, preservação da função orgânica após RCE. Miclescu et al. (2007) demonstraram que o azul de metileno em infusão continua mesmo após RCE reduziu o grau de lesão cerebral e miocárdica e a associação de azul de metileno com solução hipertônica com dextran reduziu ainda mais a lesão miocárdica, entretanto, todos de forma experimental <sup>(33,34)</sup>. Pouco se sabe sobre o uso de azul de metileno somente em bolus durante a RCP.

### 3.2 Síndrome pós-parada cardiorrespiratória

A SPPCR foi descrita inicialmente em 1970 e inclui efeitos no metabolismo e na homeostase do sistema nervoso central, lesão miocárdica e em outros órgãos, podendo acarretar mudanças irreversíveis. A SPPCR também potencializa a descompensação das causas subjacentes, como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, doenças da tireóide e outras <sup>(35-37)</sup>.

A mortalidade da SPPCR é muito variável na literatura, com valores médios próximos a 70%. Há muita dificuldade para realização de estudos comparativos destes pacientes, pois são variados o tempo de RCP, as causas de PCR, as condutas nas unidades de terapia intensiva, além de outros fatores. Também é difícil definir o fator principal causador do óbito, devido aos diversos fatores que interferem na evolução do paciente desde a ocorrência da PCR até a alta hospitalar ou óbito. Estas variáveis fazem com que a sobrevida em cada região estudada seja diferente, e inclusive com diferentes status de qualidade de vida em cada grupo após a alta hospitalar <sup>(37)</sup>. As causas mais comuns de óbito após PCR de causa não neurológica são disfunção miocárdica, infecção secundária e falência de múltiplos órgãos. A disfunção ventricular sistólica do ventrículo esquerdo ocorre em praticamente 2/3 dos pacientes após RCE <sup>(38)</sup>.

Após a restauração do fluxo sanguíneo a reperfusão pode causar diversos efeitos prejudiciais no organismo, tanto pelo retorno da oferta de oxigênio aos tecidos, como pelo fato de que a reperfusão não ocorre de forma plena para todos os órgãos e tecidos. Em alguns o fluxo sanguíneo retorna de forma parcial, lenta, mantendo um quadro de hipoperfusão e baixa oferta de oxigênio e nutrientes. Durante esta fase de reperfusão ocorre necrose de células irreversivelmente lesadas, edema, apoptose, acúmulo de cálcio intracelular, disfunção endotelial <sup>(39)</sup>.

A reperfusão ativa ocasiona uma cascata inflamatória, com liberação de ERO, citocinas (Interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ), quimiocinas e com ativação de leucócitos. Há também a participação da via Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT), que participa da ampliação da resposta das citocinas <sup>(40)</sup>. Após a isquemia o tecido sofre infiltração de leucócitos com aumento da adesão ao endotélio, causando lesão, edemaciando o



endotélio e bloqueando o fluxo sanguíneo. Com o baixo fluxo sanguíneo ocorre deficiência de oxigênio, causando fosforilação oxidativa da mitocôndria, reduzindo a produção de ATP, o que torna a bomba de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  pouco funcionante. Desta forma, há acúmulo de cálcio intracelular, que ativa a fosforilase A2 cálcio dependente, endonuclease e proteases. Estas alterações ocasionam morte celular e apoptose <sup>(40)</sup>.

O processo de inflamação e formação de produtos tóxicos não termina de forma rápida. Segundo Medeiros & Benfato (2013) pacientes com RCE podem manter acidose metabólica por longo período <sup>(41)</sup>. Com a falta de oxigênio o metabolismo ocorre em anaerobiose, com acúmulo tecidual de metabólitos e acidose. A restauração da oxigenação não faz com que o metabolismo retorne ao processo de aerobiose imediatamente. Mesmo com grande oferta de oxigênio, a normalização do metabolismo demanda algum tempo. Somente após 90-180 minutos da restauração da circulação e da respiração aeróbia é que a compensação da acidose metabólica se inicia. Além do metabolismo anaeróbico durante a PCR, outra explicação é a lesão hepática após isquemia, que prejudica a eliminação do lactato, com piora da acidose <sup>(36,42)</sup>. O ácido láctico além de contribuir para a acidose metabólica causa alteração do metabolismo dos neurônios e na neuroglia, produz edema no endotélio dos capilares no encéfalo e trombos de plaquetas e eritrócitos, altera o estado hemodinâmico e a contratilidade muscular <sup>(36)</sup>.

Além da ação local nas células, a reperfusão ocasiona liberação de hormônios de estresse como catecolaminas e cortisol, ativação de inflamação sistêmica, translocação bacteriana do intestino <sup>(41)</sup>. A hiperglicemia pode ocorrer, sendo mais um fator de complicações, pois a oxidação das moléculas de glicose forma ERO e ocasiona inativação de enzimas <sup>(43)</sup>.

Outra forma de lesão é pela liberação de ERO que causam peroxidação lipídica das membranas e dano oxidativo das proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), com posterior ocorrência de apoptose e morte celular. A mitocôndria é a maior fonte de ERO, e o primeiro alvo das mesmas <sup>(40)</sup>. Para tentar entender melhor o desenvolvimento da SPPCR e suas particularidades, dividiu-se a fase após PCR em quatro fases, com as complicações mais

frequentes e objetivos no tratamento. Elas iniciam logo após o RCE e persistem indefinidamente:

- Fase imediata - os primeiros 20 minutos após RCE;
- Fase precoce - intervalo entre 20 minutos e 12 horas após RCE. Momento este ideal para as intervenções;
- Fase intermediária - entre 12 e 72 horas, período em que ainda ocorrem lesões e novos tratamentos podem ser feitos;
- Fase tardia - inicia após 72 horas, e no qual os danos já estão definidos. Nesta fase avalia-se o prognóstico e a reabilitação.

O cérebro é o órgão mais afetado, apresentando lesão em 10-40 % dos pacientes, podendo ser estas decorrentes da fase de PCR ou da lesão após reperfusão. É o principal responsável pela elevada mortalidade nos primeiros dias após o RCE e pelas sequelas após alta hospitalar. Sendo desta forma um dos principais focos de estudo na atualidade, ao ser avaliar mudanças de conduta na RCP <sup>(44,45)</sup>.

O dano miocárdico da SPPCR é caracterizado principalmente por disfunção miocárdica, perpetuando o estado de hipoperfusão, como detalhado a frente. Esta tendência a baixo fluxo sanguíneo reduz a oferta de oxigênio e nutrientes, ocasionando mais lesões sistêmicas, demandando suporte hemodinâmico nesta fase inicial. Esta redução da oferta de sangue aos tecidos torna-se mais deletéria nesta fase devido ao estado hiperadrenérgico, em que o consumo de oxigênio esta elevado, ampliando o delta entre a demanda e a oferta de oxigênio <sup>(36,46)</sup>.

A descompensação pulmonar e da oferta de oxigênio também é frequente nestes doentes, seja pelo processo inflamatório da isquemia-reperfusão, pelos fármacos utilizados durante a RCP ou pelo trauma relacionado a compressão torácica. Não é incomum o desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e de pneumonia, com alguns pacientes apresentando  $\text{PaO}_2 < 100 \text{ mmHg}$  <sup>(38,47)</sup>.

São alterações comuns na gasometria, segundo Youn-Jung et al. (2016), a hipoxemia, hipercalemia, lactato elevado, elevação do  $\text{CO}_2$ , muitas vezes ocasionando acidose mista, com componente tanto respiratório como metabólico.

Estas alterações são geralmente consequência do quadro de baixa perfusão e não causa da PCR. O nível de PaCO<sub>2</sub> é um fator isolado preditor de RCE sustentado em pacientes que apresentaram PCR fora do ambiente hospitalar. Pacientes que apresentam PaCO<sub>2</sub> <75 mmHg tem 3,3 vezes mais chance de RCE, e 89 % dos casos que apresentaram RCE tinham PaCO<sub>2</sub> <100 mmHg <sup>(48)</sup>.

McKensie et al. (2016), em metanálise, defendem a importância do CO<sub>2</sub> na sobrevida e no prognóstico neurológico. A normocarbica tem sido considerada a situação desejada após RCE, pois a hipocarbica ocasionaria vasoconstrição cerebral com baixa perfusão, e a hipercarbica com vasodilatação pioraria o edema cerebral e todas as demais consequências do edema <sup>(49)</sup>.

Já em relação ao oxigênio, apesar da necessidade de reverter o estado de hipóxia, evidências têm sugerido que a oferta rápida de oxigênio pode piorar os mecanismos de injúria após reperfusão. Ocorreria grande produção de ERO e maior lesão oxidativa. Além deste processo, ocorre o processo inflamatório devido a liberação de citocinas pelo dano endotelial e liberação de óxido nítrico (NO) <sup>(39)</sup>.

A descompensação inicial do paciente pode ser um problema também na SPPCR. Algumas doenças como infarto agudo do miocárdio (IAM), doenças pulmonares, sepse, hemorragias e outras podem desencadear a PCR e necessitam de atenção após o RCE, seja com tratamentos intervencionistas como no IAM ou com tratamentos clínicos. O IAM pode estar presente em até 50 % dos casos de PCR em adulto <sup>(50)</sup>.

Alguns marcadores séricos podem ser utilizados nas fases iniciais para elucidar o prognóstico do paciente. O fator angiopoetina 1 (Ang1) solúvel estabiliza os níveis de angiopoetina 2 (Ang2) endotelial, sendo que uma elevada proporção de Ang2/Ang1 é preditiva de falência múltipla de órgãos e pior prognóstico <sup>(51)</sup>. Autores tem defendido que as elevações nas 3 primeiras horas de RCE da concentração de citocinas, de receptores solúveis e endotoxinas tem correlação direta com o desfecho na morbidade e mortalidade dos pacientes <sup>(52)</sup>.

E para o prognóstico final, é desejável a realização de testes neuropsicológicos, com o objetivo de analisar o grau de lesão cerebral, otimizando desta forma a reabilitação.

### 3.2.1 Lesão miocárdica

A lesão miocárdica da PCR ocorre durante o período de isquemia e também após a reperfusão, sendo representada funcionalmente pela disfunção miocárdica. Esta ocorre devido a diversos fatores: formação de ERO, disfunção no metabolismo do óxido nítrico, apoptose, resposta inflamatória, microembolizações por agregação plaquetária e efeito deletério da epinefrina <sup>(20)</sup>. Estudo realizado em suínos demonstrou alterações iniciando nos primeiros 30 minutos após RCE, com alterações na fração de ejeção (redução de 55 % para 20 %) e na pressão diastólica no ventrículo esquerdo (aumentando de 8-10 para 20-22 mmHg) <sup>(37)</sup>. A disfunção nesta fase caracteriza-se por disfunção biventricular que ocasionalmente inicia nas primeiras horas após RCE. Além da disfunção miocárdica, nesta fase há também um componente vascular, com vasodilatação, que contribui para manutenção da hipotensão.

No intuito de reduzir lesões, é indicado nesta fase o uso de fármacos vasopressores, com o intuito de manter perfusão adequada. Alguns estudos sugerem que seja mantida uma pressão arterial sistólica (PAS) maior que 90 mmHg, e outros pressão arterial média (PAM) entre 80 e 100 mmHg <sup>(51,53,54)</sup>.

Insultos agudos como o da isquemia e reperfusão, infarto agudo do miocárdio (IAM) e mesmo condições crônicas como miocardiopatia isquêmica estão associados ao aumento da morte celular, tanto em estudos em animais como em humanos. No caso da isquemia e reperfusão, ocorre morte celular por apoptose e por necrose. A necrose é maior na fase inicial, durante a isquemia <sup>(55, 56)</sup>, enquanto que a apoptose ocorre mais frequentemente com a reperfusão, momento em que ocorre aumento das ERO, com aumento do índice de apoptose. A reperfusão do miocárdio ocasiona a formação aguda de citocinas e ERO, entre eles o superóxido, responsáveis pela disfunção do miocárdio. As NOS são ativadas ocasionando aumento exagerado de NO <sup>(57,58)</sup>.

Também ocorre indução de apoptose pela estimulação dos receptores beta-adrenérgicos, efeito comprovado in vivo e in vitro. Ao estimular os receptores beta-adrenérgicos a glicogênio sintase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) é ativada e inicia um processo pró-apoptótico <sup>(59)</sup>. A morte dos miócitos ocorre por hiperfosforilação de receptores rianodina 2 (RyR<sub>2</sub>) e de calstabin. Com a

disfunção do complexo RyR<sub>2</sub>-calstabin, este canal passa a funcionar de maneira inadequada e aumenta o cálcio intracelular, propiciando o processo apoptótico. O estímulo dos receptores beta é considerado o fator da cardiotoxicidade das catecolaminas endógenas e da epinefrina, pois a ação nos receptores  $\beta$ -1 aumenta a apoptose e nos receptores  $\beta$ -2 tem atividade anti-apoptótica, fazendo com que no desequilíbrio entre os dois estímulos ocorra aumento da apoptose <sup>(59,60)</sup>.

Outro ponto de desequilíbrio ocasionado pela PCR é a alteração na autoregulação da perfusão coronariana. No estado normal, o coração apresenta um mecanismo de auto-regulação do fluxo coronariano, aumentando o fluxo para áreas de maior demanda metabólica em relação aos outros. Esta ação possibilita que a demanda metabólica de todas as áreas seja atendida, mantendo o metabolismo em aerobiose, produção de ATP adequada as necessidades e eliminação de produtos do metabolismo. Em casos de baixa perfusão, como ocorre na PCR, este mecanismo é perdido, com fluxo igual em todas as áreas, independente do consumo local. Nestes casos, ocorre menor produção de ATP pelo metabolismo em anaerobiose, produção de lactato deletério as células, e aumento do consumo de glicose e oxigênio pela fibrilação ventricular e taquicardia após o RCE.

Também as variações de fragilidade de tipos celulares e dos aspectos anatômicos de cada região interferem no grau de lesão. Os miócitos tem maior demanda energética que o endotélio, sendo lesado precocemente em relação a este. Já em relação a anatomia, a região endocárdica é a que tende a apresentar lesão primeiro em relação a epicárdica. Na região endocárdica a pressão intraventricular comprime os vasos e reduz o fluxo de sangue. Em situações habituais o mecanismo de auto-regulação corrigiria esta demanda metabólica, com maior fluxo para esta região. No entanto, após o RCE, este mecanismo não está funcionando, fazendo com que os danos isquêmicos ocorram precocemente nos miócitos da região endocárdica, em relação ao epicardio <sup>(17)</sup>. E quanto maior o tempo de anaerobiose, menor é a produção de ATP, e maior é o grau de disfunção miocárdica <sup>(3)</sup>.

Pode-se encontrar lesões miocárdicas difusas, pela hipoperfusão difusa, ou focais, causadas geralmente por focos de embolia pelo miocárdio. A região

tipicamente mais acometida é no ápice cardíaco e na camada subendocárdica deste, pois são áreas mais susceptíveis a lesões por isquemia e por serem áreas mais distais <sup>(60)</sup>.

Com relação aos marcadores de lesão, a elevação da troponina após PCR está relacionada a maior morbidade, sendo fator isolado de risco para morte de causa cardiovascular e por falência de múltiplos órgãos <sup>(61)</sup>. A troponina é liberada após lesão aguda, com elevação durante a fase ativa da lise celular, retornando a base com o fim da patogênese <sup>(62)</sup>. A elevação da troponina no rato inicia com 30 minutos da lesão aguda, tendo pico com 2-4 horas e voltando ao valor basal em 24 horas <sup>(63)</sup>. Elevações da troponina 0-5 ng/mL são esperadas após RCP e desfibrilação. Nos casos em que a dosagem apresentar níveis maiores, deve-se pensar em outras causas que não a RCP e desfibrilação, como por exemplo a síndrome coronariana aguda e miocardite <sup>(62,64)</sup>. O clearance renal da  $\frac{1}{2}$  vida da troponina é de 1-2 horas <sup>(65)</sup>.

### 3.2.2 Lesão cerebral

A lesão isquêmica cerebral é uma das principais causas de morte após PCR, respondendo por 68% dos óbitos em pacientes que tiveram PCR fora do hospital e 23 % dos casos que ocorreram no ambiente hospitalar <sup>(37,66)</sup>. Entre os que apresentam RCE somente 3-7 % recuperam o status funcional como era antes da PCR <sup>(15)</sup>.

Os mecanismos de lesão cerebral após PCR incluem excitotoxicidade, quebra da homeostase do cálcio, produção de ERO, ativação da cascata de proteases e ativação de vias de apoptose e necrose celular. O estresse oxidativo é mais intenso no cérebro que no restante do corpo <sup>(34)</sup>. Além dos efeitos agudos, a alteração de perfusão cerebral, seja por edema, pela alteração na autorregulação ou pelos microembolos, ocasionam mais danos nos dias subsequentes. Além destes, a hiperglicemia também está comprovadamente relacionada a pior desfecho neurológico <sup>(37)</sup>.

No processo de isquemia e reperfusão, ocorre dano mitocondrial no cérebro. E ao avaliar as regiões cerebrais, todas as áreas sofrem lesão de

forma igual, pelo processo de isquemia-reperfusão, com exceção do tronco cerebral, no qual a lesão é aproximadamente a metade da que ocorre nas demais áreas do cérebro <sup>(67)</sup>.

O processo de isquemia cerebral causa hiperemia cerebral e o RCE com hipertensão, causa lesão da barreira hemato-encefálica (BHE). A lesão da BHE permite o extravasamento de albumina para o espaço extracelular ocasionando edema vasogênico e dano celular. Todos estes mecanismos ocorrem principalmente pela formação de NO e outros ERO <sup>(68,69)</sup>.

Há relato de maior dano histológico cerebral após PCR no sexo masculino em relação ao sexo feminino, sendo o gênero feminino fator protetor, possivelmente por menor expressão das óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) no córtex cerebral <sup>(70)</sup>.

A lesão hipóxica cerebral pode continuar após o RCE, devido a lesão pulmonar pela compressão torácica, aspiração de conteúdo gástrico ou sangue e/ou pneumonia, ocasionando piora da troca gasosa. Outro fator que também impacta na oxigenação cerebral é a ventilação mecânica. Estudo realizado em animais mostrou que a ventilação mecânica pode causar estímulos vagais aberrantes, com estímulo de receptores dopaminérgicos D2 no hipocampo, e que induzem apoptose celular, independente de outros fatores inflamatórios <sup>(54)</sup>. Também o aumento da pressão torácica piora a perfusão cerebral, ao reduzir a pré-carga, ocasionando baixo débito cardíaco e queda da pressão arterial <sup>(45)</sup>.

Outro ponto relativo a ventilação é a hipocapnia e hipercapnia. Níveis de  $\text{PaCO}_2 < 35$  mmHg estão relacionados a maior mortalidade em relação a normocapnia, pois causam vasoconstrição e redução do fluxo sanguíneo cerebral. A hipercapnia ( $\text{PaCO}_2 > 45$  mmHg), quando severa, pode causar vasodilatação cerebral, além de vasoconstrição pulmonar, piora da função do ventrículo direito, acidose respiratória e aumento da pressão intracraniana, piorando o prognóstico do paciente <sup>(71)</sup>. Tem sido considerado o ideal a hipercapnia moderada, com níveis entre 45 e 50 mmHg, sendo levantada a hipótese de efeito protetor cerebral <sup>(38,54,71)</sup>.

### 3.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico pode ser formado por qualquer célula do organismo, sendo produzido de forma natural e tendo ação importante na homeostase do organismo. Ele participa como uma molécula efetora na defesa contra microrganismos, como neurotransmissor e com efeito na vasodilatação, sendo importante no controle da pressão arterial. A produção do NO usa como base a proteína semi-essencial L-arginina, que é quebrada pela NOS. Ao quebrar a L-arginina produz NO e L-citrulina.

A NOS é encontrada em diversas áreas do organismo, sendo dividida em três grupos principais, de acordo com as áreas produtoras principais:

- Óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) - produzida no endotélio vascular;
- iNOS - NOS induzida em resposta a estímulos inflamatórios e imunológicos;
- nNOS - encontrada no cérebro e sistema nervoso periférico <sup>(58,72)</sup>.

A iNOS é a mais relacionada aos processos inflamatórios e de maior interesse na SPPCR. A iNOS é a forma da NOS induzida por agentes externos, como fungos, bactérias e por células diferentes do habitual, como células oncológicas. Está presente nos macrófagos, células do endotélio vascular, no músculo liso e neurônios. Segundo alguns autores, a iNOS poderia ser produzida por qualquer célula do organismo, desde que tenha o estímulo adequado. As principais citocinas indutoras da formação de iNOS são interferon gama, lipopolissacarídeos e os principais inibidores são os glicocorticóides. A produção excessiva de NO ocasiona ação tóxica aos agentes externos e células oncológicas, mas pode também causar lesão a células saudáveis vizinhas, estando este processo ligado a doenças auto-imunes e inflamatórias. Após início da produção de iNOS ela permanece ativa por algumas horas, com mecanismo de sinergismo de indução, ocorrendo um ciclo de auto-estímulo <sup>(58)</sup>. A síntese ocorre após a estimulação de uma citocina, com formação de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro dentro da célula e posterior formação da iNOS. Esta, assim que formada, começa a sintetizar NO a partir de L-arginina.



As NOS dependem para sua função da presença de nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato-hidrogenio (NADPH), oxigênio, flavinas e biopterinas. A ativação das NOS depende inicialmente da entrada de cálcio para o intracelular. O cálcio se liga a calmodulina e liga-se a NOS, iniciando a formação de NO. As formas eNOS e a nNOS são enzimas dependentes do cálcio para atuação, iniciando a produção com o aumento do cálcio e inativando na redução do cálcio intracelular. Já a iNOS não depende da concentração do cálcio intracelular. Ela necessita de uma concentração mínima para ser ativada, porém a ativação se sustenta mesmo com a queda do níveis dentro da célula <sup>(58)</sup>.

O NO produzido terá ação no músculo liso, ligando-se a enzima EGC, que após ativada irá converter guanosina trifosfato (GTP) em GMPc. Esta molécula, a GMPc é a responsável pela vasodilatação. E existe uma íntima correlação deste mecanismo com o sistema da adenosina monofosfato cíclica (AMPc), no qual a noradrenalina tem ação. Quando a vida da GMPc está muito ativada, bloqueia a via da AMPc. Esta ação tem importância ao considerarmos os casos de vasoplegia, choque anafilático e PCR <sup>(58,72)</sup>. A vasodilatação mediada por NO, que ocorre após PCR e RCE pode afetar a taxa de sucesso da RCP devido a redução da pressão de perfusão <sup>(70)</sup>. O bloqueio farmacológico do NO ocasiona redução da vasoplegia e aumento da pressão arterial <sup>(73)</sup>.

No miocárdio o NO tem efeitos bem variados de acordo com a quantidade produzida. Em condições normais tem efeito inotrópico positivo, porém, em casos de produção excessiva o efeito é oposto, sendo inotrópico negativo, contribuindo para a hipotensão. Ao se utilizar inibidores de NO, doses moderadas têm mostrado melhora da função miocárdica, porém doses baixas ou muito elevadas ocasionam piora. Além disso, o NO causa lesão miocárdica por indução direta de necrose e apoptose, quando em altas concentrações <sup>(73)</sup>.

No sistema nervoso o efeito é como neurotransmissor, mantendo o estímulo na sinapse. Existe um mecanismo de restimulação, que faz com que o estímulo permaneça continuamente. Ocorre liberação de glutamato (neurotransmissor excitatório) no primeiro neurônio pré-sináptico, que passa através do espaço sináptico e se liga ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) no neurônio pós-sináptico. Com esta ligação a célula fica mais permeável ao

ion cálcio, fazendo com que a concentração de cálcio intracelular aumente. O cálcio intracelular se liga a calmodulina, formando o complexo  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina, que ativa a nNOS, iniciando a formação de NO. O NO difunde do neurônio pós-sináptico para o pré-sináptico, onde estimula a EGC a aumentar os níveis de GMPc, e esta por sua vez desencadeia o processo que libera o glutamato, formando uma cadeia cíclica <sup>(58)</sup>.

A importância das NOS na PCR é porque todas são ativadas com o processo de isquemia e reperfusão. A eNOS traz efeitos positivos com vasodilatação benéfica, possibilitando reperfundir os órgãos, lavando metabólitos e ofertando oxigênio, retornando ao metabolismo em aerobiose. E a iNOS gera efeitos deletérios, com produção e inflamação, geração de ERO e dano celular. Para que a inibição do NO ou das NOS seja benéfico, o ideal é que ocorra somente o bloqueio da iNOS, reduzindo os efeitos prejudiciais e mantendo os efeitos benéficos das outras formas. O AM, por ser um bloqueador seletivo da iNOS, torna-se uma opção atraente para uso após PCR e em situações de baixo débito. Há estudos mostrando a ausência de ação do AM na eNOS, sendo bloqueador da iNOS e da nNOS <sup>(67,68,74,75)</sup>.

### **3.4 Espécies reativas de oxigênio (ERO)**

As substâncias pró-oxidantes, em concentração normal, são importantes ao organismo. Elas são importantes na defesa do organismo, fagocitando corpos estranhos, mas podem causar lesão ao próprio organismo, se em excesso. Por isso a importância do equilíbrio contínuo entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes.

Apesar do organismo tentar manter a homeostase, em situações como hipóxia, isquemia e reperfusão ocorre redução dos antioxidantes, e ativação de monócitos, macrófagos e neutrófilos, com aumento da atividade de defesa e aumento da produção e liberação de ERO, como NO. Lembrando que uma das vias de produção de ERO é pela ativação da iNOS, já citada previamente. A ação oxidante causa danos celulares e alterações metabólicas, principalmente em órgãos com elevada demanda de oxigênio, como miocárdio e cérebro <sup>(38)</sup>.

Esta ação inclui o NO e as demais espécies de ERO, como superóxido, peroxinitritos, nitratos, superóxido. Sendo a gravidade e a duração da isquemia diretamente proporcionais a quantidade de ERO formados. O superóxido por exemplo, que pode ser produzido na mitocôndria ou pela NADPH oxidase, pode ter efeito de defesa, sendo convertido em  $O_2 + H_2O$ , ou ser convertido em peroxinitrato, que tem ação lesiva a proteínas <sup>(44)</sup>. Este tem sido considerado o provável mediador de vasoconstrição que ocorre após reperfusão, causando a vasoconstrição hipóxica, que perpetua o processo deletério da isquemia <sup>(39,73,76)</sup>.

Os peroxinitritos são formados pela reação  $O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$ . E em processos químicos seguintes, liberam novamente NO, possibilitando uma cadeia com geração constante dos dois radicais livres <sup>(57,76)</sup>.

Os peroxinitritos são potentes oxidantes, porém são instáveis e apresentam vida curta. São produzidos durante períodos de isquemia do miocárdio e o uso de fármacos que reduzam a produção deste composto reduz o grau de dano tecidual do processo de isquemia/reperfusão. Como o NO participa da formação dos peroxinitritos, o efeito do AM e outras substâncias que bloqueiem a formação de NO teria ação também na redução desses outros radicais livres <sup>(57,76-78)</sup>.

Os nitritos e nitratos são metabólitos ativos do NO, possíveis de dosar com análise quantitativa, e servem como marcadores indiretos da formação de NO. O nitrito reflete as formas circulatória e tecidual do NO, sendo formados na isquemia por oxidação do NO, apresentando elevação precoce. Já o nitrato tecidual tem elevação mais tardia, sendo produto final da oxidação do NO, sendo produzido somente após longos períodos de inibição da NOS <sup>(68)</sup>.

### 3.5 Azul de metileno

O azul de metileno é uma Tiazina catiônica, com nome de cloridrato de tetrametilitionina, de cor azul escuro na forma oxidada, e incolor na sua forma reduzida. A fórmula molecular é  $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ . Apresenta alta solubilidade em água <sup>(66,69,79)</sup>.

O primeiro uso do azul de metileno foi como tintura, no Cairo, em 1876. O primeiro uso como medicamento foi no tratamento da malária, mas foi deixado de lado devido aos efeitos colaterais (urina verde e esclera azul). Em 1920 foi utilizado como antídoto para intoxicação por cianeto e por metahemoglobina. Novos usos foram sendo descobertos, sendo útil no tratamento do choque séptico vasoplégico, da vasodilatação causada pela protamina, nos choques anafiláticos, hipotensão relacionada a intoxicação por lítio e pela hemodiálise <sup>(69)</sup>. Há também diversos usos em estudo sobre a proteção cerebral, seja nos traumas e PCR, quanto em doenças neurológicas como Alzheimer e Parkinson <sup>(79)</sup>. Há estudo demonstrando inclusive efeito do azul de metileno após PCR, no paciente submetido a hipotermia, trazendo mais benefícios que a hipotermia isolada <sup>(79)</sup>. Também há estudo experimental com bom resultado na redução da extensão e melhor evolução em casos de queimadura, com dose única poucas horas após a queimadura <sup>(80)</sup>.

O azul de metileno exerce ação sobre as NOS, sendo para alguns autores sobre todas as formas <sup>(69)</sup> e para outros somente sobre a iNOS e a nNOS, não havendo efeito sobre a eNOS <sup>(74)</sup>. Tem ação também sobre a EGC, reduzindo a produção GMPc, importante na vasoconstricção. Os dados têm sugerido que o bloqueio sobre a NOS é mais intenso que o bloqueio sobre a EGC. A resposta obtida com a ação do AM é a restauração da reatividade vascular, possibilitando a ação das catecolaminas endógenas. Dessa forma bloqueia o efeito vasodilatador do NO, possibilitando que as catecolaminas exerçam o efeito vasoconstritor <sup>(69)</sup>.

O azul de metileno tem ação antioxidante também, através do bloqueio de enzimas contendo íon ferro. O AM compete com as enzimas na ligação com o oxigênio, se ligando ao oxigênio, evitando que ERO sejam formados. Um dos exemplos é a xantina oxidase, que é inibida através da competição do AM com a enzima XO pelas moléculas de oxigênio.

Entre outras ações comprovadas do AM, favorece a transferência de oxigênio para a mitocôndria, possibilitando o funcionamento normal da mitocôndria, em aerobiose, mesmo em situações de hipoperfusão. Desta forma, reduz o elevado consumo de glicose e baixa formação de ATP da anaerobiose. Esta ação ocorre por ação na função mitocondrial, através da

redução da atividade da citocromo C oxidase. Exerce também efeito como “limpador” de radicais livres, reduzindo a lesão oxidativa e inflamatória no encéfalo e da BHE, além de melhorar o fluxo sanguíneo. Ação esta também ligada a inibição da XO <sup>(67)</sup>.

Outra ação é sobre as plaquetas, com inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, assim como inibição da produção de tromboxane A2 e prostaciclina I2 das plaquetas. Reduz o processo inflamatório através da redução da peroxidação lipídica e inflamação <sup>(68-70,81)</sup>.

O AM tem apresentado ação no miocárdio, com redução na dosagem de troponina I após PCR, devido a redução do processo oxidativo e melhora da perfusão coronariana, no grupo que utilizou AM <sup>(69)</sup>.

Além dos tratamentos já citados, há outras indicações de uso. Um deles é para tratamento de metemoglobinemia, favorecendo a reversão para hemoglobina. Porém o uso em altas doses tem o efeito oposto, favorecendo a formação de metemoglobina. A dose usual é de 1-2 mg/kg em 5 a 10 minutos, podendo repetir se necessário após 30-60 minutos. Outros determinam a dose de 2 mg/kg em bolus, seguido da infusão contínua de 2 mg/kg/h, considerando que a concentração plasmática cai após 40 minutos. A meia vida plasmática do AM é de 6-8 horas <sup>(81)</sup>.

Outros usos são para tratamento de sepse com hipotensão, anafilaxia com ou sem hipotensão, vasoplegia. Muitos casos utilizam além de dose de ataque, dose de manutenção, permanecendo por 48-72 horas, principalmente nos casos de vasoplegia, devido a meia vida do fármaco e a queda precoce dos níveis, permitindo maior estabilização do quadro <sup>(12,13,82,83)</sup>.

Há estudos atualmente avaliando a sua ação na PCR, seja reduzindo o tempo até obtenção do RCE, seja reduzindo os danos da SPPCR. Apesar de não ter ação vasoconstritora direta, como já relatado, ele inibe a ação vasodilatadora do NO e através da inibição da GMPc, age também na vida da AMPc, que participa da ação de vasoconstrição, facilitando o efeito da epinefrina e da noradrenalina. Além disso ao bloquear a GMPc, que é um dos importantes fatores da depressão miocárdica, reduz este efeito na SPPCR <sup>(84)</sup>.

O azul de metileno atravessa a barreira hemato-encefálica, causando vasoconstrição transitória, melhorando a pressão sanguínea, reduzindo os

danos da hipoperfusão, tanto no acidente vascular cerebral (AVC) quanto na sepse. Outro ponto que o azul de metileno teria efeito protetor cerebral é na macroautofagia, através da alteração nos níveis de microtubulos associados a cadeias leves de proteína de cadeia 3, tipo II, catepsina D. Ele também reduz as lesões cerebrais focais, após isquemia e reperfusão do AVC <sup>(85)</sup>. Apesar de diversas formas de ação na proteção cerebral, o efeito observado tem sido tardio. Ao avaliar a lesão após AVC nos pacientes que receberam azul de metileno, houve pouca diferença entre os grupos num período de 30 minutos após infusão, porém nas avaliações após 2 dias, ocorreu redução de 30 % nas lesões no grupo no qual foi administrada a medicação <sup>(85)</sup>. Esta proteção cerebral é variável entre as diversas regiões do cérebro <sup>(67)</sup>.

Apesar dos diversos benefícios apresentados em estudos com uso de AM, há discordância na literatura quanto a melhora da sobrevida com o uso na RCP. Semenas et al. (2011) não encontraram diferença de sobrevida e dano miocárdico e Weiner et al. (2013) encontraram aumento de morbidade com o uso de AM. Porém, outros estudos têm mostrado resultados favoráveis ao uso do AM <sup>(11,34,69)</sup>. Além de alteração na sobrevida, estudos demonstram melhora na perfusão coronariana e menor lesão cerebral e miocárdica <sup>(34,69,81, 86)</sup>.

Não podem ser desconsiderados também os efeitos colaterais do fármaco, assim como a dose tóxica (40 mg/kg). O azul de metileno causa vasoconstrição sistêmica, incluindo a vasculatura pulmonar, podendo ocasionar piora da troca gasosa e hipertensão pulmonar, com suas consequências. Estes dois últimos efeitos limitam o uso deste medicamento na SDRA. Também a vasculatura mesentérica sofre vasoconstrição, podendo comprometer o fluxo na mesma, em caso de altas doses de epinefrina, e ocasionar isquemia intestinal <sup>(81)</sup>.

Outra complicação do uso do azul de metileno é a ação inibitória sobre a monoamina oxidase (MAO), podendo causar síndrome serotoninérgica em pacientes em uso de agentes serotoninérgicos. Porém, só ocorre em um pequeno número de pacientes e pode ser facilmente tratada com medidas de suporte e benzodiazepínicos. Cabe nestes casos avaliar o risco benefício <sup>(81)</sup>.

---

## 4 MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental, com ratos, ambientado no Laboratório de Investigação Médica nº 8 – Anestesiologia, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais da Universidade de São Paulo – CEUA-USP, protocolo número: 021/16 (anexo 1).

### 4.1 Animais e grupos

Foram utilizados ratos machos Wistar, isogênicos, com peso entre 300 e 550 gramas provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram acondicionados em gaiolas de plástico (03 animais por gaiola), mantidos em ambiente climatizado a 22°C com ciclos alternados de 12 horas (claro e escuro), água e ração *ad libitum*

Foram utilizados 51 animais, sendo alocados inicialmente 11 animais em cada grupo principal e 5 animais no grupo sham. Dois animais foram perdidos durante a execução do modelo de estudo, sendo um por perda de material e outro por falha na canulação, com lesão da veia jugular, sendo descartados.

Os ratos foram alocados em 5 grupos de estudo, sendo os grupos de intervenção sendo considerados os grupos principais: grupo azul (GA), grupo controle (GC), grupo epinefrina (GE), grupo misto (GM) e o grupo sham (GS) um grupo secundário, como controle negativo do estudo.

Os grupos GA, GC, GE e GM estão detalhados abaixo:

- GA: grupo em que foi utilizado azul de metileno como medicação na RCP, na dose de 2 mg/kg/dose<sup>(13)</sup>. Foram administradas até 3 doses, com intervalo de 3 minutos entre as doses. Para as demais doses, seguindo o intervalo de 3 minutos, utilizou-se solução salina, objetivando manter a volemia infundida nos demais grupos. Limitou-se a dose de azul de metileno devido a dose tóxica do fármaco;

- GC: grupo em que foi utilizada solução salina como medicação na RCP, com intervalo de 3 minutos entre as doses, mantendo o mesmo volume infundido nos demais grupos;
- GE: grupo em que foi utilizado epinefrina como medicação na RCP, na dose de 20 mcg/kg/dose. As doses foram administradas a cada 3 minutos;
- GM: grupo em que foram utilizados azul de metileno e epinefrina de forma associada, nas mesmas doses do GA e GE, com intervalo de 3 minutos entre as doses. Manteve-se a limitação de três doses para o azul de metileno neste grupo também.

Em todos os grupos, a primeira dose do medicamento foi administrada ao iniciar o primeiro ciclo da RCP, seguindo então os intervalos padronizados de 3 minutos.

Foi utilizada solução salina, no volume de 0,2 ml em todos os grupos após a administração da medicação, com o intuito de garantir que a medicação atinja a corrente sanguínea.

O grupo GS foi utilizado para descartar a interferência da indução anestésica e canulação vascular nos resultados finais. O animal foi anestesiado, porém sem indução da fibrilação ventricular (FV). Foi mantido anestesiado por 4 horas após o término da canulação vascular.

Os animais utilizados e com intercorrências antes do início da indução da PCR ou com hemotórax, foram descartados e utilizado um outro rato em substituição. Foram perdidos 5 animais durante o estudo.

A alocação foi realizada por randomização simples, por sorteio, definindo a ordem completa previamente.

## **4.2 Preparo inicial dos animais**

Inicialmente todos os ratos foram anestesiados em câmara de indução anestésica, com uso de isoflurano na concentração de 5%, até a perda da consciência. Em seguida, foram intubados com uso de cateter sob agulha



tamanho 14 e iniciada a ventilação mecânica controlada a volume, com 8 ml/kg e frequência respiratória de 60 irpm. A manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano 1% em fração inspirada de oxigênio de 100%.

Após intubação orotraqueal, realizou-se tricotomia nas regiões a serem dissecadas e onde seriam colocadas as placas para desfibrilação no tórax e região dorsal. Foram monitorizados com eletrocardiograma (MP100. Biopac Systems, Santa Barbara, Estados Unidos da América) durante todo o procedimento.

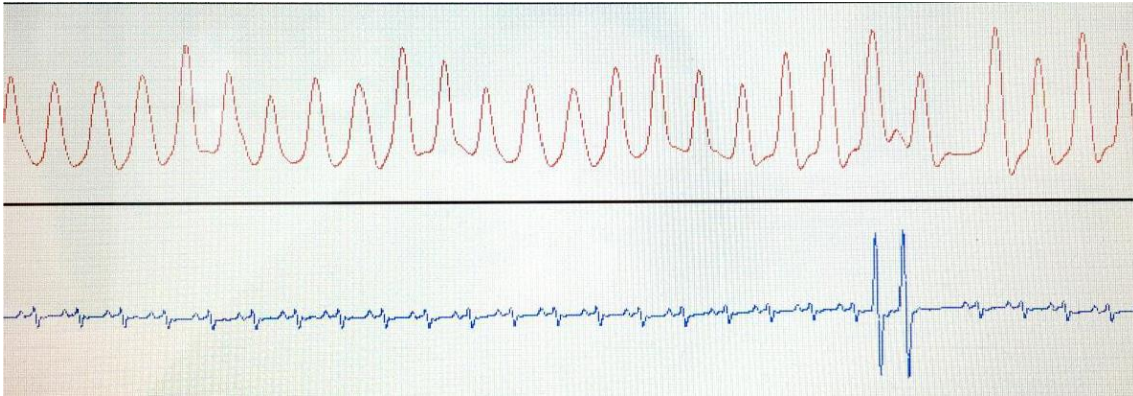
Realizou-se a antisepsia da região cervical e localização da veia jugular externa direita, com dissecação da mesma e colocação de cateter venoso, que foi utilizado para administração de medicamentos e para indução da FV.

Também foi dissecada a artéria femoral comum esquerda, com inserção de um cateter PE10, fornecendo monitorização da pressão arterial invasiva (MP100. Biopac Systems, Santa Barbara, Estados Unidos da América) e acesso para coleta de exames laboratoriais <sup>(87,88)</sup>.

Foi então verificado a qual grupo o rato pertenceria, preparado o fármaco para a RCP e iniciado o protocolo de indução de FV. O grupo sham, após estas etapas, foi mantido anestesiado por 4 horas, sem outras intervenções. Após as 4 horas, o rato foi sacrificado e as coletas foram realizadas como nos demais grupos.

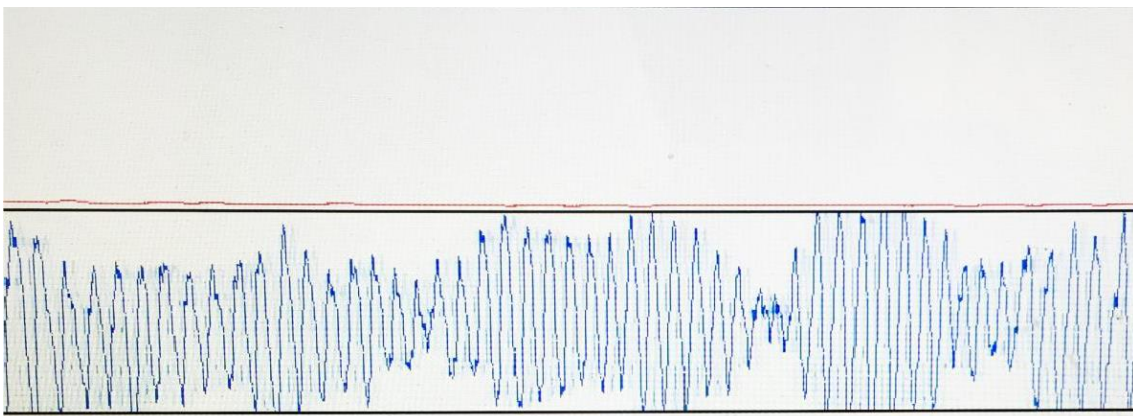
### **4.3 Indução da parada cardiorrespiratória e protocolo de ressuscitação cardiopulmonar**

Para indução da PCR, o cateter da veia jugular foi conectado ao transdutor de pressão e alocado no ventrículo direito guiado pela curva pressórica (Figura 1).



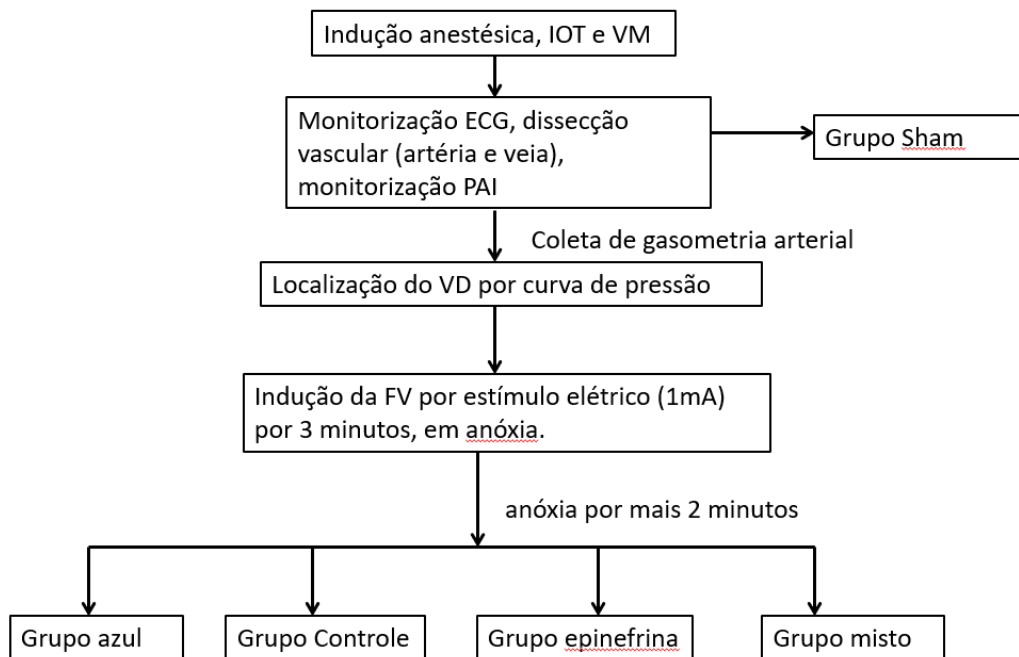
**Figura 1** – Curva pressórica do ventrículo direito e eletrocardiografia durante a localização do ventrículo direito

Em seguida, foi utilizado um estimulador elétrico conectado a um fio guia, que foi introduzido pelo cateter venoso e realizada a estimulação elétrica de 1 mA e 60 Hz por 3 minutos. Acompanhou-se o efeito da estimulação elétrica por meio da curva da pressão arterial invasiva (PAI) e da eletrocardiografia (Figura 2). O rato foi desconectado da ventilação mecânica após obtenção de FV, conforme protocolos da literatura, e mantido com o estímulo elétrico por 3 minutos. Cessados os 3 minutos o estimulador foi retirado, mas o animal permaneceu sem ventilação mecânica e em FV por mais 2 minutos, totalizando 5 minutos de anóxia, conforme demonstrado no gráfico 1.



**Figura 2** – Curva de pressão arterial e eletrocardiograma durante a estimulação elétrica de fibrilação ventricular

**Gráfico 1** – Preparo dos animais, da indução anestésica até o início da ressuscitação cardiopulmonar



NOTA: IOT: intubação orotraqueal, VM: ventilação mecânica, ECG: eletrocardiograma, PAI: pressão arterial invasiva, VD: ventrículo direito, FV: fibrilação ventricular, mA: miliamper

Após este período de 5 minutos as manobras de RCP foram iniciadas, com compressões torácicas realizadas com compressor externo mecânico (figura 3) e reiniciada a ventilação mecânica, porém com frequência de 25-30 irpm. As compressões foram mantidas numa frequência de 200/minuto e com compressão torácica máxima de 1,2 cm.

A RCP seguiu o seguinte protocolo (Gráfico 2):

- Administração da primeira dose do medicamento e início da massagem torácica (200/minuto) e da ventilação mecânica, mantendo frequência ventilatória menor (25-30/min), por um período de 3 minutos;
- Checagem do ritmo.
  - Se FV/taquicardia ventricular sem pulso (TVSP), desfibrilação, nova dose do medicamento e reinício da RCP
  - Se assistolia/atividade elétrica sem pulso (AESP), nova dose do medicamento e reinício da RCP;

- novo ciclo de 3 minutos, repetindo o item anterior ao término;
- após os dois ciclos iniciais, foram realizados ciclos de 1 minuto, repetindo a checagem do ritmo a cada intervalo, mas mantendo a dose do medicamento em intervalos de 3 minutos;

\*Foram considerados como critérios para o encerramento da RCP:

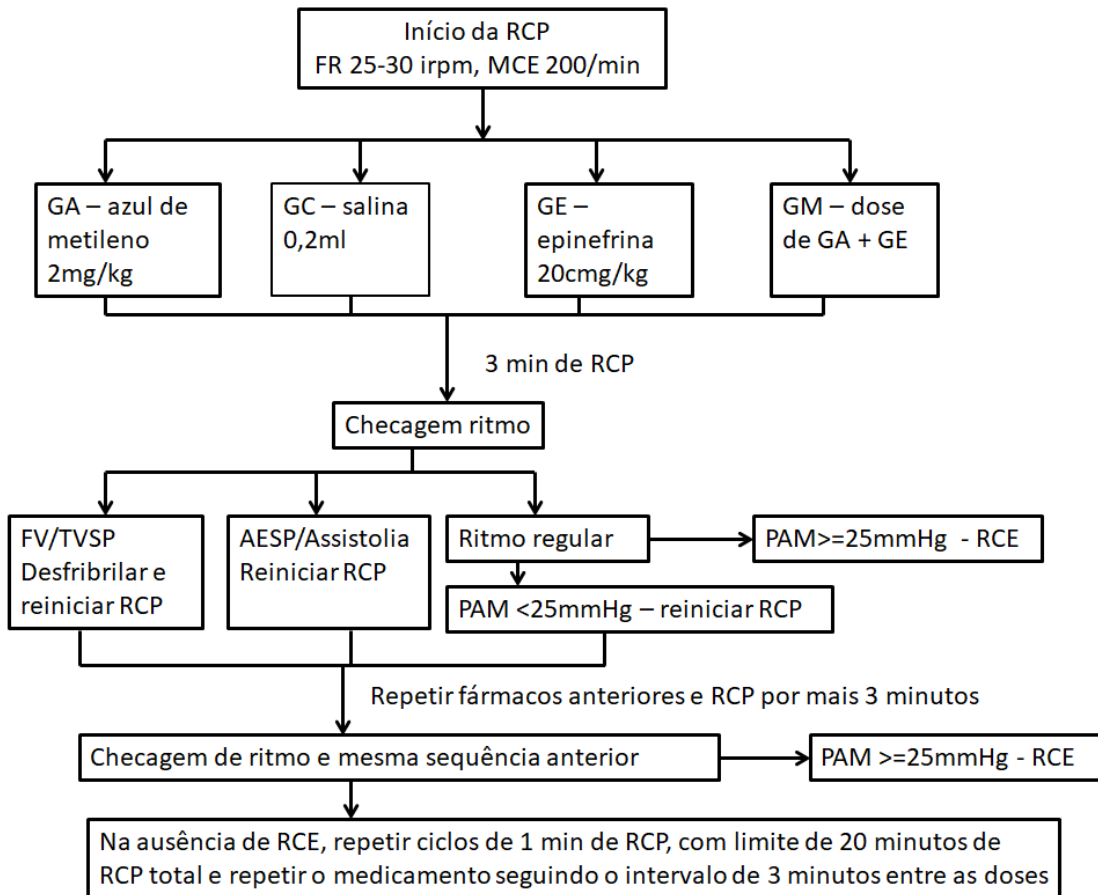
- Ritmo organizado com PAM > 25 mmHg;
- ritmo organizado com PAM ≤ 25 mmHg, após 20 minutos de RCP;
- ritmo desorganizado ou de PCR, após 20 minutos de RCP.

\*\*Desfibrilação foi realizada com carga de 7J.



**Figura 3** – Posicionamento do rato com o compressor externo automático

**Gráfico 2** – Protocolo de ressuscitação cardiopulmonar para cada grupo, e seguimento conforme ritmo eletrocardiográfico e medida de pressão arterial média aferida



NOTA: RCP: ressuscitação cardiopulmonar, FR: frequência respiratória, MCE: massagem cardíaca externa, GA: grupo azul, GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, FV: fibrilação ventricular, TVSP: taquicardia ventricular sem pulso, AESP: atividade elétrica sem pulso, PAM: pressão arterial média, RCE: retorno da circulação espontânea

Foi definido como objetivo da RCP que a pressão arterial diastólica alcançasse pelo menos 20 mmHg durante a RCP <sup>(89)</sup>. Para este objetivo o posicionamento para a massagem cardíaca externa (MCE) era ajustado durante a RCP, respeitando os limites de profundidade da compressão do tórax (1/3 do diâmetro anteroposterior). Para avaliar este parâmetro, após o término do estudo, foi registrada a pressão arterial diastólica (PAD) a cada minuto da RCP, com cálculo da mediana, sendo possível analisar a evolução durante a RCP.

#### 4.4 Condução após RCE

Nos casos em que houve RCE, foi mantido suporte ao rato. A ventilação mecânica teve sua frequência aumentada para 60 irpm. O isoflurano foi mantido desligado até que o rato apresentasse os níveis pressóricos semelhantes ao inicial ou caso apresentasse movimentação, sendo então mantido na concentração mínima necessária para manter a estabilidade do rato.

Os que mantiveram a PAM >25 mmHg por um período de 10 minutos, foram considerados sobreviventes e mantidos por 4 horas após o RCE. Considerou-se 25 mmHg por ser o valor mínimo para definição de PCR<sup>(90)</sup>. Após completar os 10 minutos, foram colhidas amostras de sangue arterial para gasometria, dosagem de eletrólitos, lactato e glicemia. Caso o animal apresentasse queda da PAM após a definição de sobrevida, mantendo níveis abaixo de 25 mmHg por mais de 5 minutos, o óbito era decretado. Nestes casos seguiu-se o mesmo protocolo utilizado para dos demais, anotando o tempo de sobrevida e coletando as amostras para análise<sup>(91-93)</sup>.

Nos casos que permaneceram estáveis durante as 4 horas após RCP, foi coletada amostra de sangue para dosagem de troponina no término do período e então realizada a eutanásia dos animais com sobredose de anestésicos. Após a eutanásia foram coletados coração e cérebro para processamento posterior, sendo armazenados parte em formol e parte congelados a -70 °C.

Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram lesões não esperadas decorrentes da estimulação ventricular, MCE ou da canulação vascular.

As amostras de sangue foram mantidas congeladas em freezer -70 °C, separadas em plasma e soro.

## 4.5 Análise dos desfechos

### 4.5.1 Dados hemodinâmicos

A pressão arterial foi registrada de forma contínua desde o início da monitorização até o óbito do animal, assim como a frequência cardíaca, sendo anotados em ficha de controle os parâmetros a cada 10 minutos, desde o RCE até o óbito.

Também foi registrada a PAD durante a RCP, visando analisar a qualidade da RCP.

### 4.5.2 Análises laboratoriais

Foi coletado sangue para gasometria arterial após a canulação da artéria femoral, fornecendo parâmetros iniciais do rato. Além de permitir avaliar as mudanças ocorridas entre o basal e o período após RCE, permite descartar ratos que já apresentassem descompensações.

Foi também coletada nova amostra para gasometria arterial nos ratos que apresentaram RCE, sendo colhida após completar 10 minutos de RCE, momento em que era definida a sobrevivência. Junto a realização da gasometria foram dosados potássio, cálcio, lactato, glicemia.

A lesão miocárdica foi avaliada pela dosagem da troponina I sérica, através do método de quimioluminescência automatizada. A amostra foi coletada após 4 horas de RCE, ou no momento do óbito, nos casos que não sobreviveram por 4 horas. A dosagem da troponina foi realizada no laboratório do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo. A determinação quantitativa de Troponina I foi obtida por meio de um imunoensaio tipo sanduíche efetuado em três etapas, utilizando tecnologia quimioluminescente direta e quantidades constantes de dois anticorpos monoclonais. Utilizou-se um reagente auxiliar para reduzir a ligação não específica. Para isso, foi utilizado o kit comercial ADVIA Centaur® TnI-Ultra (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, New York, Estados Unidos da América) em equipamento automatizado da mesma marca.

### 4.5.3 Análise histológica

O cérebro e coração foram retirados e separados em duas amostras cada um, sendo uma amostra congelada para análises químicas e outra armazenada com paraformaldeído a 4 %, logo após o sacrifício dos animais. Os fragmentos dos tecidos foram rapidamente fixados em paraformaldeído a 4 %, em tampão fosfato com pH 7,0, por 24 horas. Após esta etapa foram desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Dos blocos contendo os fragmentos obtiveram-se cortes de 5µm em micrótomo para a realização de estudos morfológicos e morfométricos. Uma vez desparafinados em xilol, as amostras foram hidratadas em gradiente alcoólico (100° a 70°) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Foram então lavados em água corrente e contracorados com eosina durante quinze minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95° e 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e entelamina para análise microscópica.

A análise das lâminas coradas com hematoxilina&eosina (H&E) foi realizada por médico patologista, em microscopia de luz, com análise às cegas.

Na análise histológica foram avaliadas alterações características de lesão hipóxica, sugestivas das primeiras fases de lesão celular.

Foram avaliados os seguintes parâmetros para cada órgão:

- Cérebro
  - Neurônio Vermelho: caracterizado por reorganização citoplasmática (perda dos corpúsculos de Nissl), retração do corpo celular, picnose nuclear e intensa eosinofilia citoplasmática;
  - Gliose: hiperplasia astrocítica em decorrência de uma lesão.
- Coração
  - Necrose de coagulação: caracterizada por eosinofilia das fibras, perda de estriações e vacuolização citoplasmática. Esta alteração é típica de infarto agudo ou recente;

Visou-se com estes critérios definir se havia sinais de necrose por hipóxia no órgão daquele grupo ou não.



#### 4.5.4 Análise imunohistoquímica

O teste Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling, também denominado de marcação de Tunel, foi utilizado como marcador de lesão celular aguda e apoptose.

Cortes do tecido de 4µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 10 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água destilada e em tampão fosfato salino pH 7,4 (Phosphate buffered saline - PBS).

O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada por proteinase K em temperatura ambiente por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 % em Metanol por 30 minutos à temperatura ambiente e após, lavado muito bem em água corrente, água destilada e PBS. As lâminas foram incubadas com 50 µl da mistura de marcação de Tunel (5 µl da solução de Enzima, +45 µl da solução tampão) para cada amostra em câmara úmida a 37° C por 60 minutos. Após esta etapa as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37° C por 30 minutos com 50 µl do conversor de peroxidase e posteriormente lavadas 3x em PBS em 3 minutos. Foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) onde as lâminas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente ocorreu a contra-coloração com verde de metila, para todos os casos.

As lâminas foram analisadas com contagem manual, utilizando microscópio de luz, no aumento 100x. Foram analisados 25 campos do cérebro e do coração foram analisados 50 campos, sendo 25 do ventrículo direito e 25 do ventrículo esquerdo, objetivando análise completa do coração. Realizou-se a seguir o cálculo da média para cada lâmina e mediana de cada grupo. Foi realizada leitura de forma cega das lâminas.

## 4.6 Dosagem de proteínas inflamatórias

### 4.6.1 Extração de proteínas

Os tecidos congelados foram homogenizados em uma solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80mM Hepes, 41mM KOH; pH 7.5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Todo o procedimento foi feito no gelo. O homogenato foi então centrifugado a 4000 rpm por 30 minutos a 4° C para remoção das células e resíduos celulares. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70° C para a análise das proteínas citoplasmáticas. A medida da concentração da proteína foi feita pelo método de Bradford (Bioagency).

### 4.6.2 Western blot

As amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida 12% para Toll-like receptors 4 (TLR4), e de 8% para Bcl-2 associated protein X (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 Tris-buffered salina and Tween 20 (TBS-T) por 1 hora e incubados com anticorpos específicos diluídos em TBS-T. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody. A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com o anticorpo para GAPDH. Os anticorpos utilizados foram:

- BAX diluição 1:500 (Santa Cruz BiotechnologyInc, CA, EUA), anticorpo secundário anti-mouse 1:2000 (Sigma) e GAPDH 1:1000 (Santa Cruz BiotechnologyInc, CA, EUA)
- TLR4 diluição 1:500, anticorpo secundário anti-rabbit 1:2000 (Sigma) com 0,1% de leite desnatado e GAPDH 1:1000 (Santa Cruz BiotechnologyInc, CA, EUA).

As imagens dos blots foram obtidas usando-se sistema de quimioluminescência Amersham ECL Western Blotting Detection (GE Healthcare,

Reino Unido) e foto documentação Alliance 4.2 (Uvitec, Reino Unido) e quantificadas com densitometria. As bandas obtidas foram analisadas por densitometria utilizando-se o programa Scion Image for Windows (IBM PC). As bandas foram normalizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização do GAPDH.

#### **4.7 Dosagem de estresse oxidativo**

O estresse oxidativo foi avaliado determinando os níveis de thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) no tecido do cérebro e coração, um marcador da peroxidação lipídica, através do ensaio do ácido tiobarbitúrico.

O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios oxidados, gerando malondialdeído. Uma alíquota de 0,2 ml de solução proteica extraído do tecido (o método de extração é o mesmo usado na extração de proteínas para Western Blott) foi diluída em 0,8 ml de água destilada. Após, 1 ml de ácido tricloroacético (ATC) 17,5 % e 1 ml de ácido tiobarbitúrico, pH 2, foram adicionados. As amostras foram levadas à 80° C por 20 minutos e a seguir, colocadas em gelo. Posteriormente, 1 ml de ATC 70 % foi adicionado e a mistura incubada por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, por 15 minutos. A densidade ótica do sobrenadante foi lida a 534 nm contra um reagente “blank” em espectrofotômetro. Os níveis teciduais de TBARS estão expressos como nmol/prot/mL

#### **4.8 Análise estatística**

O cálculo amostral foi obtido a partir da análise do valor da troponina, após PCR, de estudos anteriores <sup>(33,94,95)</sup>. Nove animais por grupo foram necessários para uma diferença de 15 % entre os grupos, com um erro tipo 1 ( $\alpha$ ) de 0.05 e um poder de 0.80 para um teste bicaudal. Entretanto, prevendo perdas, estimou-se 11 animais por grupo.

Os dados foram apresentados em medianas, considerando a distribuição não normal e o número amostral pequenos nos diversos grupos. Foram também utilizados os valores mínimo e máximo para demonstrar a variabilidade dos dados.

Para avaliar uma possível associação entre duas variáveis qualitativas (grupo e RCE/histologia) o teste exato de Fisher foi aplicado. Para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Em situações em que a hipótese nula é rejeita (valor  $p < 0,05$ : teste indica evidências de alguma diferença entre os grupos), o teste de comparação múltipla com correção de Bonferroni foi aplicado aos dados com o objetivo de identificar evidências de quais grupos são diferentes.

Com o objetivo de avaliar se duas variáveis quantitativas (exemplo: PPC – pressão de perfusão coronariana versus troponina) estão correlacionadas, o coeficiente de correlação de Spearman foi aplicado.

A distribuição dos dados da variável PAM (medida em diversos momentos) em relação à variável de grupo foi analisada por meio da Análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas não-paramétrica.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS versão 24.

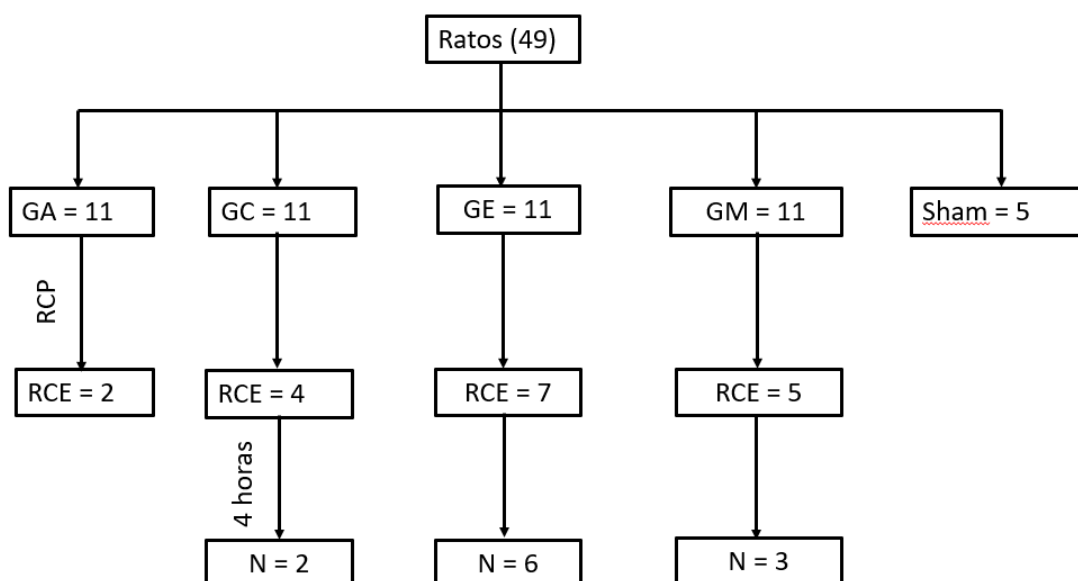
## 5 RESULTADOS

No total foram utilizados 51 ratos, sendo que um caso foi descartado por perda de material e um por dano vascular durante a dissecação. Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso dos animais ( $p = 0,38$ ).

### 5.1 Retorno da circulação espontânea e ressuscitação cardiopulmonar

Houve RCE em 2 casos do GA (18,18 %), 4 casos no grupo GC (40 %), 7 casos no grupo GE (63,63 %) e 5 casos no grupo GM (45,45 %) (Gráfico 3). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,672$ ), porém ao avaliarmos clinicamente, o grupo GE teve quase o dobro da sobrevivência do grupo GC (7 no GE e 4 no GC), podendo considerar desta forma que obteve melhor resposta.

**Gráfico 3** – Distribuição dos ratos nos grupos de estudo e com sobrevivência após ressuscitação cardiopulmonar para cada grupo



NOTA: GA: grupo azul, GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, RCE: retorno da circulação espontânea, RCP: ressuscitação cardiopulmonar, N: número de casos que sobreviveram 4 horas após o RCE

Considerando a baixa incidência de RCE no grupo GA, definiu-se que o azul de metileno, utilizado em bolus durante a RCP, ocasionou resultado desfavorável, não sendo desta forma considerado este grupo na análise dos dados. Este ponto será melhor detalhado na discussão e os dados referentes ao GA serão expostos nos anexos 2 e 3.

Apesar de apresentarem RCE, 5 animais não mantiveram PAM>25 mmHg por 4 horas. A tabela 1 detalha a mediana de tempo de RCP e do tempo de sobrevivência em cada grupo. O menor tempo de sobrevivência foi de 19 minutos, em um caso do GM.

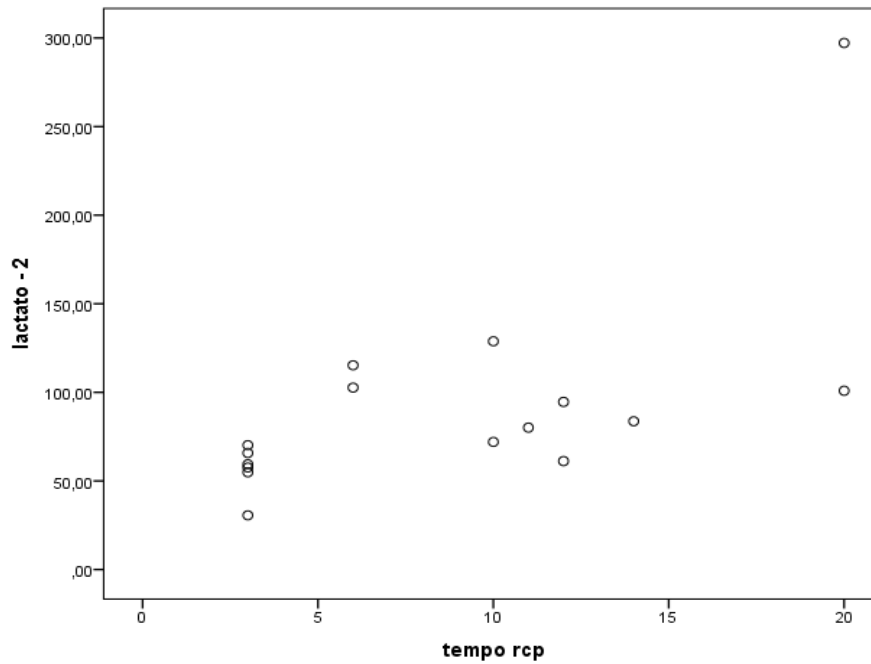
**Tabela 1** – Distribuição da mediana do tempo de ressuscitação cardiopulmonar, com mínimo e máximo, e de sobrevivência após retorno da circulação espontânea

	<b>Tempo de RCP – (minutos)</b>	<b>Tempo de sobrevivência (horas)</b>
<b>Grupo controle</b>	13 (10-20)	3:45 (1:05-4:00)
<b>Grupo epinefrina</b>	3 (3-20)	4:00 (1:04-4:00)
<b>Grupo misto</b>	6 (3-12)	4:00 (0:19-4:00)
<b>P</b>	0,091	

NOTA: RCP: ressuscitação cardiopulmonar, p: nível de significância estatística

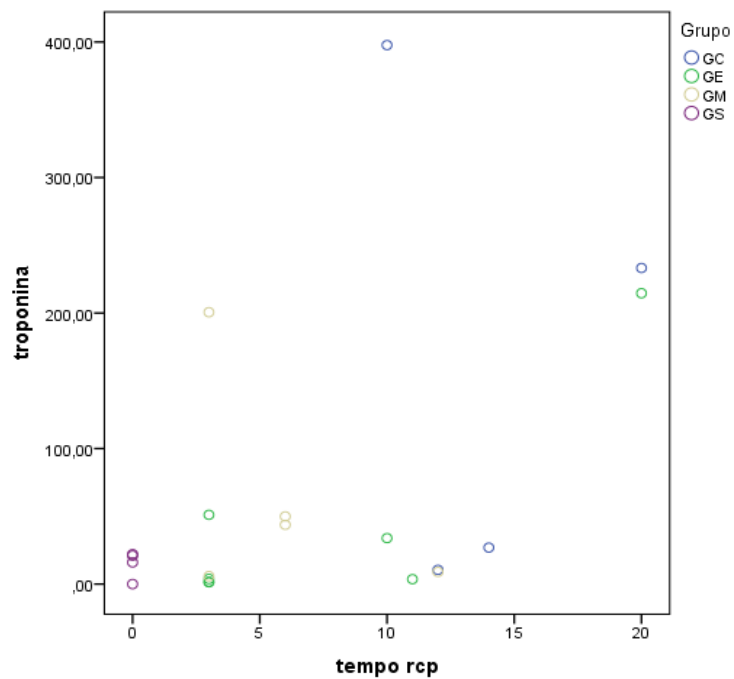
Visando analisar se o tempo de RCP foi importante para os desfechos, foi verificada a correlação deste com os dados da gasometria, lactato, troponina e tunnel. Foi possível estabelecer correlação temporal com o lactato ( $p = 0,005$ ) (gráfico 4). Porém ao estratificar por grupos, somente o GE manteve a correlação temporal ( $p=0,012$ ). Para a troponina, foco principal do estudo, não foi possível estabelecer a correlação com o tempo de rcp (Gráfico 5).

**Gráfico 4 –** Correlação entre o lactato após o retorno da circulação espontânea e o tempo de ressuscitação cardiopulmonar



NOTA: RCP: ressuscitação cardiopulmonar, lactato-2: lactato após o retorno da circulação espontânea

**Gráfico 5 –** Correlação entre o tempo de ressuscitação cardiopulmonar e a dosagem de troponina para cada grupo.

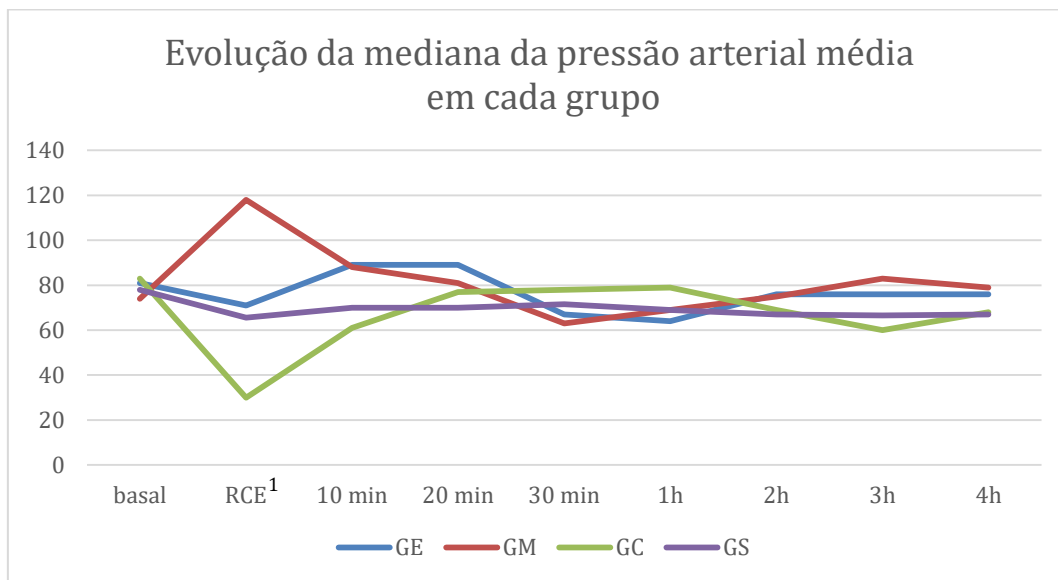


GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, RCP: ressuscitação cardiopulmonar

## 5.2 Pressão arterial e frequência cardíaca

Houve similaridade no nível inicial de PAM entre os grupos e no comportamento após 30 min de RCE. A diferença entre os grupos predominou nos 30 minutos iniciais após o RCE, em que os grupos GM e GE iniciaram com níveis de PAM superiores aos demais (Gráfico 6).

**Gráfico 6** – Mediana da pressão arterial média nos diversos grupos, em relação temporal, desde o tempo basal até o encerramento do protocolo



NOTA: GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GC: grupo controle, GS: grupo sham  
<sup>1</sup> p=0,007

Para uma análise mais detalhada do período inicial, do período basal até os 30 minutos após RCE, foram analisados os dados de cada rato e avaliada a diferença entre os grupos nos momentos principais. Na análise estatística, não houve diferença entre os grupos em relação a PAM basal, com todos iniciando o estudo de forma semelhante. O único momento, entre os analisados, em que houve diferença estatisticamente significativa foi no RCE, com GC e GM diferentes entre si ( $p=0,007$ ). Após o RCE, os valores oscilam até os 30 minutos, e depois apresentam pequenas variações, mas sem significado clínico ou estatístico. Não é possível afirmar que houve diferença significativa no comportamento da pressão arterial após o RCE entre os grupos (Tabela 2).



**Tabela 2** – Mediana da pressão arterial, com mínimo e máximo, de acordo com os períodos de registro do estudo, separados por grupos (mmHg)

		<b>GC</b>	<b>GE</b>	<b>GM</b>	<b>GS</b>
<b>Basal</b>	PAS	99 (79-114)	96 (89-120)	95 (76-105)	80 (70-87)
	PAD	76 (67-86)	74 (61-86)	72 (63-86)	60 (54-62)
<b>RCE</b>	PAS	37 (34-47)	80 (53-160)	171 (118-218)	-
	PAD	22 (20-27)	57 (38-120)	113 (92-163)	-
<b>10 min</b>	PAS	57 (44-130)	102 (73-131)	111 (51-136)	75 (69-100)
	PAD	36 (30-97)	85 (44-113)	79 (34-106)	59 (47-70)
<b>20 min</b>	PAS	60 (47-108)	91 (70-157)	95 (88-105)	78 (74-90)
	PAD	63 (39-97)	74 (53-129)	69 (53-86)	59 (47-70)
<b>30 min</b>	PAS	94 (55-125)	85 (53-97)	69 (51-115)	78 (72-84)
	PAD	80 (49-97)	65 (46-74)	49 (35-94)	60 (47-69)
<b>40 min</b>	PAS	108 (77-119)	84 (59-95)	65 (42-113)	78 (71-82)
	PAD	92 (63-97)	55 (46-79)	45 (30-88)	60 (47-69)
<b>50 min</b>	PAS	98 (75-141)	80 (52-100)	65 (61-113)	79 (73-80)
	PAD	80 (61-112)	55 (37-83)	49 (44-92)	59 (49-69)
<b>1 hora</b>	PAS	80 (49-92)	85 (40-100)	74 (62-116)	76 (69-82)
	PAD	61 (40-80)	67 (26-78)	56 (44-93)	57 (49-76)
<b>1:30</b>	PAS	77 (62-100)	92 (49-106)	73 (59-126)	79 (73-81)
	PAD	51 (50-75)	73 (36-87)	52 (42-103)	55 (50-71)
<b>2:00</b>	PAS	87 (58-90)	95 (62-110)	69,5 (53-136)	76 (72-89)
	PAD	71 (46-77)	74 (48-92)	50,5 (44-108)	57 (51-73)
<b>2:30</b>	PAS	70 (64-89)	94 (61-132)	95 (93-118)	76 (65-84)
	PAD	61 (42-73)	71 (44-94)	72 (58-94)	57 (50-70)
<b>3:00</b>	PAS	52 (52-103)	90 (58-131)	96 (90-100)	74 (67-86)
	PAD	43 (37-87)	73 (43-91)	74 (61-75)	56 (45-70)
<b>3:30</b>	PAS	41 (25-102)	95 (52-130)	105 (85-106)	79 (67-87)
	PAD	35 (21-76)	74 (39-93)	70 (66-84)	50 (43-71)
<b>4:00</b>	PAS	77 (44-109)	100 (52-136)	85 (73-97)	76 (66-86)
	PAD	63 (37-89)	83 (39-97)	68 (54-77)	57 (41-72)

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, RCE: retorno da circulação espontânea, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica

A frequência cardíaca foi também registrada, não ocorrendo diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Mediana, com mínimo e máximo, da frequência cardíaca de cada grupo, nos períodos de registro do estudo (batimentos por minuto)

	<b>GC</b>	<b>GE</b>	<b>GM</b>	<b>GS</b>
<b>Basal</b>	250 (182-273)	270 (159-300)	270 (170-294)	216 (186-263)
<b>RCE</b>	267 (230-294)	276 (197-303)	267 (166-288)	-
<b>10 min</b>	266 (225-297)	286 (182-320)	303 (280-315)	218 (186-271)
<b>20 min</b>	297 (230-317)	280 (164-301)	306 (285-321)	206 (189-263)
<b>30 min</b>	245 (185-293)	270 (172-300)	299 (295-322)	206 (189-258)
<b>40 min</b>	236 (159-308)	270 (175-321)	301 (277-316)	206 (184-258)
<b>50 min</b>	238 (176-308)	273 (181-313)	290 (279-321)	206 (185-274)
<b>1 hora</b>	244 (197-285)	277 (183-300)	286 (277-290)	208 (185-251)
<b>1:30</b>	186 (185-270)	275 (173-290)	277 (240-321)	203 (185-257)
<b>2:00</b>	180 (175-298)	219 (166-298)	306 (283-312)	222 (190-261)
<b>2:30</b>	197 (194-298)	217 (169-310)	279 (169-285)	208 (192-258)
<b>3:00</b>	201 (192-300)	230 (168-316)	273 (178-277)	208 (193-251)
<b>3:30</b>	290 (201-321)	225 (175-325)	277 (185-300)	207 (187-240)
<b>4:00</b>	250 (212-288)	211 (181-334)	290 (171-291)	208 (192-240)

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, RCE: retorno da circulação espontânea

### 5.3 Exames laboratoriais

Ao avaliar a gasometria, os dados iniciais não mostraram nenhuma alteração que necessitasse descartar o animal do estudo. Comprovou-se também a oxigenação adequada dos animais, com boa saturação de oxigênio e boa PaO<sub>2</sub>. Para possibilidade de comparação, no GS foi colhida uma gasometria com 20 minutos do início do tempo de manutenção (foram mantidos 4 horas anestesiados após cateterização arterial e venosa).

Nas amostras após RCE, a acidose foi comum em todos os grupos, submetidos a PCR, com pH variando entre 7,0 e 7,1 (Tabela 4). Apesar de comum a todos os grupos houve diferença do tipo de acidose entre os grupos. Enquanto nos grupos GE e GM a acidose teve características de um distúrbio misto, com aumento do lactato e do CO<sub>2</sub>, no GC não houve elevação do CO<sub>2</sub>, mantendo um perfil de acidose metabólica principalmente. Vale destacar que em todos os grupos houve consumo de bases, na tentativa de compensação da acidose (Tabela 5).

**Tabela 4** – Mediana dos parâmetros da gasometria, nos períodos basal e após retorno da circulação espontânea, por grupos de estudo. Valores mínimo e máximo entre parenteses

Grupo	Tempo	pH	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	Sat O <sub>2</sub> (%)
GC	Basal	7,38 (7,33-7,44)	347,5 (243-453)	33,20 (30-35)	97,8 (97-98)
	Pós-RCE	7,1 (7,01-7,2)	199 (135-213)	35 (31-54)	96 (89-97)
GE	Basal	7,34 (7,32-7,43)	185 (146-256)	37,20 (30-44)	97,5 (97-98)
	Pós-RCE	7,00 (6,6-7,14) <sup>1</sup>	111 (88-208)	55,10 (36-83)	91 (69-95)
GM	Basal	7,42 (7,42-7,46)	297,5 (116-386)	33 (32-34)	97,7 (96-98)
	Pós-RCE	7,07 (6,97-7,29)	129 (51-251))	49,80 (36-57)	89,9 (46-98)
GS	Basal	7,39 (7,39-7,53)	285 (254-308)	34,8 (29-34,8)	97,1 (97,1-98,1)
	Após20 min	7,42 (7,2-7,43) <sup>1</sup>	206 (149-272)	36,3 (31,5-47)	96,5 (95-98,6)
<b>p</b>		0,025	0,248	0,08	0,179

NOTA: pH: potencial hidrogeniônico, PaO<sub>2</sub>: pressão arterial parcial de oxigênio, PaCO<sub>2</sub>: pressão arterial parcial de gás carbônico, Sat O<sub>2</sub>: saturação de oxigênio, GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística (entre os valores pós-RCE e após 20 minutos), pós-RCE: após o retorno da circulação espontânea  
1 dados que tem diferença estatisticamente significativa entre eles

**Tabela 5** – Mediana do Excesso de base e do bicarbonato, nos períodos basal e após retorno da circulação espontânea, por grupo de estudo. Valores mínimo e máximo entre parênteses

<b>Grupo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Excesso de base (mmol/L)</b>	<b>Bicarbonato de sódio (mmol/L)</b>
<b>GC</b>	Basal	(4,1) ((9)-0)	20,2 (16-24)
	Pós-RCE	(15,1) ((21)-(13))	12,3 <sup>1</sup> (8-15)
<b>GE</b>	Basal	(4,05) ((7)-(2))	20,4 (18-23)
	Pós-RCE	(12,70) ((28)-(10))	16,6 (5-19)
<b>GM</b>	Basal	(2,0) ((3)-0)	21,7 (22-24)
	Pós-RCE	(17,10) ((18)-(7))	12 (11-19)
<b>GS</b>	Basal	(2,3) ((3)-(1))	22,3 (21-23)
	Após 20 min	(2,8) ((3)-0)	21,5 <sup>1</sup> (20-23)
<b>P</b>		0,061	0,051

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística, pós-RCE: após o retorno da circulação espontânea  
1 dados que tem diferença estatisticamente significativa entre eles

Em relação a oxigenação, houve queda da PaO<sub>2</sub> e da saturação de O<sub>2</sub> e aumento da PaCO<sub>2</sub>. A redução na PaO<sub>2</sub> mais intensa foi no GM, em que houve redução de 56%, superior aos GE com 40%, GC com 42%.

Para avaliar o impacto da PaO<sub>2</sub> final na oxigenação sistêmica, foi verificada a correlação entre o valor final da PaO<sub>2</sub> e lactato, marcação de tunel do cérebro e do coração. Não houve correlação significativa entre estes parâmetros (Tabela 6).

**Tabela 6** – Avaliação da correlação estatística entre PaO<sub>2</sub> após o retorno da circulação espontânea com marcação de Tunel do cérebro, marcação de Tunel do coração e lactato após o retorno da circulação espontânea

		<b>Tunel cérebro</b>	<b>Tunel coração</b>	<b>Lactato pós-RCE</b>
	Coeficiente de Correlação	-0,220	-0,379	-0,274
<b>PaO<sub>2</sub> pós-RCE</b>	p (bilateral)	0,366	0,109	0,243
	Número de casos	19	19	20

NOTA: PaO<sub>2</sub>: pressão arterial parcial do oxigênio, pós-RCE: após o retorno da circulação espontânea, p: nível de significância estatística

Outro ponto avaliado foram os eletrólitos, com especial atenção ao potássio e ao cálcio, pois são importantes no potencial de ação das células e em muitos casos demandam tratamento para normalização. Houve elevação do potássio nos grupos GC e GS, porém nos grupos GE e GM houve redução ou estabilidade. Nenhum dos dados apresentou valores fora dos limites considerados normais para o eletrólito. Em relação ao cálcio, houve redução dos níveis plasmáticos, com exceção do GE que apresentou pequena elevação (Tabela 7).

**Tabela 7** – Mediana das concentrações plasmáticas de potássio e cálcio, nos períodos basal e após retorno da circulação espontânea, por grupo de estudo

<b>Grupo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Cálcio (mmol/L)</b>	<b>Potássio (mmol/L)</b>
<b>GC</b>	Basal	0,83 (0,63-1,02)	3,35 (3-3,8)
	Pós-RCE	0,79 (0,61-0,85)	4,2 (2,8-4,4)
<b>GE</b>	Basal	0,82 (0,63-1,03)	4,2 (3,8-4,6)
	Pós-RCE	0,84 (0,54-1,11)	3,9 (3,3-5,6)
<b>GM</b>	Basal	1,04 (0,74-1,15)	3,8 (3,6-4,1)
	Pós-RCE	0,89 (0,68-0,95)	3,7 (2,8-4)
<b>GS</b>	Basal	0,89 (0,76-0,94)	3,7 (3,7-4)
	Após 20 minutos	0,69 (0,69-1,07)	4,5 (3,5-5,1)
<b>P</b>		0,623	0,400

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística, pós-RCE: após o retorno da circulação espontânea

A glicemia inicial estava elevada em todos os ratos já na amostra basal, e apresentando elevação na amostra colhida com 10 minutos após RCE, com exceção do GS (Tabela 8).

**Tabela 8** – Variação da glicemia em cada grupo, considerando o valor basal e a medida após 10 min de retorno da circulação espontânea

<b>Grupo</b>	<b>Glicemia basal (mg/dL)</b>	<b>Glicemia pós-RCE (mg/dL)</b>
<b>GC</b>	266 (156-410)	332 (206-352)
<b>GE</b>	335 (229-413)	432 <sup>1</sup> (344-468)
<b>GM</b>	328 (309-347)	424 <sup>2</sup> (400-466)
<b>GS</b>	348 (317-376)	188 <sup>1,2</sup> (172-226)
<b>P</b>	0,550	0,007

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística, pós-RCE: após o retorno da circulação espontânea

1 e 2 dados que tem diferença estatisticamente significativa entre eles

Outra medida de estresse e má-perfusão dosada foi o lactato, com elevação em todos os grupos. O GM foi o grupo que apresentou a maior concentração de lactato final e maior elevação, apesar de o GE ter o valor absoluto maior (Tabela 9).

**Tabela 9** – Mediana do lactato nos períodos basal e após o retorno da circulação espontânea, separados por grupos

<b>Grupo</b>	<b>Lactato basal (mg/dL)</b>	<b>Lactato pós-RCE (mg/dL)</b>
<b>GC</b>	28,8 (21-45)	77,9 (61-101)
<b>GE</b>	26,6 (17-42)	70,2 (55-297)
<b>GM</b>	18,9 (11-29)	94,6 (31-115)
<b>GS</b>	20,7 (19-23)	21,6 (22-28)
<b>P</b>	0,222	0,063

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística, pós-RCE: após o retorno da circulação espontânea

## 5.4 Pressão diastólica

Em relação a pressão diastólica durante a RCP, encontrou-se mediana de 17,5 para GC, 27 para GE e 32 para GM, com  $p = 0,11$  (Tabela 10).

**Tabela 10** – Mediana da pressão arterial diastólica durante a ressuscitação cardiopulmonar, com mínimo e máximo, separadas por grupo de estudo (mmHg)

Tempo (minutos)	GC	GE	GM
1	14,5 (10-22)	17 (5-33)	19 (10-41)
2	22,5 (18-26)	30 (6-85)	35 (24-29)
3	17,5 (14-21)	30,5 (5-82)	34,5 (20-38)
4	19 (8-22)	13 (13-15)	22,5 (20-25)
5	19,5 (14-23)	19,5 (18-21)	24,5 (19-26)
6	18,5 (18-24)	29,5 (26-33)	20(19-22)
7	17,5 (15-22)	20 (17-23)	20 (19-21)
8	14 (11-18)	54,5 (17-92)	-
9	17 (14-25)	30 (24-33)	-
10	18,5 (14-24)	30 (26-34)	-
11	18 (17-21)	28 (24-32)	-
12	19 (15-20)	30	-
13	16 (13-17)	25	-
14	18 (17-19)	28	-
15	17 <sup>1</sup>	27	-
16	17 <sup>1</sup>	25	-
17	17 <sup>1</sup>	29	-
18	11 <sup>1</sup>	29	-
19	21 <sup>1</sup>	25	-
20	19 <sup>1</sup>	25	-

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto

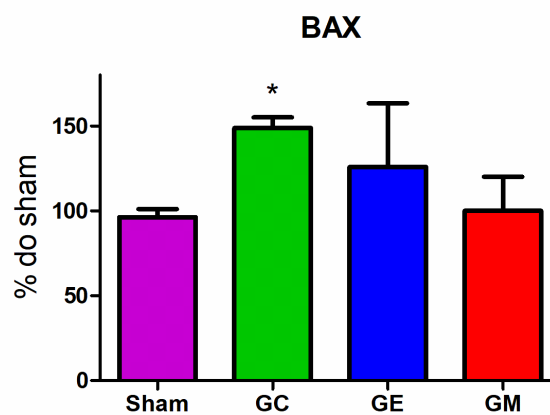
1 Neste item há dados de somente 1 rato, não existindo valor mínimo e máximo



## 5.5 Dosagem de proteínas e de estresse oxidativo

As duas proteínas dosadas tiveram comportamentos semelhantes. A BAX, que gera estímulo próapoptótico, teve o GC estatisticamente diferente do GS. Os grupos com uso de medicamento, apesar de não apresentarem diferença estatisticamente significativa, apresentaram valores reduzidos em relação ao GC, e com GM menor em relação ao GE (Gráfico 7).

**Gráfico 7** – Dosagem da proteína BAX nos grupos de estudo

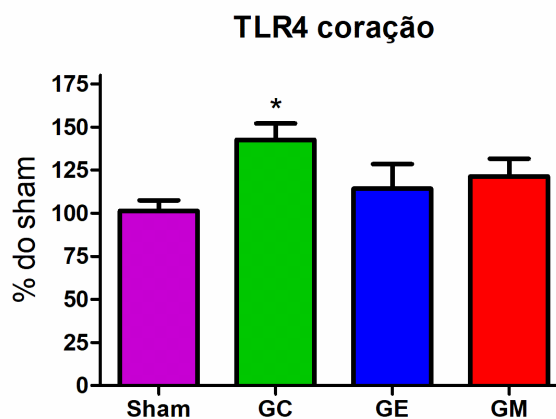


NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto

\* estatisticamente significativa a diferença deste grupo em relação ao sham

A outra proteína TLR4, apesar de apresentar o pior resultado no GC e os grupos com medicamento menores que este, o GM apresentou resultado superior ao GE (Gráfico 8).

**Gráfico 8** – Dosagem da proteína TLR4 nos grupos de estudo

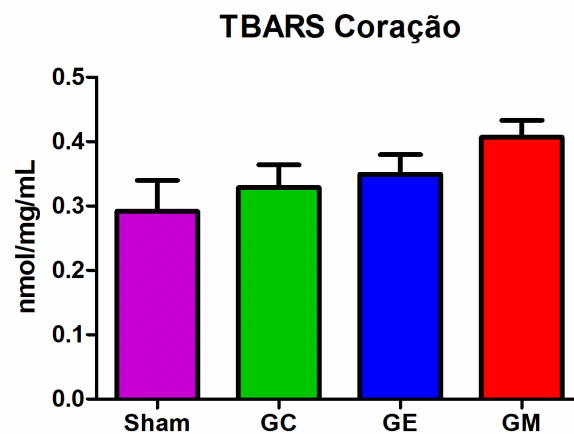


NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto

\* estatisticamente significativa a diferença deste grupo em relação ao sham

Na análise do TBARS no coração, que demonstra a resposta ao estresse oxidativo, não houve diferença significativa entre os grupos, apesar de dosagem maior no GM (gráfico 9).

**Gráfico 9** – Dosagem da enzima TBARS nos grupos de estudo



NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto

## 5.6 Troponina

Foi colhida amostra de sangue para dosagem de troponina dos ratos que apresentaram RCE, sendo coletada após o período de manutenção de 4 horas ou no momento do óbito, caso ocorresse antes das 4 horas. Para o GS foi coletado no término do período de manutenção da anestesia após a cateterização vascular, totalizando também um período de 4 horas. todos os ratos. Na tabela abaixo estão descritos os resultados da troponina em mediana e extremos de cada grupo (Tabela 11).

**Tabela 11** – Mediana da dosagem de troponina nos ratos com retorno da circulação espontânea, com valores mínimo e máximo entre parênteses

<b>Grupo</b>	<b>RCE (ng/ml)</b>
<b>GC</b>	130,08 <sup>1</sup> (10,5 – 397,8)
<b>GE</b>	3,82 (1,3 – 214,6)
<b>GM</b>	43,72 (5,9-200,6)
<b>GS</b>	0,021 <sup>1</sup> (0,0 – 0,315)
<b>P</b>	0,013

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística, RCE: retorno da circulação espontânea

1 dados que tem diferença estatisticamente significativa entre eles

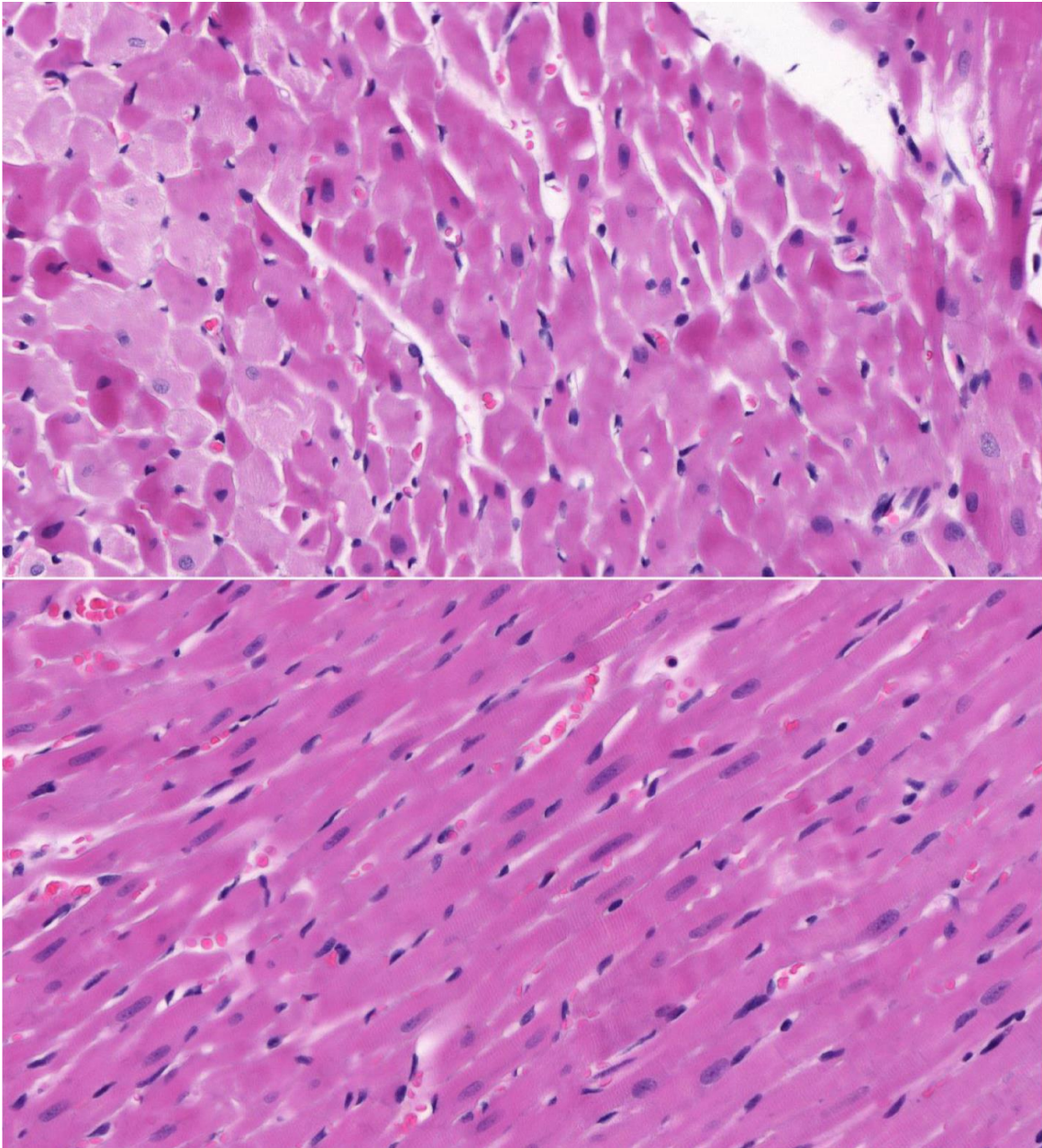
## 5.7 Histologia

Não foi encontrado sinal clássico de infarto em nenhum dos grupos, sinal este demonstrado por necrose de coagulação instalada. No entanto, ao avaliar os sinais primários de lesão hipóxica (figura 4), foi encontrada vacuolização citoplasmática em 40% das amostras do GM, demonstrando ter ocorrido alguma lesão pela hipoperfusão com hipóxia no coração neste grupo (Tabela 12).

**Tabela 12** – Características histológicas de lesão hipóxico-isquêmica avaliadas no coração, separadas por grupo, dos ratos que tiveram retorno da circulação espontânea, referidas em percentual da amostra

	<b>GC</b>	<b>GE</b>	<b>GM</b>	<b>GS</b>
<b>Vacuolização citoplasmática</b>	0	0	40%	0
<b>Dispersão</b>	0	0	0	0
<b>Eosinofilia miocárdica</b>	0	0	0	0
<b>Infarto</b>	0	0	0	0

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística



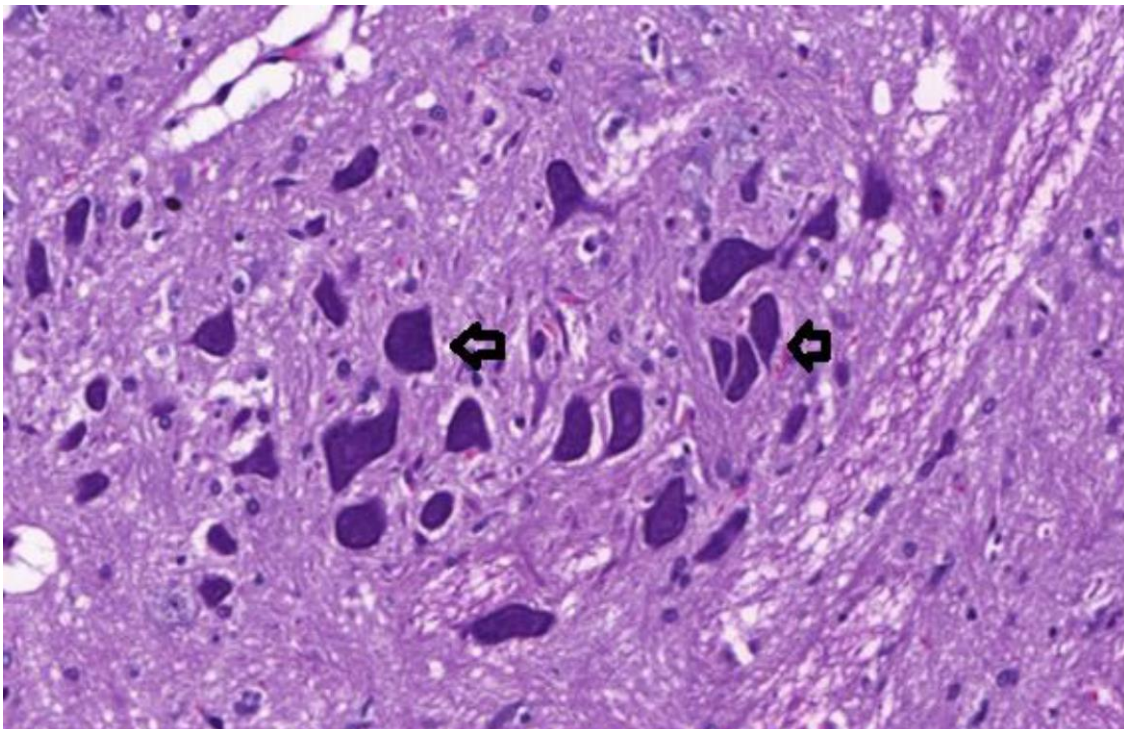
**Figura 4** – Secção histológica de um corte miocárdico (H&E, 400x). A figura superior representa uma área lesionada com eosinofilia citoplasmática proeminente, com perda das estriações celulares características dessa topografia e presença de discretas vacuolizações, evidenciando uma lesão precoce resultante de surto de hipóxia/isquemia. A figura inferior representa uma área normal com fibras cardíacas mantendo suas estriações citoplasmáticas

As lesões no cérebro ocorreram com maior frequência que no coração. A lesão ocorreu em todos os grupos do estudo, com exceção do grupo GS (Tabela 13 e Figura 5).

**Tabela 13** – Características histológicas de lesão hipóxico-isquêmica avaliadas no cérebro, separadas por grupo, dos ratos que tiveram retorno da circulação espontânea, referidas em percentual da amostra

	GC	GE	GM	GS	P
<b>Lesão neuronal tipo neurônio vermelho</b>	75%	33%	80%	0	0,349
<b>Gliose</b>	25%	33%	20%	0	1

NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística



**Figura 5** – Secção histológica de um corte cerebral (H&E, 400x). Secção histológica de cérebro demonstrando área de neurônios lesionados por ação de hipóxia/isquemia. Setas indicando neurônios eosinofílicos, com reorganização das organelas citoplasmáticas caracterizada por sua redistribuição mais periférica em relação ao núcleo

## 5.8 Marcação de Tunel

Foram analisadas lâminas de todos os ratos que apresentaram RCE, apresentando os dados em mediana por grupo. Na avaliação do cérebro, o GC e GE (12,25 e 12,95, respectivamente) foram os grupos em que houve maior ocorrência de apoptose, em oposição ao grupo GS, que apresentou 7,85 (Tabela 14, Figura 6 e Gráfico 10).

E na avaliação do coração, a incidência de lesões foi maior que no cérebro, com os maiores índices ocorrendo também nos grupos GC e GE (18,7 e 19,1, respectivamente) (Tabela 15 e Figura 7).

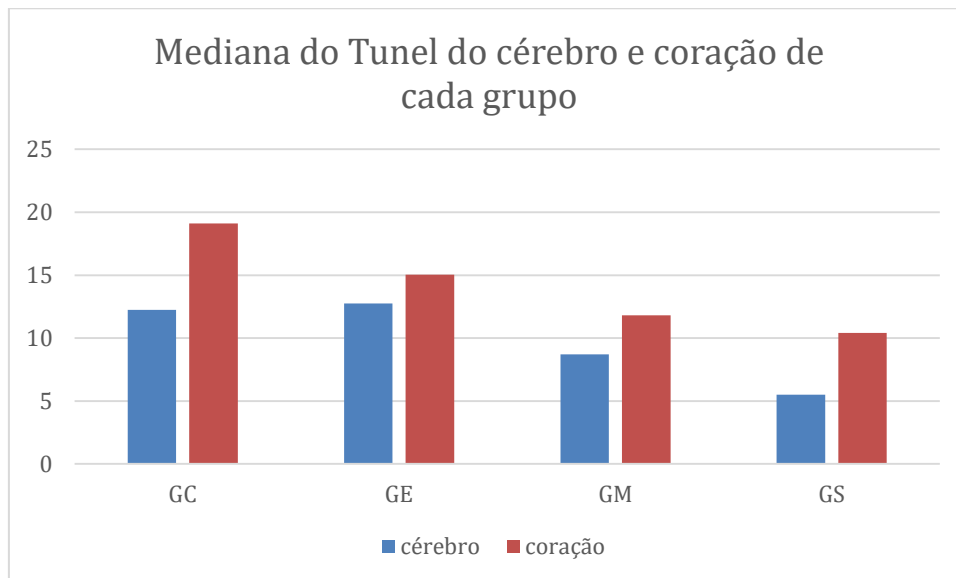
**Tabela 14** – Mediana da marcação de Tunel em cada grupo, com mínimo e máximo de lesões em cada grupo.

Grupo	Tunel cérebro	Tunel coração
<b>GC</b>	12,25 (6,6-22,2)	19,1 (12,1-24,6)
<b>GE</b>	12,75 (6,6-19,2)	15,05 (12,9-24,7)
<b>GM</b>	8,7 (3,9-17,2)	11,8 (6,9 – 19,6)
<b>GS</b>	5,5 (1,7-11,9)	10,4 (9,4-13,2)
<b>P</b>	0,308	0,071

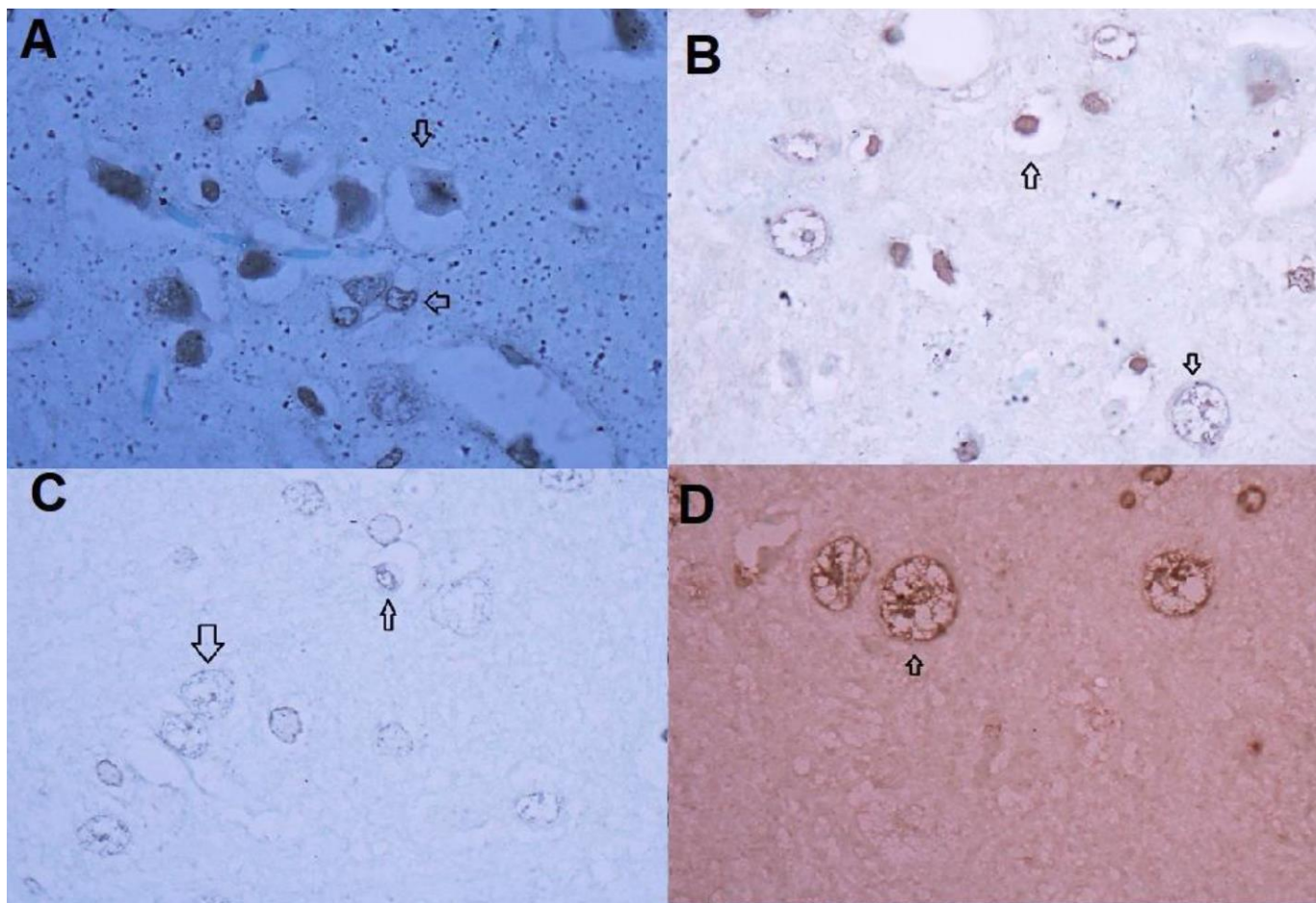
NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham, p: nível de significância estatística

No entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo a marcação de Tunel do cérebro com  $p=0,399$  e marcação de Tunel do coração com  $p=0,053$ .

**Gráfico 10** – Mediana de lesões em cada grupo, para análise da marcação de Tunel no cérebro e no coração

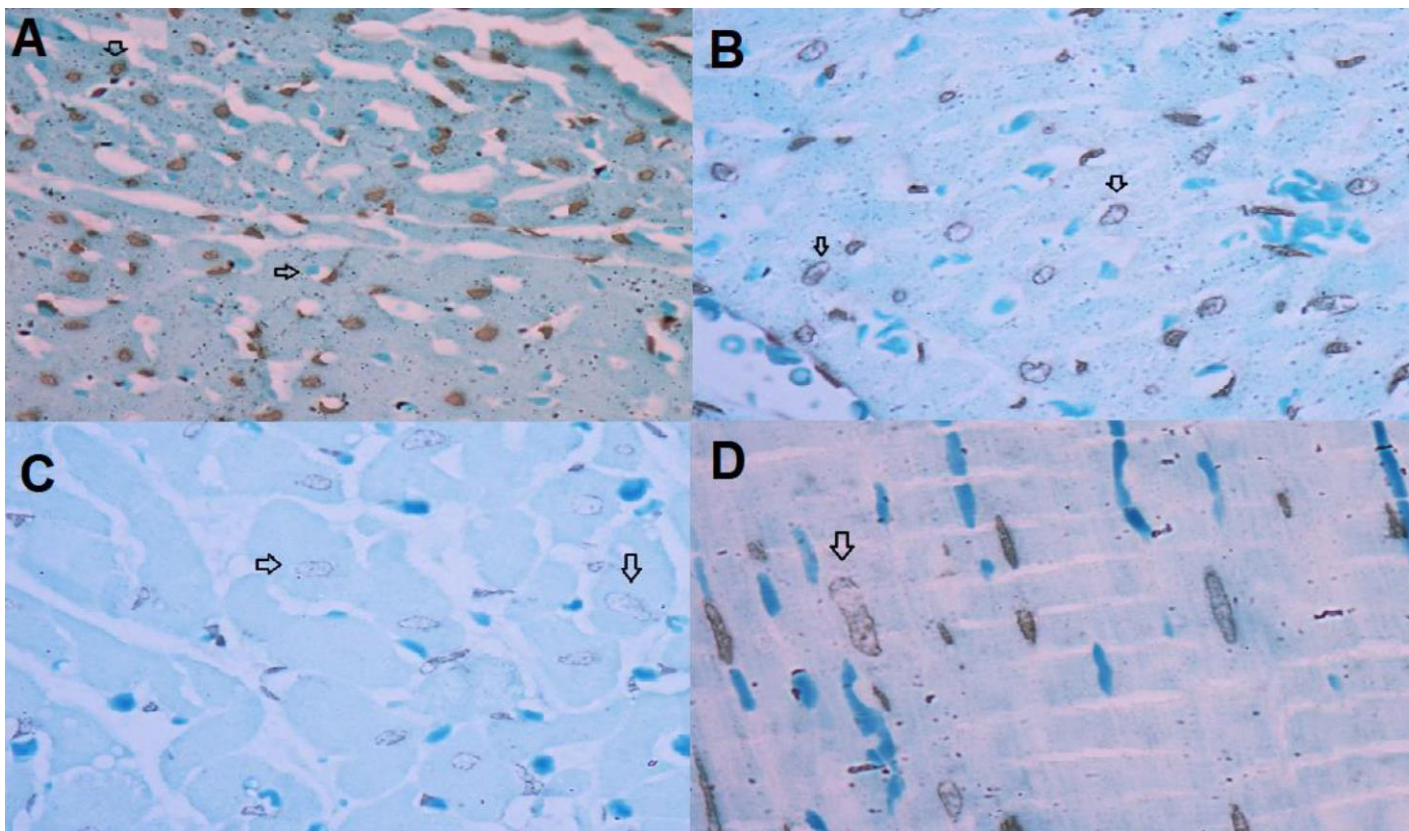


NOTA: GC: grupo controle, GE: grupo epinefrina, GM: grupo misto, GS: grupo sham



**Figura 6** – Campo de lâminas de cérebro, mostrando a marcação de Tunel, em aumento 1000X, com lesões por apoptose demonstradas pelas setas. A: grupo controle, B : grupo epinefrina, C: grupo misto, D: grupo sham





**Figura 7** – Campo de lâminas de coração, apresentando a marcação de Tunel, com perda das estriações e núcleos com cromatina periférica (1000x), demonstradas pelas setas. A: grupo controle, B: grupo epinefrina, C: grupo misto, D: grupo sham

## 6 DISCUSSÃO

O modelo experimental realizado apresentou mortalidade superior ao esperado, o que dificultou a análise dos dados do ponto de vista estatístico.

O grupo do azul de metileno apresentou resultado desfavorável, contrário ao esperado pelo efeito farmacológico do medicamento. O percentual de RCE foi baixo, sendo somente 2 casos em 11, menor inclusive que no grupo controle, em que foi utilizada somente solução salina. E um dos casos saiu já no limite do tempo de RCP, com 20 minutos de ressuscitação. Pode-se considerar desta forma que o azul de metileno, quando administrado em bolus na RCP, tem efeito prejudicial na RCP, piorando o prognóstico.

Considerou-se que, pelo resultado encontrado inicialmente, não há interesse na avaliação dos demais parâmetros deste grupo, tendo sido desconsiderados na apresentação dos resultados. Além da elevada mortalidade no grupo, o fato de só ter dois ratos no grupo, poderia ocasionar viés na análise, além de tornar a análise estatística impossível.

### 6.1 Grupo Sham

Os animais do grupo sham, anestesiados e preparados sem a indução de FV e realização de RCP, foram necessários para se avaliar o efeito da anestesia e das canulações sobre a pressão arterial, troponina sérica e análises histológicas.

O número de casos neste grupo foi reduzido, considerando as perguntas a serem respondidas e a pouca variabilidade esperada.

A realização destes casos auxiliou ao descartar estes fatores. Estes ratos mantiveram hemodinamicamente estáveis durante todo o período, além de metabolicamente estáveis. Na avaliação histológica, não houve lesão no coração nem cérebro.

## 6.2 Retorno da circulação espontânea e pressão arterial

Apesar de alguns estudos da literatura relatarem alta sobrevida em estudos experimentais de PCR em ratos, com resultados de 60-70 %, neste estudo o RCE foi em geral baixo, excetuando-se o grupo da epinefrina, em que houve RCE em 63 % dos casos. Desta forma, apesar de ter um número de 11 ratos para cada grupo, o número de ratos com RCE para análise foi pequeno, o que pode ocasionar vieses na análise final. Há que se considerar para alguns dados as diferenças clínicas e não somente as diferenças estatísticas entre os grupos, com o intuito de avaliar o benefício, maléficio ou ausência de efeito do AM associado a epinefrina.

Foi considerado que houve RCE nos casos em que os ratos apresentaram PAM >25 mmHg, conforme protocolo já citado, e mantiveram este quadro por pelo menos 10 minutos, conforme literatura <sup>(91,92)</sup>. Muitos artigos não relatam o nível de PAM para RCE, somente comentando ter ocorrido <sup>(3,68,88)</sup>. E há estudos que utilizam outros níveis, seja 60 mmHg <sup>(96)</sup>, bem próximo ao nível basal, seja 20 mmHg <sup>(93)</sup>, nível que para outros estudos encaixaria no critério de PCR, por ser abaixo de 25 mmHg. Neste estudo utilizou-se como base os dados de Lamoureux et al. (2015), com PAM > 25 mmHg para definir RCE, compatível com outros estudos já citados. <sup>(90)</sup>. Em alguns casos a PAM inicial nos intervalos da RCP foi superior a este nível, porém com queda rápida, sendo reiniciada a RCP.

Foi levantada a hipótese de uso de drogas vasoativas para auxiliar na estabilidade hemodinâmica e manutenção da PAM, porém além de não ser uma rotina na literatura nesse tipo de estudo, o resultado não foi satisfatório nos pilotos realizados, devido a grande dificuldade de infusão contínua de volumes extremamente diminutos nesses animais. Esta conduta é rotina no ser humano, pois considera-se ideal a manutenção de PAS>90 mmHg, muitas vezes sendo necessário suporte medicamentoso para isto. A manutenção da hipotensão após o RCE perpetua a lesão hipóxico-isquêmica e lentifica a recuperação metabólica. No entanto, a PAM manteve-se baixa somente no GC na primeira medida após RCE, já apresentando elevação posterior e níveis próximos aos basais na medida de 10 minutos.

O resultado encontrado foi compatível com a literatura que aponta que comparativamente ao placebo, o grupo em que se utilizou epinefrina ocorreu

maior RCE, com 63 % em GE e 40 % no GC <sup>(97)</sup>. Já o efeito encontrado no grupo em que foi utilizado o azul de metileno foi contrário ao esperado. Considerando os efeitos do azul de metileno, era esperado um efeito aditivo a epinefrina, no entanto o RCE no GM foi de 45 %, inferior ao uso isolado da epinefrina, com 63 % de RCE <sup>(69)</sup>. Estes dados são contrários aos relatados por Hwang et al. (2015), que mostraram maior percentual de sobrevivência nos grupos em que foi utilizado AM, contudo diferentemente deste estudo, Hwang et al. (2015) utilizaram AM em bolus único associado a infusão contínua <sup>(98)</sup>.

Outro ponto avaliado foi o tempo de RCP até a ocorrência do RCE. Os grupos nos quais utilizou-se a epinefrina tiveram menor tempo de RCP, sendo mediana de 3 minutos no GE e 6 minutos no GM, contra 14,5 minutos no GC. Demonstrando que a associação da epinefrina foi favorável a RCP, com RCE mais rápido da circulação espontânea, conforme demonstra a literatura. A associação de azul de metileno a epinefrina, no entanto ocasionou maior tempo para RCE em relação ao uso isolado da epinefrina, não ocasionando benefício no uso do fármaco.

Um dos pontos que pode ter participado da diferença de tempo para RCE entre os grupos com epinefrina e o GC foi a PAD durante a RCP. Literatura refere que a PAD durante a RCP deve ser igual ou maior que 20 mmHg <sup>(89)</sup>. Neste estudo o GE e GM apresentaram mediana da PAD superior a 20 mmHg, enquanto no grupo GC este valor foi de 17 mmHg, tornando o RCE menos provável neste grupo.

Também em relação a evolução da PAM era esperado que no grupo GM a PAM mantivesse mais alta que nos demais, ou apresentasse recuperação mais precoce dos níveis basais. Efeito este pelo bloqueio do óxido nítrico e, desta forma, da vasodilatação. Há na literatura estudos com porcos em PCR mostrando recuperação precoce dos níveis basais da PAM e também estudos com processo inflamatório, em que o animal demorou mais tempo para apresentar instabilidade hemodinâmica, demonstrando o efeito do AM na pressão arterial. Apesar de haver estudos em que não houve diferença entre os grupos <sup>(99)</sup>. Em geral o uso em bolus apresenta efeitos mais limitados que o uso em infusão contínua, quando avalia-se o efeito na pressão arterial. Neste estudo a PAM apresentou diferença significativa no momento inicial após o RCE, mas

mantendo um equilíbrio entre os grupos após 10 minutos de RCE, com mediana das PAM entre 60 e 80 mmHg, não havendo diferença estatística entre os grupos <sup>(69,82,100)</sup>.

Fato positivo é que em nenhum caso houve pico hipertensivo ou pressão arterial elevada persistentemente, complicação do uso da epinefrina, principalmente em doses elevadas. Este efeito ocasiona danos ao organismo pelo estado hiperadrenérgico, com piora da perfusão cerebral e vasoconstrição periférica <sup>(18,20,100)</sup>.

Apesar de a literatura apresentar estudos com uso de azul de metileno em pacientes após RCE, o uso durante a RCP não é comum. Os estudos avaliados apresentam a administração em infusão contínua após o RCE ou em bolus associado à infusão contínua. Neste estudo foi levantada a hipótese de que o uso do azul de metileno em bolus teria efeito semelhante na redução de dano miocárdico e cerebral após RCE, sendo de uso mais fácil do que a infusão contínua. Considerou-se haver necessidade de reaplicação da dose, otimizando a distribuição sistêmica e melhor efeito, desde que respeitando a dose tóxica. No entanto, o efeito encontrado em relação ao RCE e ao tempo de RCP é desfavorável ao uso deste fármaco na RCP. E mesmo não ocorrendo a infusão contínua após o RCE, apesar de a concentração plasmática começar a reduzir com 40 minutos, a meia-vida do AM é de 6-8 horas.

## **6.3 Exames laboratoriais e de anatomia patológica**

### **6.3.1 Gasometria**

A ocorrência de acidose é comum após RCE, sendo em muitos casos mista, pelo aumento de lactato e pela retenção de CO<sub>2</sub> <sup>(100)</sup>. Considera-se esperado um pH entre 7,0 e 7,1, compatível com o encontrado neste estudo <sup>(101)</sup>. Outro fato relevante é que a acidose não compensa imediatamente após o RCE. Segundo Negovsky et al. (2012), a acidose começa a compensar com 1,5 a 3 horas após o RCE, sendo compatível também com o achado de acidose após 10 minutos de RCE nos ratos (36).

Neste estudo chama a atenção o fato de que no grupo GC a acidose apresentou características de um distúrbio metabólico, enquanto os grupos GE e GM de um distúrbio misto, misturando o desequilíbrio metabólico e respiratório. Considerando que o distúrbio respiratório fosse devido ao tempo de PCR, esperava-se que o GC apresentasse maior descompensação, o que não ocorreu. A PaCO<sub>2</sub> neste grupo manteve-se praticamente igual a inicial. Pode-se cogitar desta forma que o uso dos fármacos, a outra característica que diferencia os grupos, seja o causador desta descompensação respiratória. Sabe-se que tanto a epinefrina quanto o AM ocasionam vasoconstricção pulmonar, piorando as trocas gasosas, além da vasoconstricção periférica. Este efeito poderia ser o responsável pelo aumento do CO<sub>2</sub>, e pela redução maior na PaO<sub>2</sub>, tanto no GE quanto no GM <sup>(18-20)</sup>. Apesar de esperar resultado pior no grupo GM, já que estariam associados os efeitos dos dois fármacos na vasculatura do pulmão, o GM apresentou efeitos reduzidos, ao comparar com o GE. O pH final do GM foi 7,07 enquanto no GE foi de 7,0. A PaCO<sub>2</sub> do GM foi 33 mmHg enquanto no GE foi de 37 mmHg. E na PaO<sub>2</sub> houve diferença de 18 mmHg, melhor no GM. Estes dados demonstram que opostamente ao esperado, o AM apresentou um efeito benéfico em relação a troca gasosa.

Em relação a oferta de oxigênio, houve queda em todos os grupos, ao avaliar a PaO<sub>2</sub>. Os níveis abaixo de 200 mmHg em todos os grupos da intervenção e menor que 150 mmHg nos grupos GE e GM seriam compatíveis com SDRA. Esta queda é compatível com a literatura que aponta não serem incomuns valores menos que 100 mmHg após PCR <sup>(38)</sup>. Porém cabe ressaltar que os níveis plasmáticos podem não representar exatamente a realidade da oferta e demanda de oxigênio no organismo. É de conhecimento que nem todas as células voltam ao metabolismo aeróbio após o RCE. Desta forma aumenta a oferta após o RCE, sem que o consumo pelas células aumente, criando um aumento plasmático relativo. Este fato afeta também a produção de CO<sub>2</sub> e o equilíbrio ácido-base <sup>(36)</sup>.

Também é importante o efeito dos fármacos utilizados na RCP em relação a homeostase dos gases. A epinefrina esta relacionada a aumento do consumo miocárdico de oxigênio além do estado hiperadrenérgico, que ocasiona um aumento sistêmico do consumo de oxigênio. Também o aumento

da resistência vascular pulmonar, já citado, interfere na troca gasosa. Todos estes fatores ocasionam a queda da  $\text{PaO}_2$  <sup>(17,18,84)</sup>. Estes dados são compatíveis com o encontrado neste estudo. Houve queda da  $\text{PaO}_2$  em todos os grupos, mantendo abaixo de 200 mmHg, sem diferença estatística entre o resultado final dos grupos. Apesar de não haver diferença estatística, na análise clínica os grupos GE e GM tiveram mediana de  $\text{PaO}_2$  abaixo de 150 mmHg, enquanto o GC foi de 199. O limite de 150 mmHg é utilizado para definir doença hipoxêmica grave, denotando um quadro pulmonar pior, apesar de valores iguais ou abaixo de 200 mmHg já serem critério para a definição da SDRA.

Segundo Secher et al. (2016), a  $\text{VO}_2$  no rato é 7 vezes superior ao ser humano, em ratos anestesiados com isoflurano. Este fato pode ocasionar uma redução da  $\text{PaO}_2$  nos ratos superior ao que ocorreria no ser humano, não podendo considerar que no ser humano após PCR teria redução igual da pressão arterial de oxigênio <sup>(102)</sup>.

O controle da  $\text{PaCO}_2$  após o RCE é relevante tanto em relação ao equilíbrio ácido-base, assim como em relação a perfusão cerebral. O acúmulo de gás carbônico é um dos fatores causais da acidose após PCR, sendo a sua eliminação importante para o retorno ao pH neutro. Contudo hiperventilação e quedas acentuadas trariam maléfico por ocasionar vasoconstrição cerebral, e queda na concentração de potássio no extracelular. Níveis de  $\text{PaCO}_2$  entre 45 e 50 mmHg são recomendados para manter perfusão cerebral adequada, como já citado. Neste estudo o GC manteve o  $\text{CO}_2$  estável, enquanto nos grupos GE e GM houve aumento, com mediana do grupo GM dentro do limite considerado adequado e o GE com mediana superior (55 mmHg) <sup>(38,54)</sup>.

Cabe discutir que há outros fatores relacionados as alterações de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ , não somente o tempo e qualidade da RCP. O processo inflamatório da isquemia-reperfusão participa do processo, por alterar o funcionamento das células, prolongando o metabolismo anaeróbio. A lesão pulmonar, comum nos pacientes após RCP, piora a troca gasosa. O uso da epinefrina causa aumento da atividade adrenérgica, com maior consumo de oxigênio, além do efeito dos fármacos, já mencionado acima, causando vasoconstrição pulmonar. Todos estes fatores participam, em proporções diferentes em cada paciente, sendo difícil definir a participação de cada um deles <sup>(15)</sup>.

### 6.3.2 Lactato

Lactato está relacionado a glicólise anaeróbia e maior mortalidade. Este metabolismo anaeróbio, como já relatado previamente, não se restringe a fase de PCR e hipofluxo, mas permanece algumas horas após a reperfusão, numa fase de adaptação do organismo. No caso deste estudo, a amostra foi colhida após 10 minutos de RCE, podendo representar adequadamente a fase de PCR e RCP. Espera-se aumento do lactato após RCE, com valores de até 135mg/dl (15 mmol/L) nesta fase após PCR <sup>(34,64,103,104)</sup>. Os valores encontrados estão dentro desta faixa, sendo o GM com mediana de 94,59 mmol/L o maior valor entre os grupos.

Esperava-se valor maior nos grupos GE e GM, pois segundo Ditchex & Lindenfeld (1988) a epinefrina ocasiona maior aumento do valor do lactato, porém este dado não se confirmou. Apesar do GM ter sido maior que o GC, o GE apresentou valor menor <sup>(17)</sup>. Outro ponto de discordância da hipótese levantada pela literatura era que o GM tivesse valores de lactato reduzidos, pois o AM teria a ação de manter metabolismo aeróbio nas células, mesmo em situação de hipóxia. Com menor metabolismo anaeróbio, teoricamente haveria menor elevação do lactato, diferente do encontrado neste estudo <sup>(85)</sup>.

A literatura já tem bem estabelecida a importância do lactato como referência de prognóstico, contudo o valor de cutt off ainda permanece variável, com alguns estudos defendendo 45 mg/dl, enquanto outro consideram valores de até 108 mg/dl. Neste estudo a mortalidade não foi foco de estudo, mas o grupo GM apresentou lesões histológicas em um maior número de ratos, com provável maior morbidade e mortalidade. Também o aumento do lactato está relacionado a acidose após RCE, com maior mortalidade <sup>(64)</sup>.

### 6.3.3 Glicemia

A glicemia é um dos marcadores utilizados como sinal de isquemia e má-perfusão. Houve aumento em todos os grupos submetidos a PCR. Pode-se considerar que o aumento é devido ao processo de estresse metabólico, com glicólise e gliconeogênese, comum em paciente inflamados e sob situações de estresse. A elevação nos grupos GE e GM foi superior ao GC, com média de



100 mg/dL a mais, apesar de não haver diferença estatística. Um dos fatores que pode estar relacionado é a queda da PaO<sub>2</sub>. Existe uma relação inversa da glicemia, com PaO<sub>2</sub>, e nos grupos GE e GM houve maior redução da oferta de oxigênio em relação ao GC. Outro fator é a resposta adrenérgica ao uso da epinefrina, que aumenta a liberação de glicose e reduz a liberação de insulina, contribuindo para esta diferença <sup>(85,105)</sup>.

Hipoglicemia e hiperglicemia estão relacionados a pior prognóstico neurológico nos pacientes após PCR. Os níveis exatos de risco são pouco definidos, variando inclusive entre pacientes com e sem diabetes mellitus. Porém a recomendação da American Heart Association para o nível superior é de glicemia abaixo de 180 mg/dl <sup>(105)</sup>.

Neste estudo, tanto a glicemia quanto o lactato elevaram, ambos marcadores utilizados como referência de má perfusão. A glicemia, além da hipoperfusão, tem como fator causal o uso da epinefrina, como já explicado anteriormente. O maior valor de ambos os dados foi no grupo GM, apesar de ser o grupo que apresentou a maior PAM inicial após o RCE e ter obtido RCE com 6 minutos, menos do que o GC. Estes dados levam a considerar que o AM piora a perfusão periférica e a homeostase.

A interferência do estresse ocasionada nestes animais é perceptível ao avaliar a variação no GS. Neste grupo, em que não ocorreu o estresse da pcr, percebe-se o valor elevado inicialmente, como consequência tanto da alimentação no período noturno quanto pelo estresse da indução inalatória e dissecação vascular. Porém, na análise após 10 minutos da cateterização vascular, o valor reduziu, demonstrando que não há manutenção do estresse neste grupo. Resultado este diferente dos demais grupos, nos quais a glicemia foi superior com 10 minutos após RCE, demonstrando a contribuição do estresse ocasionado pela PCR e RCP. Não é possível porém demonstrar efeito diferencial pelo uso dos fármacos, pois a elevação nos diversos grupos foi semelhante.

#### **6.3.4 Eletrólitos**

Após reperfusão ocorre influxo de cálcio para as células, reduzindo a concentração plasmática, o que ocorreu neste estudo, com exceção do grupo GE que manteve-se estável <sup>(39)</sup>.

Em relação ao potássio, espera-se aumento após RCP, pois diversos fatores comuns à esta fase ocasionam liberação de potássio, como isquemia, acidose, uso de catecolaminas e o trauma muscular. Neste estudo, a variação entre os níveis basais e a segunda amostra foram pequenos, permanecendo dentro da faixa de normalidade. Dois fatores poderiam explicar a pouca variação nos grupos em que utilizou-se epinefrina, sendo o menor tempo de RCP neste grupo eo efeito  $\beta$ -2 da epinefrina. O menor tempo de RCP ocasiona menor trauma muscular e lise celular, o que ocasionaria em menor elevação do potássio. E o efeito  $\beta$ -2 da epinefrina pode ocasionar uma falsa estabilidade ou redução do potássio, pois este efeito ocasiona transporte de potássio para o intracelular, reduzindo a concentração plasmática, mas não a corporal <sup>(64)</sup>.

Nenhum dos dois eletrólitos apresentou alteração clinicamente significativa, mantendo sempre dentro da faixa de normalidade.

### 6.3.5 Coração

As troponinas cardíacas estão bem estabelecidas como indicativo de necrose miocárdica após hipóxia e reperfusão em ratos, sendo o aumento proporcional ao score histopatológico e ao tamanho da área de necrose. São marcadores de alta sensibilidade e especificidade <sup>(62,94,106)</sup>. Esperava-se redução da lesão miocárdica no grupo GM pelo bloqueio da vasodilatação e pela redução da formação de ERO ocasionada pelo uso do AM <sup>(9,68,69,72,81)</sup>

Neste estudo, houve elevação da troponina nos grupos de intervenção, demonstrando lesão miocárdica pela PCR e RCP. O GS, em que não houve intervenção, a troponina ficou abaixo de 1 (mediana de 0,021 ng/ml), diferente dos demais em que houve rato com valores de até 397 ng/ml. Em relação ao efeito da massagem cardíaca externa sobre a troponina, foi realizada dosagem em dois ratos submetidos a massagem, sem PCR. Nesses dois casos em que foi realizada a massagem cardíaca, a troponina manteve-se abaixo de 1 ng/ml (dados não tabulados), sendo este dado compatível com Faa et al. (2012), que relata não haver interferência da MCE no resultado da troponina <sup>(106,107)</sup>.

E em relação a carga elétrica da desfibrilação, estudo realizado em cardioversão elétrica sincronizada não apresentou elevação de troponina em

mais de 97% dos casos, demonstrando que a carga elétrica não é um fator de relevância na elevação da troponina após RCP <sup>(108)</sup>.

Os valores da troponina demonstram efeito protetor no grupo em que foi utilizado epinefrina, sendo neste grupo o menor valor. Este dado vai contra a idéia de que a epinefrina teria ação lesiva ao coração <sup>(3,19,21,106,109)</sup>, apesar de não ser um consenso na literatura <sup>(109)</sup>. O grupo controle apresentou valores superiores ao esperado em casos de infarto, como demonstrado em estudo com ratos, que induziu infarto com uso de isoproterenol e com dosagem de 55,97ng/ml em 4 horas de acompanhamento. Talvez o processo de isquemia sistêmica, diferente da isquemia local do isoproterenol, possa contribuir para o pior resultado, por ter efeitos da inflamação e estresse oxidativo sistêmicos <sup>(106)</sup>.

Ao compararmos os dados da troponina com o achado histológico, os dados são discordantes. O único achado histológico referente a lesão hipóxico-isquêmica ocorreu no GM. Esperava-se que houvesse lesão também no GC, grupo em que o valor de troponina foi aproximadamente três vezes o valor do GM e que manteve com baixo débito por tempo superior aos demais grupos. Porém muitos fatores devem ser considerados nesta avaliação. Apesar de o grupo GM ter tido menor tempo de RCP, apresentou PaO<sub>2</sub> menor que o GC, além de lactato e glicemia mais elevados. Estes dados demonstram que mesmo tendo tempo menor de RCP, a descompensação metabólica no GM foi pior, ocasionando maior processo inflamatório e maior ação dos ERO, confirmando a ação desfavorável do uso do AM em bolus na RCP.

É possível correlacionar também o achado na histopatologia com os marcadores de estresse oxidativo e proteínas dosados com western blot. O TBARS, marcador de estresse oxidativo, apresentou resultado pior no grupo GM em relação aos demais. Mesmo considerando que o GC teve mediana de tempo de RCP de quase o dobro do GM, a produção de ERO foi maior no grupo misto. Em relação ao processo inflamatório, o TLR4 demonstrou maior correlação com o tempo de RCP. O GE foi o que teve menor dosagem, entre os grupos de intervenção, compatível com o menor tempo de RCP, sendo no oposto o GC, com maior tempo de RCP e dosagem maior de TLR4. Apesar de estes dados não serem compatíveis com o encontrado na análise histológica, sendo esperado que no grupo GC houvesse maior incidência de lesões, o que

não ocorreu. Estes dados demonstram que o azul de metileno não teve efeito protetor no bloqueio da resposta inflamatória e oxidativa, como esperado pela literatura <sup>(110-112)</sup>.

Outro fato que pode ter impactado no resultado foi o tempo curto de PCR e de observação pós PCR nesses ratos. Estudo em porcos demonstrou que com tempo curto de hipóxia haveria somente edema e hipereosinofilia, enquanto tempo superior a 15 minutos ocasionaria lesões mais características como necrose de coagulação, hemorragia, apoptose, infiltração de neutrófilos e presença de vacúolos. Não há dados referentes ao tempo exato para as alterações em ratos. Neste estudo o tempo de hipóxia variou de 8 minutos (nos que apresentaram RCE com 3 minutos) a 23 minutos (nos que apresentaram RCE com 20 minutos). Neste estudo as alterações apareceram de forma precoce. Os dois ratos em que havia a presença de vacuolização tiveram tempo de RCP de 3 e 6 minutos, sendo desta forma 8 e 11 minutos de hipóxia/baixo fluxo. Talvez as alterações no rato sejam mais precoces em relação ao ser humano e ao porco <sup>(107)</sup>.

Com relação a apoptose, foram encontradas lesões diversas no coração, porém com resultados semelhantes entre os grupos com intervenção. Considera-se que apesar de a apoptose ocorrer principalmente após a reperfusão, o tempo prolongado de RCP propicia a formação de mais ERO e apoptose por consequência. Era esperado que nos grupos GE e GM o grau de lesão da marcação de tunnel fosse menor em relação ao GC, já que o tempo de RCP nestes grupos foi reduzido. O grupo GM teve número menor do que o GE e GC, apesar de não ser estatisticamente diferente. Este dado corroboraria com a hipótese do estudo de que o AM reduziria as lesões miocárdicas, podendo haver maior diferença com o ajuste da forma de administração <sup>(56,85,113-116)</sup>.

Outra forma utilizada para avaliar a apoptose foi a dosagem de BAX, uma proteína da família de células B de linfoma 2 (Bcl-2), com ação proapoptótica. Os estudos que demonstraram redução da produção de BAX mostraram também menor lesão miocárdica por apoptose <sup>(117-119)</sup>. Neste estudo a dosagem foi compatível com o encontrado na marcação de Tunnel, pois o grupo GM apresentou menor dosagem de BAX e menor número de lesões no

miocárdio pela marcação de Tunel. Este dado confirma a idéia de redução de apoptose ocasionada pelo AM<sup>(34)</sup>.

Outro fato relevante é que a literatura aponta o uso da epinefrina como fator de maior lesão miocárdica, com aumento de troponinas e maior lesão miocárdica. No entanto, neste estudo, os grupos em que foi utilizada a epinefrina tiveram menores dosagens de troponina e na lesão histológica não houve diferença entre o GE e GC<sup>(3,30)</sup>. Desta forma, os dados deste estudo não favorecem a descontinuação do uso da epinefrina na RCP.

### 6.3.6 Cérebro

O azul de metileno tem sido relacionado à redução das lesões cerebrais, seja com administração iniciada durante a RCP ou logo após<sup>(34,39,69,79,85)</sup>. Porém a literatura não tem dados sobre o uso isolado em bolus do azul de metileno, durante a RCP. Esperava-se que o resultado fosse o mesmo da infusão contínua, com efeito protetor em relação aos demais grupos.

Ao avaliar a apoptose através da marcação de tunel, o número de lesões por cada caso foi semelhante nos grupos em que foi utilizado o azul e nos demais, apesar de tendendo a menor número no GM(12,95 no GE contra 9,6 no GM, e mínimas de 6,6 no GE e 3,9 no GM). Este dado, assim como no miocárdio, aponta para um efeito protetor contra a apoptose, podendo talvez ser otimizado com alterações na administração do fármaco. Apesar da diferença de lesões, não houve diferença estatisticamente significativa.

Já em relação as lesões avaliadas pela histologia, focando em lesões hipóxico-isquêmicas, o grupo em que foi utilizado AM apresentou resultado pior em relação ao GE. Esperava-se que com a administração do AM o tempo de RCP reduzisse, o nível da pressão arterial se recuperasse precocemente, e desta forma, as lesões ocasionadas pela hipoperfusão seriam reduzidas. Contudo o resultado encontrado foi oposto a hipótese levantada. A mediana do tempo de RCP no GM foi o dobro do GE, e a proporção de casos em que houve RCE foi menor (0,63 no GE contra 0,45 no GM), apesar de não haver diferença estatisticamente significativa. Ao avaliar a PAM, houve diferença significativa no momento do RCE, no entanto esta diferença não se manteve

nos demais momentos da avaliação. Desta forma, este discreto efeito do AM sobre a pressão arterial não foi suficiente para ocasionar diferenças relevantes entre os grupos e nem reduzir as lesões.

Outro ponto relevante na lesão neuronal é a ventilação pulmonar com  $FiO_2$  de 100 %. Alguns estudos relatam maior morte de neurônios quando era utilizada  $FiO_2$  de 100 %. Estudos relatam aumento de até 5 vezes na  $PaO_2$  cerebral nos primeiros 30-60 minutos de ventilação após RCE, utilizando oxigênio a 100 %, o que está relacionado a maior formação de ERO. Porém a maior ocorrência de lesão não é consenso na literatura, com alguns estudos em rato não demonstrando esta diferença <sup>(44,120)</sup>. Também vale destacar que diferentemente de outros órgãos, no cérebro a lesão por apoptose e necrose acontece ao mesmo tempo, o que pode ampliar o número de lesões <sup>(121)</sup>.

Com relação ao grupo GE, a epinefrina tem sido correlacionada com pior desfecho neurológico após alta, sendo um dos pontos que torna o seu uso questionável na RCP. Apesar de melhorar o percentual de pacientes com RCE, muitos evoluem mal do ponto de vista cerebral, com óbito ou sequelas. Apesar de o grau de lesões hipóxicas estruturais não poder ser correlacionado diretamente a função, vale considerar que ambos estejam correlacionados. Neste caso, os dados deste estudo estariam contrários a esta idéia do efeito deletério da epinefrina. Neste estudo o GE foi o grupo com menor número de casos com lesão estrutural.

#### **6.4 Seleção do modelo experimental e padronização do método**

Estudos experimentais têm sido utilizados para avaliação de aspectos relacionados a PCR, devido a dificuldade de padronização dos grupos de PCR e da questão ética envolvida na execução de estudos prospectivos em seres humanos. Os estudos experimentais de PCR iniciaram com uso de animais de maior porte, como porcos e cães. Posteriormente foram desenvolvidos modelos para uso de ratos e camundongos, possibilitando o uso de animais menores e menor custo <sup>(89)</sup>.

A tabela abaixo (Tabela 15) apresenta os dados hemodinâmicos de seres humanos e ratos, possibilitando avaliar a proximidade entre os dois grupos na PCR. Em relação as variáveis hemodinâmicas, o modelo com ratos diverge somente em relação a frequência cardíaca, o que exige uma frequência de massagem cardíaca superior nos ratos em relação ao ser humano <sup>(89)</sup>.

**Tabela 15 –** Parâmetros hemodinâmicos no ser humano e no rato

	<b>Humanos</b>	<b>Ratos</b>
<b>Frequência Cardíaca (bpm)</b>	60-70	260-450
<b>Pressão aórtica média (mmHg)</b>	70-90	80-100
<b>Pressão no átrio direito (mmHg)</b>	2-7	2-8
<b>EtCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	25-35	23-35
<b>PPC para sucesso na RCP (mmHg)</b>	15-20	20

FONTE: Papadimitriou et al. (2007) <sup>(89)</sup>

NOTA: EtCO<sub>2</sub> – tensão expirada de gás carbônico no final da expiração; PPC – pressão de perfusão coronariana; RCP – ressuscitação cardiopulmonar

Após a análise destes dados, decidiu-se pela utilização dos ratos como espécie para o modelo experimental deste estudo. Foi realizada a revisão da literatura e alguns casos piloto, para adequação do modelo.

Há variações entre os estudos em relação ao modo de estimular a PCR, tempos de hipóxia e RCP. Outro dado percebido foi que a variação do método para induzir PCR interfere na resposta do animal aos diferentes medicamentos. Foi considerado, com base nestes dados, que a padronização do grupo de estudo teria importância na validade interna do estudo <sup>(11,34,88-90,93,122)</sup>.

O primeiro ponto de definição foi a forma para indução de PCR. Há duas formas principais na literatura, sendo por hipóxia e por estímulo elétrico. Sendo que a primeira ocasiona divergências na análise final por diversos aspectos, sendo alguns deles:

- o tempo de hipóxia até ocorrência de PCR é variável entre cada rato. Esta variação ocasiona dificuldade na interpretação dos exames laboratoriais;

- a hipóxia também é um fator de lesão em órgão alvo, sendo somado ao tempo de PCR o tempo até que esta ocorresse. E com tempos de hipóxia diferentes, poderia haver grupos heterogêneos e aumentando o número de vieses na comparação;
- a hipóxia como fator de indução de PCR tem como ritmos finais mais comuns a bradicardia com AESP e assistolia, apesar de que pode ocorrer PCR em qualquer ritmo. Para o objetivo deste estudo e devido ao número restrito de casos, a variação de ritmos de PCR tornaria mais difícil a análise dos dados.

A estimulação elétrica, por permitir um tempo de estímulo da PCR padronizado em todos os grupos foi o escolhido, além de ser o mais comumente utilizado na literatura <sup>(88,97)</sup>.

Para o estímulo elétrico, duas vias são descritas, sendo a indução por via esofágica e por estímulo direto no ventrículo direito (VD). Foi realizada a estimulação por via esofágica em dois ratos, porém em ambos houve queimadura no esôfago e estimulação da FV incerta. Optou-se por utilizar o estímulo direto no VD, através do cateter inserido na veia jugular externa direita, utilizando a curva de pressão para localização.

E foi necessário também avaliar a carga elétrica necessária. Após teste com a carga de 3mA descrita na literatura, todos os ratos foram a óbito. Após novas tentativas, definiu-se como adequada a carga de 1mA, sendo mantido este estímulo por 3 minutos. A literatura cita que tempos menores que 1,5 minuto evoluem como reversão espontânea ao ritmo sinusal.

A etapa seguinte foi a MCE, pois a massagem manual ocasiona variação na força de compressão, fadiga do profissional e risco aumentado de lesão pulmonar. Foi então desenvolvido o massagador automático, permitindo a estabilidade na força de compressão e a manutenção adequada do ritmo de massagem.

Iniciada a RCP, seguiu-se a literatura com a recomendação de MCE por 6 minutos, sendo após este período realizados ciclos de 1 minuto. Esta sequência deve-se a informação de que a resposta do rato a desfibrilação é pequena neste intervalo inicial de 6 minutos. Contudo, durante a realização dos



pilotos, alguns ratos apresentaram PAS > 50 mmHg durante a massagem e ao checar o ritmo, apresentavam ritmo cardíaco regular, podendo ser definido o RCE. Optou-se então por desmembrar o tempo inicial em dois ciclos de 3 minutos, possibilitando que o RCE antes dos 6 minutos fosse diagnosticado.<sup>(87)</sup> Esta redução do tempo de RCP até a primeira desfibrilação é compatível com o achado de Ettl et al. (2017), que demonstrou que a primeira desfibrilação realizada com 2 minutos em relação a 6 minutos apresentou maior incidência de RCE<sup>(97)</sup>.

## 6.5 Limitações e pontos negativos do estudo

O número de ratos em cada grupo, apesar de ter sido determinado pelo cálculo amostral, ocasionou em amostra pequena, devido a grande mortalidade do modelo. Há discussão na literatura em relação a relevância da significância estatística em estudos em que existe diferença clínica, como ocorreu em alguns dados deste estudo.

## 6.6 Considerações finais

Considerando os achados do estudo e a literatura, cabe discutir a forma de administração do AM e a dose utilizada. A literatura tem utilizado a administração em infusão contínua ou bolus associado a infusão contínua. Porém esta forma é mais trabalhosa pela necessidade do preparo da solução, da dependência de bomba de infusão. A idéia levantada neste estudo foi que a opção de uso somente em bolus na RCP facilitaria o uso e mantendo os mesmos resultados. E optou-se por utilizar a dose de 2 mg/kg em cada bolus, por ser a dose padrão utilizada em alguns estudos na literatura. Porém restringindo a 3 doses, evitando que atingesse a dose tóxica do medicamento.

Há que se discutir se o acúmulo de 3 doses de bôlus do AM em um intervalo curto de tempo não seria prejudicial, já que este não é o uso comum na literatura, sendo o fator de piora dos demais parâmetros. A análise com

outros estudos torna-se difícil pois a maioria dos estudos avaliaram o benefício do AM no cérebro em modelos de isquemia e reperfusão diferentes da PCR, e não foi encontrado estudo em que foram realizadas todas as amostras realizadas neste. Outro fato de interesse é que apesar de o protocolo do estudo permitir até 3 doses, os ratos que apresentaram sobrevida receberam 1 ou 2 doses somente (uma dose - dois casos / duas doses - três casos), não sendo assim tão diferente do encontrado em outros estudos <sup>(11,69,88-90)</sup>.

O efeito descrito na literatura de redução de apoptose foi observado tanto na avaliação da marcação de Tunel quando na dosagem da proteína BAX, proteína com efeito proapoptótico. Estes dois demonstraram menor tendência ou ocorrência de apoptose no grupo GM em relação ao GE, demonstrando efeito protetor do AM em relação a este tipo de lesão, apesar de não ser estatisticamente significativo. Apesar deste benefício em relação a apoptose, o efeito benéfico não ocorre nos demais parâmetros avaliados.

## 7 CONCLUSÕES

O azul de metileno em bolus não reduziu a lesão miocárdica em PCR, ao se avaliar a dosagem de troponina após 4 horas de RCE.

A lesão miocárdica e cerebral não reduziu com o uso de azul de metileno em bolus, pela avaliação histológica com hematoxilina&eosina. Mas ocasionou redução discreta na morte celular por apoptose.

Os parâmetros da gasometria arterial, pressão arterial, tempo para RCE, bicarbonato de sódio, lactato e marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo foram piores no grupo em que foi utilizado azul de metileno.

Concluindo-se que o azul de metileno trouxe resultados desfavoráveis para a maioria dos parâmetros avaliados no estudo, tanto no uso isolado na PCR quanto associado a epinefrina, tendo efeito benéfico somente na redução da apoptose.

## 8 ANEXOS

### 8.1 Anexo 1 - Aprovação da CEUA



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Amalido, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito de fármacos coadjuvantes no desfecho da parada cardíaca”, protocolo nº 021/16 sob a responsabilidade de Denise Aya Otsuki e Marcelo Souza Xavier, apresentado pelo Departamento de Cirurgia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 11.05.2016.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril/2016
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	40
Peso/Idade	300 e 400gr
Sexo	macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 11 de Maio de 2016

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

## 8.2 Anexo 2 – Resultados dos exames do grupo azul

### Dados do Grupo azul (GA)

	Basal	Pós-RCE
Tempo RCP (min)	-	17,25
Troponina (ng/ml)		205,15
pH	7,38	6,95
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	227	268
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	35,6	46,8
Lactato (mg/dl)	24,8	112,1
Glicose (mg/dl)	302	356
Potássio (mmol/L)	3,95	4,1
Cálcio (mmol/L)	0,71	0,89
Base excesso (mmol/L)	(3,55)	(19,45)
Saturação O <sub>2</sub> (%)	97,6	96,7
Bicarbonato (mmol/L)	20,6	10,25
Tunnel cérebro	-	7,25
Tunnel coração	-	13,4

---

### 8.3 Anexo 3 – Resultados da análise histológica do grupo azul

---

Histologia Cérebro	
Neurônio vermelho	0
Gliose	50%
<b>Histologia coração</b>	
Vacuolização	0
IAM	0
<b>Histologia rim</b>	
LRA	100
Grumos eosinofilicos	50%
Pigmentos	0
Destaceamento celular	0
NTA	0

---

## 9 REFERÊNCIAS

1. Gonzalez MM, Timerman S, de Oliveira RG, Polastri TF, Dallan LA, Araujo S, et al. I guideline for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care -- Brazilian Society of Cardiology: executive summary. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(2):105-13.
2. Checchia PA, Sehra R, Moynihan J, Daher N, Tang W, Weil MH. Myocardial injury in children following resuscitation after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2002;57:131-7.
3. Tang W, Weil MH, Sun S, Noc M, Yang L, Gazmuri RJ. Epinephrine increases the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation.* 1995;92(10):3089-93.
4. Perondi MB, Reis AG, Paiva EF, Nadkarni VM, Berg RA. A comparison of high-dose and standard-dose epinephrine in children with cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2004;350(17):1722-30.
5. Rivers EP, Wortsman J, Rady MY, Blake HC, McGeorge FT, Buderer NM. 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):1499-507.
6. Chen QM, Tu VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2002;2(1):43-57.
7. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(2):367-74.
8. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J.* 1993;14 Suppl I:22-6.
9. Salaris SC, Babbs CF, Voorhees WD, 3rd. Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. A potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(3):499-506.
10. Kelner MJ, Bagnell R, Hale B, Alexander NM. Potential of methylene blue to block oxygen radical generation in reperfusion injury. *Basic Life Sci.* 1988;49:895-8.

11. Miclescu A, Basu S, Wiklund L. Methylene blue added to a hypertonic-hyperoncotic solution increases short-term survival in experimental cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2006;34(11):2806-13.
12. Jang DH, Nelson LS, Hoffman RS. Methylene blue in the treatment of refractory shock from an amlodipine overdose. *Ann Emerg Med*. 2011;58(6):565-7.
13. Evora PR. Methylene blue for the treatment of refractory anaphylaxis without hypotension. *Am J Emerg Med*. 2013;31(4):753.
14. Wang CH, Huang CH, Chang WT, Tsai MS, Yu PH, Wu YW, et al. The influences of adrenaline dosing frequency and dosage on outcomes of adult in-hospital cardiac arrest: A retrospective cohort study. *Resuscitation*. 2016;103:125-30.
15. Patel JK, Schoenfeld E, Parikh PB, Parnia S. Association of Arterial Oxygen Tension During In-Hospital Cardiac Arrest With Return of Spontaneous Circulation and Survival. *J Intensive Care Med*. 2016.
16. Palacio MA, Paiva EF, Azevedo LC, Timerman A. Experimental cardiac arrest treatment with adrenaline, vasopressin, or placebo. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(6):536-44.
17. Ditchey RV, Lindenfeld J. Failure of epinephrine to improve the balance between myocardial oxygen supply and demand during closed-chest resuscitation in dogs. *Circulation*. 1988;78(2):382-9.
18. Lundin A, Djarv T, Engdahl J, Hollenberg J, Nordberg P, Ravn-Fischer A, et al. Drug therapy in cardiac arrest: a review of the literature. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2016;2(1):54-75.
19. Berg RA, Otto CW, Kern KB, Sanders AB, Hilwig RW, Hansen KK, et al. High-dose epinephrine results in greater early mortality after resuscitation from prolonged cardiac arrest in pigs: a prospective, randomized study. *Crit Care Med*. 1994;22(2):282-90.
20. 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.
21. Holmberg M, Holmberg S, Herlitz J. Low chance of survival among patients requiring adrenaline (epinephrine) or intubation after out-of-hospital cardiac arrest in Sweden. *Resuscitation*. 2002;54(1):37-45.



22. Lin S, Callaway CW, Shah PS, Wagner JD, Beyene J, Ziegler CP, et al. Adrenaline for out-of-hospital cardiac arrest resuscitation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Resuscitation*. 2014;85(6):732-40.
23. Callaway CW, Soar J, Aibiki M, Bottiger BW, Brooks SC, Deakin CD, et al. Part 4: Advanced Life Support: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*. 2015;132(16 Suppl 1):S84-145.
24. Herlitz J, Ekstrom L, Wennerblom B, Axelsson A, Bang A, Holmberg S. Adrenaline in out-of-hospital ventricular fibrillation. Does it make any difference? *Resuscitation*. 1995;29(3):195-201.
25. Machida M, Miura S, Matsuo K, Ishikura H, Saku K. Effect of intravenous adrenaline before arrival at the hospital in out-of-hospital cardiac arrest. *J Cardiol*. 2012;60(6):503-7.
26. Hayakawa M, Gando S, Mizuno H, Asai Y, Shichinohe Y, Takahashi I, et al. Effects of epinephrine administration in out-of-hospital cardiac arrest based on a propensity analysis. *J Intensive Care*. 2013;1(1):12.
27. Nakahara S, Tomio J, Nishida M, Morimura N, Ichikawa M, Sakamoto T. Association between timing of epinephrine administration and intact neurologic survival following out-of-hospital cardiac arrest in Japan: a population-based prospective observational study. *Acad Emerg Med*. 2012;19(7):782-92.
28. Goto Y, Maeda T, Goto Y. Effects of prehospital epinephrine during out-of-hospital cardiac arrest with initial non-shockable rhythm: an observational cohort study. *Crit Care*. 2013;17(5):R188.
29. Hagihara A, Hasegawa M, Abe T, Nagata T, Wakata Y, Miyazaki S. Prehospital epinephrine use and survival among patients with out-of-hospital cardiac arrest. *JAMA*. 2012;307(11):1161-8.
30. Dumas F, Bougouin W, Geri G, Lamhaut L, Bougle A, Daviaud F, et al. Is epinephrine during cardiac arrest associated with worse outcomes in resuscitated patients? *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(22):2360-7.
31. Cairns CB, Niemann JT. Hemodynamic effects of repeated doses of epinephrine after prolonged cardiac arrest and CPR: preliminary observations in an animal model. *Resuscitation*. 1998;36(3):181-5.

32. Bar-Joseph G, Weinberger T, Ben-Haim S. Response to repeated equal doses of epinephrine during cardiopulmonary resuscitation in dogs. *Ann Emerg Med.* 2000;35(1):3-10.
33. Krieter H, Denz C, Janke C, Bertsch T, Luiz T, Ellinger K, et al. Hypertonic-hyperoncotic solutions reduce the release of cardiac troponin I and s-100 after successful cardiopulmonary resuscitation in pigs. *Anesth Analg.* 2002;95(4):1031-6, table of contents.
34. Miculescu A, Basu S, Wiklund L. Cardio-cerebral and metabolic effects of methylene blue in hypertonic sodium lactate during experimental cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation.* 2007;75(1):88-97.
35. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; 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; the Council on Stroke. *Resuscitation.* 2008;79(3):350-79.
36. Negovsky VA. Reprint of: The second step in resuscitation-the treatment of the post-resuscitation disease. *Resuscitation.* 2012;83(10):1187-90.
37. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger 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.
38. Jentzer JC, Clements CM, Murphy JG, Scott Wright R. Recent developments in the management of patients resuscitated from cardiac arrest. *J Crit Care.* 2017;39:97-107.
39. Evora PR, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. [Ischemia-reperfusion lesion. Physiopathologic aspects and the importance of the endothelial function]. *Arq Bras Cardiol.* 1996;66(4):239-45.

40. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev*. 2015;4(2):20-7.
41. Medeiros TM, Benfato MS. Estudo de Parametros de Estresse Oxidativo na Síndrome Pos-Parada Cardiorrespiratoria. Tese de mestrado apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências. 2013:76.
42. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-4.
43. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.
44. Neumar RW. Optimal oxygenation during and after cardiopulmonary resuscitation. *Curr Opin Crit Care*. 2011;17(3):236-40.
45. Lurie KG, Nemergut EC, Yannopoulos D, Sweeney M. The Physiology of Cardiopulmonary Resuscitation. *Anesth Analg*. 2016;122(3):767-83.
46. Bougouin W, Cariou A. Cardiac Issues in Cardiac Arrest. *Semin Neurol*. 2017;37(1):13-8.
47. Wu B, Peng YG, Zhao S, Bao N, Pan L, Dong J, et al. Supplement of levosimendan to epinephrine improves initial resuscitation outcomes from asphyxial cardiac arrest. *BMC Anesthesiol*. 2017;17(1):18.
48. Kim YJ, Lee YJ, Ryoo SM, Sohn CH, Ahn S, Seo DW, et al. Role of blood gas analysis during cardiopulmonary resuscitation in out-of-hospital cardiac arrest patients. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(25):e3960.
49. McKenzie N, Williams TA, Tohira H, Ho KM, Finn J. A systematic review and meta-analysis of the association between arterial carbon dioxide tension and outcomes after cardiac arrest. *Resuscitation*. 2017;111:116-26.
50. Ornato JP, Peberdy MA, Tadler SC, Strobos NC. Factors associated with the occurrence of cardiac arrest during hospitalization for acute myocardial infarction in the second national registry of myocardial infarction in the US. *Resuscitation*. 2001;48(2):117-23.
51. Navarro-Vargas JR, Díaz JL. Post cardiac arrest syndrome. *Rev Colomb Anestesiol*. 2014;42(2):107-13.
52. Pohl J, Rammos C, Totzeck M, Stock P, Kelm M, Rassaf T, et al. MIF reflects tissue damage rather than inflammation in post-cardiac arrest syndrome in a real life cohort. *Resuscitation*. 2016;100:32-7.

53. Schaafsma A, de Jong BM, Bams JL, Haaxma-Reiche H, Pruim J, Zijlstra JG. Cerebral perfusion and metabolism in resuscitated patients with severe post-hypoxic encephalopathy. *J Neurol Sci.* 2003;210-23.
54. Topjian AA, Berg RA, Taccone FS. Haemodynamic and ventilator management in patients following cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care.* 2015;21(3):195-201.
55. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res.* 2000;86(11):1107-13.
56. Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ Res.* 2000;87(2):118-25.
57. Yasmin W, Strynadka KD, Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res.* 1997;33(2):422-32.
58. Filho RF, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil.* 2000;46(3):265-71.
59. Dalal S, Foster CR, Das BC, Singh M, Singh K. Beta-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2012;364(1-2):59-70.
60. Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Purushothaman S, Curcio A, Gasparri C, et al. Acute beta-adrenergic overload produces myocyte damage through calcium leakage from the ryanodine receptor 2 but spares cardiac stem cells. *J Biol Chem.* 2007;282(15):11397-409.
61. Gilje P, Koul S, Thomsen JH, Devaux Y, Friberg H, Kuiper M, et al. High-sensitivity troponin-T as a prognostic marker after out-of-hospital cardiac arrest - A targeted temperature management (TTM) trial substudy. *Resuscitation.* 2016;107:156-61.
62. O'Brien PJ, et al. Review of Qualification Data for Cardiac Troponins. Center for Drug Evaluation and Research US Food and Drug Administration. 2011.
63. Dunn ME, Coluccio D, Hirkaler G, Mikaelian I, Nicklaus R, Lipshultz SE, et al. The complete pharmacokinetic profile of serum cardiac troponin I in the rat and the dog. *Toxicol Sci.* 2011;123(2):368-73.

64. Rittenberger JC, Doshi AA, Reynolds JC, Post Cardiac Arrest S. Postcardiac Arrest Management. *Emerg Med Clin North Am.* 2015;33(3):691-712.
65. Friden V, Starnberg K, Muslimovic A, Ricksten SE, Bjurman C, Forsgard N, et al. Clearance of cardiac troponin T with and without kidney function. *Clin Biochem.* 2017.
66. Wiklund L, Basu S, Miculescu A, Wiklund P, Ronquist G, Sharma HS. Neuro- and cardioprotective effects of blockade of nitric oxide action by administration of methylene blue. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1122:231-44.
67. Wiklund L, Sharma A, Sharma HS. Neuroprotection by Methylene Blue in Cerebral Global Ischemic Injury Induced Blood-Brain Barrier Disruption and Brain Pathology: A Review. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2016;15(9):1181-7.
68. Miculescu A, Sharma HS, Martijn C, Wiklund L. Methylene blue protects the cortical blood-brain barrier against ischemia/reperfusion-induced disruptions. *Crit Care Med.* 2010;38(11):2199-206.
69. Miculescu A, Wiklund L. Methylene Blue, an old drug with new indications? *J Rom Anest Terap Int.* 2010;17(nr 1):35-41.
70. Semenas E, Nozari A, Thiblin I, Rubertsson S, Wiklund L. Modulation of nitric oxide expression with methylene blue does not improve outcome after hypovolemic cardiac arrest. *Resuscitation.* 2011;82(10):1344-9.
71. Eastwood GM, Schneider AG, Suzuki S, Peck L, Young H, Tanaka A, et al. Targeted therapeutic mild hypercapnia after cardiac arrest: A phase II multi-centre randomised controlled trial (the CCC trial). *Resuscitation.* 2016;104:83-90.
72. dos Santos MRGA, Silva LGC, Evora PRB, Piccinato CE, Joviliano EE. Use of methylene blue in the reversal of vasoplegia refractory to the use of catecholamines after aortobifemoral bypass. *J Vasc Bras.* 2010;9( 1):74-7.
73. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):402-13.
74. Iwamoto J, Yoshinaga M, Yang SP, Krasney E, Krasney J. Methylene blue inhibits hypoxic cerebral vasodilation in awake sheep. *J Appl Physiol (1985).* 1992;73(6):2226-32.
75. Sharma HS, Miculescu A, Wiklund L. Cardiac arrest-induced regional blood-brain barrier breakdown, edema formation and brain pathology: a light and electron microscopic study on a new model for neurodegeneration and neuroprotection in porcine brain. *J Neural Transm (Vienna).* 2011;118(1):87-114.

76. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30(5):1323-38.
77. Arteel GE, Briviba K, Sies H. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett*. 1999;445(2-3):226-30.
78. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
79. Batista-Filho MM, Kandratavicius L, Nunes EA, Tumas V, Colli BO, Hallak JE, et al. Role of Methylene Blue in Trauma Neuroprotection and Neuropsychiatric Diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2016;15(8):976-86.
80. Rosique MJ, Rosique RG, Faria FM, Oliveira CC, Farina JA, Jr., Evora PRB. Methylene blue reduces progression of burn and increases skin survival in an experimental rat model. *Burns*. 2017.
81. Evora PR, Alves Junior L, Ferreira CA, Menardi AC, Bassetto S, Rodrigues AJ, et al. Twenty years of vasoplegic syndrome treatment in heart surgery. Methylene blue revised. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015;30(1):84-92.
82. Meirelles RF, Jr., Ceneviva R, Viaro F, Baldo CF, Evora PR. Methylene blue improves hemodynamic shock but increases lipoperoxidation in severe acute pancreatitis pig model. *Acta Cir Bras*. 2008;23 Suppl 1:8-16; discussion
83. Albuquerque AA, Margarido EA, Menardi AC, Scorzoni AF, Celotto AC, Rodrigues AJ, et al. Methylene Blue to Treat Protamine-induced Anaphylaxis Reactions. An Experimental Study in Pigs. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2016;31(3):226-31.
84. Donati A, Conti G, Loggi S, Munch C, Coltrinari R, Pelaia P, et al. Does methylene blue administration to septic shock patients affect vascular permeability and blood volume? *Crit Care Med*. 2002;30(10):2271-7.
85. Jiang Z, Duong TQ. Methylene blue treatment in experimental ischemic stroke: a mini review. *Brain Circ*. 2016;2(1):48-53.
86. Weiner MM, Lin HM, Danforth D, Rao S, Hosseinian L, Fischer GW. Methylene blue is associated with poor outcomes in vasoplegic shock. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013;27(6):1233-8.

87. Hackenhaar FS, Fumagalli F, Li Volti G, Sorrenti V, Russo I, Staszewsky L, et al. Relationship between post-cardiac arrest myocardial oxidative stress and myocardial dysfunction in the rat. *J Biomed Sci.* 2014;21:70.
88. 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.* 113:115-23.
89. Papadimitriou D, Xanthos T, Dontas I, Lelovas P, Perrea D. The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research. *Lab Anim.* 2008;42(3):265-76.
90. Lamoureux L, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. A Rat Model of Ventricular Fibrillation and Resuscitation by Conventional Closed-chest Technique. *J Vis Exp.* 2015(98).
91. Vane MF, Carmona MJC, Otsuki DA, Maia DRR, Vane LF, Vane LA, et al. [Cardiac arrest animal model: a simple device for small animals' chest compression]. *Rev Bras Anesthesiol.* 2017;67(4):440-1.
92. Lin JY, Liao XX, Li H, Wei HY, Liu R, Hu CL, et al. Model of cardiac arrest in rats by transcutaneous electrical epicardium stimulation. *Resuscitation.* 2010;81(9):1197-204.
93. Chen MH, Xie L, Liu TW, Song FQ, He T. Naloxone and epinephrine are equally effective for cardiopulmonary resuscitation in a rat asphyxia model. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006;50(9):1125-30.
94. Bertsch T, Denz C, Janke C, Weiss M, Fassbender K, Luiz T, et al. Hypertonic-hyperoncotic solutions decrease cardiac troponin I concentrations in peripheral blood in a porcine ischemia-reperfusion model. *Exp Toxicol Pathol.* 2001;53(2-3):153-6.
95. Bertsch T, Janke C, Denz C, Weiss M, Luiz T, Ellinger K, et al. Cardiac troponin I and cardiac troponin T increases in pigs during ischemia-reperfusion damage. *Exp Toxicol Pathol.* 2000;52(2):157-9.
96. Dave KR, Della-Morte D, Saul I, Prado R, Perez-Pinzon MA. Ventricular fibrillation-induced cardiac arrest in the rat as a model of global cerebral ischemia. *Transl Stroke Res.* 2013;4(5):571-8.
97. Ettl F, Magnet IAM, Weihs W, Warenits A, Grassmann D, Wagner M, et al. Establishing a Rodent Model of Ventricular Fibrillation Cardiac Arrest with Graded Histologic and Neurologic Damage with Different Cardiac Arrest Durations. *Shock.* 2017.

98. Hwang JE, Kim K, Jo YH, Lee J, Kim J, Chung H, et al. Methylene blue has a beneficial effect to prolonged cardiac arrest in rat model. *Journal of Critical Care*. 2015;30:826.
99. Baldo CF, Capellini VK, Celotto AC, Sônego F, Tirapelli LF, Batalhão M, et al. Inibição da guanilato ciclase pelo azul de metileno no choque circulatório causado por pancreatite aguda necrosante: uma palavra de cuidado embasada em modelo suíno. *Rev Col Bras Cir*. 2013;40(6):480-9.
100. Miclescu A, Sharma HS, Martijn C, Wiklund L. Methylene blue administration during cardio-pulmonary resuscitation and early reperfusion protects against cortical blood-brain barrier disruption. 2009.
101. Spindelboeck W, Gemes G, Strasser C, Toescher K, Kores B, Metnitz P, et al. Arterial blood gases during and their dynamic changes after cardiopulmonary resuscitation: A prospective clinical study. *Resuscitation*. 2016;106:24-9.
102. Secher N, Malte CL, Tonnesen E, Ostergaard L, Granfeldt A. Comparing anesthesia with isoflurane and fentanyl/fluanisone/midazolam in a rat model of cardiac arrest. *J Appl Physiol (1985)*. 2016;jap 00998 2015.
103. Momiyama Y, Yamada W, Miyata K, Miura K, Fukuda T, Fuse J, et al. Prognostic values of blood pH and lactate levels in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest. *Acute Med Surg*. 2017;4(1):25-30.
104. Kurowski A, Czyzewski L, Smereka J, Szarpak L. Blood lactate concentration after cardiac arrest resulting from myocardial infarction and outcome. *Am J Emerg Med*. 2016;34(7):1311-3.
105. Wang CH, Huang CH, Chang WT, Tsai MS, Yu PH, Wu YW, et al. Associations between blood glucose level and outcomes of adult in-hospital cardiac arrest: a retrospective cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):118.
106. Hasic S, Jadric R, Kiseljakovic E, Mornjakovic Z, Winterhalter-Jadric M. Troponin T and histological characteristics of rat myocardial infarction induced by isoproterenol. *Bosn J Basic Med Sci*. 2007;7(3):212-7.
107. Faa A, Iacovidou N, Xanthos T, Locci A, Pampaloni P, Aroni F, et al. Hypoxia/reoxygenation-induced myocardial lesions in newborn piglets are related to interindividual variability and not to oxygen concentration. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(5):503-8.



108. Santos ES, Pereira MP, Minuzzo L, Moreira DA, Ramos R, Avezum A, et al. [Electrical cardioversion and myocardial injury: evaluation by new cardiac injury markers]. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(3):191-7.
109. Morales-Cane I, Valverde-Leon MD, Rodriguez-Borrego MA. Epinephrine in cardiac arrest: systematic review and meta-analysis. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2016;24:e2821.
110. Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, Takayama H, Spring DJ, Rothnie CL, et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;128(2):170-9.
111. Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:704202.
112. Asci S, Demirci S, Asci H, Doguc DK, Onaran I. Neuroprotective Effects of Pregabalin on Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Balkan Med J.* 2016;33(2):221-7.
113. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996;79(5):949-56.
114. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994;94(4):1621-8.
115. Wiklund L, Zoerner F, Semenas E, Miclescu A, Basu S, Sharma HS. Improved neuroprotective effect of methylene blue with hypothermia after porcine cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2013;57(8):1073-82.
116. Greca FH, Goncalves NM, Souza Filho ZA, Noronha L, Silva RF, Rubin MR. The protective effect of methylene blue in lungs, small bowel and kidney after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2008;23(2):149-56.
117. Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM, Zhou ZN. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res.* 2003;13(5):385-91.
118. Xie Z, Koyama T, Suzuki J, Fujii Y, Togashi H, Sawa H, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis. *Jpn Heart J.* 2001;42(6):759-70.
119. Yan P, Chen SQ, Li ZP, Zhang J, Xue JK, Wang WT, et al. Effect of exogenous phosphocreatine on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax after cardiopulmonary resuscitation in rats. *World J Emerg Med.* 2011;2(4):291-5.

120. Lipinski CA, Hicks SD, Callaway CW. Normoxic ventilation during resuscitation and outcome from asphyxial cardiac arrest in rats. *Resuscitation*. 1999;42(3):221-9.
121. Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Huttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):9-23.
122. Coutinho M. [Principles of clinical epidemiology applied to cardiology]. *Arq Bras Cardiol*. 1998;71(2):109-16.